

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) 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) 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) 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.

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

M. Dolors Serret Molins

Barcelona, 2001



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

Autora

Dra. M. Isabel Trillas Gay

Dr. Francesc X. Martínez

M. Dolors Serret Molins

AGRAÏMENTS

Vull expressar el meu agraïment a totes aquelles persones, col·lectius i institucions que, directament o indirectament han contribuït a la realització d'aquest treball de recerca.

Als directors d'aquesta tesi, Dra. Maribel Trillas, per haver acceptat la direcció, i per la seva ajuda i amistat; sempre ha estat al meu costat quan ha calgut i m'ha transmès l'energia i l'entusiasme que la caracteritzen i al Dr. Francesc X. Martínez, director d'aquesta tesi, pel seu suport, ajuda, consell i comentaris assenyats tan al començament com al final del treball.

A la Dra. Núria Cañameras, perquè ella va ser qui em va familiaritzar amb totes les tècniques del cultiu *in vitro*, a l'Escola d'Enginyeria Tècnica Agrícola de Barcelona.

Als professors i companys del Departament, per la seva amistat i suport durant tot aquest temps, i molt especialment a Roser Garcia, per la seva valuosa ajuda en tota la feina de laboratori i amb qui hem compartit molts moments de treball al laboratori i a la cambra fosca, fent les mesures de fluorescència. També al Dr. Jordi Bort pel seu ajut en qüestions d'informàtica.

Al Servei de Camps Experimentals de la Universitat de Barcelona, dirigit pel Sr. Ricardo Simonneau, per la seva ajuda i pel seu suport en la preparació de la cambra d'ambient controlat; particularment, a Josep Matas per posar a punt diferents tècniques experimentals, especialment les mesures de fotosíntesi i d'intercanvi de gasos. I al Dr. Jaume Casadesús, per la seva capacitat d'idear muntatges i per col·laborar en la preparació de

l'equip necessari per fer mesures d'espectroradiometria en material *in vitro*.

Així mateix, vull agrair al Servei de Microscopia de la Universitat de Barcelona la seva col·laboració en la preparació del material i la seva ajuda en les observacions de microscopia electrònica de transmissió i de rastreig.

A la Direcció General de Recerca, Generalitat de Catalunya, pel suport econòmic durant l'any 1999 i 2000, mitjançant una beca predoctoral per a l'acabament de tesis doctorals d'interès rellevant industrial, social o empresarial (1999TDOC00041).

Als meus pares, particularment a la mare, per la seva col·laboració a l'hora d'aguantar els seus néts. A Anna, Pau i Isaac, per suportar aquesta tesi amb paciència i a la vegada amb interès. A Josep Lluís, pels ànims que m'ha donat en tot moment.

També al Servei de Llengua Catalana de la Universitat de Barcelona per la revisió lingüística de la tesi.

MOLTES GRÀCIES A TOTS

INDEX

INTRODUCCIÓ	7
0. Presentació	9
1. El cultiu <i>in vitro</i> i l'ambient que l'envolta	13
1.1. Sistema de cultiu	13
1.1.1. Llum	
1.1.2. Temperatura	
1.1.3. Humitat	
1.1.4. Composició dels medis de cultiu	
1.1.5. Atmosfera dins el pot de cultiu	
2.2. Característiques estructurals de les plantes micropropagades	26
2. Aclimatització	27
3. Paràmetres fisiològics d'avaluació del desenvolupament fotosintètic	29
3.1. Fluorescència de la clorofil·la	30
3.2. Elèctrode d'oxigen	32
3.3. Composició en isòtops estables de carboni $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	33
OBJECTIUS	39
MATERIALS I MÈTODES	43
1. Material vegetal	43
1.1. Obtenció dels explants	43
2. Mètodes	44
2.1. Medi de cultiu	44
a) Experiment I	
b) Experiment II	
2.2. Condicions de cultiu	45
a) Experiment I: Llum i temperatura	
b) Experiment II: Llum, temperatura i CO_2	

2.3. Mesura de les condicions ambientals dins els tubs de cultiu	48
a) Mesura de la radiació fotosintèticament activa	
b) Radiació total dintre de la cambra de cultiu	
c) Humitat relativa i temperatura de l'aire	
d) Temperatura de fulla	
2.4. Estimació del grau d'autotròfia de les plantetes cultivades <i>in vitro</i>	49
a) Experiment I	
b) Experiment II	
2.5. Avaluació de l'estrés durant les últimes fases de cultiu <i>in vitro</i> i l'acimatació	53
a) Experiment I	
b) Experiment II	
2.6. Mesura d'intercanvi de gasos	54
2.6.1. Mesura de la concentració de CO ₂ dins els tubs de cultiu	54
2.6.2. Elèctrode d'oxigen	55
2.7. Anatomia i ultraestructura	56
a) Fixació	
b) Deshidratació	
c) Inclusió	
d) Obtenció dels talls	
e) Observació	
2.8. Determinació del contingut de pigments fotosintètics	58
2.8.1. Presa de mostres	
2.8.2. Extracció i quantificació	
2.9. Anàlisi de dades	59

RESULTATS I DISCUSSIÓ 59

1. Fotoautotròfia i fotoinhibició durant la micropropagació.	
1.1. Introducció	61
1.2. Resultats	64
1.3. Discussió	77

2. Efectes de les condicions de cultiu en l'anatomia, la ultraestructura i la fotosíntesi en gardènies cultivades <i>in vitro</i> .	
2.1. Introducció	85
2.2. Resultats	87
2.3. Discussió	96
3. Efecte de diferents paràmetres ambientals sobre el creixement de plantetes de gardènia durant la micropropagació i la posterior aclimatització <i>ex vitro</i> .	
3.1. Introducció	103
3.2. Resultats	105
3.3. Discussió	115
4. Micromorfologia de la superfície foliar de <i>gardenia jasminoides</i> durant la micropropagació i l'aclimatització posterior.	
4.1. Introducció	123
4.2. Resultats	124
4.3. Discussió	137
5. Efecte de les condicions de cultiu <i>in vitro</i> en el desenvolupament fotoautròfic de plantes de gardènia durant la micropropagació i l'aclimatització <i>ex vitro</i> .	
5.1. Introducció	143
5.2. Resultats i discussió	146
a) Micropropagació	146
b) Aclimatització	163
CONCLUSIONS	175
BIBLIOGRAFIA	181

ABREVIACIONS

ABA	Àcid abscísic
AIA	Àcid indolacètic
AP	Fotosíntesi aparent
BA o BAP	Benziladenina
Chl	Contingut total de clorofil·les (a + b)
Chl a/b	Quocient entre clorofil·les a respecte a b
Chl/Car	Quocient entre contingut total de clorofil·les i carotenoides
Δ	Discriminació isotòpica del carboni
DIF	Diferència de temperatures entre el període de llum i de foscor
DM	Pes sec
F_0	Fluorescència basal
FM	Pes fresc
F_m	Fluorescència màxima
F_v	Fluorescència variable
F_v/F_0	Fluorescència variable respecte a la basal
F_v/F_m	Fluorescència variable respecte a la màxima
GA ₃	Àcid giberèl·lic
H-PPFD	Densitat de flux fotònic fotosintètic de $100 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
HR	Humitat relativa
H-Suc	Medi amb 30 g l^{-1} de sacarosa
IBA	Àcid indolbutíric
IRGA	Analitzador de gasos per infraroig
$\delta^{13}\text{C}$	Composició isotòpica del carboni
L ₅₀	Densitat de flux fotònic fotosintètic de $50 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
L ₁₀₀	Densitat de flux fotònic fotosintètic de $100 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
L ₁₁₀	Densitat de flux fotònic fotosintètic de $110 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
L ₃₀₀	Densitat de flux fotònic fotosintètic de $300 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
L-PPFD	Densitat de flux fotònic fotosintètic de $50 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
LS-tubs	Tubs amb tap permeable a l'intercanvi de gasos
L-Suc	Medi amb 5 g l^{-1} de sacarosa
MET	Microscopi electrònic de transmissió
MS	Medi de Murashige i Skoog
NAA	Àcid naftalenacètic
NPq	Extinció no fotoquímica
N-Suc	Medi sense sacarosa
PAR	Radiació fotosintèticament activa
Pq	Extinció fotoquímica
PPFD	Densitat de flux fotònic fotosintètic
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
q	Extinció de la fluorescència
R _d	Respiració a la foscor

Rubisco	Ribulosa bi-fosfat carboxilasa
SEM	Microscopi electrònic de rastreig
S ₀	Medi sense sacarosa
S ₅	Medi amb 5 g l ⁻¹ de sacarosa
S ₁₅	Medi amb 15 g l ⁻¹ de sacarosa
S ₃₀	Medi amb 30 g l ⁻¹ de sacarosa
SPAD	Contingut relatiu de clorofil·les totals, mesurat amb aquest mètode
t _{1/2}	Meitat de temps perquè la fluorescència passi del nivell F ₀ a F _m
t ₅₀	Meitat de temps necessari perquè la meitat del CO ₂ s'escapi del tub
TE	Eficiència de la transpiració
TS-tubs	Tubs tapats hermèticament
VPD	Pressió parcial de vapor d'aigua
WUE	Eficiència en l'ús de l'aigua

INTRODUCCIÓ

0. PRESENTACIÓ

Aquest treball s'inicià l'any 1993 al laboratori de cultiu *in vitro* de la Unitat de Fisiologia Vegetal de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, i suposà la integració de dues línies ja existents en aquesta Unitat: el cultiu *in vitro* de material vegetal i l'ecofisiologia fotosintètica.

El cultiu *in vitro* dels vegetals es pot definir com el creixement o desenvolupament de plantes superiors a partir d'òrgans, teixits, cèl·lules o protoplasts en un medi nutritiu de composició definida i en ambients estèrils i controlats dins un tub o pot de vidre o plàstic (Vieitez *et al.*, 1987). És una eina molt important en biotecnologia. S'utilitza per a la propagació, la millora genètica, la producció de metabòlits secundaris, en estudis de fisiologia, de patologia i en la preservació i emmagatzematge de recursos genètics.

La micropropagació o multiplicació vegetativa de les plantes *in vitro* és una tècnica que consisteix en el cultiu de fragments de plantes en condicions estèrils amb l'objectiu de multiplicar de manera intensiva l'exemplar d'origen. Aquesta tècnica ens permet clonar quasi totes les plantes superiors en poc temps i amb unes condicions definides pel que fa als ambients físic i químic. La finalitat de la micropropagació és obtenir un gran nombre de plantes genèticament idèntiques, fisiològicament uniformes, amb desenvolupament normal, i autotròfiques, és a dir, que utilitzen CO₂ atmosfèric com a principal font de carbó, per poder ser cultivades en condicions d'hivernacle en un període curt de temps i a baix cost.

La micropropagació és una indústria molt important i reeixida a tot arreu del món (Vasil i Thorpe, 1994). Pel que fa a la seva importància econòmica, podem dir que actualment al món es fan més de 500 milions de plantes micropropagades l'any, i d'aquestes, la majoria són ornamentals. Per exemple, a l'Europa occidental, el 100 % de la propagació de *Gerbera jasmesonii*, el 90 % de *Spathiphyllum* i el 75 % d'*Anthurium*

spp, es fa amb aquesta tècnica (Debergh, 1994). Els països de l'est d'Europa, Polònia i Hongria en són productors importants. Àsia de l'est també juga un paper molt important en la micropropagació. De totes maneres, l'ús comercial de la micropropagació és encara reduït perquè comporta uns costos elevats de producció, resultat de la necessitat de determinades instal·lacions i utilatge, de mà d'obra qualificada, de la baixa taxa de multiplicació *in vitro* d'algunes espècies vegetals i de la supervivència durant l'acclimatització.

El procés de la micropropagació és pot dividir en tres estadis (Murashige, 1974):

- Estadi I:** establiment del cultiu asèptic.
- Estadi II:** multiplicació dels explants.
- Estadi III:** arrelament.

Més tard, Debergh i Maene (1981) van introduir l'**Estadi 0**: selecció i preparació de la planta mare a l'hivernacle, de la qual se n'obtenen els explants. A la vegada, van subdividir l'estadi III en altres dos:

- Estadi III a:** elongació de les tiges.
- Estadi III b:** producció d'arrels a les tiges.

Posteriorment, George i Sherrington (1984) van definir un últim estadi:

- Estadi IV:** acclimatització de les plantes crescudes *in vitro* a les condicions *ex vitro* d'un hivernacle.

