

# Influència dels factors ambientals sobre la fisiologia i l'anatomia de “*Gardenia jasminoides*” en la propagació “*in vitro*” i l'aclimatització posterior

M. Dolors Serret Molins

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA

U

B

DIVISIÓ DE CIÈNCIES EXPERIMENTALS I MATEMÀTIQUES  
FACULTAT DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA VEGETAL

**INFLUÈNCIA DELS FACTORS AMBIENTALS SOBRE  
LA FISIOLOGIA I L'ANATOMIA DE *GARDENIA*  
*JASMINOIDES* EN LA PROPAGACIÓ *IN VITRO* I  
L'ACLIMATITZACIÓ POSTERIOR**

Memòria presentada per M. Dolors Serret Molins, inscrita en el programa de doctorat "La fisiologia de les plantes i l'ambient (bienni 1990-1992) del Departament de Biologia Vegetal de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, per optar al grau de Doctor en Biologia per la Universitat de Barcelona.

Directors de Tesi

Dra. M. Isabel Trillas Gay

Dr. Francesc X. Martínez

Autora

M. Dolors Serret Molins

**2. EFECTES DE LES CONDICIONS DE CULTIU EN  
L'ANATOMIA, LA ULTRAESTRUCTURA I LA  
FOTOSÍNTESI EN GARDÈNIES CULTIVADES IN  
VITRO**



## 2. EFECTES DE LES CONDICIONS DE CULTIU EN L'ANATOMIA, LA ULTRAESTRUCTURA I LA FOTOSÍNTESI EN GARDÈNIES CULTIVADES *IN VITRO*

Aquest apartat complementa l'anterior. S'hi descriu l'efecte de les condicions de cultiu sobre els aspectes anatòmics i ultraestructurals associats amb el desenvolupament de l'autotròfia durant la micropropagació i l'aclimatització posterior a condicions *ex vitro*. Els resultats avaluats aquí formen part de l'experiment I.

### 2.1. INTRODUCCIÓ

L'aclimatització és l'estadi de la micropropagació on més pèrdues de plantes hi ha durant tot el procés dels cultius *in vitro*. En aquesta fase les plantes estan exposades a canvis molt sobtats en les condicions ambientals per raó del traspàs des d'un tub o pot *in vitro* a les condicions *ex vitro* d'un hivernacle. En aquest cas, l'efecte d'una llum elevada i d'una humitat relativa baixa dins l'hivernacle fa que les plantes pateixin un grau d'estrès molt gran en el moment que comencen a ser fotoautotròfiques (Lee *et al.*, 1985; Kozai *et al.*, 1992 b). Per facilitar un creixement *in vitro* ràpid, normalment s'incorpora sacarosa en el medi de cultiu. Aquest elevat nivell de carbohidrats juntament amb el nivell baix de radiació en què s'acostuma a fer el cultiu *in vitro*, a més d'afavorir les contaminacions (Debergh i Maene, 1984) fan que el procés de desenvolupament de la fotoautotròfia sigui molt lent i que l'aclimatització posterior sigui menys eficient (Kozai *et al.*, 1992 b; Serret *et al.*, 1996, 1997). Molts autors han definit com a causa important de les pèrdues durant l'aclimatització el fet que l'aparell fotosintètic estigui poc desenvolupat (Lee *et al.*, 1985; Kozai *et al.*, 1992b).

Una de les línies actuals de recerca sobre cultius *in vitro* se centra a obtenir sistemes cada vegada més fotoautotròfics que es basen en un procés de micropropagació amb poca sacarosa o sense, llum més alta, suplement de CO<sub>2</sub> i un intercanvi d'aire més gran entre el pot de cultiu i el seu microambient (Kozai i Iwanami, 1988; Kozai, 1991 b).

Com a conclusió d'aquests treballs es pot dir que a través d'una modificació del microambient on es troba la planta *in vitro* es poden afavorir les seves característiques fotosintètiques (Kozai, 1991 b; Capellades *et al.*, 1991; Lumsden *et al.*, 1994; Aitken-Christie *et al.*, 1995) i això es traduirà en una aclimatització millor. Ara bé, hi ha molta menys informació sobre els canvis anatòmics i ultraestructurals de les plantes *in vitro* associats amb el desenvolupament de l'autotròfia durant la micropropagació i l'efecte de les condicions de cultiu sobre aquestes plantes (Grout i Aston, 1978 b; Wetzstein i Sommer, 1982; Lee *et al.*, 1985; Dimassi-Theriou i Bosabalidis, 1997). A més a més, la majoria d'aquests estudis es basen en els canvis anatòmics associats amb el control de pèrdua d'aigua, factor molt important durant l'aclimatització (Lee *et al.*, 1985; Capellades *et al.* 1990 b). Però els canvis intrínsecs en el desenvolupament dels teixits fotosintètics poden tenir també un paper important en l'aclimatització de les plantes i en la supervivència posterior. Caldria esperar que un augment del nivell de sacarosa en el medi tingués un efecte negatiu que disminuís la capacitat fotosintètica de les plantetes *in vitro* per raó d'una baixa regeneració de la carboxilació de la ribulosa 1,5-bifosfat (Langford i Wainwright, 1988; Capellades *et al.*, 1991) i a una falta de fosfat inorgànic (Neuman i Bender, 1987). Ara bé, mentre que aquest fet s'accepta com a resposta a curt termini en plantes cultivades *ex vitro* (Azcón-Bieto, 1983), en les plantes cultivades *in vitro* sembla que també hi hauria d'haver canvis anatòmics i ultraestructurals associats amb el desenvolupament dels teixits fotosintètics. Bockers *et al.* (1997), treballant en cultius cel·lulars, assenyalen que l'estimulació de la capacitat fotosintètica provocada per un augment de la concentració de CO<sub>2</sub> s'associa amb un augment del nombre de cloroplasts per cèl·lula mentre que no canvia l'eficiència fotosintètica dels cloroplasts. Si l'efecte de les condicions de cultiu *in vitro* sobre la capacitat fotosintètica de les fulletes és degut als canvis en la densitat de cloroplasts o a la seva eficiència fotosintètica, aquest fet pot tenir unes implicacions considerables en el mecanisme posterior d'aclimatització (Bockers *et al.*, 1997).

L'objectiu d'aquest apartat és estudiar els efectes de la concentració de sucre i de la quantitat de llum sobre l'anatomia i la ultraestructura de les fulletes de gardènia durant la fase de multiplicació *in vitro*. També es relacionen aquestes observacions estructurals

amb les característiques fisiològiques (capacitat fotosintètica i respiració a les fosques) associades amb el desenvolupament de l'autotròfia.

## 2.2. RESULTATS

En tots els tractaments assajats, les fulles mostraven una epidermis clarament desenvolupada, amb estomes, que eren rudimentaris en el cas de l'epidermis abaxial. El parènquima en palissada i el parènquima esponjós també eren fàcils de distingir, i presentaven una forma cel·lular i una disposició dels cloroplasts ben diferenciada entre els dos teixits (vegeu, per exemple, el tractament  $L_{100} - S_5$  a la fig. 2.1B). En canvi, els dos tractaments amb  $L_{100}$ , comparats amb els de  $L_{50}$ , independentment de la quantitat de sacarosa del medi, van presentar el volum relatiu del parènquima en palissada més gran, com també el quocient entre aquest parènquima i el parènquima esponjós (taula 2.1). Per altra banda, el tractament  $L_{50} - S_5$  tenia el volum relatiu més petit de parènquima en palissada. El tractament  $L_{100} - S_{30}$  presentava el volum relatiu més petit d'espais intercel·lulars en el mesòfil, mentre que no hi havia diferències en els altres tres tractaments.

El gruix de les fulles i del mesòfil (parènquima en palissada més el parènquima esponjós) va ser significativament més petit en el tractament  $L_{100} - S_{30}$  que en els altres, on no hi va haver diferències. Pels dos caràcters esmentats, es van trobar interaccions significatives entre la concentració de sacarosa i el PPF. El gruix de l'epidermis (adaxial + abaxial) no va ser diferent en cap dels tractaments, fins i tot en el cas de  $L_{100} - S_{30}$ , on el volum relatiu de les epidermis era màxim, i representava el 37 % del volum total de la fulla (taula 2.1).

La secció de les cèl·lules del parènquima esponjós va ser significativament més alta que les del parènquima en palissada en tots els tractaments, menys en el  $L_{100} - S_5$ , on ambdós tipus de cèl·lules van presentar valors similars (taula 2.2). Exceptuant les cèl·lules del parènquima esponjós a  $L_{100}$ , les cèl·lules dels dos tractaments amb menys quantitat de sacarosa ( $S_5$ ) van presentar cèl·lules més grans. La combinació de llum baixa

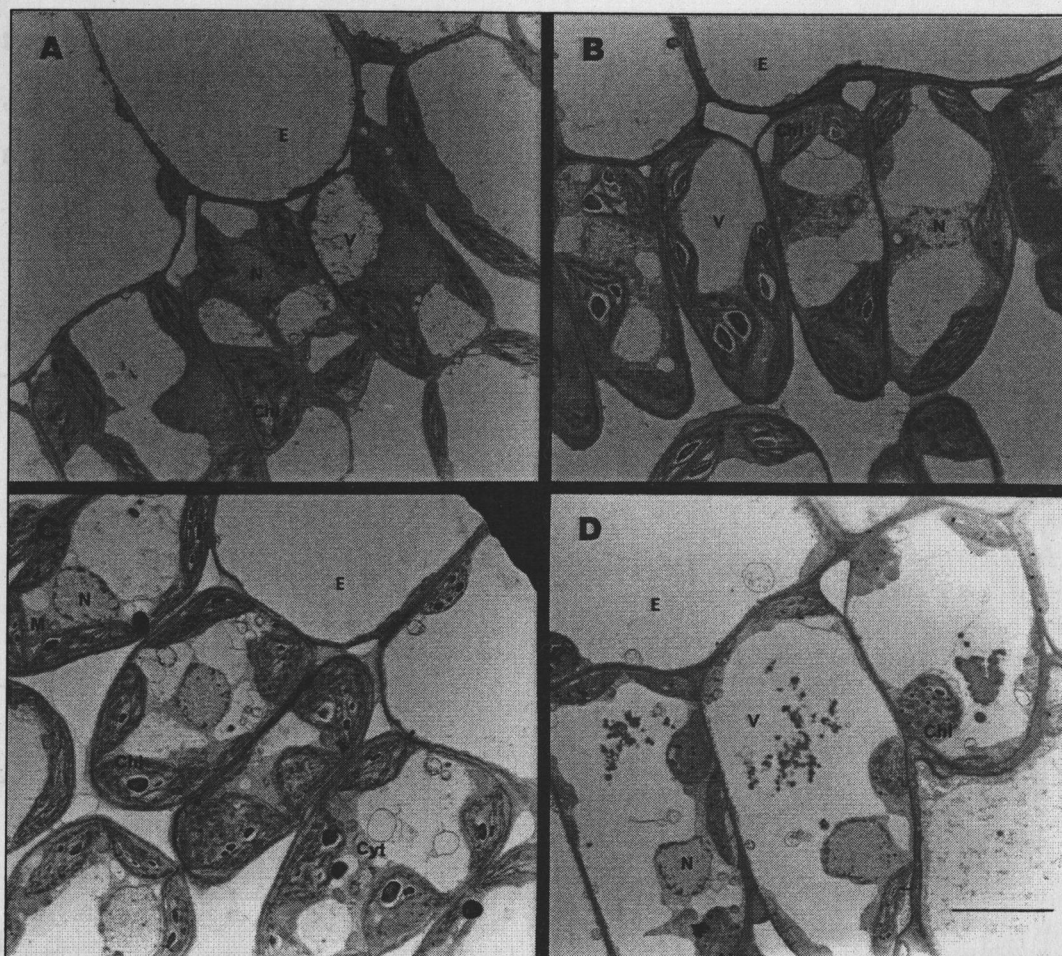
i contingut reduït de sacarosa en el medi ( $L_{50} - S_5$ ) va generar una superfície més gran en les cèl·lules dels dos parènquimes (taula 2.2).