En un procés normal de micropropagació, els explants que estan en les fases de diferenciació, multiplicació o arrelament creixen amb sacarosa en el medi de cultiu. Les plantes, en la fase d'acclimatització, han de créixer sense sacarosa en el substrat. És a dir, en el primer cas, els explants es comporten com a heterotròfics o mixotròfics. En canvi, durant l'acclimatització, han d'acabar de desenvolupar l'autotròfia. Les plantes heterotròfiques o mixotròfiques necessiten nutrients orgànics com ara vitamines, àcids orgànics i sacarosa, que són la seva font d'energia i carbó per al seu creixement. Les plantes autotròfiques requereixen la llum com a font d'energia, més CO₂, H₂O i sals

minerals. Amb tot això, i mitjançant el procés de la fotosíntesi, poden produir tots els components orgànics necessaris. Aquest canvi tan dràstic al començament de l'aclimatització hauria de tenir-se en compte a l'hora de parlar de diferents estratègies per a aquesta fase.

La història del cultiu *in vitro* ha estat llarga. Segons White (1943) i Gautheret (1985) es pot dividir en cinc períodes:

— 1834-1900: el concepte de totipotència cel·lular i la seva demostració per cèl·lules s'inclouïa en els tractats de teoria cel·lular, però mai no es va expressar clarament com un concepte diferent, atès que durant aquest període no es va provar experimentalment. A finals del segle XIX se sabia que les plantes podien viure en una solució de diferents sals minerals.

— 1901-1922: Haberland, l'any 1902, va perfilar per primera vegada la idea del cultiu de teixits en el seu ampli aspecte, i va cultivar cèl·lules aïllades en una solució de Knop addicionada amb sacarosa, però les cèl·lules creixien i no es dividien. Més tard, Harrison (1907) i Burrows i Carell (1910) ho van posar en pràctica en teixits animals. L'any 1913, Haberland donà una nova orientació als seus treballs i va aconseguir divisió cel·lular en discs de patata provistos de floema (tubs cribosos i cèl·lules acompanyants). Kotte i Robbins, independentment, l'any 1922 van cultivar trossos d'arrels durant períodes breus.

— 1923-1934: nombrosos intents sense èxit es van succeir en diferents direccions. L'any 1934 es va descobrir l'àcid indolacètic (AIA). També, White i Gautheret van donar una nova orientació al tema; el primer va demostrar la possibilitat de fer créixer arrels aïllades durant períodes il·limitats de temps, i el segon va demostrar la possibilitat d'obtenir *in vitro* fragments de càmbium. Posteriorment es va descobrir la tiamina, que també juga un paper important en els processos de diferenciació i de creixement. Va ser un període de ràpida expansió, de perfeccionament de solucions de nutrients i de condicions de cultiu, i d'establiment de les tècniques de cultiu *in vitro*.

— 1935-1959: L'any 1939 es va identificar la giberel·lina A, posteriorment anomenada àcid giberèl·lic o GA₃. A partir dels anys 50 es produeix un gir molt gran, i Hoagland i Arnon revelen que quasi totes les plantes poden viure en una solució que contingui els tretze elements minerals essencials per al creixement. L'any 1957, Skoog i Miller purifiquen i caracteritzen una citoquinina i demostren que, segons el nivell baix o alt d'aquesta hormona, es podien desenvolupar arrels o tiges en un teixit de call de tabac. L'any 1958, Steward *et al.* obtenen embrions a partir de teixits somàtics. L'any 1959, Gautheret cultiva teixits d'arrel de pastanaga i observa que per obtenir un bon creixement ha d'afegir-hi auxines.

— 1960 - fins avui: paral·lelament al final de l'etapa anterior i fins a 1962, Miller, Skoog i Murashige desenvolupen medis nutritius i condicions de cultiu adequats per a treballs *in vitro*. El 1970 s'aconsegueix la regeneració de plantes a partir de protoplasts. Des de 1986 i fins avui, els estudis relacionats amb aquests temes serveixen per optimitzar les condicions de creixement *in vitro* i per aconseguir unes condicions de cultiu més fotoautotròfiques. La tendència actual és d'aprofundir molt en els estudis ecofisiològics doncs permeten optimitzar les condicions del cultiu durant la micropropagació i la seva aclimatització posterior a condicions *ex vitro*.

1. EL CULTIU *IN VITRO* I L'AMBIENT QUE L'ENVOLTA

1.1. Sistema de cultiu

En principi, un pot de cultiu es pot considerar un hivernacle en miniatura. També podem comparar-lo amb una cambra de cultiu. Això vol dir que les relacions entre una planta i el seu ambient, dins i fora el recipient de cultiu són similars a les que té una planta a l'interior de l'hivernacle i l'ambient dins i fora del mateix. A la pràctica, però, l'ambient normal dins un sistema de cultiu *in vitro* és força diferent del d'un hivernacle, i moltes vegades es produeixen plantes que presenten problemes fisiològics i patològics, per raó precisament, de les condicions ambientals en què es desenvolupa el cultiu *in vitro* (Debergh i Maene, 1984). Les plàntules que provenen del cultiu *in vitro* tradicional, presenten normalment unes característiques físiques i fisiològiques determinades; per exemple:

- poca formació de ceres epicuticulars
- mal funcionament dels estomes i baixa densitat estomàtica
- baix contingut en clorofil·les
- baix percentatge de matèria seca
- teixits esponjós, de palissada i sistema vascular poc estructurats
- baixa capacitat fotosintètica
- poques arrels o arrels secundàries molt petites

Aquestes característiques són sovint indesitjables per una posterior aclimatització de les plantes a condicions *ex vitro*. Quan es fa el traspàs d'una plàntula crescuda dins d'un contenidor relativament tancat, on hi ha unes condicions microambientals molt particulars i on es comporta heterotròficament o mixotròficament, en un hivernacle, on les condicions ambientals són molt diferents, la planta està obligada a comportar-se de manera autotròfica.

Desenvolupar un model de creixement per a plantes *in vitro* hauria de ser més fàcil que per a un cultiu de camp perquè molts paràmetres ambientals, per exemple, la temperatura i la intensitat de llum, han de ser constants tot el temps. Sorprenentment, però, s'ha fet molt poca recerca sobre el control dels factors físics ambientals

(microambient) que afecten les plantes dins un recipient, amb la finalitat d'incrementar la seva productivitat en els diferents estadis del cultiu *in vitro* i la seva supervivència durant l'acclimatització. Aquest fet és evident si ho comparem amb la gran quantitat d'estudis en plantes crescudes *ex vitro* (ja sigui en hivernacle o en el camp). Això és degut en part que els recipients de cultiu tradicionals (pots i tubs) són de petit volum i sovint hermètics o amb una taxa baixa de renovació d'aire, cosa que fa difícil la mesura dels paràmetres ambientals. La recerca actual indica que els factors físics, com també els químics, afecten els processos fisiològics i morfològics dels cultius (Hayashi *et al.*, 1992 a; Lumsden *et al.*, 1994; Kozai i Smith, 1995). Aquests processos són la fotosíntesi, la respiració, la transpiració, l'assimilació de minerals, la sacarosa i l'aigua del medi de cultiu, els quals, sens dubte, afecten el creixement i desenvolupament dels cultius (multiplicació, allargament de les tiges, desenvolupament de les fulles, arrelament, etc.). Així doncs, en aquest estadi de la recerca dels cultius *in vitro* podríem introduir un nou concepte d'estudi titulat: **l'ecosistema dels cultius *in vitro* i el seu ambient.**

Tradicionalment, un ambient *in vitro* es caracteritza (Kozai *et al.*, 1992 b) per:

- poca llum
- temperatura constant
- humitat relativa alta
- font orgànica de carbó (principalment sacarosa) en el medi de cultiu
- sals minerals, aminoàcids, vitamines i hormones a concentracions elevades en el medi de cultiu
- grans oscil·lacions en la concentració de CO₂ durant el dia

Totes aquestes condicions condueixen a taxes baixes de transpiració, de fotosíntesi, d'intercanvi d'aigua i nutrients, i a una taxa alta de respiració a les fosques. Com a conseqüència de tots aquests factors obtenim poc creixement dels cultius i, sovint, problemes durant l'acclimatització posterior. Un control adequat d'aquest microambient afavoreix el desenvolupament i el creixement de les plàntules, redueix els trastorns fisiològics i morfològics i estimula el creixement més ràpid i vigorós dels cultius durant l'acclimatització (Jeong *et al.*, 1995). A la vegada, caldria esperar una

reducció en els costos de producció.

Observem ara amb més detall cadascun dels paràmetres ambientals esmentats anteriorment:

1.1.1. Llum

La llum afecta el creixement i el desenvolupament de les plantes per raó de l'efecte sobre el fotoperíode, la fotosíntesi i la fotomorfogènesi. La llum, pel que fa a la seva duració, intensitat i qualitat de l'espectre (Bidwell i McLachlan, 1983; Young i Cameron, 1985) és important per regular els processos de fotomorfogènesi també en condicions *in vitro*. S'ha demostrat que el fotoperíode té un efecte important en el creixement dels cultius *in vitro* (Debergh i Maene, 1977; Hughes, 1981; Economou i Read, 1986; 1987). Afecta de diferents formes segons les espècies perquè algunes plantes responen bé a la foscor, d'altres a la llum continuada i d'altres a condicions intermèdies (Morini *et al.*, 1991). Les condicions més favorables de creixement per a la gran majoria de plantes són entre 16-18 hores de llum o una mica menys (Morini *et al.*, 1991). Per exemple, en brots d'azalea (Economou i Read, 1986) i en cultivars de pomera (Yae *et al.*, 1987), l'allargament del fotoperíode de 16 a 24 hores va reduir la taxa de proliferació. En altres espècies es va trobar poca diferència de creixement com a resposta a la variació del fotoperíode (Bressan *et al.*, 1982; Morini *et al.*, 1990). Aquests últims autors també han trobat que després de 6-8 setmanes de cultiu, el pes sec, el pes fresc i el nombre de tiges de roure havia augmentat fent quatre cicles de 4 h/2 h en comptes d'un de sol de 16 h/8 h, probablement a causa de les variacions en la concentració de CO₂ dins els pots de cultiu. Estudis de fotoperíode fets en *Prunus cerasifera* i *Malus pumila* Mill (Zacchini *et al.*, 1997) demostren el seu efecte sobre la densitat estomàtica, que és més alta en les plantes sotmeses a llum continuada que les plantes que han crescut a les fosques. A més, una mateixa quantitat de radiació diària, però distribuïda en diferents cicles comporta variacions en la diferenciació estomàtica (és millor diversos cicles de 4:2 h que un de sol de 16:8 h), i s'obtenen resultats intermedis entre els valors anteriors.

La intensitat de la llum és un altre factor important i, en aquest sentit, Infante *et al.* (1989) van observar un increment en el pes sec i en el % pes sec/pes fresc d'*Actinida deliciosa* quan van augmentar la densitat de flux fotònic fotosintètic (PPFD) des de 30 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ fins a 250 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$. Ara bé, la taxa de proliferació va incrementar fins a 120 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$, però va disminuir en PPFD més alts. Els requeriments de llum durant la micropropagació presenten molta variabilitat. Murashige (1974), per a la multiplicació de propàguls d'azalea i Economou i Read (1986), per al seu arrelament troben necessària una intensitat baixa de llum (aproximadament entre 20 i 60 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$), mentre que Murashige i Jones (1974) i Hussey (1978) suggereixen nivells molt alts de llum (entre 140 i 200 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$) per a l'arrelament d'aquests propàguls. Ara bé, en l'estadi III de la micropropagació pot ser interessant augmentar la radiació, a fi i efecte de preparar les plantetes per al seu traspàs a l'hivernacle.

També és important la font d'il·luminació sota la qual creixen les plàntules cultivades *in vitro*, pel fet que això influirà en la qualitat de la llum fotosintèticament activa i en les regions espectrals de l'infraroig (Bubenheim *et al.*, 1988). Quan es va iniciar la tècnica del cultiu *in vitro*, les llums que s'utilitzaven eren bàsicament làmpades fluorescents de llum blanca i se suposava que aquestes cobririen totes les necessitats espectrals dels cultius *in vitro*. Més tard, però, es va veure que presentaven certes limitacions (Bula *et al.*, 1991). Avui es fa servir llum blanca combinada amb llums incandescents o llum vermella. Appelgren (1991) va comprovar que l'exposició d'explants de *Pelargonium* durant 18 h/dia entre 6-8 setmanes a una llum vermella de 30 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ augmentava significativament l'elongació de les tiges en comparació amb la llum blanca o amb la llum incandescent per a una mateixa intensitat, mentre que una llum blava inhibia fortament l'elongació. La llum incandescent augmenta tant el diàmetre de la tija com l'elongació dels peciols de les fulles. La qualitat de la llum també es controla afegint-hi fonts suplementàries com poden ser làmpades fluorescents que emeten llum monocromàtica, i a més es poden combinar amb filtres de llum. En un experiment recent (D'Onofrio *et al.*, 1998) es va estudiar l'efecte de la qualitat de la llum sobre l'embriogènesi somàtica de fulles de codony, i es va arribar a la conclusió que aquella era més gran en els cultius amb llum vermella, i que disminuïa progressivament

en el pas vermella+blava i llum blanca. De totes maneres, en aquest moment la bibliografia encara és escassa i és difícil atribuir un paper determinat als diferents tipus d'espectres.

En un experiment de micropropagació convencional, la font de llum es col·loca per damunt els pots de cultiu i a una distància prudencial. Quan les làmpades es posen juntes, produeixen una distribució de la llum (PPFD) relativament uniforme sobre el prestatge de la cambra de cultiu. Això crea un gradient vertical de la radiació que reben les fulles, perquè les de dalt poden fer ombra a les de baix (Kozai, 1991 c). A més, la distribució d'aquesta llum dins el pot depèn del seu tipus, del tap (Aitken-Christie *et al.*, 1995; Solárová *et al.*, 1996) i del lloc on està col·locat en el prestatge (Aitken-Christie *et al.*, 1995).

Resumint, el mètode d'il·luminació, com també el fotoperíode, la font de llum i la seva disposició necessiten ser optimitzades a fi i efecte d'aconseguir unes condicions favorables per al creixement de les plàntules dins els pots de cultiu (Hayashi *et al.*, 1992b).

1.1.2. Temperatura

La majoria de les vegades la temperatura de la cambra de cultiu es fixa perquè sigui constant dia i nit, sense tenir en compte l'època de l'any, el grau de desenvolupament del material vegetal, l'espècie o l'estadi de cultiu. Però la distribució de temperatures dins el pot de cultiu és quelcom irregular en l'espai i en el temps. Així doncs, durant el període de llum, la temperatura és més alta dins el pot que a fora (Kozai *et al.*, 1992a). S'ha calculat que la temperatura de l'interior dels recipients de cultiu és entre 2-4°C més alta que a fora. Urban i Jaffrin (1990) van desenvolupar un model matemàtic per aplicar-lo a diferents condicions físiques per tal de preveure les variacions de temperatura dins el pot de cultiu.

Molts autors han definit els 24±1°C com la temperatura òptima en tots els estadis de cultiu *in vitro* de maduixera (Boxus, 1974; Lee i De Fossard, 1975; Waithaka *et al.*,

1980). Altres autors, com Hunter *et al.* (1983) van obtenir el creixement màxim a 28°C. També hi ha treballs (Kozai *et al.*, 1992a) que descriuen l'efecte de la diferència de temperatures entre el període de llum i el de foscor (DIF) a diferents intensitats de llum (74 i 147 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ sobre la morfogènesi i el creixement de la patata en atmosfera de CO_2 (1300-1500 $\mu\text{mol mol}^{-1}$). En general, tant si el PPFD és alt o si és baix, la longitud dels explants augmenta proporcionalment al DIF, mentre que el pes sec i el pes fresc no varien (Kozai *et al.*, 1992a). El nombre de fulles desenvolupades, en canvi, augmenta amb el descens del DIF. Com a conclusió podem dir que el DIF és una mesura eficient per controlar el creixement dels explants *in vitro*. Així, en el cas de producció a gran escala s'estalviarien costos en l'escalfament i en el refredament de les cambres. Watanabe *et al.*, (1992) conclouen que, a més del nivell de PPFD i de la relació fotoperíode/foscor, el DIF i les interaccions de tots aquests paràmetres tenen un paper important en el creixement i en el desenvolupament de les plantetes de menta i de patata.

1.1.3. Humitat

L'intercanvi d'aigua entre les plantetes, l'aire i el medi de cultiu dins el pot, com també les característiques de l'aire a fora del pot tenen un paper important en el creixement i en el desenvolupament de les plantes *in vitro*. Com en condicions *ex vitro*, la direcció i quantitat del flux d'aigua entre el pot i l'ambient extern es determina a través del gradient espacial en pressió parcial de vapor d'aigua (VPD) i de la conductivitat dels diferents elements del sistema.

La humitat relativa (HR) dins el pot de cultiu és un factor ambiental molt important perquè afecta les relacions hídriques dels cultius *in vitro*, i aquestes influeixen en els processos bioquímics i fisiològics. Normalment, la HR és alta dins el pot de cultiu. El cultiu *in vitro* convencional comporta inevitablement una saturació de l'atmosfera del pot de cultiu amb vapor d'aigua (Wardle *et al.*, 1983). Aquest fet pot provocar certes anormalitats en l'estructura i en el funcionament de les plantetes, per exemple, la falta de ceres epicuticulars (Grout i Aston, 1977; Sutter i Langhans, 1979; Fuchigami *et al.*, 1981), taxes de transpiració baixes, deficiències en la funcionalitat dels estomes i vitrificació (Schloupf *et al.*, 1995).

Normalment, els cultius *in vitro* tenen unes taxes de transpiració molt baixes, resultat del baix gradient d'humitat entre els espais intercel·lulars de les fulles i de l'atmosfera saturada del pot. Blanke i Belcher (1989) deduiren que aquest baix gradient era el responsable de la falta d'estomes funcionals en pomeres cultivades *in vitro*. La combinació d'estomes no funcionals i la falta de ceres epicuticulars fan que hi hagi una pèrdua incontrolada d'aigua en el moment de transferir les plantetes a un ambient de baixa humitat (Whish *et al.*, 1992). A més a més, una atmosfera saturada d'aigua també redueix la transpiració estomàtica, que, a la vegada, pot reduir la captació de nutrients, per exemple el Ca i el B, en condicions *in vitro*.

Tanaka *et al.* (1992) van observar en plantes de patata cultivades *in vitro* una correlació positiva entre una menor HR dins el pot de cultiu i un augment de la resistència de la cara abaxial de la fulla en la transpiració. En un altre sentit, Capellades *et al.* (1990 b) van demostrar que plantetes de *Rosa multiflora* cultivada *in vitro* a 80 % d'HR s'assemblaven molt a plantes crescudes a l'hivernacle.

Sallanon i Coudret (1990) van mesurar el déficit de pressió de vapor de l'atmosfera interna del pot de cultiu i el potencial hídric de les plantes *in vitro* i de l'agar del medi per estudiar els intercanvis d'aigua entre les plantetes i el seu ambient. Un increment de la temperatura provocaria, en un principi, un major VPD, però també podria augmentar l'evaporació d'aigua del medi i/o de les plantes. El VPD resultant depèn de la combinació d'aquests dos fenòmens.

Hi ha diverses formes de reduir la HR dins els pots de cultiu com ara: obrir els pots en intervals cada vegada més llargs (Vilaplana-Marshall i Mullins, 1986), posar tapes semipermeables (Roberts *et al.*, 1992), refredar la tapa dels pots o la base (Vanderschaeghe i Debergh, 1987), usar solucions saturades de sal (Whish *et al.*, 1992; Fujiwara *et al.*, 1993), usar glicerol (Forney i Brandl, 1992). Fins i tot, Wardle *et al.* (1983) van posar una capa de lanolina sobre la superfície del medi de cultiu i unes bosses de gel de sílice per reduir la HR. El resultat, en fulles de crisantem, va ser una menor obertura estomàtica i una gran quantitat de ceres, i en *Brassica oleracea*, una taxa

reduïda de pèrdua hídrica en baixa HR. En la vinya, l'ús de paclobutrazol i una HR baixa va millorar molt la resistència de les plantes durant l'aclimatització. Així doncs, les plantes presentaven poca obertura estomàtica, tiges més curtes i arrels més fines. A més, el paclobutrazol provoca una reducció de l'àrea foliar, però incrementa el nombre d'arrels (Novello i Roberts, 1992; Smith *et al.*, 1992).

1.1.4. Composició dels medis de cultiu

La formulació del medi de cultiu és un factor important a l'hora de definir els protocols de cultiu dels teixits. Si es varia el contingut de nutrients en el medi, podem regular el creixement de les plantetes o dels teixits. El volum de medi que s'utilitza és relativament petit (4-10 mL per explant), si es compara amb el que es fa servir en sistemes *ex vitro*. Per afavorir el màxim creixement de les plantes, un medi ideal ha de contenir prou quantitat d'elements essencials (sals minerals –macro i microelements–), i substàncies orgàniques com ara vitamines i aminoàcids, a més de sacarosa com a font d'energia i carbó en condicions de creixement heterotròfic o mixotròfic, fins al final del període de cultiu. A més, els cultius necessiten reguladors del creixement o fitohormones, que són molt importants per al creixement i desenvolupament dels teixits; s'utilitzen a baixes concentracions. Les més emprades són les citoquinines (zeatina, que és natural, i la benziladenina (BA) i la quinetina, que són sintètiques), les auxines com l'AIA (àcid indolacètic, que és natural), IBA (àcid indolbutíric, que és sintètic), NAA (àcid naftalenacètic, també sintètic), i les giberel·lines, entre les quals destaquen la GA₃ o àcid giberèl·lic, que és natural. Les citoquinines actuen sobre la divisió cel·lular, les auxines ho fan sobre el creixement de les cèl·lules i les giberel·lines actuen sobre l'elongació dels entrenusos (Augé, 1995). De totes maneres, totes actuen amb interacció les unes amb les altres i en petites dosis. A més, els requeriments i equilibris hormonal són funció de l'espècie i cultivar. S'ha de tenir en compte que la davallada de tots aquests nutrients i hormones en el període de subcultiu no ha de limitar-ne el creixement. Paral·lelament, les concentracions inicials han de ser les mínimes necessàries a fi de minimitzar els costos de producció i evitar a les plantes els estressos químics i d'aigua, especialment en els primers estadis del cultiu. Estudis de Sallanon *et al.* (1997) conclouen que durant la fase de multiplicació, en plantes de *Juglans regia*, els ions

amoni i fosfat s'esgoten abans que els altres minerals i això ho relacionen amb taxes altes de multiplicació cel·lular, mentre que els ions sulfat, magnesi i calci desapareixen progressivament quan el creixement és baix o nul. De totes maneres, encara que hi hagi una disminució d'algun nutrient essencial no es pot dir que hi ha una deficiència de nutrients.

Sempre s'havia considerat que els explants tenen poca capacitat fotosintètica i, per tant, que necessiten sacarosa en el medi de cultiu per utilitzar-la com a font de carboni i energia. Així doncs, tradicionalment, les plantes *in vitro* s'han cultivat en condicions mixotròfiques (amb poca llum i amb sacarosa en el medi de cultiu, i aprofitant els carbohidrats produïts per la fotosíntesi) o heterotròfiques (sense llum i amb una font de sacarosa en el medi). Avui en dia es tendeix cada cop més a desenvolupar sistemes de creixement *in vitro* més fotoautotròfics, és a dir, on la planta pugui rebre CO₂ de l'exterior, amb més intensitat de llum i amb reducció de la quantitat de sacarosa del medi de cultiu. En un cultiu *in vitro* tradicional, la quantitat de sacarosa que s'acostuma a utilitzar oscil·la entre 20-30 g l⁻¹. Ara bé, s'han fet experiments molt recents en plantes de patata en els quals s'ha posat 30 i 80 g l⁻¹, com es descriu a Wolf *et al.* (1998), i els autors arriben a la conclusió que les plantetes presenten uns pesos sec i fresc més alts amb menys quantitat de sacarosa en el medi en cultius crescuts amb una intensitat de llum de 100 μmol m⁻²s⁻¹ i amb un fotoperíode de 12 h. quan les plantetes creixien a les fosques es produïa l'efecte contrari.

S'han desenvolupat diferents sistemes de micropropagació fotoautotròfica a gran escala. Els seus avantatges sobre la micropropagació convencional són els següents: el creixement i el desenvolupament de les plantetes *in vitro* és més ràpid i uniforme, tenen menys desorganització fisiològica i morfològica, la contaminació *in vitro* és menor, les plantetes tenen un percentatge de supervivència més alt durant l'aclimatització *ex vitro* i a més es poden utilitzar uns pots de cultiu molt més grans en no haver-hi tant risc de contaminació (Kozai *et al.*, 1997).

Hi ha molts agents solidificants per als medis de cultiu de teixits, com ara l'agar, la gelatina, el midó, silicagels, la poliacrilamida, etc. Però, normalment, es fa servir l'agar, perquè té molts avantatges. L'agar és un polisacàrid de pes molecular alt i s'extreu d'unes algues vermelles del gènere *Gelidium*; es va obtenir per primera vegada l'any 1658 (Endress, 1994). Es dissol en aigua a uns 90°C. L'agar pur és una mescla de dos polisacàrids: agarosa (70 %) i agarpectina. La utilització d'agar impur podria afectar la concentració de microelements. Una altra propietat de l'agar és que és resistent a la hidrolisi enzimàtica. Per aquest motiu, la qualitat (marca) i la quantitat que s'utilitza pot afectar el creixement i el desenvolupament dels teixits (Beruto *et al.*, 1999). La quantitat d'agar que es fa servir en el medi pot ser variable. S'acostumen a utilitzar entre 6 i 8 g l⁻¹, però depèn de la marca de l'agar i de l'espècie vegetal en què es treballa. Per exemple, Singha (1982) va obtenir el màxim creixement en *Malus* sp. i en *Pyrus communis* en medis que contenen 3 i 6 g l⁻¹ d'agar, respectivament, mentre que a concentracions més grans hi havia un descens de la taxa de multiplicació. Yang *et al.* (1993) va cultivar amb èxit plantes de *Solanum tuberosum* en condicions mixotròfiques en medi MS (medi de Murashige i Skoog) sense posar-hi sacarosa, vitamines ni mioinositol, que s'afegeixen rutinàriament als medis de cultiu.