*Taula 2.1. Gruix i volum relatiu dels diferents teixits, àrea de la secció de les cèl·lules del parènquima en palissada i del parènquima esponjós, de les fulles de gardènia durant la fase de multiplicació. Les anàlisis quantitatives es van fer amb fotografies digitalitzades a partir d'observacions del microscopi òptic i electrònic, tal com s'explica en l'apartat de materials i mètodes.*

*Els valors en cada teixit són la mitjana  $\pm$  ES de 2-3 seccions mentre que en l'àrea de la secció de les cèl·lules del mesòfil és la mitjana de 20-37 cèl·lules. Per a cada caràcter mesurat, les mitjanes que no tenen una lletra igual són significativament diferents ( $P \leq 0,05$ ) en una ANOVA separada pel test de comparació de Duncan.*

PPFD ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	100		50	
SUCROSE ( $\text{g l}^{-1}$ )	30	5	30	5
<b>Thickness (<math>\mu\text{m}</math>)</b>				
Epidermis (adaxial + abaxial)	23.68 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	24.15 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup>	24.99 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	24.79 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>
Mesophyll	40.34 $\pm$ 1.77 <sup>a</sup>	51.26 $\pm$ 2.36 <sup>b</sup>	49.60 $\pm$ 1.16 <sup>b</sup>	48.01 $\pm$ 0.94 <sup>b</sup>
Total Leaflet	64.03 $\pm$ 1.90 <sup>a</sup>	75.42 $\pm$ 2.60 <sup>b</sup>	74.60 $\pm$ 1.40 <sup>b</sup>	72.80 $\pm$ 1.10 <sup>b</sup>
<b>Relative volume (% mesophyll)</b>				
Palisade parenchyma (P)	26.38 $\pm$ 0.75 <sup>b</sup>	25.83 $\pm$ 2.95 <sup>b</sup>	22.43 $\pm$ 0.88 <sup>ab</sup>	20.53 $\pm$ 0.78 <sup>a</sup>
Spongy parenchyma (S)	63.25 $\pm$ 1.25 <sup>b</sup>	56.40 $\pm$ 3.30 <sup>a</sup>	61.89 $\pm$ 1.07 <sup>b</sup>	63.06 $\pm$ 1.69 <sup>b</sup>
Air spaces	10.36 $\pm$ 1.43 <sup>a</sup>	17.69 $\pm$ 1.97 <sup>b</sup>	15.67 $\pm$ 1.13 <sup>b</sup>	16.40 $\pm$ 1.37 <sup>b</sup>
P/S	0.42 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	0.48 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	0.36 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.33 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
<b>Relative volume (% leaflet)</b>				
Epidermis	37.17 $\pm$ 0.85 <sup>b</sup>	32.16 $\pm$ 0.82 <sup>a</sup>	33.57 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	34.07 $\pm$ 0.60 <sup>a</sup>
Palisade parenchyma	16.60 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>	17.47 $\pm$ 2.05 <sup>b</sup>	14.88 $\pm$ 0.54 <sup>ab</sup>	13.52 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>
Spongy parenchyma	39.69 $\pm$ 0.63 <sup>a</sup>	38.34 $\pm$ 2.55 <sup>a</sup>	41.15 $\pm$ 0.87 <sup>a</sup>	41.63 $\pm$ 1.40 <sup>a</sup>
Air spaces	6.55 $\pm$ 0.95 <sup>a</sup>	11.92 $\pm$ 1.24 <sup>b</sup>	10.40 $\pm$ 0.74 <sup>b</sup>	10.78 $\pm$ 0.86 <sup>b</sup>
<b>Cross-sectional area (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>				
Palisade cell	56.94 $\pm$ 4.38 <sup>a</sup>	84.63 $\pm$ 5.64 <sup>b</sup>	74.40 $\pm$ 4.25 <sup>ab</sup>	108.87 $\pm$ 7.84 <sup>c</sup>
Spongy cell	84.15 $\pm$ 6.71 <sup>a</sup>	84.85 $\pm$ 6.39 <sup>a</sup>	90.71 $\pm$ 6.20 <sup>ab</sup>	160.87 $\pm$ 16.26 <sup>c</sup>





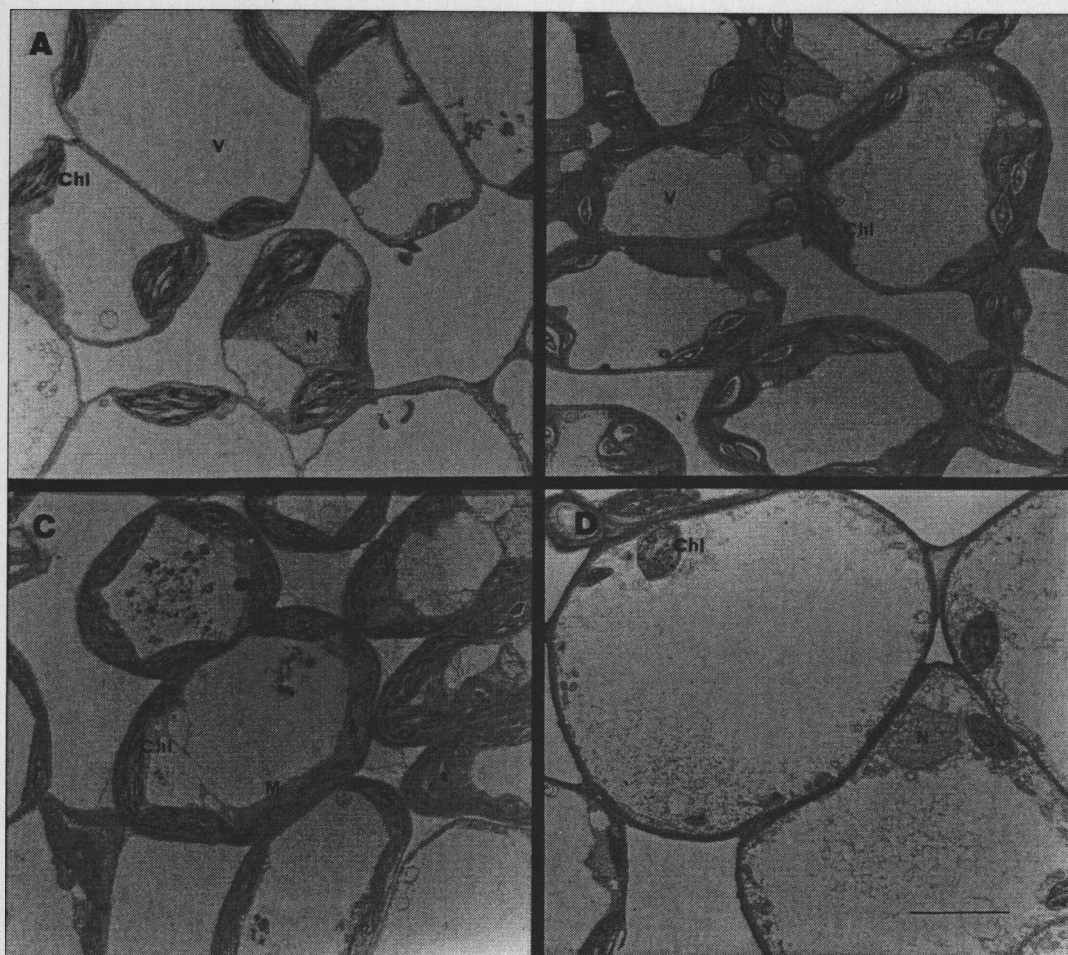
**Fig. 2.1.** Fotografies del microscopi electrònic de transmissió de cèl·lules del parènquima en palissada de fulles de gardènia desenvolupades durant la fase de multiplicació a diferents nivells de llum i de concentració de sacarosa en el medi de cultiu. (A)  $L_{100}-S_{30}$ ; (B)  $L_{100}-S_5$ ; (C)  $L_{50}-S_{30}$ ; (D)  $L_{50}-S_5$ . S'han d'assenyalar les diferències entre tractaments en la densitat de cloroplasts com també en el desenvolupament del citoplasma. Chl, cloroplast; Cyt, citoplasma; M, mitocondri; N, nucli; E, cèl·lula epidèrmica; V, vacúol. La barra representa 5  $\mu\text{m}$ .

La densitat de cloroplasts del parènquima en palissada, observada a partir de fotografies amb el MET, era molt més petita en les cèl·lules del tractament  $L_{50}-S_5$  que en els altres tres tractaments (fig. 2.1). De totes maneres, les diferències entre els diferents tractaments en el nombre total de seccions de cloroplast per secció de parènquima en palissada va ser significativament més petit en  $L_{100}-S_{30}$  que en  $L_{50}-S_5$  (taula 2.2), probablement per raó de les grans dimensions de les cèl·lules d'aquest parènquima cultivades a  $L_{50}-S_5$ , comparats amb els altres tractaments (taula 2.1). Les cèl·lules del parènquima esponjós van mostrar diferències més clares en la densitat de cloroplasts en tots els tractaments que les del parènquima en palissada (fig. 2.1 i 2.2). En

el cas del parènquima esponjós, les cèl·lules de L<sub>100</sub> - S<sub>30</sub> tenien menys densitat cloroplàstica (fig. 2.2A) que aquelles de L<sub>100</sub> - S<sub>5</sub> (fig. 2.2B) i les de L<sub>50</sub> - S<sub>30</sub> (fig. 2.2C), mentre que les cèl·lules crescudes a L<sub>50</sub> - S<sub>5</sub>, amb un perímetre molt gran i amb un citoplasma poc desenvolupat, gairebé no tenien cloroplasts (fig. 2.2D).

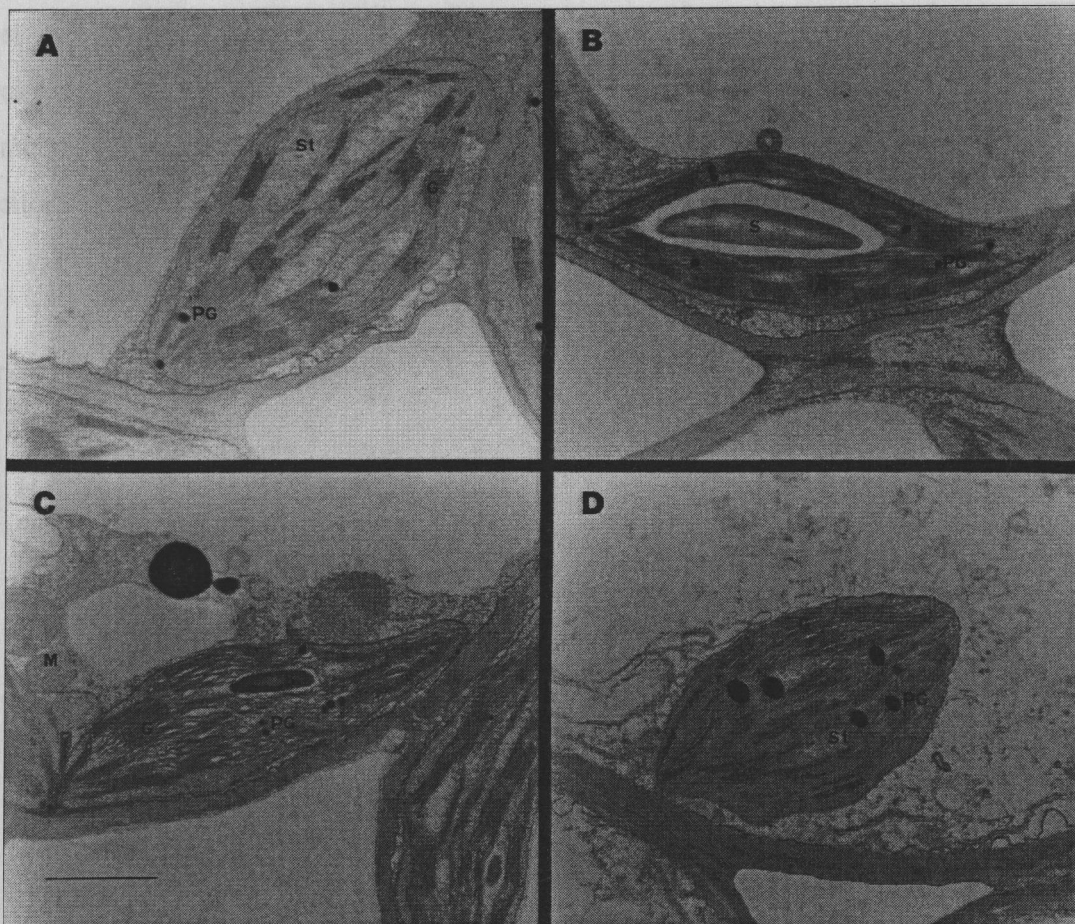
**Taula 2.2.** Efecte dels diferents tractaments i dels tipus de parènquima sobre el nombre de cloroplasts i seccions de mitocondris per a cada secció de cèl·lula, nombre de seccions de cloroplasts per secció (densitat cloroplàstica), i nombre de seccions de grans de midó i plastoglobulines per secció de cloroplast. Les anàlisis quantitatives es van fer a partir de fotografies digitalitzades obtingudes del microscopi electrònic de transmissió. Les dades són la mitjana ± ES de 10 cèl·lules per a cada tipus de parènquima. Les mitjanes que no comparteixen la mateixa lletra són significativament diferents ( $P \leq 0,05$ ) en una ANOVA separada pel test de comparació de Duncan.