El potencial osmòtic d'un medi de cultiu depèn de la concentració molar total (ions i molècules orgàniques osmòticament actives) del medi. Normalment, els potencials osmòtics baixos s'associen amb una concentració molar alta. La sacarosa i les sals minerals són els principals contribuïdors. Durant els diferents estadis d'un cultiu *in vitro* el potencial osmòtic del medi pot canviar. El potencial osmòtic causat pels sacàrids baixa quan la sacarosa es converteix en glucosa i en fructosa per raó de la invertasa localitzada a les arrels de la plàntula, mentre que el potencial osmòtic causat pels components basals augmenta quan els seus soluts són absorbits per les tiges. Segons Kinoshita *et al.* (1988), la suma dels dos indica el potencial osmòtic total d'un medi MS líquid, que va baixant progressivament al llarg del temps. En general, el potencial osmòtic dels medis utilitzats en cultiu *in vitro* és més baix que el de qualsevol solució hidropònica.

En el procediment habitual d'elaboració d'un medi de cultiu s'acostuma a corregir el pH amb àcids o bases abans d'autoclavar, i es deixa al voltant de 5,5-5,7. Un pH massa àcid afavoriria la no solidificació de l'agar. A més podria provocar una mala assimilació d'algun nutrient essencial per a la plàntula. S'han descrit canvis de pH després d'aquest procediment causats per altes temperatures i pel temps d'autoclavatge (Skirvin *et al.*, 1986), com també per la quantitat d'agar utilitzat (Singha, 1982).

1.1.5. Atmosfera dins el pot de cultiu

Amb la finalitat de protegir el cultiu, evitar el creixement de microorganismes (fongs i bacteris) i prevenir la dessecació de les plantes i del medi de cultiu, el cultiu *in vitro* s'efectua en recipients tancats, cosa que provoca una restricció de l'intercanvi de gasos entre l'atmosfera del pot i l'aire de l'exterior. A causa de la restricció d'intercanvi de gasos dins els recipients de cultiu, la composició gasosa dins el pot pot ser diferent de la de l'aire exterior. Està comprovat que el tipus de pot i el tap utilitzats poden tenir efectes en l'apariència i en el desenvolupament de les plantetes (Melé *et al.*, 1982; Blazková *et al.*, 1989; Woltering, 1989; Jackson *et al.*, 1991; Serret *et al.*, 1996). Tichá (1996) també descriu la importància de la utilització d'un tipus de tap permeable als gasos, perquè una aportació extra de CO₂ té un efecte beneficiós sobre el creixement. Els factors més importants que afecten l'acumulació de gasos són el tipus i la quantitat de material vegetal, les propietats físiques del pot i el tap, els components del medi nutritiu i el microclima (temperatura, ventilació i intensitat de llum). Aquest fets suggereixen que, a més del medi nutritiu, la fase gasosa i la planta interactuen uns amb els altres i produeixen condicions favorables o desfavorables per al creixement. De totes maneres, el creixement i el desenvolupament dels explants depèn no solament de la composició del medi nutritiu, sino que també està afectat per l'atmosfera dins el recipient (Blazková *et al.*, 1989; Jackson *et al.*, 1987). Totes les substàncies gasoses que alliberen els cultius són biològicament actives; afecten directament la fisiologia de la planta i indirectament modulen l'activitat dels constituents de la fase condensada i fan crític l'ambient *in vitro* atès que provoquen anormalitats en el creixement i debilitat en les plantes (Smith i McClelland, 1991). Segons Righetti *et al.* (1988) i Woltering (1989) durant el cultiu s'acumulen etilè i altres hidrocarburs i (sovint de manera cíclica) CO₂. L'etilè pot ser

tòxic per a les plantes i els seus efectes poden variar; de vegades es requereix una certa quantitat per iniciar òrgans, però, en general, inhibeix el creixement i provoca senescència (Melé *et al.*, 1982; De Proft *et al.*, 1985; Lentini *et al.*, 1987). En experiments fets amb *Prunus avium*, una espècie llenyosa, es va comprovar que l'etilè i el CO₂ eren els components gasosos més importants alliberats dins els pots de cultiu i produïts per les cèl·lules i teixits *in vitro*. La formació d'etilè quedà afectada per la concentració de CO₂ i per la interacció amb la llum. A més a més, al cap d'uns quants dies de cultiu s'observà la producció d'etanol i d'acetaldehid (Righetti *et al.*, 1990). Un augment de la concentració de CO₂ es correspon amb una davallada en la d'O₂ (Adkins *et al.*, 1990; Righetti, 1990; Jackson *et al.*, 1991). Però, també està comprovat que pot haver-hi un descens de la concentració de CO₂ dins els pots durant el cultiu *in vitro* (Fujiwara *et al.*, 1988; Kozai i Iwanami, 1988). Es coneix poc la presència i els efectes d'altres components que es poden acumular dins els pots de cultiu, com ara l'etanol i l'acetaldehid (Kimmerer i Kozlowski, 1982).

Encara que els explants, les tiges i les plantes cultivades *in vitro* tenen capacitat fotosintètica, la seva fotosíntesi i el seu creixement *in vitro* es redueixen bàsicament a causa de les baixes concentracions de CO₂ en el recipient de cultiu durant el període de llum (Fujiwara *et al.*, 1987; Kozai *et al.*, 1987; Desjardins *et al.*, 1988; Solárová, 1989; Kozai, 1990). Una concentració elevada de CO₂ té un efecte positiu en l'allargament de les tiges i en el desenvolupament de fulles de *Theobroma cacao*, espècie que ha estat considerada recalcitrant en els sistemes convencionals de micropropagació (Figueira *et al.*, 1991). Així, Figueira i Janick (1994) van notar un augment de l'allargament de les tiges, del nombre i de l'àrea de les fulles, del pes sec i del pes fresc de les plantes en *Theobroma cacao*, quan incrementaven la concentració de CO₂ fins a 24 mmol mol⁻¹. També, però, van observar un descens de la concentració de nutrients i un augment de la d'etilè en el pot de cultiu. Woltering (1990) va demostrar que concentracions de CO₂ per damunt dels 10 mmol mol⁻¹ eren beneficioses per als cultius *in vitro* de roses i gerberes i disminuïen l'abscisió i la senescència de les fulles. Sallanon *et al.*, (1995) i Genoud-Gourichon *et al.* (1996) demostren que una concentració alta de CO₂ combinada amb una llum alta, el tipus de medi i la quantitat de sacarosa, incrementa la capacitat

fotosintètica de les plantetes *in vitro*. Kirdmanee *et al.* (1995) en estudis sobre l'efecte del CO₂ en el creixement fotoautotròfic d'*Eucalyptus camaldulensis* van comprovar que les plantes *in vitro* cultivades sense sacarosa en el medi de cultiu es veien afavorides anatòmicament i fisiològicament pel CO₂, com també pel substrat; el parènquima de palissada era més gruixut en les plantes enriquides amb CO₂, i a la vegada influïa sobre la fotosíntesi. Les plantes crescudes sense CO₂ i amb agar en el medi presentaven un parènquima de palissada molt fi i no tenien l'activitat fotosintètica prou desenvolupada per aconseguir un balanç positiu de carboni després del seu trasllat a l'hivernacle per aclimatar-se. Nguyen *et al.*, (1999) van demostrar que les plantetes de cafè cultivades *in vitro* tenien una capacitat fotosintètica més elevada si s'augmentava la concentració de CO₂ dins el pot de cultiu. També s'ha demostrat que un enriquiment amb CO₂ comporta una millor aclimatització *ex vitro* en plantes de tabac (Pospíšilová *et al.*, 1999). Faria *et al.* (1996) observen en el seu treball en *Quercus suber* L. a l'hivernacle que concentracions altes de CO₂ suposen una regulació baixa de la fotosíntesi i les plantes presenten menor activitat de la Rubisco que les que creixen en CO₂ ambient.

La fotorespiració sovint limita la producció de les plantes C₃. En calls de tabac cultivat fotoautotròficament, la mitjana d'inhibició de la fotosíntesi neta per a un 21 % i un 40 % d'O₂ va oscil·lar del 30 % al 47 %, respectivament, un percentatge molt semblant al que es va trobar en fulles senceres (McHale *et al.*, 1987). Un increment de les concentracions de CO₂ des de 500 μmol mol⁻¹ a 2000 μmol mol⁻¹ va produir una davallada constant en el percentatge d'inhibició i la inhibició per O₂ de la fotosíntesi neta va ser totalment reversible per al CO₂ (McHale *et al.*, 1987). En canvi, la fotorespiració es va suprimir quasi completament en un 2 % d'O₂, mentre que la taxa de fotosíntesi neta es va doblar si es comparava amb el 21 % d'O₂ que hi havia en condicions *ex vitro* (Zelitch, 1975). Shimada *et al.* (1988) estudiant l'efecte de tres concentracions diferents d'O₂ en dues plantes C₃, van comprovar que a part d'una supressió de la fotorespiració i d'un afavoriment de la fotosíntesi neta, la reducció de la concentració d'O₂ en el pot de cultiu podria limitar el creixement de fongs i bacteris.

2.2. Característiques estructurals de les plantes micropropagades

Els teixits de plantes que han crescut en condicions *in vitro* tenen una estructura diferent de les que han crescut en condicions de camp o a l'hivernacle. Aquest fet és degut que després d'una inducció ràpida de la divisió i del creixement cel·lular tenen lloc canvis anatòmics considerables (Gautheret, 1966; Bornman, 1974; Reinert *et al.*, 1977). A més a més, l'heterotròfia parcial de les plàntules cultivades *in vitro* també produeix canvis en l'estructura cel·lular (Grout i Aston, 1978 b; Wetzstein i Sommer, 1982).

Hi ha molts pocs estudis en què es parla de l'estructura i de l'anatomia de plantes crescudes *in vitro*. En general, les plantes cultivades *in vitro* presenten una petita quantitat de ceres epicuticulars (Grout, 1975; Grout i Aston, 1977; Hazel *et al.*, 1983), una cutícula poc desenvolupada (Wetzstein i Sommer, 1982) i estomes poc funcionals (Brainerd i Fuchigami, 1982; Wardle i Short, 1983; Ziv *et al.*, 1987). Junhong (1990), en estudis fets en pomeres (*Malus pumila* Mill.), va examinar les característiques anatòmiques de les fulles *in vitro* i després de transferir les plantes al sòl. Va arribar a la conclusió que les fulles de les plàntules *in vitro* eren relativament més primes que les *ex vitro* i presentaven cèl·lules poc desenvolupades del parènquima de palissada i molts espais intercel·lulars. Els estomes estaven sempre oberts i no responien ni a l'estrès hídric ni a la foscor. Wetzstein i Sommer (1982), en estudis ultraestructurals en *Liquidambar* cultivada *in vitro*, van observar que les fulles presentaven cèl·lules amb grans vacúols i amb poc contingut citoplasmàtic i els cloroplasts amb membranes tilacoïdals aplanades, amb poc apilament granal, i amb disposició irregular, si es comparava amb plantes crescudes en condicions de camp. Cachita i Cracium (1990) van treballar amb diferents plantes ornamentals i van observar que les cèl·lules del mesòfil eren pobres en citoplasma i tenien menys cloroplasts que les cèl·lules de plantes crescudes a l'hivernacle. A més a més, la disposició del citoplasma, del nucli i dels cloroplasts són parietals i una gran part del volum cel·lular està ocupat per un gran vacúol. També hi havia grans espais intercel·lulars. Tots els orgànuls, però, tenien estructures aparentment normals. En *Chrysanthemum morifolium* van observar cloroplasts amb pocs grana i un sistema de membranes desorganitzat; en observacions al microscopi electrònic de cèl·lules de clavell crescudes a l'hivernacle es va observar una

notable capa protectora a l'epidermis, de cutícula i de ceres epicuticulars. Per contra, però, a les fulles desenvolupades *in vitro*, l'epidermis era protegida amb una cutícula molt prima (Cachita i Cracium, 1990).

2. ACLIMATITZACIÓ

El terme aclimatació es defineix com l'adaptació climàtica d'un organisme, especialment una planta, que es traspasa a un ambient nou (Conover i Poole, 1984). En el cas del cultiu *in vitro* es tracta d'un procés artificial i per tant es referirà com aclimatització.