PPFD ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	100		50	
SUCROSE ( $\text{g l}^{-1}$ )	30	5	30	5
<b>PALISADE PARENCHYMA</b>				
Chloroplasts cell <sup>-1</sup>	2.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	3.7 ± 0.2 <sup>b</sup>	5.3 ± 0.3 <sup>c</sup>	3.6 ± 0.3 <sup>b</sup>
Chloroplasts $\mu\text{m}^{-2}$ cell (x 10 <sup>2</sup> )	4.7 ± 0.4 <sup>b</sup>	4.7 ± 0.3 <sup>b</sup>	7.3 ± 0.4 <sup>c</sup>	3.6 ± 0.3 <sup>a</sup>
Starch grains chloroplast <sup>-1</sup>	1.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.3 <sup>ab</sup>	1.6 ± 0.2 <sup>ab</sup>	0.9 ± 0.2 <sup>ab</sup>
Plastoglobules chloroplast <sup>-1</sup>	10.2 ± 1.0 <sup>b</sup>	8.8 ± 1.0 <sup>ab</sup>	7.9 ± 1.0 <sup>ab</sup>	6.1 ± 0.7 <sup>a</sup>
Mitochondria cell <sup>-1</sup>	3.5 ± 0.9 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.6 <sup>a</sup>	3.8 ± 0.4 <sup>a</sup>	6.7 ± 0.9 <sup>b</sup>
<b>SPONGY PARENCHYMA</b>				
Chloroplasts cell <sup>-1</sup>	2.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	4.3 ± 0.2 <sup>b</sup>	5.1 ± 0.3 <sup>c</sup>	3.2 ± 0.3 <sup>a</sup>
Chloroplasts $\mu\text{m}^{-2}$ cell (x 10 <sup>2</sup> )	3.5 ± 0.3 <sup>b</sup>	5.5 ± 0.5 <sup>c</sup>	5.7 ± 0.3 <sup>c</sup>	2.4 ± 0.3 <sup>a</sup>
Starch grains chloroplast <sup>-1</sup>	0.5 ± 0.3 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.3 <sup>bc</sup>	0.7 ± 0.2 <sup>ab</sup>	0.7 ± 0.2 <sup>ab</sup>
Plastoglobules chloroplast <sup>-1</sup>	6.4 ± 0.9 <sup>a</sup>	5.1 ± 0.4 <sup>a</sup>	5.7 ± 0.5 <sup>a</sup>	6.9 ± 0.9 <sup>a</sup>
Mitochondria cell <sup>-1</sup>	2.9 ± 0.5 <sup>a</sup>	3.1 ± 0.8 <sup>a</sup>	4.2 ± 0.5 <sup>a</sup>	4.4 ± 0.6 <sup>a</sup>



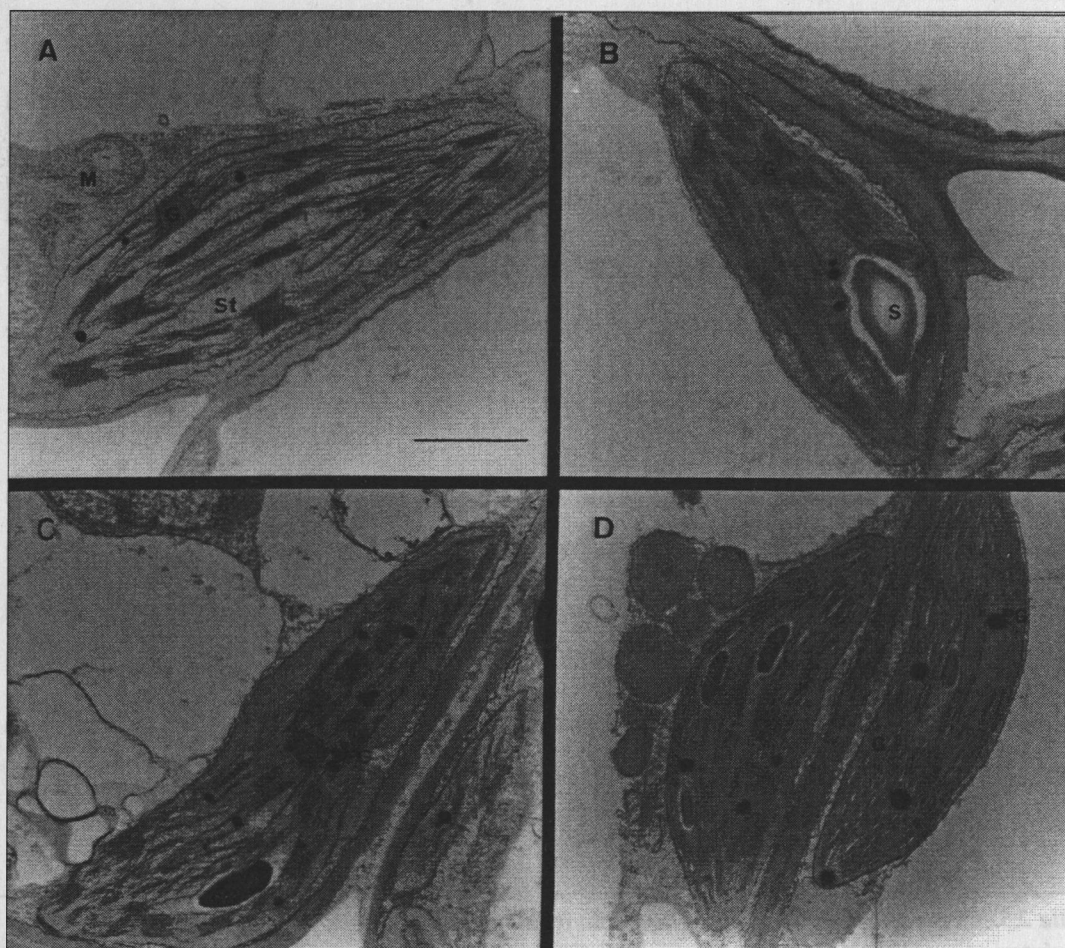
*Fig. 2.2. Fotografies del microscopi electrònic de transmissió de cèl·lules del parènquima esponjós de fulles de gardènia desenvolupades durant la fase de multiplicació a diferents nivells de llum i de concentració de sacarosa en el medi de cultiu. (A)  $L_{100}-S_{30}$ ; (B)  $L_{100}-S_5$ ; (C)  $L_{50}-S_{30}$ ; (D)  $L_{50}-S_5$ . S'han d'assenyalar les diferències entre tractaments en la densitat de cloroplasts, mida dels vacúols i extensió del citoplasma. Chl, cloroplast; M, mitocondri; N, nucli; V, vacúol. La barra representa 5  $\mu\text{m}$ .*

De la mateixa manera, el nombre de seccions de cloroplasts per secció de parènquima esponjós va ser significativament menor en els tractaments  $L_{100}-S_{30}$  i  $L_{50}-S_5$ , comparats amb els altres dos (taula 2.2). Però no hi havia diferències en aquest paràmetre entre els tractaments esmentats per raó probablement de les grans dimensions de les cèl·lules de  $L_{50}-S_5$  (taula 2.1, fig. 2.2). Quan la densitat de cloroplasts es va calcular com a nombre de seccions de cloroplast per unitat de superfície de cèl·lula, les diferències entre els tractaments eren evidents. Així, a  $L_{50}-S_5$  les cèl·lules d'ambdós parènquimes tenien menys densitat cloroplàstica que les dels altres tres tractaments, mentre que les de  $L_{50}-S_{30}$  presentaven la major densitat cloroplàstica en els dos teixits.



**Fig. 2.3.** Fotografies del microscopi electrònic de transmissió de cloroplasts del parènquima esponjós de fulles de gardènia desenvolupades durant la fase de multiplicació a diferents nivells de llum i de concentració de sacarosa en el medi de cultiu. (A)  $L_{100}-S_{30}$ ; (B)  $L_{100}-S_5$ ; (C)  $L_{50}-S_{30}$ ; (D)  $L_{50}-S_5$ . S'han d'assenyalar les diferències entre tractaments sobre l'apilament de tilacoides, desenvolupament dels grana, densitat de l'estroma i presència de midó i plastoglobulines. G, grana; M, mitocondri; P, peroxisoma; PG, plastoglobulina; S, gra de midó; St, estroma; T, tilacoide. La barra representa 1  $\mu\text{m}$ .

La ultraestructura dels cloroplasts d'ambdós parènquimes era força similar en tots els tractaments (figs. 2.3 i 2.4), però si es consideren cadascun dels parènquimes per separat, es pot observar que presenten una apariència molt diferent. La llum alta ( $L_{100}$ ) va fer desenvolupar cloroplasts madurs amb membranes ben organitzades formant grana i tilacoides estromàtics (figs. 2.3A, B i 2.4A, B). La combinació de llum alta i més quantitat de sacarosa ( $S_{30}$ ) va produir cloroplasts amb pocs o cap gra de midó i un estroma amb poca densitat (figs. 2.3A i 2.4A), mentre que amb  $S_5$  es va afavorir la producció de grans de midó i un estroma més dens (figs. 2.3B i 2.4B; també figs. 2.1B i 2.2B).



**Fig. 2.4.** Fotografies del microscopi electrònic de transmissió de cloroplasts del parènquima de palissada de fulles de gardènia desenvolupades durant la fase de multiplicació a diferents nivells de llum i de concentració de sacarosa en el medi de cultiu. (A)  $L_{100}-S_{30}$ ; (B)  $L_{100}-S_5$ ; (C)  $L_{50}-S_{30}$ ; (D)  $L_{50}-S_5$ . G, grana; M, mitocondri; PG, plastoglobulina; S, gra de midó; St, estroma. La barra representa 1  $\mu\text{m}$ .

Així a  $L_{100}$ , el nombre de seccions de grans de midó acumulats per secció de cloroplast de parènquima esponjós va ser significativament més alt pel que fa al nivell més baix de sacarosa estudiat ( $S_5$ ) (taula 2.2). La intensitat de llum baixa  $L_{50}$  va induir cloroplasts amb tilacoides granals i estromàtics inflats i ondulats (figs. 2.3C, D i 2.4C, D). Aquest punt és molt més evident en el tractament de  $S_5$  (figs. 2.3D i 2.4D) mentre que a  $S_{30}$ , els cloroplasts amb grana més desorganitzats es localitzaven preferentment en el parènquima esponjós (fig. 2.3C). A més a més, els cloroplasts del tractament  $L_{50} - S_5$  eren sovint més petits i amb plastoglòbuls grans en comparació amb els cloroplasts desenvolupats en les altres tres condicions de cultiu (figs. 2.3D, 2.4D). A  $L_{50}$  no es van detectar diferències

significatives en el nombre de seccions de grans de midó per secció de cloroplast entre els dos nivells de sacarosa assajats, encara que en el cas dels cloroplasts de S<sub>5</sub> tendien a presentar els valors més baixos en el parènquima de palissada (taula 2.2). Pel que fa al nombre de seccions de plastoglobulines per secció de cloroplast del parènquima esponjós, no hi va haver diferències entre els quatre tractaments, mentre que en el de palissada, solament el tractament L<sub>100</sub> - S<sub>30</sub> va presentar més plastoglòbuls que el de L<sub>50</sub> - S<sub>5</sub>.

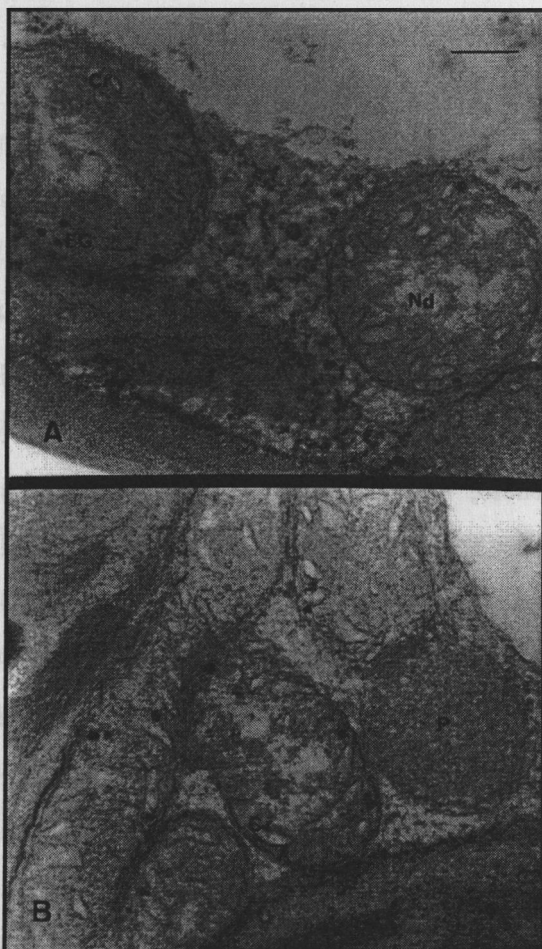
Exceptuant el cas de L<sub>50</sub> - S<sub>5</sub>, el nombre de seccions de plastoglòbuls per secció de cloroplast va ser més alt a les cèl·lules del parènquima de palissada que en les del parènquima esponjós (taula 2.2), i el quocient més elevat entre palissada i esponjós es va assolir a L<sub>100</sub>. El nombre de grans de midó per cloroplast també va a ser més alt en el parènquima de palissada que en l'esponjós, sobretot en els dos tractaments amb la quantitat de sacarosa més alta (S<sub>30</sub>).

**Taula 2.3.** Efecte del nivell de llum i de la quantitat de sacarosa en el medi de cultiu sobre la fotosíntesi i la respiració a les fosques. Les mesures es van fer amb un electrode de Clark tal com s'explica en l'apartat de material i mètodes. Els valors representen la mitjana ± ES de 10 mostres (respiració) i 4 mostres (fotosíntesi). Cada mostra consisteix almenys de dues fulles. Les mitjanes que no tenen una mateixa lletra són significativament diferents ( $p \leq 0,05$ ) en una ANOVA separada pel test de comparació de Duncan.

PPFD ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	100		50	
SUCROSE ( $\text{g l}^{-1}$ )	30	5	30	5
Photosynthesis ( $\mu\text{mol O}_2 \text{ g DW}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	587 ± 104 <sup>bc</sup>	733 ± 347 <sup>c</sup>	267 ± 87 <sup>ab</sup>	162 ± 33 <sup>a</sup>
Respiration ( $\mu\text{mol O}_2 \text{ g DW}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	121 ± 11 <sup>bc</sup>	135 ± 10 <sup>c</sup>	97 ± 7 <sup>ab</sup>	86 ± 7 <sup>a</sup>

El nombre de seccions de mitocondris per secció transversal de cèl·lules del parènquima en palissada va ser significativament més alt en les fulles del tractament L<sub>50</sub> - S<sub>5</sub> que en els altres tres (taula 2.2). La mateixa tendència va passar amb el parènquima

esponjós, encara que les diferències no van ser significatives (taula 2.2). La ultraestructura de les mitocondries apareix molt semblant en tots els tractaments (vegeu-ne els extrems a la fig. 2.5). Així, en  $L_{50} - S_5$  i  $L_{100} - S_5$  podem veure mitocondris amb crestes i matrius ben desenvolupades com també ribosomes i grànuls d'alta densitat.