Durant els passats vint anys, la micropropagació ha experimentat un desenvolupament molt espectacular. De totes maneres, la micropropagació, en el seu sentit més ampli, està una mica restringida a causa de diverses raons. Una raó és que un gran percentatge de plantes micropropagades es pot perdre o es pot danyar durant la fase d'aclimatització, és a dir, en el traspàs del pot de cultiu al sòl. L'ambient en què es desenvolupa un cultiu *in vitro* és molt especial i, per aquest motiu, és difícil obtenir plantes que es puguin adaptar al nou ambient. Per poder incrementar el percentatge de supervivència de les plantes durant aquest estadi, l'ambient, al començament de l'aclimatització hauria d'estar controlat per poder simular les condicions ambientals en les quals les plàntules havien estat durant les fases de multiplicació i d'arrelament. De la mateixa manera, per evitar danys o morts després de l'aclimatització (en el seu pas a l'hivernacle), l'ambient, durant l'última part de l'aclimatització, s'hauria de controlar per poder simular les condicions en què es trobaran les plantes en passar a l'hivernacle. Així doncs, el creixement i la fotosíntesi de totes les plantes durant la fase d'aclimatització s'hauria de realitzar amb el mínim de pèrdues possible.

El control de l'elongació de les tiges també és un aspecte important dins la micropropagació per obtenir brots o plantetes de qualitat. En la multiplicació és més interessant tenir tiges amb uns entrenusos llargs perquè això facilita el tall manual. Per

trasplantar i per obtenir una millor aclimatització és ideal tenir brots amb tiges curtes i fines, i fulles grans.

Quan les plantes es traspassen al sòl, s'han d'adaptar a la falta de sacarosa, a l'alta irradiància i a la reducció d'humitat. En un procés d'aclimatització convencional, l'esforç principal que s'ha de fer és mantenir un grau d'humitat elevat, sobretot al començament. Això, generalment s'aconsegueix si es cobreixen les plantes amb plàstic i es posen a l'ombra, o es polvoritzen amb una freqüència elevada. L'ombra és necessària perquè la llum solar directa, per si mateixa, faria malbé les plantes (per fotodestrucció) i, a més, la fluctuació de la intensitat de llum comportaria canvis de temperatura i d'HR, i, consegüentment, un excés de pèrdua d'aigua de les plantes. A mesura que les plantes es tornen autotròfiques, s'ha d'anar disminuint el grau d'ombra i modificant el règim de regs. Això fa que durant el període d'aclimatització les plantetes perdin molta aigua, cosa que pot provocar la dessecació i una mort ràpida. A més, un excés de llum solar pot fotodestruir la planta. Fins ara, la solució més pràctica ha estat adaptar aquestes plantes a unes condicions d'atmosfera humida i de baixa irradiància durant un període entre dues i quatre setmanes, continuar amb una davallada progressiva de la humitat relativa i augmentar a poc a poc la irradiància. Actualment s'han desenvolupat cambres o unitats d'aclimatització que estan controlades per ordinadors, on paràmetres com la temperatura de l'aire, l'HR, la llum, la concentració de CO₂, el flux d'aire, la temperatura de la solució nutritiva poden ser controlats. L'aparent precisió amb què l'ambient físic i químic de les plantes cultivades *in vitro* pot ser controlat ha creat grans oportunitats per a la regeneració, la multiplicació i l'arrelament d'aquestes plantes. Però hi ha dificultats a crear un ambient adequat a l'hora de passar del recipient de cultiu a condicions *ex vitro*. De fet, una de les etapes més crítiques durant la micropropagació de totes les plantes cultivades *in vitro* és la transició d'un mode de nutrició heterotròfic o fotomixotròfic a un d'autotròfic. En aquest sentit, l'aportació de CO₂ extern durant el cultiu *in vitro* s'utilitza per afavorir la fotosíntesi neta com a camí per preparar les plantes per al creixement *ex vitro*. Lakso *et al.* (1986) demostraren que l'enriquiment amb CO₂ extern era efectiu per estimular el creixement de vinya *in vitro* després de transferir-ne els cultius. Així mateix, Desjardins *et al.* (1987) van demostrar que l'enriquiment de CO₂ i

un suplement de llum durant l'acimatització comportava un pas més ràpid a l'autotròfia, un creixement més accelerat i una millora de la productivitat en plantetes de maduixera, gerd i espàrrec. Per això, el procés d'acimatització és car, i, sovint, les taxes de mortalitat són altes. En aquest cas, l'interès bàsic és produir plantes més adaptades a les condicions *ex vitro*, modificant l'estadi III o la fase final del cultiu *in vitro* (Roberts *et al.*, 1994). Experiments més recents en plantetes d'arròs regenerades a partir d'un call (Seko i Nishimura, 1996) demostren que és possible obtenir plantetes fotoautotròfiques en unes determinades condicions de cultiu com ara un medi sense sacarosa, un fotoperíode de 24 h, una llum alta ($125 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) i un CO_2 alt (50 mmolmol^{-1}), eliminant el procés d'acimatització.

Alguns estudis han demostrat que si es redueix l'HR dins el pot s'aconsegueix una resistència més elevada dels teixits a la pèrdua hídrica (Wardle *et al.*, 1983; Smith *et al.*, 1990, 1992) i consegüentment, una supervivència major en passar a condicions *ex vitro*. Un control acurat de les condicions d'HR en els pots hauria de contribuir a millorar la qualitat i la producció de les plantes cultivades *in vitro* (Fujiwara *et al.*, 1993; Kozai *et al.*, 1993). Si es canvia l'HR en els pots de cultiu es pot influenciar el creixement i el desenvolupament de les plantes abans de transferir-les a condicions *ex vitro*, com a conseqüència de la modificació de l'estructura i de la funció de les fulles. Whish *et al.* (1992) en *Ptilotus* i Roberts *et al.* (1992) en roses i crisantems afirmen que si es redueix l'HR en els pots, després del traspàs de les plantes a condicions *ex vitro*, hi ha un augment de la supervivència, cosa que també va associada a un canvi en l'estructura de la fulla.

3. PARÀMETRES FISIOLÒGICS D'AVALUACIÓ DEL DESENVOLUPAMENT FOTOSINTÈTIC

El desenvolupament assolit per les plàntules *in vitro* com també l'estrés que pateixen en ser trasplantades al sòl durant la fase d'acimatització, es poden avaluar de manera instantània mitjançant tècniques de fluorescència i d'intercanvi de gasos, i en un

nivell integrat en el temps, utilitzant l'abundància natural d'isòtops estables.

3.1. Fluorescència de la clorofil·la

L'any 1921, Stern va ser el primer investigador que va detectar l'emissió de la fluorescència de la clorofil·la. Més tard, Kautsky i Hirsch (1931) van descriure la relació inversa existent entre la fluorescència clorofil·lica i l'assimilació fotosintètica de CO₂. Tres anys més tard els mateixos autors van publicar els principis de la mesura de la fluorescència clorofil·lica (Kautsky i Hirsch, 1934). A partir d'aleshores, la fluorescència de la clorofil·la és utilitzada com un paràmetre sensible per mesurar el funcionament fotosintètic *in vivo*, en condicions de camp o de laboratori. La mesura d'aquest paràmetre no és destructiva, i per això és molt útil a l'hora de treballar *in vivo*. A més, permet identificar danys en les plantes abans que apareguin els símptomes visibles.

Normalment es treballa amb la resposta de la fluorescència produïda per pols de llum actínica sobre una porció de teixit fotosintètic prèviament adaptat a la foscor. La cinètica d'aquesta resposta rep el nom de *corba de Kautsky*. Les diferents fases s'anomenen *OIDPSMT* (per a més informació, vegeu Jorba, 1994). La fluorescència que augmenta d'O a P té lloc durant el primer segon d'il·luminació i és el que anomenem *fluorescència ràpida* i té relació amb els processos primaris del fotosistema II (PSII). De P a T té lloc la fase lenta de la fluorescència. La fluorescència emesa immediatament després dels pols de llum en teixits fotosintètics adaptats a foscor és el nivell mínim o F_0 (*fluorescència basal*), és a dir, en fulles intactes, és el nivell de fluorescència si l'acceptor primari Qa està completament oxidat. Amb una il·luminació prou intensa, la fluorescència s'incrementa des de F_0 , via un nivell intermedi I, i sovint una petita inclinació D, que semblen reflectir els desequilibris entre les taxes de reducció i de reoxidació de Qa, cap a un pic P. Aquesta pujada reflecteix un increment gradual en la producció de fluorescència. Després es produeix una caiguda molt lenta via un estat quasi estacionari S, fins a arribar a un valor terminal T. El nivell màxim de fluorescència aconseguit en la corba d'inducció (P) rep el nom de *fluorescència màxima* o F_m , i és el màxim de fluorescència produïda per l'aparell fotosintètic, observable quan tots els acceptors primaris són reduïts. Un altre paràmetre important derivat de la cinètica ràpida

és la fluorescència variable (F_v), que és l'increment de fluorescència des de F_o a F_m . La disminució de fluorescència que es produeix després del màxim P és l'extinció de fluorescència (q). Hi ha dos components principals: extinció fotoquímica (P_q), causada per la transformació energètica en els centres de reacció del fotosistema II, i l'extinció no fotoquímica (NP_q), que representa totes les altres vies de desexcitació no irradiant, principalment calor i transferència al fotosistema I (PS I).

El PSII és particularment susceptible a la fotoinhibició. L'eficiència fotoquímica del PSII s'expressa per mitjà del quocient entre les fluorescències variable i màxima (F_v/F_m), normalment dins d'un rang 0,75-0,85 en plantes no estressades (Bolhàr-Nordenkampf *et al.*, 1989), i mesura l'eficiència d'excitació dels seus centres de reacció. Una disminució del quocient F_v/F_m és un bon indicador de fotoinhibició del PSII si les plantes estan sota l'efecte de diferents tipus d'estrès ambiental (Ögren i Öquist, 1985). La disminució d'aquest quocient pot ser deguda a un augment del paràmetre F_o , que representa l'emissió de fluorescència quan tots els centres de reacció són oberts i l'extinció és mínima, o a una disminució de la fluorescència màxima (F_m). L'augment del primer indicaria la destrucció dels centres de reacció del PSII, o bé l'impediment de transferir energia d'excitació als centres de reacció. La disminució de F_m correspondria a un augment en la dissipació no fotoquímica de l'excés de llum rebuda (Bolhàr-Nordenkampf i Öquist, 1993) anomenat *fotoprotecció* (Osmond *et al.*, 1987), perquè disminueix els danys d'un excés d'excitació. La diferència entre F_m i F_o és proporcional a la quantitat d'acceptors d'electrons reduïts del PS II.

El paràmetre $t_{1/2}$ representa el temps necessari perquè la fluorescència passi del nivell F_o a la fluorescència màxima (Bolhàr-Nordenkampf i Öquist, 1993). També és un indicador simple de la quantitat d'acceptors d'electrons que redueix el PSII. Els valors normals per a aquest paràmetre depenen de cada espècie. En mongetera, per exemple, Bolhàr-Nordenkampf i Öquist (1993) van trobar valors de $t_{1/2}$ d'uns 100-150 ms; els més alts es trobaven en plantes de sol i els més baixos en plantes d'ombra. Araus i Hogan (1994), treballant en palmeres, en ambient de selva, van obtenir valors entre 90 i 110 ms en plantes de zones il·luminades, mentre que en les plantes d'ombra, els valors eren molt

baixos, d'uns 20 ms. En condicions de camp i en blat dur, Araus *et al.* (1998) han trobat valors de $t_{1/2}$ d'uns 75 i 125 ms. En plantes cultivades *in vitro* en una tesi de doctorat (Jorba, 1994), treballant en l'híbrid presseguer x atmeller s'ha observat un augment del $t_{1/2}$ segons augmentaven les hores de llum i els dies d'acimatització de la planta. Els valors van oscil·lar entre 20 i 50 ms.

3.2. Elèctrode d'oxigen

La taxa fotosintètica de les plantes es pot avaluar mesurant el consum de CO_2 o l'evolució d' O_2 a les fulles. El consum de CO_2 es pot mesurar utilitzant un analitzador de gasos per absorció en l'infraroig (IRGA) i l'evolució d'oxigen fotosintètic es pot determinar utilitzant elèctrodes d'oxigen. La taxa de respiració d'obscuritat es pot determinar de forma anàloga, tot i que els intercanvis de gasos són oposats als que tenen lloc per fotosíntesi: evolució de CO_2 i consum d' O_2 . L'ús de l'elèctrode d'oxigen de fase líquida és molt indicat per mesurar el consum respiratori d'oxigen.

L'elèctrode d'oxigen és l'aparell utilitzat amb més freqüència per mesurar els intercanvis d'oxigen d'un teixit vegetal submergit en un medi aquós. Aquest aparell monitoritza els canvis de concentració que tenen lloc en la solució per efecte d'un teixit vegetal que està fotosintetitzant o respirant. L'elèctrode actua com una cèl·lula electroquímica on es genera un corrent elèctric que és proporcional a la quantitat d'oxigen que es troba present a la solució.