*Fig. 2.5 Fotografies del microscopi electrònic de transmissió de mitocondris del parènquima de palissada de fulles de gardènia desenvolupades durant la fase de multiplicació mostrant crestes ben desenvolupades, presència de material fibril·lar en la regió del nucleoid i abundants ribosomes així com grànuls densos electrònicament de gran tamany dins la regió de les crestes.*

*(A)  $L_{100} - S_5$  (B)  $L_{50} - S_5$ . Cr, cresta; EG, grànuls densos electrònicament; Nd, regió del nucleoid; P, peroxisoma. La barra representa 0,2  $\mu$ m.*

Les diferències observades en els diferents tractaments en les taxes de fotosíntesi neta i respiració a les fosques concorden amb les esmentades anteriorment en relació amb el desenvolupament del teixit fotosintètic. En aquest cas, per als dos paràmetres es van trobar diferències significativament més altes en les fulles de  $L_{100}$  que en les de  $L_{50}$  (taula 2.3). Les plantes cultivades amb baix nivell de sacarosa van presentar una capacitat fotosintètica 4,5 vegades més alta a  $L_{100}$  que a  $L_{50}$ , mentre que en un nivell de sacarosa

alt ( $S_{30}$ ) aquesta diferència va ser de 2,2 vegades. Pel que fa a la respiració, les diferències entre els mateixos tractaments van ser 1,6 i 1,2 vegades, respectivament. Com havíem dit en relació amb el desenvolupament del teixit fotosintètic, l'efecte de la quantitat de sacarosa sobre les taxes fotosintètiques i respiratòries també depèn del règim de llum. Mentre que a  $L_{100}$  els dos paràmetres tendien a augmentar amb els descens de la sacarosa, a l'inrevés s'observava a  $L_{50}$ . En resum, els tractaments amb la taxa més alta i més baixa de fotosíntesi i de respiració van ser  $L_{100} - S_5$  i  $L_{50} - S_5$ , respectivament.

### 2.3. DISCUSSIÓ

En totes les condicions assajades, les fulletes de gardènia *in vitro* van presentar un parènquima de palissada i un parènquima esponjós clarament diferenciats amb espais intercel·lulars. El grau de desenvolupament del mesòfil en aquestes fulletes dona suport a la hipòtesi que en l'estadi de la multiplicació, les plantetes ja tenien uns teixits fotosintètics bastant desenvolupats, independentment de les condicions de cultiu assajades. En aquest estadi, la natura fotomixotròfica de les plantes cultivades *in vitro* està clarament acceptada (Kozai, 1991 b; Kozai *et al.*, 1992 b; Serret *et al.*, 1996, 1997). Els quatre tractaments assajats van presentar unes taxes de fotosíntesi neta positives. De totes maneres el valor va ser quatre vegades més alt en el tractament  $L_{100} - S_5$  que en el  $L_{50} - S_5$  (taula 2.3), la qual cosa ens indica el fort efecte que les condicions de cultiu exerceixen en l'estadi de multiplicació sobre el desenvolupament de la fotoautotrofia. Com ja hem descrit als altres capítols, els resultats obtinguts amb marcatge amb  $^{13}\text{C}$  ens indicaven que, amb la combinació de llum alta i un baix contingut de sacarosa en el medi de cultiu, obteníem un patró de cultiu més fotoautotròfic (Serret *et al.*, 1996, 1997). Lògicament, aquestes diferències en el desenvolupament de la capacitat fotosintètica tenen una base anatòmica i ultraestructural. Així, la llum alta estimulava el desenvolupament relatiu del parènquima de palissada en comparació de l'esponjós, mentre que per a tots dos parènquimes, augmentava la densitat de cloroplasts amb membrana interna ben estructurada i grana ben organitzats. També la llum va tenir un efecte negatiu sobre la mida de les cèl·lules del mesòfil. Els efectes del PPFD sobre les



plantetes cultivades *in vitro* concorden amb canvis anatòmics i ultraestructurals en els teixits fotosintètics descrits com a respostes adaptatives o aclimatatives en plantes *ex vitro* quan s'augmenta el PPF (Boardman, 1977; Björkman, 1981; Araus *et al.*, 1986 b). Segons Lee *et al.* (1985), en plantes de *Liquidambar styraciflua* cultivades *in vitro* es van descriure cloroplasts amb una estructura granal ben organitzada en els tractaments de llum alta mentre que a PPF baixos l'estructura granal estava desorganitzada. A més a més, les fulletes *in vitro* d'aquesta mateixa planta presenten cèl·lules amb grans vacúols i amb contingut citoplasmàtic reduït si es compara amb les plantes aclimatades o crescudes en el camp (Wetzstein i Sommer, 1982). En els nostres resultats solament s'aprecia un augment de la densitat cloroplàstica (mesurat com a nombre de seccions de cloroplasts per secció d'àrea) en les plantes de S<sub>5</sub>, mentre que es va observar un descens en les plantes de S<sub>30</sub> (taula 2.2). Aquesta pauta de resposta no concorda amb un treball fet en kiwis *in vitro* (Dimassi-Theriou i Bosabalidis, 1997), on es diu que la llum alta no solament afavoreix un increment clar del nombre de cloroplasts dels dos parènquimes sinó també de l'àrea de les cèl·lules dels mateixos teixits. Per altra banda, l'efecte del PPF sobre el nombre de grans de midó en els cloroplasts depèn de la quantitat de sacarosa en el medi de cultiu. Així, mentre que en les plantetes de S<sub>5</sub>, el nombre de grans de midó tendia a augmentar amb el PPF, en les plantetes de S<sub>30</sub> obteníem una resposta oposada. Dimassi-Theriou i Bosabalidis (1997) en kiwis cultivats amb 20 g l<sup>-1</sup> també descriuen un efecte negatiu de la llum sobre el nombre de grans de midó per secció de cloroplast.

Els nostres resultats indiquen que, a més de l'efecte de la llum sobre el desenvolupament de l'activitat fotosintètica, hi ha una interacció deguda a la quantitat de sacarosa del medi de cultiu. Aquest fet explicaria les grans diferències d'anatomia, d'ultraestructura i d'intercanvi de gasos observades entre el tractament L<sub>50</sub> - S<sub>5</sub> i els altres tres. Encara que la concentració de sacarosa del medi fa disminuir la mida de les cèl·lules del mesòfil, amb independència de la llum, el seu efecte sobre la densitat de cloroplasts i la presència de grans de midó depèn de la quantitat de llum. A llum baixa, més quantitat de sacarosa fa augmentar la densitat cloroplàstica i el nombre de grans de midó per cloroplast, mentre que tendeix a succeir a l'inrevés amb el nivell alt de llum. L'efecte

negatiu de la quantitat de sacarosa sobre la mida de les cèl·lules concorda amb els resultats obtinguts en kiwis per Dimassi-Theriou i Bosabalidis (1997). Aquests autors també descriuen un efecte positiu de la sacarosa (independentment del règim de llum) sobre la densitat de cloroplasts i el nombre de grans de midó per cloroplast (resultats expressats com a secció) solament quan l'activitat fotosintètica va ser restringida per baixos nivells de magnesi en el medi. Capellades *et al.* (1991), treballant amb roses cultivades *in vitro* en condicions de  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de llum i amb un fotoperíode de 16 h, molt semblants al nostre tractament de  $L_{100}$  ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de llum i fotoperíode de 12 h), assenyalen que el nombre i la mida dels grans de midó, com també el contingut total de midó augmenta quan puja la quantitat de sacarosa en el medi de cultiu.

El descens de la capacitat fotosintètica i de la taxa de respiració a les fosques de les fulletes cultivades a  $L_{100}$ , en augmentar la quantitat de sacarosa del medi, està d'acord amb les nostres mesures en plantes senceres de gardènia sota els mateixos règims de llum (Serret *et al.*, 1996). Com en els nostres resultats, en el cas de plantetes de rosa, la capacitat fotosintètica i la respiració a les fosques eren més baixes a mesura que augmentava la quantitat de sacarosa en el medi fins a  $30 \text{ g l}^{-1}$  (Capellades *et al.*, 1991). Neumann i Bender (1987) van trobar un descens de l'eficiència fotosintètica quan augmentava la quantitat de sacarosa del medi. Aquesta limitació es pot atribuir a la baixa regeneració de la carboxilació del substrat ribulosa 1,5-bifosfat o a una inhibició de l'activitat/síntesi de la Rubisco (Azcón-Bieto, 1983; Langford i Wainwright, 1988; Neumann i Bender, 1987; Capellades *et al.*, 1991). De totes maneres, en el nostre estudi, altres factors podrien intervenir en el descens de la capacitat fotosintètica en les plantetes cultivades a  $L_{100}$  a mesura que la quantitat de sacarosa del medi augmenta. D'aquesta manera, en aquestes plantetes, el fet que el nombre de grans de midó baixi quan la sacarosa del medi augmenta no dóna suport a l'efecte limitador sostingut sobre l'acumulació de carbohidrats. D'altra banda, la densitat cloroplàstica en el parènquima esponjós baixa a mesura que augmenta la sacarosa del medi. Segons Dimassi-Theriou i Bosabalidis (1997), en plantetes de kiwis *in vitro*, l'efecte negatiu de la sacarosa sobre la fotosíntesi va ser clar solament quan altres factors de creixement no són limitadors de la fotosíntesi. A més a més, el descens de l'activitat fotosintètica va també acompanyada

d'una menor densitat cloroplàstica, encara que es va posar de manifest un patró d'acumulació de grans de midó no massa clar. En el nostre experiment, a  $L_{100}$ , l'increment del nombre de grans de midó quan el contingut de sacarosa del medi baixa es pot explicar per un increment de l'activitat fotosintètica que contribueix al subministrament de més carbohidrats. El mateix argument serveix per explicar les respostes a  $L_{50}$ , on els cloroplasts del parènquima de palissada tendeixen a acumular més grans de midó a mesura que augmenta el nivell de sacarosa. No es van trobar diferències, motivades pel contingut de sacarosa en el medi en el nombre de grans de midó dels cloroplasts del parènquima esponjós cultivats a  $L_{50}$ . Això podria ser una conseqüència del fort increment de la densitat de cloroplasts a mesura que augmenta la quantitat de sacarosa del medi.

En resum, en les plantes cultivades a  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , un contingut alt de sacarosa podria complir la demanda per més esquelets de carboni a fi d'intervenir en l'augment de la densitat cloroplàstica i en els canvis en la ultraestructura dels cloroplasts associats amb el desenvolupament dels teixits fotosintètics. La ultraestructura dels mitocondris de tots els tractaments és molt similar (fig. 2.5) i suggereix una activitat en la transducció d'energia similar malgrat el fet que mostren diferents taxes de respiració a les fosques (taula 2.3). Per tant, en un nivell baix de llum és necessària una aplicació de sacarosa externa per estimular el desenvolupament dels teixits fotosintètics.

Aquest experiment ens demostra que un augment de la intensitat de la llum fins a uns valors moderats de  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  té un efecte beneficiós en el desenvolupament dels canvis anatòmics i ultraestructurals associats amb l'autotròfia. Aquest mateix efecte és estimulat amb una quantitat baixa de sacarosa, com ara  $5 \text{ g l}^{-1}$  en el medi de cultiu. Aquestes condicions de cultiu utilitzades per micropropagació, i que són modificacions de les que s'utilitzen normalment en cultiu *in vitro* (aproximadament  $45\text{-}50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPFD i  $30 \text{ g l}^{-1}$  sacarosa) de gardènia o altres espècies (Kozai, 1991b; Kozai *et al.*, 1992b), poden ser útils per a la micropropagació. Ara bé, la utilització d'un baix contingut de sacarosa en les condicions habituals de llum en el cultiu *in vitro* pot ser contraproduent.



**3. EFECTE DE DIFERENTS PARÀMETRES  
AMBIENTALS SOBRE EL CREIXEMENT DE  
PLANTES DE GARDÈNIA DURANT LA  
MICROPROPAGACIÓ I LA POSTERIOR  
ACLIMATITZACIÓ EX VITRO**



### 3. EFECTE DE DIFERENTS PARÀMETRES AMBIENTALS SOBRE EL CREIXEMENT DE PLANTES DE GARDÈNIA DURANT LA MICROPROPAGACIÓ I LA POSTERIOR ACLIMATITZACIÓ *EX VITRO*

En aquest apartat s'avalua l'efecte de la concentració de CO<sub>2</sub> dins el tub en relació amb el desenvolupament de l'activitat autotròfica i amb el creixement, com també la posterior aclimatització. Els resultats obtinguts formen part de l'experiment II.

#### 3.1. INTRODUCCIÓ

Les plantetes cultivades *in vitro* tenen prou capacitat fotosintètica per desenvolupar l'autotrofia, però sovint aquesta capacitat està restringida, més que per la concentració de sacarosa del medi de cultiu, per la baixa concentració de CO<sub>2</sub> dins el pot de cultiu durant el fotoperíode (Desjardins *et al.*, 1988; Hdider i Desjardins, 1994; Kozai, 1991b, c; Kubota i Kozai, 1992; Solárová, 1989). La sacarosa del medi de cultiu es considera la causa principal de l'alt cost de producció de les plantes cultivades per micropropagació convencional, per raó de la pèrdua de moltes plantes per contaminació. Per altra banda, sovint, el creixement de les plantes *in vitro* és més alt en condicions fotoautotròfiques que heterotròfiques (Kozai, 1991b, c). A més, la capacitat fotosintètica de les plantes *in vitro* afavoreix la posterior aclimatització a condicions *ex vitro* (Kozai, 1991b, c; Kozai *et al.*, 1990a). Altres experiments, però, no han confirmat que el CO<sub>2</sub> és un factor limitador ni que les plantes més fotoautotròfiques es poden aclimatar més ràpidament (Debergh *et al.*, 1992). De fet, Capellades *et al.*, (1990a, b) assenyalen que les plantes menys fotoautotròfiques de *Rosa multiflora* són les que s'aclimaten més bé.

Com s'ha apuntat a l'apartat anterior, encara que està àmpliament provat que determinats canvis en els factors ambientals afecten el desenvolupament de la fotoautotrofia *in vitro* (Kozai, 1991b, c), és molt difícil afirmar en quina mesura la fotoautotròfia aconseguida per una planta cultivada *in vitro* depèn d'aquelles condicions de cultiu. Els criteris de mesura senzills o ràpids no reflecteixen el procés complicat de desenvolupament de l'autotrofia atès que hi estan relacionats indirectament o en són

indicadors a curt termini. Mesures més directes o més acurades per a la quantificació de la contribució fotosintètica total (al llarg del temps) del creixement de les plantetes *in vitro* mitjançant, per exemple, marcatge radioactiu, impliquen tècniques complicades, cares i llargues de portar a terme.

A través del marcatge amb components dèbilment enriquits amb isòtops estables de carboni és possible un seguiment precís, a llarg termini, de les diferents fonts de carboni que les plantes utilitzen. S'han fet estudis de marcatge de components amb isòtops estables de carbó per controlar les diferents fonts de carboni de les plantes (Deléens *et al.*, 1994). Així, en cultius mixotròfics d'una planta  $C_3$ , com ara la *Gardenia jasminoides*, l'origen metabòlic del carboni en les fulletes (ja procedeixi de la fotosíntesi o de la sacarosa del medi de cultiu) es pot seguir gràcies a la petita diferència en la seva composició natural d'isòtops entre les diferents fonts de carboni (apartat 1). D'aquesta manera, les dues fonts de carboni que es troben en una planta cultivada *in vitro* poden diferenciar-se per la seva composició isotòpica natural: per una banda, els productes heterotròfics enriquits en  $^{13}C$ , formats a partir de la sacarosa de sucre de canya (una planta  $C_4$ ) del medi, i per una altra, els productes fotosintètics dins el rang típic de les plantes  $C_3$  (Farquhar *et al.*, 1989).

Es van utilitzar isòtops estables per determinar en quina mesura els canvis en les condicions del cultiu (per exemple, la concentració de  $CO_2$ , nivells de sacarosa i de llum) durant dos estadis de la micropropagació (multiplicació i arrelament) afectaven el grau de fotoautotròfia de les plantetes de gardènia. A més a més, la composició isotòpica de les fulles desenvolupades durant l'acclimatització en condicions *ex vitro* es va utilitzar per determinar l'estrès d'aigua sofert per les plantes durant el mateix període. Aquest és el principal tipus d'estrès a què estan sotmeses les plantes durant l'acclimatització (Fujiwara *et al.*, 1993). En les plantes  $C_3$ , la composició isotòpica del carboni és un indicador que integra en el temps el quocient de pressió parcial de  $CO_2$  entre els espais intercel·lulars i l'atmosfera ( $p_i/p_a$ ) (Farquhar *et al.*, 1982; 1989). Aquest quocient esdevé molt afectat per les condicions hídriques durant el creixement. El descens de la quantitat d'aigua disponible així com també l'augment de l'evapotranspiració condueix a un valor més alt



(menys negatiu) de  $\delta^{13}\text{C}$  en les plantes, per raó que redueix la conductància estomàtica i la capacitat fotosintètica (Condon *et al.*, 1992). Per tant, a partir de l'anàlisi de  $\delta^{13}\text{C}$  de les fulles hauria de ser possible inferir l'existència d'estrès d'aigua durant l'acimatització.

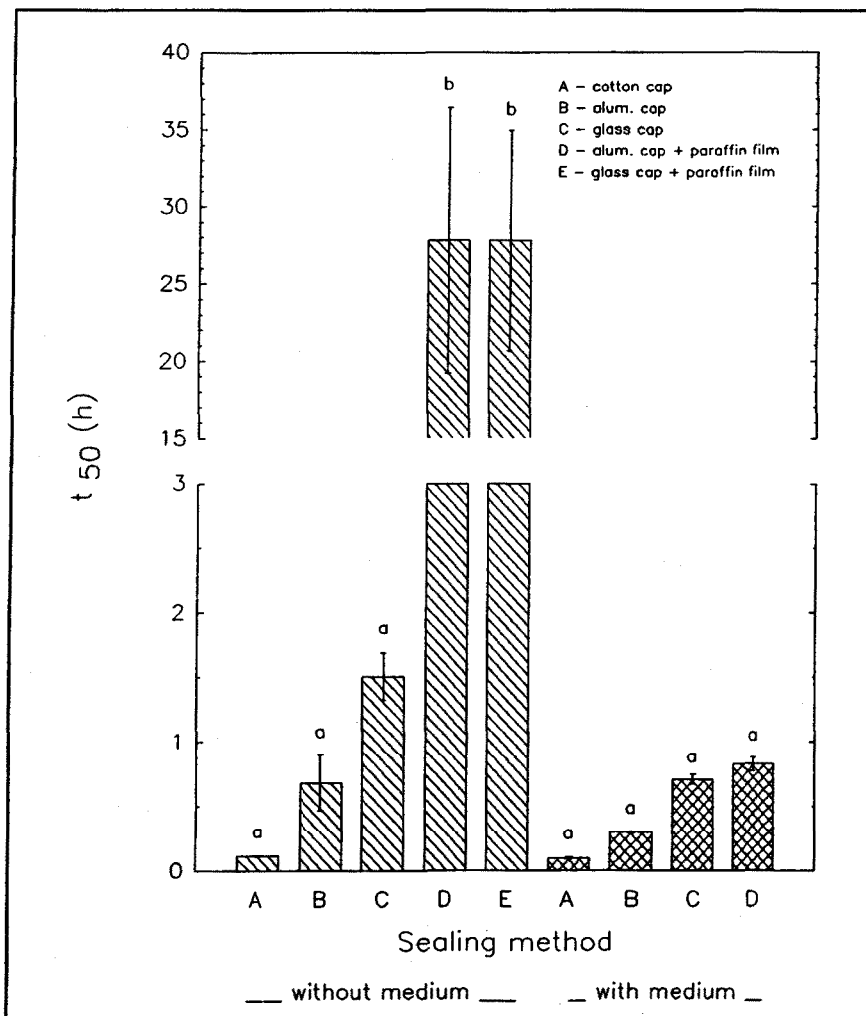
### 3.2. RESULTATS

#### L'intercanvi de $\text{CO}_2$ en els tubs de cultiu i l'efecte de la foscor i de les variacions de llum sobre la concentració de $\text{CO}_2$ dins els tubs

La fig. 3.1 mostra l'efecte de les diferents maneres de tapar els tubs de cultiu i la presència o l'absència de medi sobre el  $t_{50}$  (temps mitjà per a la retenció de gasos), mesurat després d'injectar una quantitat suficient de gas per augmentar la concentració de  $\text{CO}_2$  a l'interior del tub fins aproximadament un 2 %. Cal esmentar que aquestes mesures es van fer amb tubs sense plantetes. En els tubs amb taps segellats amb pel·lícula de parafina es va observar un augment significatiu ( $p \leq 0,05$ ) del  $t_{50}$ . Així, els tubs sense medi van presentar valors de més de 25 h, en el cas d'estar segellats amb parafina, i d'1,5 h o menys en els tubs sense la pel·lícula, tant si tenien tap d'alumini com de vidre. En els tubs amb tap d'alumini, el fet de segellar-los amb parafina, va incrementar unes 40 vegades el  $t_{50}$ . Per contra, en els tubs amb medi de cultiu, no hi va haver un efecte significatiu entre els tubs segellats amb parafina i els que no ho estaven, perquè els valors de  $t_{50}$  van ser menors d'1 h en tots els tipus de tancament analitzats. De fet, hi ha una interacció significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre la presència de medi i la utilització de pel·lícula de parafina.

En mesures fetes durant l'estadi d'arrelament, el  $\text{CO}_2$  acumulat al final del període de foscor (vegeu les barres negres de la fig. 3.2) dins els tubs tapats més hermèticament (TS-tubs) va ser aproximadament  $6500 \mu\text{mol mol}^{-1}$ , (valor mitjà entre tots els tractaments), és a dir, entre 5-10 vegades més gran que en els tubs no segellats (LS-tubs), mentre que la concentració de  $\text{CO}_2$  dins la cambra de cultiu es va mantenir constant a  $750 \mu\text{mol mol}^{-1}$ . Aquesta concentració tan alta de  $\text{CO}_2$  dins els tubs tancats hermèticament pot ser deguda al baix traspàs (principalment per difusió) del  $\text{CO}_2$  a través d'aquests tubs. Ara bé, després de 3-4 h de llum, la concentració de  $\text{CO}_2$  dins els

tubs tancats més hermèticament va descendre fins a uns 200  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ , mentre que en els tubs sense pel·lícula de parafina va ser quasi el doble. La diferència de concentració de  $\text{CO}_2$  dins els tubs per raó del tipus de tap va ser altament significatiu ( $p \leq 0,001$ ), tant en el període de llum com en el de foscor. A més a més, durant el període de llum, la concentració de sacarosa també va influir significativament ( $p \leq 0,001$ ) sobre la concentració de  $\text{CO}_2$ . També hi ha interaccions significatives ( $p \leq 0,05$ ) entre la concentració de sacarosa o el nivell de llum i el tipus de tap.



**Fig. 3.1.** Efecte dels diferents mètodes de tancament dels tubs així com de la presència o absència d'agar dins el tub en el temps (en hores) necessari perquè la meitat del  $\text{CO}_2$  injectat s'escapi del tub ( $t_{50}$ ). El volum dels tubs buits i del medi utilitzat van ser 52 ml i 13 ml, respectivament. Les mesures es van fer a  $23^\circ\text{C}$  i la concentració inicial de  $\text{CO}_2$  va ser de 2 % (v/v). Els valors de  $t_{50}$  són les mitjanes  $\pm$  ES d'almenys 18 (tubs buits) o 5 (tubs amb medi) mesures. Les mitjanes que no comparteixen la mateixa lletra són significativament diferents ( $p \leq 0,05$ ) amb el test de comparació de Duncan. Els diferents tipus de tap assajats van ser: A: tap de cotó; B: tap d'alumini; C: tap de vidre; D: tap d'alumini segellat amb parafina; E: tap de vidre segellat amb parafina.

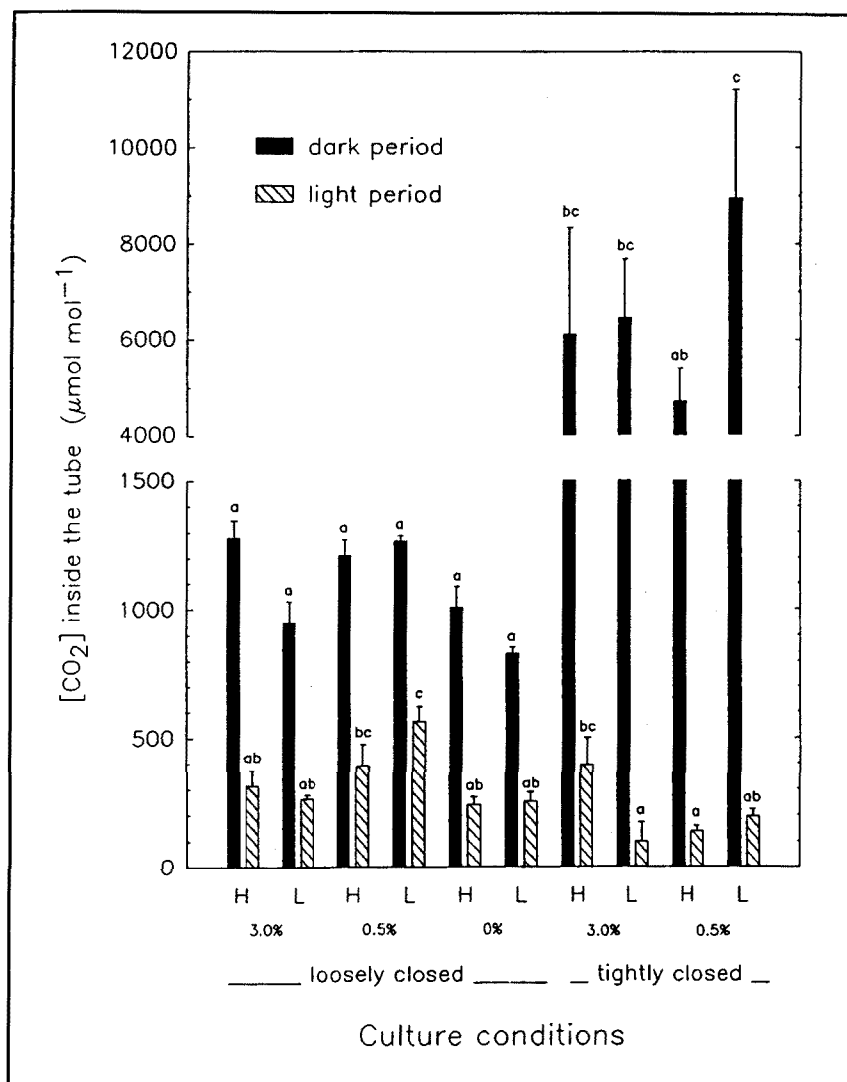


Fig. 3.2. Concentració de CO<sub>2</sub> dins els tubs de cultiu mesurada durant la fase d'arrelament en diferents tractaments mitjançant un IRGA portàtil. Els valors representen la concentració de CO<sub>2</sub> una hora abans del començament del període de llum (barres negres) i la concentració trobada després de 4 h. de llum (barres ratllades). Els valors són les mitjanes ± ES de 4-5 tubs. Els tractaments assajats van ser: nivell de llum alt i baix (H i L-PPFD), tres concentracions de sacarosa en el medi (S<sub>0</sub>, S<sub>5</sub> i S<sub>30</sub>) i taps permeables o no al CO<sub>2</sub>. Entre el període de llum i de foscor, les mitjanes que no tenen la mateixa lletra són significativament diferents ( $p \leq 0,05$ ) amb el test de comparació de Duncan.