Aquest aparell és un instrument molt sensible a variacions de factors externs i només el seu funcionament òptim proporcionarà la garantia necessària per obtenir resultats fiables. És fonamental que no entri oxigen extern a la cambra de reacció de l'elèctrode, tot i que l'oxigen atmosfèric queda exclòs de les reaccions de la cambra per un tap de plàstic que queda molt ajustat. Aquest tap té a la part central un forat d'aproximadament 1 mm. De diàmetre que permet l'addició, amb l'ajuda d'una microxeringa, de substàncies a dins la cambra.

3.3. Composició en isòtops estables de carboni $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

Aproximadament el 98,89 % de tots els isòtops estables de carbó que hi ha a la natura són ^{12}C , mentre que l'1,11 % és ^{13}C (Stuiver, 1982). La proporció d'aquests isòtops estables en les diferents matèries varia lleugerament com a resultat d'un fraccionament isotòpic per raó de processos físics, químics i biològics. Per treballar amb seguretat aquestes petites però significatives variacions, el quocient $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ s'ha de mesurar amb la màxima precisió. L'únic instrument capaç de fer-ho és l'espectròmetre de masses, que McKinney *et al.* (1950) van començar a utilitzar en aquesta tasca fa uns 50 anys. Posteriorment, amb els avanços en electrònica, òptica i tecnologia del buit s'ha pogut perfeccionar aquest tipus d'aparell.

També, al voltant dels anys 50 es van descriure variacions en la composició isotòpica del carboni en diferents plantes. Ja el 1970 era acceptat que existien realment aquestes petites diferències i que el quocient $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ es podia utilitzar per distingir entre diferents tipus de vies fotosintètiques: C_3 , C_4 i CAM (O'Leary, 1981). Des de llavors, l'ús de la proporció dels isòtops estables del carbó en la recerca ecològica i fisiològica de les plantes ha augmentat considerablement (Rundel *et al.*, 1989).

El quocient $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ mesurat com a composició isotòpica ($\delta^{13}\text{C}$) relativa a un patró de referència o PDB (carbonat càlcic de la formació de foraminífers Pee Dee Bee de Carolina del Nord, EUA) ens permet avaluar les condicions hídriques a les que ha crescut la planteta (Farquhar *et al.*, 1989). En aquest sentit la $\delta^{13}\text{C}$ pot ser utilitzada per avaluar l'estatus hídric de les plàntules *in vitro* quan són traspassades a condicions *ex vitro* durant el procés d'acclimatització. Per a la majoria de materials d'interès biològic, el quocient $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ oscil·la aproximadament entre 0 i -110‰ *versus* PDB. Les plantes C_3 , en la seva fotosíntesi, redueixen el CO_2 a fosfoglicerat, un component de 3-C, via l'enzim RuBP-carboxilasa; aquest enzim discrimina contra el $^{13}\text{CO}_2$, i resulten uns valors relativament molt baixos de $\delta^{13}\text{C}$ en les plantes C_3 . Així, els valors de $\delta^{13}\text{C}$ oscil·larien entre -32‰ i -20‰ , amb una mitjana de -27‰ . Les plantes C_4 redueixen el CO_2 a àcid aspàrtic o màlic, components tots dos de 4-C, via l'enzim PEP carboxilasa. Aquest enzim no discrimina contra el ^{13}C tant com l'anterior, i, per tant, les plantes C_4

tenen valors més alts de $\delta^{13}\text{C}$. Així, els valors de $\delta^{13}\text{C}$ en les plantes C_4 oscil·len entre -7‰ i -9‰ , amb una mitja de -13‰ .

La gran majoria de plantes cultivades *in vitro* presenten metabolisme de C_3 , motiu pel qual va sorgir la idea d'utilitzar sacarosa que provenia d'una planta C_4 per identificar la font de carbó que utilitza la plàntula *in vitro*. Així, a l'hora de fer una valoració dels resultats dels valors de $\delta^{13}\text{C}$ podríem veure fins a quin punt les plantes havien captat el carboni de l'aire del tub o aquest provenia de la font de sacarosa del medi de cultiu.

Totes aquestes variacions descrites pels diferents materials biològics es poden aplicar a una gran varietat d'estudis, des d'un nivell fisiològic fins a un nivell d'organització d'ecosistemes (Rundel *et al.*, 1989) o a aspectes de nutrició i metabolisme animal (Klein *et al.*, 1986). En el nostre cas, les variacions de $\delta^{13}\text{C}$ es poden utilitzar per estudiar característiques bioquímiques i fisiològiques de la fotosíntesi (O'Leary, 1988).

Per altra banda, en plantes C_3 , alguns aspectes de control estomàtic durant la fotosíntesi es poden avaluar utilitzant el quocient $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. L'estrès per manca d'aigua causa una davallada de l'apertura estomàtica i Guy *et al.* (1980) van demostrar que la composició isotòpica en isòtops ^{13}C de la fulla augmentava quan en disminuïa el potencial hídric, és a dir, disminuïa la discriminació contra el ^{13}C en augmentar el dèficit hídric.

En les plantes C_3 , la discriminació isotòpica del carboni contra el ^{13}C (Δ) mesurada en material sec de les plantes indica a llarg termini el quocient de CO_2 intercel·lular respecte a la pressió parcial de CO_2 atmosfèric (p_i/p_a), al llarg de tota la vida del teixit analitzat (Farquhar *et al.*, 1982; 1989). La p_i està afectada per processos bioquímics i de difusió i això comporta canvis en l'eficiència de la transpiració (TE o quocient entre l'assimilació neta i l'aigua transpirada), i atesa una diferència constant de pressió de vapor fulla-aire, Δ pot donar una integració adequada de TE (Farquhar i Richards, 1984; Hubick i Farquhar, 1989; Condon *et al.*, 1990). Així doncs, les plantes

que tinguin un TE més elevat discriminaran menys contra el ^{13}C , ja que els estomes estaran més tancats i la pressió intercel·lular de CO_2 serà menor. Llavors aquest isòtop s'acumularà en major quantitat en els teixits. Quan mesurem la composició relativa de ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$) n'obtindrem una mesura integrada de l'eficiència transpiratòria (Morgan *et al.*, 1993).

OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquest treball ha estat analitzar, pel cas de gardènia, la incidència de diferents paràmetres ambientals sobre el creixement, fisiologia i anatomia de les plantetes *in vitro*. A més, veure si les condicions que normalment s'utilitzen en el cultiu *in vitro* són les adequades per al creixement de les plantetes, fent èmfasi en els punts següents:

1. Avaluar l'efecte de la quantitat de sacarosa del medi de cultiu, de la llum i de la concentració de CO₂ dins el pot de cultiu en l'afavoriment de la fotoautotròfia de les plantetes cultivades *in vitro*, sobretot en les primeres fases del cultiu (estadi II i estadi III b) i en la seva aclimatació posterior (estadi IV).

2. Desenvolupar una metodologia originalment emprada en condicions naturals i basada en la composició en isòtops estables de carboni per una avaluació ràpida i senzilla de l'efecte de diferents condicions ambientals sobre el grau de fotoautotròfia de les gardènies durant la micropropagació.

3. Estudiar l'efecte de les condicions de cultiu i estadi de micropropagació en les pautes de fotoinhibició durant la micropropagació i posterior aclimatació *ex vitro*.

4. Comprovar si una tècnica d'avaluació ràpida com ara fluorescència de la clorofil·la, molt utilitzada en estudis de planta i ambient *ex vitro*, pot utilitzar-se per indicar l'estat fisiològic de l'aparell fotosintètic de les plantes micropropagades durant els diversos estadis del cultiu i l'aclimatació posterior.

5. Estudiar els canvis de l'anatomia i de la ultraestructura fol·liar i del contingut en pigments fotosintètics associats a les variacions de les condicions del cultiu i als estadis de desenvolupament, i comparar com es relacionen amb determinades característiques fisiològiques, com ara les taxes de fotosíntesi i de la respiració a les fosques.

Aquesta tesi es va dur a terme bàsicament en dues etapes, que a partir d'ara es descriuran com a experiment I i experiment II. S'ha estructurat en cinc apartats de resultats (els dos primers corresponen a l'experiment I i els altres tres, a l'experiment II). Són apartats independents, però relacionats entre si, i que consten d'una introducció, dels resultats i de la discussió. L'apartat corresponent al material i a la metodologia és comú a tots els resultats. Els apartats de resultats que conformen aquesta tesi estan basats en els diferents articles publicats (3), en premsa (1) i acceptat (1), enviats per la doctoranda i coautors. Això pot fer que, de vegades, certs conceptes que es desenvolupen a l'introducció general es repeteixin en alguna de les introduccions específiques de cada apartat.

MATERIALS I MÈTODES

1. MATERIAL VEGETAL

El material vegetal emprat per a la realització dels experiments objecte d'aquesta memòria és la gardènia (*Gardenia jasminoides*, Ellis). La gardènia és una espècie originària de la Xina. Es començà a cultivar a Europa al segle XVIII i va rebre el nom del naturalista Alexandre Garden, metge botànic. És una planta ornamental arbustiva de fulla perenne de la família de les rubiàcies. Té fulles oposades i senceres d'un color verd lluent, encara que de vegades en presenta tres en un mateix nus. És apreciada per les seves flors blanques, solitàries i oloroses. Després de la seva apoteosi decimonònica es va oblidar i no es trobava ni en els jardins ni al comerç. Afortunadament va tornar a reaparèixer. També és important perquè els seus fruits produeixen metabòlits secundaris (del tipus glucòsids com ara l'àcid geniposídric, gardenòsid, crocina) utilitzats en perfumeria i en farmàcia com a principis actius. En medicina, a la Xina, els fruits secs s'utilitzen per curar malalties inflamatòries, i al Japó es fan servir com a colorant alimentari (Mizukami, 1989).

1.1. Obtenció dels explants

La planta mare es va obtenir d'un cultivador de gardènies de Tiana (Maresme, Barcelona). Els explants (entrenusos sense fulles, d'aproximadament 2 cm, contenint almenys un nus) es van esterilitzar amb lleixiu comercial en una concentració del 30 %, seguit de tres rentats amb aigua destil·lada estèril de 15 minuts cadascun. S'inicià el cultiu en tubs individuals i així es van poder eliminar els explants contaminats, tant per fongs i bacteris endògens al material vegetal com per fongs externs a causa d'una esterilització deficient. Després d'unes 4 setmanes es va fer un segon subcultiu, també en tub, per assegurar l'absència de microorganismes, i a partir del tercer subcultiu, es van col·locar entre 20 i 25 explants en pots de cultiu per poder obtenir una reserva de plantetes amb les quals poder iniciar els experiments. El medi que es va utilitzar per la iniciació dels explants va ser el mateix que es descriurà al següent apartat, o sigui, igual al medi de multiplicació. Els subcultius es feien aproximadament cada 3-4 setmanes. Així es van poder estudiar les fases de multiplicació i d'arrelament *in vitro*, a la vegada que altres explants es mantingueren en pots a fi de conservar una reserva.

2. MÈTODES

2.1. Medi de cultiu

Per crear la reserva, es va utilitzar un medi sòlid agaritzat MS (Murashige i Skoog, 1962), modificat amb un 3 % de sacarosa procedent de bleada-rave i un pH ajustat a 5,5. Es van posar uns 100 ml de medi a cada pot, de 500 ml de capacitat.

Durant la fase de multiplicació, la citoquinina emprada va ser la benziladenina (BA), en una concentració de $1,0 \text{ mg l}^{-1}$. Aproximadament quatre setmanes després es va promoure l'arrelament *in vitro* utilitzant el mateix medi que en la fase anterior, però reduint la quantitat de macronutrients a la meitat i, en aquest cas, l'auxina emprada va ser l'àcid indolacètic (AIA) en una concentració de $2,0 \text{ mg l}^{-1}$.

Després de quatre setmanes en medi d'arrelament es va iniciar el procés d'acclimatització. Un cop netejades les arrels de les restes de medi de cultiu es van posar les plantetes en un medi de creixement format per torba TKS1 i perlita (50:50) en *multipots* de 4x4 cm. Els *multipots* es van introduir en un túnel, que es va protegir amb un plàstic a fi de mantenir una humitat relativa elevada. Durant els 30 dies que va durar l'acclimatització, el plàstic es va anar obrint a poc a poc a fi i efecte de fer disminuir la humitat ambiental d'una manera gradual, passant d'una HR del 99 % al començament fins al 60 % al final del procés.

a) Experiment I

Durant la fase de multiplicació *in vitro* es va utilitzar el mateix medi de cultiu descrit per a la reserva, però modificant les concentracions de sacarosa, és a dir, ara obteníem tres medis diferents amb un 3 %, 1,5 % i 0,5 % (S_{30} , S_{15} i S_5 , respectivament) de sucre de canya i un quart amb un 3 % de sucre de bleada-rave. Els explants es van introduir en tubs de vidre de 52 ml de volum que contenien uns 15 ml de medi sòlid. Per tapar aquests tubs es van utilitzar taps de vidre Pyrex (Vitrolab).

b) Experiment II

En aquest experiment es va utilitzar el mateix medi que havíem descrit per a l'experiment anterior, però canviant les concentracions de sacarosa. Vam obtenir tres medis diferents amb un 3 % (S_{30}), 0,5 % (S_5) de sucre de canya i sense sucre (0 % o S_0).