**Efecte de la font de carboni sobre la composició isotòpica de les fulles:  
desenvolupament de l'autotròfia de les plàntules *in vitro***

La composició isotòpica de les fulles va variar àmpliament segons l'estadi de desenvolupament i de les condicions de cultiu (taula 3.1). A la fase de multiplicació, en els tubs tapats hermèticament no va haver-hi efecte de la llum excepte en el cas de S<sub>0</sub>. Els valors més alts els van presentar els tubs tapats i amb S<sub>30</sub> mentre que els més baixos

eren els de  $S_0$  permeables als gasos. Els valors disminueixen a mesura que baixa la quantitat de sacarosa en el medi. Pel que respecta a l'arrelament, la tendència és bastant similar que en la fase anterior, però en aquest cas sembla que hi hagi un efecte de la llum en els tubs permeables, sent valors més alts a baixa llum. Com més avançat és l'estadi de desenvolupament, les diferències observades entre els diferents tractaments són menors. Els valors més alts provenen dels tubs tapats hermèticament per una mateixa llum i quantitat de sacarosa. Entre la primera fulla desenvolupada a la fase d'acclimatització (procedent de *in vitro*) i la segona fulla (desenvolupada totalment a l'acclimatització) tampoc van haver-hi masses diferències, encara que en el primer cas hi va haver un mínim a  $L_{100} - S_{30}$  i un màxim a  $L_{50} - S_0$ , i en el segon no hi van haver diferències significatives, cosa que demostra que les plantetes ja estaven acclimatades *ex vitro* abans de desenvolupar-se aquesta fulleta. Els valors de la segona fulleta van ser molt similars als dels tubs oberts de la primera fulleta. Les fulletes amb més (menys negativa)  $\delta^{13}\text{C}$  van ser el resultat d'una utilització major de la sacarosa de la canya de sucre com a font de carbó ( $\delta^{13}\text{C}$  sacarosa canya de sucre =  $-11,29\text{ ‰}$ ), mentre que els que tenien valors més baixos (més negatius) van fixar més  $\text{CO}_2$  de l'atmosfera del voltant.

A partir de la mitjana dels valors de  $\delta^{13}\text{C}$  de les fulles de cada estadi i de la condició de cultiu (taula 3.1), es va calcular la diferència ( $\delta^{13}\text{C}$  sacarosa -  $\delta^{13}\text{C}$  fulles), utilitzant la  $\delta^{13}\text{C}$  de la sacarosa del sucre de canya com a constant (fig. 3.3).

En les plantes crescudes dins els tubs no hermètics amb  $S_5$  i  $S_{30}$  de sacarosa en el medi, els valors de ( $\delta^{13}\text{C}$  sacarosa -  $\delta^{13}\text{C}$  fulles), durant l'estadi d'arrelament, van ser més alts que en l'estadi de multiplicació (fig. 3.3A). Aquest fet suggereix que el metabolisme fotoautotròfic està més desenvolupat en la fase d'arrelament que en la de multiplicació. També, basant-se en la diferència  $\delta^{13}\text{C}$  sacarosa -  $\delta^{13}\text{C}$  fulles, es demostra que cultivar les plantes dins els tubs no tancats hermèticament, (és a dir, amb facilitat per a l'intercanvi de gasos a través dels tubs) va ser el factor més influent en el desenvolupament de la fotoautotròfia durant tot el cultiu *in vitro*, i particularment en l'últim estadi (fig. 3.3A-B). Així, el valor ( $\delta^{13}\text{C}$  sacarosa -  $\delta^{13}\text{C}$  fulles) es va incrementar dels tubs més hermètics

**Taula 3.1.** Efecte del tancament del tub, nivell de llum i concentració de sacarosa en el medi sobre la composició isotòpica ( $\delta^{13}\text{C}$ , ‰) de les fulletes de gardènia desenvolupades durant els períodes de multiplicació i d'arrelament *in vitro*. També s'hi inclouen els valors de  $\delta^{13}\text{C}$  de fulles de planta aclimatada *ex vitro*. Els valors són la mitjana  $\pm$  ES de 2-3 mostres, cadascuna de les quals està formada per dues fulletes, respectivament. Per a cada període de creixement, les mitjanes dins una columna que no comparteixen la mateixa lletra són significativament diferents ( $p \leq 0,05$ ) amb el test de comparació de Duncan. Abreviatures utilitzades: LS-tubs i TS-tubs (tubs permeables i no permeables, respectivament); L-PPFD i H-PPFD (baixa radiació,  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  i alta radiació,  $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , respectivament); N-Suc, L-Suc i H-Suc (medi amb 0 %, 0,5 % i 3,0 % de sacarosa, respectivament).

<sup>x</sup> A causa del creixement reduït de les mostres d'aquest tractament solament es va poder fer una anàlisi amb tot un pool de fulletes. Per aquest motiu es va descartar aquest tractament en estadis posteriors.

<sup>y</sup>La descripció dels tractaments es refereix al cultiu *in vitro*.

	H-Suc LS-Tubes	H-Suc TS-Tubes	L-Suc LS-Tubes	L-Suc TS-Tubes	N-Suc LS-Tubes	N-Suc TS-Tubes <sup>x</sup>
Shoot Multiplication						
H-PPFD	-21.73 $\pm$ 0.50 <sup>c</sup>	-15.68 $\pm$ 0.21 <sup>ab</sup>	-26.24 $\pm$ 1.99 <sup>d</sup>	-19.05 $\pm$ 1.21 <sup>bc</sup>	-31.22 $\pm$ 0.57 <sup>ef</sup>	-32.00 <sup>ef</sup>
L-PPFD	-25.44 $\pm$ 1.78 <sup>d</sup>	-15.26 $\pm$ 1.02 <sup>a</sup>	-28.27 $\pm$ 1.24 <sup>de</sup>	-20.26 $\pm$ 0.52 <sup>c</sup>	-33.11 $\pm$ 1.35 <sup>f</sup>	-26.98 <sup>d</sup>
Root Induction						
H-PPFD	-26.53 $\pm$ 0.69 <sup>b</sup>	-15.57 $\pm$ 1.18 <sup>a</sup>	-30.26 $\pm$ 1.79 <sup>bc</sup>	-16.61 $\pm$ 0.62 <sup>a</sup>	-34.35 $\pm$ 1.19 <sup>cd</sup>	—
L-PPFD	-34.85 $\pm$ 0.72 <sup>d</sup>	-17.35 $\pm$ 0.98 <sup>a</sup>	-33.97 $\pm$ 2.60 <sup>cd</sup>	-17.42 $\pm$ 1.49 <sup>a</sup>	-32.90 $\pm$ 0.53 <sup>cd</sup>	—
Acclimation <sup>y</sup>						
1 <sup>st</sup> leaf developed						
H-PPFD	-28.36 $\pm$ 0.65 <sup>b</sup>	-24.17 $\pm$ 0.98 <sup>a</sup>	-29.18 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>	-29.37 <sup>—b</sup>	-29.87 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>	—
L-PPFD	-28.28 $\pm$ 0.69 <sup>b</sup>	—	-30.71 $\pm$ 1.25 <sup>b</sup>	-24.60 $\pm$ 1.12 <sup>a</sup>	-30.75 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup>	—
2 <sup>nd</sup> leaf developed						
H-PPFD	-29.20 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>	-28.44 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	-28.68 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	-28.77 <sup>—a</sup>	-29.17 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	—
L-PPFD	-28.78 $\pm$ 0.54 <sup>a</sup>	—	-29.44 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	-29.10 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup>	-29.06 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	—

(TS) als menys hermètics (LS) unes 2,5 i 4 vegades durant la multiplicació i l'arrelament, respectivament (fig. 3.3C). De totes maneres, durant la multiplicació, en els tubs TS, es va observar una marcada pèrdua de la fotoautotròfia a mesura que augmentava la concentració de sacarosa en el medi (fig. 3.3B). Aquesta pèrdua de fotoautotròfia es va compensar parcialment en les plantes crescudes en els tubs LS (fig. 3.3A vs 3B). Durant la multiplicació hi ha una interacció important entre el tipus de tancament del tub i la sacarosa del medi, i menys important en relació amb el nivell de llum.

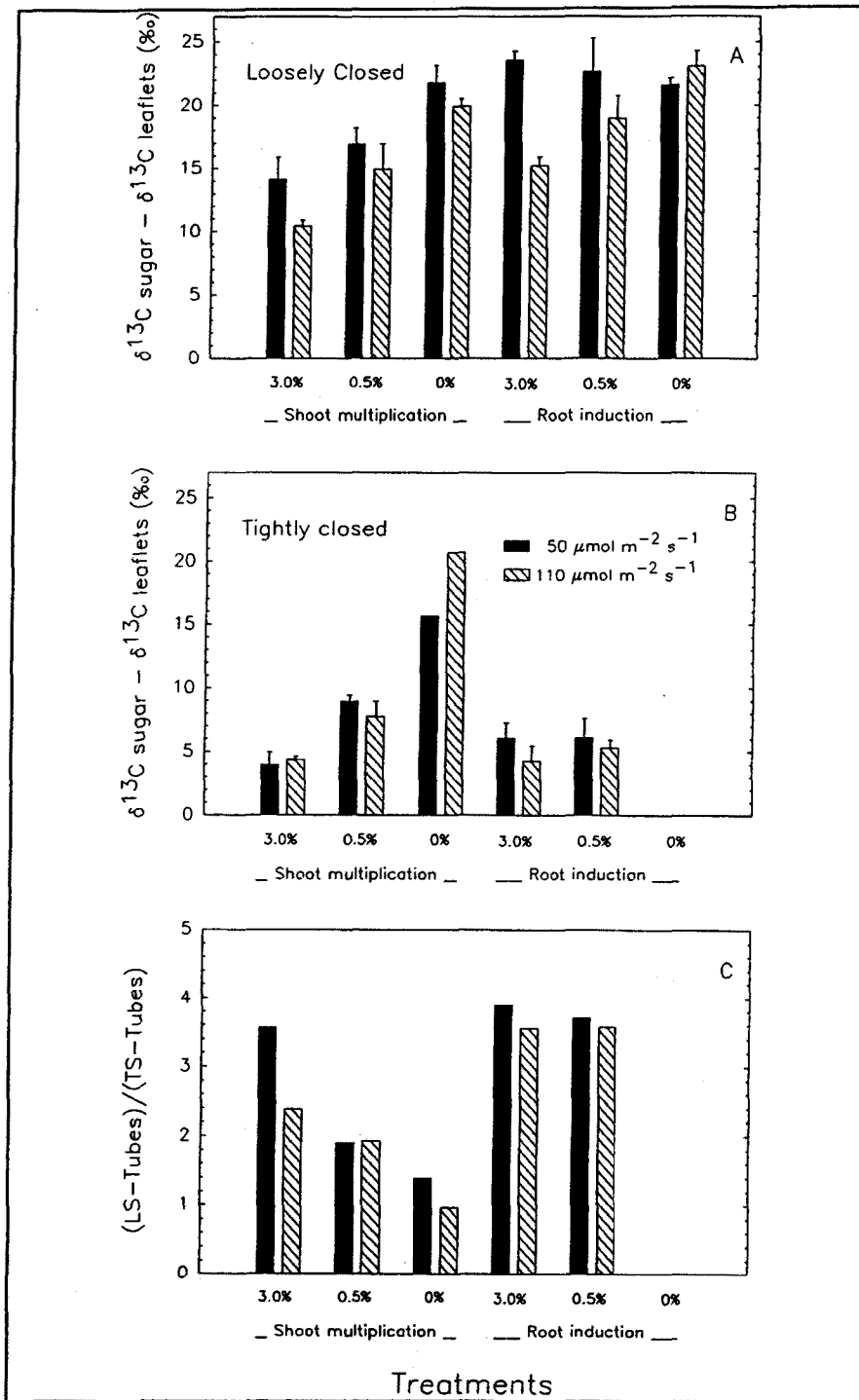


Fig. 3.3 Efecte del PFD i del nivell de llum sobre la diferència entre  $\delta^{13}\text{C}$  de la sacarosa del sucre de canya del medi de cultiu i  $\delta^{13}\text{C}$  de la matèria seca de fulletes de gardènia ( $\delta^{13}\text{C}$  sacarosa -  $\delta^{13}\text{C}$  fulles) desenvolupades durant els estadis de multiplicació i d'arrelament dins tubs permeables (LS-tubs: fig. 3.3A) i no permeables a l'intercanvi de gasos (TS-tubs: fig. 3.3B). Exceptuant la fase de multiplicació (tractament sense sacarosa, solament n'existia una mostra), els valors són les mitjanes  $\pm$  ES de 2-3 mostres, cadascuna de les quals consistia en 1-3 plantes. En cada tractament i en cada estadi de cultiu, l'efecte d'augmentar la concentració de  $\text{CO}_2$  dins el tub durant el període de llum (utilitzant tubs permeables) en la inducció de l'autotròfia es representa pel quocient entre la diferència ( $\delta^{13}\text{C}$  sacarosa -  $\delta^{13}\text{C}$  fulles) en LS-tubs i TS-tubs (fig. 3.3C).

En canvi, durant l'arrelament, en els tubs permeables al  $\text{CO}_2$ , es va observar una gran estimulació de la fotoautotròfia independentment de la quantitat de sacarosa del medi i del nivell de llum. En els tubs tapats hermèticament la fotoautotròfia és menor que a la fase de multiplicació i que en els tubs permeables, sense efectes de la quantitat de sacarosa del medi. En aquest estadi, el tipus de tancament sembla el principal factor que controla el desenvolupament de la fotoautotròfia (fig. 3.3C). Encara que la llum va ser el factor en què l'efecte era menys evident, la llum baixa, comparada amb l'alta, estimulava en certa manera la fotoautotròfia en les plantes dels dos estadis cultivades en els tubs LS (tapats menys hermèticament) i en una concentració alta de sacarosa (fig. 3.3A).

Per raó que el tipus de tancament del tub va ser el factor més important en la inducció de la fotoautotròfia en les plantes *in vitro* (fig. 3.3), l'efecte d'aquest tractament en la inducció de la fotoautotròfia es va examinar amb més detall cultivant també les plantes amb tubs LS i TS i sucre de bleada-rave en el medi de cultiu (taula 3.2). Així, durant l'estadi de multiplicació, amb  $S_{30}$  i  $L_{50}$ , la contribució relativa dels fotosintetitzats al contingut total de carboni de les fulles va augmentar des del 36,3 % fins un 92,7 %, segons que les plantes fossin cultivades amb tubs TS o LS, respectivament (taula 3.2).

#### Canvis en la composició isotòpica durant l'aclimatització

Per poder avaluar la resposta de las plantes durant l'aclimatització, es va analitzar la composició isotòpica de les primeres dues fulles expandides durant aquest període. El rang dels valors de  $\delta^{13}\text{C}$  mesurats va ser menor que el de les fulletes *in vitro*, atès que el  $\text{CO}_2$  era l'única font de carboni en les plantes. Les variacions en la  $\delta^{13}\text{C}$  són probablement degudes al desenvolupament de l'estrès hídric durant l'aclimatització. Els valors de  $\delta^{13}\text{C}$  de la primera fulla desenvolupada van ser més alts en les plantes que provenien d'aquells tractaments tapats hermèticament ( $S_{30} - L_{100}$  i  $S_{15} - L_{50}$  i sense diferències en els altres tractaments) comparats amb els més permeables amb la mateixa llum i amb els mateixos nivells de sacarosa (taula 3.1). En la segona fulla desenvolupada durant l'aclimatització no es van observar diferències en la  $\delta^{13}\text{C}$  de les plantes procedents dels diferents tractaments de cultiu *in vitro*. Aquests valors van ser tan baixos com els de la primera fulla de plantes que provenien dels tubs menys

hermètics.

*Taula 3.2. Composició isotòpica dels fotosintetitzats ( $\delta^{13}\text{C}$ -fotosintetitzats) i la contribució relativa dels fotosintetitzats (% fotosintetitzats) al contingut de carbó de les fulletes de gardènia crescudes durant la fase de multiplicació amb 3,0 % de sacarosa, L-PPFD i dos tipus de tap (LS i TS tubs). Les plantetes *in vitro* es van subcultivar amb medi MS amb 3,0 % de sacarosa tant de sucre de canya com de blada-rave. Per calcular la  $\delta^{13}\text{C}$ -fotosintetitzats i el % fotosintetitzats, els valors de  $\delta^{13}\text{C}$  del sucre de blada-rave i del sucre de canya, com també el de les fulletes crescudes en medi MS amb diferents tipus de sacarosa es van utilitzar en les equacions [2] i [3] de l'apartat de materials i mètodes.*

	$\delta^{13}\text{C}$ sucrose	Leaflets	
		LS-Tubes	TS-Tubes
$\delta^{13}\text{C}$ sugar cane (‰)	-11.29	-25.44	-15.26
$\delta^{13}\text{C}$ sugar beet (‰)	-23.54	-26.33	-23.06
% photosynthates (%)		92.7	36.3
$\delta^{13}\text{C}$ photosynthates (‰)		-26.55	-22.22

**Efecte de les condicions *in vitro* sobre el pes de les plantes durant la micropropagació i l'acimatització posterior**

Durant la multiplicació, en un nivell de llum i en presència de sacarosa (més del 0 %) determinats, les plantes cultivades en tubs hermètics (TS) van tenir un pes fresc més alt que les cultivades en els tubs permeables (LS), mentre que, en el tractament sense sacarosa, les plantes dels tubs no hermètics van presentar pesos més alts (taula 3.3). Les plantetes que havien crescut amb llum alta també van tenir uns pesos frescos més elevats que les que van créixer amb llum més baixa, en presència de sacarosa. La quantitat de sacarosa en el medi no va tenir cap efecte i, fins i tot, les plantetes crescudes sense sacarosa presentaren tendència a pesos frescos més alts, en el cas de tubs permeables i baixa llum. Ara bé, durant l'arrelament, la resposta al tipus de tancament va ser oposada. En aquest cas, en uns determinats nivells de llum i sacarosa, les plantes cultivades amb tubs LS van presentar un pes fresc més alt que les dels tubs TS (taula



3.3).

Durant l'arrelament, el principal factor influent sobre % pes sec / pes fresc, en els tractaments d'alta llum, va ser la concentració de sacarosa en el medi. Aquest percentatge va disminuir des d'un valor lleugerament més alt que el 20 % fins al 16 % a mesura que la quantitat de sacarosa en el medi descendia des del 3 % fins al 0 %. El pes fresc de les arrels va ser més alt en les plantetes dels tubs LS respecte als TS, sense tenir en compte el PPF i els tres nivells de sacarosa assajats.

Després de l'aclimatització, i igual que s'ha dit a l'arrelament, el pes fresc total tendia a ser més alt en les plantes provinents dels tubs permeables que en els tapats més hermèticament. El pes fresc total de les plantetes al final de l'arrelament sembla important perquè pot haver influït en el seu pes fresc un cop aclimatades *ex vitro*. Ajuntant tots els tractaments estudiats, hi havia una correlació positiva ( $r^2 = 0,51$ ,  $n = 8$ ,  $p \leq 0,05$ ) entre el pes fresc total de les plantes en la fase d'arrelament i el de les plantes aclimatades. El % pes sec / pes fresc de les plantes aclimatades va ser aproximadament el 20 % del pes fresc amb independència de les condicions de cultiu durant la micropropagació.

**Taula 3.3.** Efecte del tancament del tub, del nivell de llum, i de la concentració de sacarosa en el medi sobre el pes fresc de les plantetes (mg per planta) i el pes sec relatiu en el pes fresc (%) de la part aèria de les plantetes de gardènia desenvolupades durant els estadis de multiplicació i d'arrelament in vitro i la seva posterior aclimatització ex vitro.

En les plantes de la fase d'arrelament i d'aclimatització també es va calcular el pes fresc de les arrels i el pes fresc total (pes part aèria + pes arrels). Els valors són la mitjana ± ES d'almenys 21 plantetes de la fase de multiplicació, 5 de la d'arrelament i entre 5-24 (segons el tractament) de la d'aclimatització. En cada període de creixement i en cada paràmetre estudiat, les mitjanes que no comparteixen la mateixa lletra són significativament diferents del test de comparació de Duncan. Les columnes que no tenen lletra no presenten ANOVA significativament diferent.

<sup>x</sup> A causa del creixement reduït de les mostres d'aquest tractament solament es va poder fer una anàlisi amb tot un pool de fulletes. Per aquest motiu, es va descartar aquest tractament en estadis posteriors.

<sup>y</sup>La descripció dels tractaments es refereix al cultiu in vitro

	H-Suc LS-Tubes	H-Suc TS-Tubes	L-Suc LS-Tubes	L-Suc TS-Tubes	N-Suc LS-Tubes	N-Suc TS-Tubes <sup>x</sup>
Shoot Multiplication (aerial part: total)						
H-PPFD	289±38 <sup>cd</sup>	448±68 <sup>e</sup>	244±37 <sup>bcd</sup>	308±18 <sup>d</sup>	188±18 <sup>abc</sup>	113±17 <sup>a</sup>
L-PPFD	248±37 <sup>bcd</sup>	257±31 <sup>bcd</sup>	177±21 <sup>ab</sup>	236±19 <sup>bcd</sup>	234±33 <sup>bcd</sup>	98±09 <sup>a</sup>
Root Induction (aerial part)						
H-PPFD	252±33	253±32	356±67	295±18	292±37	—
L-PPFD	283±11	154±31	223±37	218±51	299±28	—
(relative dry weight)						
H-PPFD	21.2±0.3 <sup>c</sup>	20.8±0.7 <sup>c</sup>	17.5±0.3 <sup>ab</sup>	17.4±0.4 <sup>ab</sup>	16.3±1.0 <sup>ab</sup>	—
L-PPFD	18.1±1.8 <sup>abc</sup>	27.8±1.5 <sup>d</sup>	21.0±1.1 <sup>c</sup>	19.2±0.9 <sup>bc</sup>	15.9±0.7 <sup>a</sup>	—
(roots)						
H-PPFD	129±12 <sup>c</sup>	115±18 <sup>c</sup>	64±13 <sup>ab</sup>	49±3 <sup>a</sup>	94±11 <sup>bc</sup>	—
L-PPFD	92±08 <sup>bc</sup>	63±15 <sup>ab</sup>	106±13 <sup>c</sup>	63±9 <sup>ab</sup>	125±15 <sup>c</sup>	—
(total)						
H-PPFD	382±45	369±40	420±80	345±20	386±41	—
L-PPFD	374±19	218±36	348±43	281±59	424±25	—
Acclimation <sup>y</sup> (aerial part)						
H-PPFD	983±174 <sup>cde</sup>	950±67 <sup>bcde</sup>	793±71 <sup>bc</sup>	—	861±67 <sup>bcd</sup>	—
L-PPFD	1206±127 <sup>e</sup>	—	699±100 <sup>b</sup>	405±40 <sup>a</sup>	1116±81 <sup>de</sup>	—
(relative dry weight)						
H-PPFD	19.8±0.6 <sup>ab</sup>	18.4±0.4 <sup>a</sup>	20.1±0.7 <sup>ab</sup>	—	19.8±0.5 <sup>ab</sup>	—
L-PPFD	20.9±0.5 <sup>b</sup>	—	19.4±0.6 <sup>ab</sup>	19.7±0.6 <sup>ab</sup>	20.3±0.3 <sup>b</sup>	—
(roots)						
H-PPFD	508±49 <sup>bcd</sup>	429±40 <sup>bc</sup>	379±40 <sup>b</sup>	—	438±40 <sup>bc</sup>	—
L-PPFD	642±70 <sup>d</sup>	—	390±70 <sup>b</sup>	177±30 <sup>a</sup>	555±40 <sup>cd</sup>	—
(total)						
H-PPFD	1491±128 <sup>cd</sup>	1379±98 <sup>cd</sup>	1171±99 <sup>bc</sup>	—	1299±148 <sup>cd</sup>	—
L-PPFD	1848±196 <sup>d</sup>	—	937±150 <sup>ab</sup>	582±67 <sup>a</sup>	1669±129 <sup>d</sup>	—

### 3.3. DISCUSSIÓ

Durant la multiplicació, amb  $S_{30}$  i  $L_{50}$ , la contribució de la fotosíntesi al carboni total acumulat per les plantes cultivades dins els tubs més hermètics va ser d'un 36 % (taula 3.3.2). Aquest valor es troba dins el rang de variació (per raó del cultivar escollit) de fixació de  $CO_2$  (25-60 %) en *Rosa multiflora* cultivada sota condicions de tub hermètic, i mesurat amb marcatge de  $^{14}C$  (De Riek *et al.*, 1991; Debergh *et al.*, 1992). Fujiwara *et al.* (1987), utilitzant un mètode indirecte basat en mesures diàries d'intercanvi de  $CO_2$ , van concloure que en 12 espècies de plantes ornamentals crescudes en recipients tancats, la principal font de carbó era la sacarosa del medi. En cultius dins tubs permeables a l'intercanvi de gasos, la contribució del  $CO_2$  extern al carbó assimilat per les fulles va augmentar fins gairebé un 95 %, la qual cosa ens demostra el fort efecte d'aquest tractament. L'efecte de la variació d'altres condicions de cultiu, com ara l'augment de la intensitat de llum durant la multiplicació, no va produir una millora en la contribució de  $CO_2$  extern (Serret *et al.*, 1996).

Segons els resultats d'aquest treball, podem dir que el desenvolupament de la fotoautotròfia en gardènia micropropagada sembla estar limitat pel grau d'hermeticitat del tancament dels tubs (durant el fotoperíode, dins els tubs sovint es troben nivells més baixos de  $CO_2$  en comparació amb els tubs permeables al  $CO_2$ ) i també, és degut en part a la presència de sacarosa en el medi, sobretot en la fase de multiplicació (fig. 3.3.2, taula 3.3.2). Les plantes de l'estadi d'arrelament van mostrar unes característiques fotoautotròfiques més desenvolupades que en les de l'estadi de multiplicació. Altres autors havien arribat a conclusions molt semblants en altres tipus de plantes micropropagades utilitzant metodologies més cares i/o sofisticades com ara la mesura continuada d'intercanvi de gasos en el transcurs del desenvolupament o del marcatge amb isòtops radioactius (De Riek *et al.*, 1991; Kozai, 1991b, c; Kozai *et al.*, 1992b).