Vam mesurar el potencial osmòtic en tots aquests tipus de medi, amb un osmòmetre de pressió de vapor Wescor 5500 (Wescor, Inc., Logan, Utah). Els valors van ser:

Medi sense sacarosa: $-0,202$ MPa

Medi amb 0,5 % sacarosa: $-0,221$ MPa

Medi amb 1,5 % sacarosa: $-0,303$ MPa

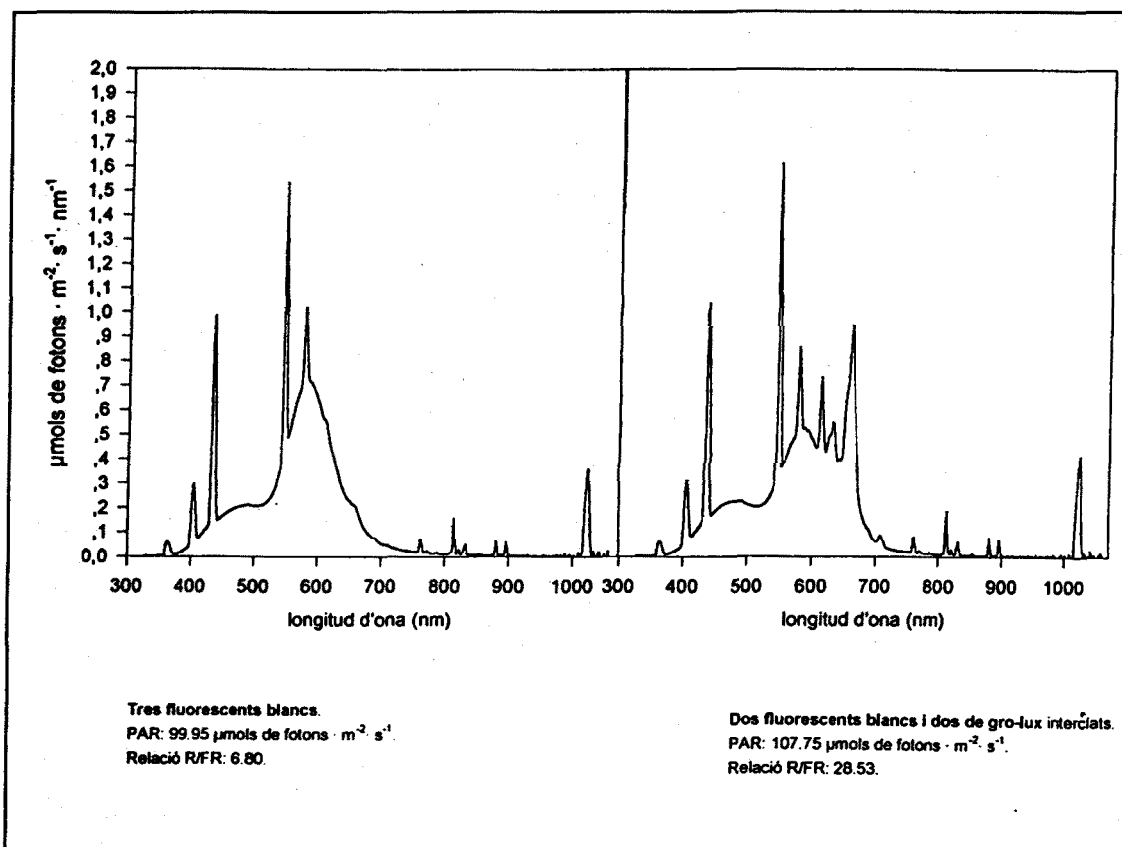
Medi amb 3 % sacarosa: $-0,373$ MPa

2.2. Condicions de cultiu

Els pots de reserva es van mantenir en una cambra de cultiu *in vitro* d'ASL Aparatos Científicos, (Madrid) en unes condicions de fotoperíode de 12 h/12 h i a una temperatura aproximada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Aquesta cambra està proveïda de dos tipus de fluorescents: de llum blanca (Philips TLD 58W/33) i de llum vermella (Sylvania Gro-lux F58W/GR0) que aportaven una intensitat de llum fotosintèticament activa (PAR, 400-700 nm), d'aproximadament $60 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Per aconseguir la intensitat desitjada per al nostre experiment es va jugar amb el nombre de cadascun dels diferents tipus.

A la figura de la pàgina següent podem veure un exemple de la diferència de l'espectre de PAR aconseguit quan s'utilitzen fluorescents blancs (figura esquerra) dins la cambra de cultiu o bé, quan alguns d'aquests fluorescents són substituïts per alguns de llum vermella (figura dreta). Ja s'han comentat a la introducció els avantatges de suplementar les cambres de cultiu amb alguna llum vermella.

Per realitzar els experiments I i II es va utilitzar una cambra de cultiu d'ambient controlat Conviron, model E-15. La il·luminació es feia amb tubs fluorescents (F72T12/



CW/VHO 160W) complementada amb bombetes incandescents (Sylvania) (4:4) amb la finalitat d'aconseguir un espectre de llum adequat per al creixement de les plantes.

a) Experiment I: llum i temperatura

En cada un dels medis descrits en la pàgina anterior es van estudiar tres intensitats de llum PAR diferents: $50 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (llum baixa o L_{50}), $100 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (llum intermèdia o L_{100}) i $300 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (llum alta o L_{300}), mesurades en la part superior del tub. El PPFD desitjat pel experiment es va aconseguir mitjançant l'ús de malles neutres. Es va mesurar amb un radiòmetre integrador Li-Cor 188B, amb un sensor quàntic 190SB.

En la fase d'arrelament només es van emprar les dues primeres intensitats de llum (L_{50} i L_{100}), perquè s'havia observat molt poca taxa de supervivència en les plantetes exposades a llum alta durant la fase de multiplicació.

En la fase d'acclimatització, la intensitat de llum va ser la mateixa en tots els tractaments: $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ amb un fotoperíode de 12 h/12 h, el mateix que en les fases anteriors.

Tant en la fase de multiplicació com en la d'arrelament, la temperatura de la cambra de cultiu es va mantenir constant durant el període de llum i de foscor ($20 \pm 2^\circ\text{C}$). Ara bé, la temperatura dins els tubs, mesurada amb un termoparell durant el període de llum i en la fase de multiplicació, va oscil·lar entre $24,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$, $25,5 \pm 1,5^\circ\text{C}$, i $29,5 \pm 3,0^\circ\text{C}$, en les plantes crescudes a llum baixa, intermèdia i alta, respectivament. En la fase d'acclimatització, la temperatura va ser de 25°C durant el dia i de 15°C durant la nit.

b) Experiment II: Llum, temperatura i CO₂

Es va prescindir del nivell alt de llum ($300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), perquè, com s'ha dit abans, les plantetes crescudes en aquesta intensitat de llum presentaven taxes altes de mortalitat.

Així doncs, quan parlem de l'experiment II, la intensitat baixa de llum serà L_{50} ($50 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) i l'alta L_{110} ($110 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), que en aquest cas estan mesurades dins el tub, a l'altura del medi de cultiu.

Les plantetes creixien sota un fotoperíode de 14 h/10 h. L'encès i l'apagat de les llums es va programar de manera progressiva durant un interval de 15 m. La temperatura dins la cambra de cultiu era de 23°C durant el dia i de 18°C durant la nit. La humitat relativa va ser del 70 % a la llum i del 75 % a la foscor.

La principal diferència entre l'experiment I i el II és l'enriquiment del cultiu amb CO_2 , fins a arribar a $750 \mu\text{mol mol}^{-1}$ en la cambra de cultiu. Així, els estudis es van fer amb plantes crescudes amb taps permeables o impermeables al CO_2 de la cambra de cultiu, de manera que garantien una concentració o una altra de CO_2 dins els tubs. Per aconseguir aquests dos nivells es van tapar els tubs amb taps d'alumini (Sero-Tap 24-26

mm, Selecta), proveïts d'una molla que assegurava la manca d'hermeticitat del tap. Ara bé, la meitat de tubs de cada tractament es van segellar amb una pel·lícula de parafina (Parafilm, American Nat.Can., Greenwich, CT. EUA), amb la qual cosa s'impedia l'entrada del CO₂ de la cambra de cultiu.

Durant l'aclimatització, la cambra de cultiu estava programada a una temperatura de 20°C, encara que la mesura real a nivell dels multipots va ser de 23,7°C. L'HR al final del procés era d'un 60 % amb el túnel obert. La il·luminació de la cambra es va reduir aproximadament a la meitat de la seva capacitat, amb una mitjana de PAR en diferents punts del túnel de $125 \pm 3,6 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, a nivell del substrat. No es va tenir en compte la llum que el plàstic del túnel podia absorbir, amb la qual cosa va baixar una mica la radiació que rebien les plantes.

2.3. Mesura de les condicions ambientals dins els tubs de cultiu

Es van avaluar els diferents paràmetres ambientals dins els tubs de cultiu com ara la llum, la radiació total i la il·luminació, la temperatura i la humitat de l'aire, utilitzant els següents sensors:

a) Mesura de la radiació fotosintèticament activa (PAR)

Es va mesurar el PAR dins el tub amb un radiòmetre LI-COR 188B amb sensor Quantum 190SB. Així, es va col·locar el sensor de 8 mm dins un tub seccionat, en el nivell que correspondria a la superfície de l'agar.

b) Radiació total dins la cambra de cultiu

Es va fer amb un piranòmetre Eppley, que, a causa de les seves dimensions no es podia muntar com en el cas anterior i es va haver de situar a fora de la gradeta dels tubs. Amb aquest sensor es va poder comprovar la diferència entre la radiació PAR i la radiació total deguda al tipus de làmpades utilitzades (fluorescents i/o incandescents), i la seva repercussió en el balanç tèrmic dins el tub.

c) Humitat relativa i temperatura de l'aire

La primera es va mesurar amb sensors capacitius Vaisala i la segona amb un Pt-100 Vaisala. A través de perforacions en la part superior dels taps, es van introduir els dos tipus de sensors, es van tapar els forats i es va procurar que no interferissin en la transmissió de llum a l'interior dels tubs. Es va fer la mesura en tres posicions diferents a dins dels tubs: a la part superior, a la central (al costat de les fulles joves) i a la inferior (sota la plàntula i damunt de l'agar). Cada posició es va mesurar en dos nivells de PAR.

d) Temperatura de fulla

Es van utilitzar dos termoparells fins LI-COR 6200 *spare parts*. A través de la perforació superior es van introduir els dos termoparells units i amb les puntes corbades i separades uns 3 mm, de manera que en situar-se sota una fulla, un hi quedava en contacte i l'altre quedava separat, amb la qual cosa mesuraven simultàniament T_{leaf} i T_{air} . Tots dos se situaven a l'ombra de la radiació directa.

Totes les dades ambientals eren registrades a través d'un registre continu en un *data-logger* HP.

2.4. Estimació del grau d'autotròfia de les plantetes cultivades *in vitro*

a) Experiment I

Les fulles noves, desenvolupades *in vitro* es van assecar en una estufa a 60°C i després es van reduir a una pols molt fina amb un morter. Per a cada estadi de creixement (multiplicació i arrelament), intensitat de llum i medi de cultiu es van agafar de 2-4 mostres, cadascuna provenia d'una a tres plantetes. També es va analitzar la font de sacarosa (tant la que procedia del sucre de canya com la de bleada-rave). El quocient $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ es va determinar a través de l'espectrometria de masses a Isotope Services, Inc. (Los Alamos, NM 87544, USA) amb mostres d'almenys 2 mg. Els resultats es van expressar com a valors de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) segons la fórmula següent:

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = [(R \text{ mostra}/R \text{ patró}) - 1] \times 1000 \quad [1]$$

on R és el quocient $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

Per comparació, es va utilitzar un patró secundari calibrat contra el primer amb Pee Dee belemnite (PDB). A més a més, la sacarosa (tant del sucre de canya com de la bleada-rave) també es va analitzar ($\delta^{13}\text{C}$ sacarosa) i es va calcular la diferència entre la composició isotòpica de les plantetes i la de la sacarosa com: $\delta^{13}\text{C}$ sacarosa - $\delta^{13}\text{C}$ fulletes. En aquest experiment, els valors de $\delta^{13}\text{C}$ en la sacarosa del sucre de canya i en la de bleada-rave van ser $-11,60\text{‰}$ i $-23,65\text{‰}$, respectivament.