En principi, el fet de que un nivell baix de llum pugui estimular la fotoautotròfia podria semblar sorprenent. Generalment, s'accepta que el creixement fotoautotròfic *in vitro* s'estimula amb l'increment de la densitat fotònica fotosintètica (Lee *et al.*, 1985),

sobretot quan un PPFd alt s'associa amb enriquiment de CO<sub>2</sub> (Dubé i Vidaver, 1992; Kozai, 1991b, c). En el nostre experiment s'observa que amb llum baixa (L<sub>50</sub>) les plantes esdevenen més fotoautotròfiques que amb llum alta (L<sub>110</sub>) quan es cultiven en un medi amb sacarosa. En el primer estudi amb gardènies (experiment I), l'efecte de la llum alta sobre la fotoautotròfia no quedava gaire clar. Així, el nivell intermedi de llum (L<sub>110</sub> fora del tub) afavoria la fotoautotròfia solament durant l'estadi de multiplicació, mentre que un PPFd alt (L<sub>300</sub>) tenia l'efecte contrari. També s'ha de tenir en compte que un PPFd més gran afavoreix l'augment de la temperatura dins els tubs (experiment I), i que en la major part de les fulles i en condicions de baixa transpiració, pot ser fins i tot més alta. Normalment, les condicions de radiació d'un cultiu *in vitro* es refereixen a mesures preses en un prestatge sense pots de cultiu i no en un tub tapat situat entre altres i col·locats en una gradeta de cable d'acer. Per això, el PPFd que arriba a les plantetes acostuma a ser substancialment menor. Un estudi de Fujiwara *et al.* (1989) assenyala que el PPFd dins uns tubs de vidre de 47 ml de volum tancats amb taps d'alumini i col·locats en un prestatge per a cultius era un 76 % menor que la llum incident en el prestatge buit.

La diferència del grau de permeabilitat dels dos tipus de taps (hermètics i permeables) es pot deduir fàcilment a partir de la diferència en la concentració de CO<sub>2</sub> dins els tubs, durant el període de llum o de foscor. Així, mentre que la concentració de CO<sub>2</sub> dins la cambra de cultiu (750 µmol mol<sup>-1</sup>) era més del doble que la que es troba en condicions atmosfèriques normals, en els tubs més hermètics, arribava, després de 4 hores de llum, al voltant de 200 µmol mol<sup>-1</sup> i a més o menys el doble en els tubs més permeables als gasos (fig. 3.2). Concentracions estables de CO<sub>2</sub> entre 100-200 µmol mol<sup>-1</sup> o menors en tubs de cultiu relativament tapats durant el període de llum han estat descrites per alguns autors (Fujiwara *et al.*, 1992; Kozai, 1991b; Kozai *et al.*, 1990a; Kubota i Kozai, 1992; Righetti *et al.*, 1993; Solárová, 1989). En canvi, els nostres resultats sobre *t*<sub>50</sub> (fig. 3.1) suggereixen que el medi amb agar actua com a fort destí de CO<sub>2</sub>, la qual cosa pot tenir implicacions molt importants per suavitzar el patró de canvis de CO<sub>2</sub> dins els tubs de cultiu. De fet, altres autors (Debergh *et al.*, 1992) assenyalen que el nivell de CO<sub>2</sub> dins els pots tancats hermèticament segueix un típic canvi circadiari que

depen del període de llum i foscor, malgrat que sempre és més alt que la concentració atmosfèrica normal a l'exterior ( $350 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ). Però Debergh *et al.* (1992) van utilitzar un PPFD molt més baix que els autors anteriors ( $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), sense especificar si estava mesurat dins o fora dels pots de cultiu. Kozai *et al.* (1990 a), treballant amb plantes de *Cymbidium*, conclogueren que la concentració estable de  $\text{CO}_2$  durant el fotoperíode era menor dins el pot que fora a qualsevol PPFD més gran que  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Durant el període de foscor, el  $\text{CO}_2$  procedent de la respiració de les plantes es va acumular fins a concentracions d'uns  $1000 \mu\text{mol mol}^{-1}$  en els tubs permeables, mentre que va arribar a valors entre  $4000\text{-}9000 \mu\text{mol mol}^{-1}$  en els tubs hermètics. Resultats semblants van ser obtinguts per Fujiwara *et al.* (1987) en tubs tancats hermèticament. Aquesta acumulació de  $\text{CO}_2$  durant la foscor suggereix que aquesta mena de tubs representen un tipus de sistema relativament tancat. El carboni de la sacarosa del sucre de canya consumit per efecte de la respiració de les plantetes es pot acumular durant la foscor i podria ser refixat posteriorment per fotosíntesi durant el període de llum. Aquesta refixació, si té lloc, comportaria una subestimació del grau de desenvolupament fotosintètic (fotoautotròfia) aconseguit per les plantes. És a dir, la refixació del  $\text{CO}_2$  respirat en un sistema tancat com el dels tubs hermètics no comporta una posterior discriminació del  $\text{CO}_2$  reassimilat per les plantes (Farquhar *et al.*, 1989), i consegüentment la  $\delta^{13}\text{C}$  dels fotoassimilats no hauria de quedar afectada. Amb la metodologia actual, com ara la quantificació de la contribució fotosintètica en plantes micropropagades utilitzant dos substrats marcats com la  $^{14}\text{C}$ -sacarosa i  $^{14}\text{C}$ - $\text{CO}_2$ , podem també subestimar la capacitat fotosintètica real de les plantes cultivades en tubs o pots relativament hermètics. Per tant, la subestimació pot ser deguda a la refixació del  $\text{CO}_2$  acumulat per respiració sempre que aquest  $\text{CO}_2$  no es ventili periòdicament (De Riek *et al.*, 1991). Per altra part, en aquest estudi, la  $\delta^{13}\text{C}$  dels fotosintetitzats de les plantes cultivades amb tubs hermètics durant la fase de multiplicació (taula 3.2) va ser 4,33 % més gran que en les plantes dels tubs permeables als gasos. Aquest fet pot ser degut a la poca conductància del  $\text{CO}_2$  a través dels primers tubs. En aquest sentit, és interessant observar que el valor d'aquesta diferència és similar al que es va proposar com a

fraccionament dels isòtops del carbó per raó de la diferent difusió del CO<sub>2</sub> que conté <sup>12</sup>C i <sup>13</sup>C a través dels estomes (Farquhar *et al.*, 1989).

A part d'això, el nostre mètode senzill d'avaluació de la fotoautotròfia permet establir un barem de la contribució relativa del CO<sub>2</sub> extern com a font de carbó en les plantes cultivades *in vitro* en un gran nombre de tractaments i/o estadis de cultiu. En qualsevol tipus de tap, amb les mateixes característiques d'intercanvi de gasos amb l'ambient, aquesta tècnica permet ordenar els diferents tractaments, ja siguin els nivells de sacarosa o de llum o l'estadi de micropropagació, segons el grau relatiu de fotoautotròfia que assoleixen.

En experiments d'altres autors ja s'havia observat que el pes fresc i el pes sec aconseguits en les plantes cultivades *in vitro* és més gran en els tractaments d'ambients enriquits amb CO<sub>2</sub> que en els que no ho estan (Kozai *et al.*, 1990b; Kozai *et al.*, 1991a), independentment del contingut de sacarosa del medi de cultiu (Kozai *et al.*, 1991b). En els nostres resultats es va observar aquest patró només a la fase d'arrelament (taula 3.3). Durant la fase més primerenca de la multiplicació i amb l'excepció del medi sense sucre, la tendència era la contrària. Aquest fet es pot explicar pel menor desenvolupament de la fotoautotròfia durant la multiplicació si es compara amb l'arrelament (taula 3.1, fig. 3.3). Fujiwara *et al.* (1992) conclouen que en les plantes de patata *in vitro* i amb condicions de CO<sub>2</sub> i llum que afavoreixen la fotoautotròfia, els cultius van créixer i es van desenvolupar gràcies a la sacarosa del medi i abans que el balanç de CO<sub>2</sub> esdevingués positiu. En l'estadi de multiplicació de la gardènia, la concentració de sacarosa del medi té un efecte positiu sobre el pes final de les plantetes perquè és la font principal de carboni. Reuther (1991) constata un cert retard en el creixement de les plantes de diferents espècies quan les posa en medis sense sacarosa durant l'estadi de multiplicació. Durant l'arrelament, en ambients rics amb CO<sub>2</sub> i amb medis sense sacarosa, la producció de les plantes va ser comparable a la de les plantes cultivades amb sacarosa. També Reuther (1991) va observar que no es produïa retard en l'arrelament de *Pelargonium peltatum* i *Vitis vinifera* per raó de la falta de sacarosa en el medi de cultiu. En canvi, Galzy i Compan (1992) expliquen que el creixement s'incrementa durant l'arrelament de

*Vitis vinifera* quan es cultiva en condicions mixotròfiques (medi amb sacarosa) si ho compara amb els cultius fotoautotròfics (medi sense sacarosa).

Durant l'aclimatització, les plantes amb la fotoautotròfia més desenvolupada (les que creixien en tubs permeables i amb enriquiment de CO<sub>2</sub>) són les més eficients si tenim en compte el seu pes final (taula 3.3) o els valors de δ<sup>13</sup>C més baixos de la primera fulla desenvolupada (taula 3.1). Aquests resultats concorden amb els d'altres autors fets en diferents espècies micropropagades i trasplantades *ex vitro* (Kozai, 1991a, b). També hi ha resultats contradictoris com els de Capellades *et al.* (1990a, b) i Debergh *et al.* (1992) en altres espècies. Aquests autors assenyalen que les plantes menys fotoautotròfiques són les que s'adapten millor durant l'aclimatització. En la mateixa línia, Capellades *et al.* (1991) suggereixen que, en les condicions del seu experiment, aquelles plantes crescudes menys fotoautotròficament, van acumular midó en els seus cloroplasts, la qual cosa afavoria la seva posterior aclimatització. De totes maneres, els resultats poden explicar-se, almenys en part, per raó de la baixa intensitat de llum utilitzada: 25-30 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, sense especificar si la mesura és dins o fora dels pots. En canvi, segons el nostre primer experiment, les intensitats més elevades de llum durant la micropropagació es van associar a un augment de la temperatura dins els tubs respecte a la cambra de cultiu, i per tant, probablement a taxes majors de transpiració (Tanaka *et al.*, 1992; Fujiwara i Kozai, 1995). El resultat d'això és que les plantes cultivades *in vitro* poden expressar certes característiques xerofítiques o d'aclimatització a la llum (Desjardins, 1995; Serret *et al.*, 1996; Trillas *et al.*, 1995) semblants a les explicades per a fulles *ex vitro* (Araus *et al.*, 1986a; Araus i Hogan, 1994). Aquestes característiques morfofisiològiques podrien afavorir la posterior aclimatització en condicions *ex vitro*.

Amb la mesura de la δ<sup>13</sup>C de les fulles que es van desenvolupar durant l'aclimatització podem inferir si hi ha hagut estrès d'aigua durant aquest període. D'aquesta manera, hauríem d'esperar valors més alts (menys negatius) de δ<sup>13</sup>C com a conseqüència de l'estrès hídric (Farquhar *et al.*, 1989; Condon *et al.*, 1992; Araus *et al.*, 1993). En la primera fulla desenvolupada, els valors significativament més alts del δ<sup>13</sup>C d'algunes plantes crescudes en els tubs hermètics comparats amb els de plantes de tubs

permeables semblen indicar que els primers van sofrir estrès d'aigua després del trasplantament. El creixement *in vitro* en condicions més fotoautotròfiques afavorit per la no-hermeticitat dels tubs permeables (juntament amb una atmosfera externa d'alt CO<sub>2</sub>) podria estimular el desenvolupament de les adaptacions de les plantes contra un excés de pèrdua d'aigua per transpiració. En aquest cas, un sistema d'arrels més desenvolupat (taula 3.3), la presència de cutícules i ceres epicuticulars, juntament amb estomes més funcionals (Sutter, 1983; Capellades *et al.*, 1990a, b; Desjardins, 1995) en les plantes més fotoautotròfiques (dels tubs permeables) esdevenen factors que ajudarien a prevenir l'aparició d'estrès d'aigua durant l'acimatització. L'absència de diferències en els valors de  $\delta^{13}\text{C}$  en la segona fulla desenvolupada explica que totes les plantes ja estaven aclimatades *ex vitro* quan es va desenvolupar. Les plantes aclimatades que provenen dels diferents tractaments *in vitro*, van presentar, en general, quocients menors entre el pes de la part aèria i el pes de les arrels que els que presentaven les plantes després de l'arrelament. Durant l'acimatització, en tots els casos, els quocients es van situar al voltant de 2, encara que les plantes que provenien dels tubs tancats tenien valors un 10-15 % més elevats.

En resum, aquests resultats mostren la utilitat d'analitzar la  $\delta^{13}\text{C}$  de les fulletes *in vitro* que ja es va observar en el primer experiment, com a tècnica simple per comprovar el desenvolupament de la fotoautotròfia durant el cultiu *in vitro*. A més a més, la utilització de l'anàlisi de  $\delta^{13}\text{C}$  es pot estendre per avaluar les condicions de cultiu durant l'acimatització *ex vitro*. Les plantes procedents dels tractaments *in vitro* menys fotoautotròfics es van mostrar més afectades per les condicions hídriques durant la primera fase de l'acimatització.