Com en altres mètodes de marcatge, la quantitat d'un element marcat, fixat en un òrgan o teixit durant un període de temps determinat, indica la pauta de distribució d'aquest element. La utilització d'isòtops estables en concentracions naturals comporta un seguiment precís de la nova aportació de carbó i resulta útil per monitoritzar a llarg termini (Deléens *et al.*, 1994). En aquest sentit, la proporció d'àtoms de carboni incorporats a través de la fotosíntesi al total d'àtoms de carboni d'una fulla desenvolupada es va determinar segons una equació de dilució, que es descriurà seguidament. El contingut d'isòtops de carbó d'una fulla nova depèn de diferents factors, com ara:

- de la proporció relativa d'isòtops de carbó de la matèria preexistent (p.e., la sacarosa del medi de cultiu);
- del que s'adquireix a través de la fotosíntesi;
- del contingut preexistent de la mateixa fulla.

L'equació anteriorment esmentada per al marcatge amb ^{13}C és:

$$[^{13}\text{C}] \text{ fulla} = a ([^{13}\text{C}] \text{ fotosintetitzats}) + (1-a) ([^{13}\text{C}] \text{ sacarosa del medi}) \quad a \leq 1 \quad [2]$$

on a i $(1-a)$ és la proporció de carboni de les fulles procedent dels fotosintetitzats i de la sacarosa del medi, respectivament, i $[^{13}\text{C}]$, la concentració de ^{13}C representada per la seva mateixa abundància (p. e., la proporció absoluta d'isòtop per 100 àtoms) en el carboni total. Quan es tracta de petits enriquiments, ($\approx^{13}\text{C}$ 1-2%), aquests càlculs es poden

simplificar utilitzant directament els valors de $\delta^{13}\text{C}$ (Deléens *et al.*, 1994). Llavors, si substituïm $[^{13}\text{C}]$ per $\delta^{13}\text{C}$ en l'equació de dilució anterior, ens quedarà:

$$a = \frac{\delta^{13}\text{C fulla} - \delta^{13}\text{C sacarosa}}{\delta^{13}\text{C fotosintetitzats} - \delta^{13}\text{C sacarosa}} \quad [3]$$

Per a la correcta utilització de les dues equacions anteriors no hi hauria d'haver fraccionament entre els isòtops lleugers i pesants durant la incorporació a la planta, i llavors la $\delta^{13}\text{C}$ dels fotosintetitzats seria igual a la $\delta^{13}\text{C}$ de la font d'aire subministrat. En el cas del ^{13}C , la discriminació durant la fotosíntesi, a causa de la carboxilació i de la difusió és un fet demostrat (Farquhar *et al.*, 1989) la qual cosa invalida l'ús de la $\delta^{13}\text{C}$ de la font d'aire en tots els càlculs. En aquest sentit, el cultiu amb dos tipus de sacaroses (del sucre de canya i del de la bleada-rave) que presenten diferències en $\delta^{13}\text{C}$, pot obviar aquest petit problema. Així, per a unes determinades condicions de cultiu, com ara uns nivells determinats de sacarosa en el medi i una intensitat de llum, tenim:

$$a = \frac{\delta^{13}\text{C sb-fula} - \delta^{13}\text{C sb-sacarosa}}{\delta^{13}\text{C fotosintetitzats} - \delta^{13}\text{C sb-sacarosa}} =$$

$$\frac{\delta^{13}\text{C sc-fula} - \delta^{13}\text{C sc-sacarosa}}{\delta^{13}\text{C fotosintetitzats} - \delta^{13}\text{C sc-sacarosa}} \quad [4]$$

i consegüentment,

$$a = \frac{\delta^{13}\text{C sc-fula} - \delta^{13}\text{C sb-fula}}{\delta^{13}\text{C sb-sacarosa} - \delta^{13}\text{C sc-sacarosa}} + 1 \quad [5]$$

on $\delta^{13}\text{C}$ sb- i $\delta^{13}\text{C}$ sc-fula són la composició isotòpica de les fulles crescudes en medi MS amb sucre de bleda-rave i sucre de canya, respectivament; $\delta^{13}\text{C}$ sb- i $\delta^{13}\text{C}$ sc-sacarosa són la composició isotòpica dels sucres de bleda-rave i de canya, respectivament; i $\delta^{13}\text{C}$ fotosintetitzats, són la composició isotòpica del carbó procedent de la fotosíntesi. Per a l'experiment I, els valors de a i de $\delta^{13}\text{C}$ fotosintetitzats es van calcular durant la fase de multiplicació amb un 3 % de sacarosa (S_{30}) i per als tres nivells de llum, utilitzant les equacions [4] i [5].

En la resta de condicions de cultiu, i a fi i efecte de reduir el nombre d'anàlisis, el grau de fotoautotròfia assolit per les plantes es va fixar a partir de la diferència entre $\delta^{13}\text{C}$ de la sacarosa i la $\delta^{13}\text{C}$ de les fulles i solament en les plantes cultivades amb sucre de canya. De fet, en valors absoluts, aquesta diferència és proporcional a la contribució relativa de la fotosíntesi al carboni de la fulla (equació [3]). Aquesta aproximació tan simple ens permet establir un rang de fotoautotròfia entre totes les condicions de cultiu estudiades, encara que no permet calcular la contribució relativa dels fotosintetitzats al contingut de carboni total de la fulla. A més a més, hi ha una petita consideració de tipus metodològic que afavoreix aquesta senzilla aproximació. Els pots de cultiu representen un sistema relativament tancat perquè el carboni procedent de la sacarosa del medi, que és assimilat per les plantes durant la respiració, s'acumula en la foscor i pot ser refixat més tard en el procés de la fotosíntesi. Així, la refixació podria comportar una subestimació del grau de fotoautotròfia assolit per les plantes. Ara bé, deixant de banda aquest petit problema metodològic sobre el desenvolupament de l'autotròfia, podem establir una classificació segura entre els diferents tractaments utilitzant aquestes aproximacions simplificades.

b) Experiment II

En aquest experiment, la $\delta^{13}\text{C}$ durant la fase d'aclimatització es va utilitzar com a indicador de l'estatus hídric de la planta. El procés de recol·lecció de les mostres va ser igual que el que es va aplicar a l'experiment I, però en la fase d'aclimatització es van recollir dues mostres diferents: l'última fulla apareguda durant la fase d'arrelament i que es va acabar de formar en la fase d'aclimatització, i la primera fulla ben desenvolupada

durant aquesta mateixa fase. En aquest cas, els valors de $\delta^{13}\text{C}$ per a la sacarosa de la canya de sucre i de la de bleada-rave van ser $-11,29\text{ ‰}$ i $-23,54\text{ ‰}$, respectivament.

2.5. Avaluació de l'estrès durant les últimes fases de cultiu *in vitro* i l'aclimatització

Com a eina per detectar l'estrès es va utilitzar la tècnica de la fluorescència de la clorofil·la. La fluorescència fou mesurada amb un fluorímetre portàtil PSM (Plant Stress Meter), Biomonitor, que mesura els paràmetres F_v , F_m , quocient F_v/F_m , F_o i $t_{1/2}$.

a) Experiment I

Es van prendre mesures després de quatre setmanes de les fases de multiplicació i d'arrelament, respectivament, i posteriorment en la fase d'aclimatització. Les mesures es van realitzar en una cambra fosca; les plantes van tenir un període d'adaptació a la foscor d'uns 30 minuts i amb les fulles penúltimes o antepenúltimes totalment expandides. El període d'excitació amb llum va ser de 5 s i la intensitat de la llum actínica de $200\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$. Prèviament s'havien fet proves a una intensitat lumínica superior ($400\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$) i els resultats van ser molt similars als obtinguts a $200\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$.

b) Experiment II

Les mesures de la fluorescència de la clorofil·la es van fer com en el primer experiment, amb la diferència que per a cada tractament preniem dos tipus de mesures: la primera, abans d'encendre les llums de la cambra (mesura de foscor) i la segona, després de 5-6 h de llum (mesura de llum). Es van fer mesures durant les fases de multiplicació, d'arrelament i d'aclimatització; en aquesta última, a més, es van fer mesures els dies 0, 1, 3, 7, 14 i 28 de tot el període.

Tan per l'experiment I com per l'experiment II, per a cada una de les condicions de cultiu que es van assajar es van fer una mitjana de 13-20 mesures en la cara adaxial de les fulles. A més dels paràmetres indicats es va calcular el quocient F_v/F_o .

S'ha d'assenyalar que després de fer les mesures de la fluorescència de la clorofil·la durant totes les fases del cultiu *in vitro*, les mateixes fulles van ser utilitzades per la discriminació isotòpica, l'elèctrode de Clark i per la microscopia òptica i electrònica.

2.6. Mesura d'intercanvi de gasos

2.6.1. Mesura de la concentració de CO₂ dins els tubs de cultiu

A l'experiment I, un analitzador de gasos per infraroig o IRGA (*Infrared Gas Analyzer*) es va utilitzar per mesurar la fotosíntesi i la respiració total de cada plàntula dins el tub de cultiu, i la concentració de CO₂ estable durant el període de llum. Les mesures es van fer en la fase de multiplicació i solament en les mostres crescudes a L₁₀₀ amb tres nivells de sacarosa en el medi de cultiu. La fotosíntesi i la concentració de CO₂ estable dins el tub durant el període de llum es van mesurar a 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de PAR i a 20°C de temperatura. La concentració de CO₂ dins el tub es va calcular després de les correccions de la dilució de l'aire en el sistema d'intercanvi de gasos que es descriu a continuació.

Durant la fase d'arrelament de l'experiment II i en tots els tractaments assajats es va mesurar la concentració de CO₂ dins els tubs, durant els períodes de llum i de foscor mitjançant l'IRGA portàtil (IRGA, LICOR 6200, Lincoln, Nebraska, USA). En tubs amb medi i sense, es van estudiar les diferències de permeabilitat als gasos segons els dos tipus de tancament descrits (taps d'alumini sense o amb parafina) comparant-los amb altres sistemes de tancament habituals, com ara els taps de vidre o de cotó. El temps mitjà de retenció de gasos (t_{50}) per al CO₂ es va mesurar segons el protocol de Jackson *et al.*, (1994) seguint el descens de la concentració de CO₂ que s'havia injectat prèviament en el tub amb l'IRGA, en el transcurs del temps.

Per fer aquestes mesures, es van foradar els taps d'alumini, i es va introduir en el forat un tap de goma preparat adequadament per facilitar la presa de mostres d'aire de l'interior dels tubs. Amb una xeringa es va extreure un volum petit d'aire i es va injectar dins l'IRGA.

La concentració de CO₂ de la mostra es va calcular a partir de la variació de CO₂, causada per la injecció de 1 ml d'aire del tub, que es va mesurar amb l'IRGA i es va corregir aquesta lectura segons els canvis de pressió i de volum de l'aire dins l'IRGA per raó d'afegir l'aire de la xeringa al sistema d'intercanvi de gasos (170 ml).

Es van fer tres extraccions successives amb intervals d'aproximadament dues hores: la primera, una hora abans d'apagar els llums. La primera i la segona extracció consistint en 1 ml d'aire cadascuna, és a dir, aproximadament un 2,5 % del volum total d'aire dins el tub (39 ml volum d'aire = 52 ml volum del tub - 13 ml volum del medi), mentre que la tercera era de 2 ml d'aire, a fi i efecte d'assegurar l'eficàcia de les mesures atès que en aquell moment la concentració de CO₂ de l'aire dins els tubs era baixa.

Es van prendre 4-5 mostres (segons disponibilitat de tubs) de cadascun dels tractaments que havien arribat a l'estadi d'arrelament.

2.6.2. Elèctrode d'oxigen

Per fer les mesures de respiració i de fotosíntesi es va utilitzar un elèctrode d'oxigen, del tipus Clark de Rank Brothers Ltd., Bottisham, UK, que ofereix informació sobre la respiració a les fosques i sobre la taxa màxima de fotosíntesi en condicions de saturació de CO₂ (20 µL de 1M KHCO₃ i llum de $\approx 1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Les fulles de gardènia es van tallar a trossos d'1x1 mm amb un bisturí en una solució de CaCl₂ 0,2 mM i es van incubar en plaques de Petri amb el mateix tampó durant 30 m, i després es van passar a la cambra de reacció. Per a les mesures de fotosíntesi es va il·luminar la cambra i es va omplir amb 4 mL de 10 mM TES (àcid *N*-tris [hidroximetil] metil-2-aminoetanosulfònic, Sigma) en 0,2 mM CaCl₂ i pH = 7,2. Les de respiració es van fer a les fosques i en 4 mL de 20 mM MES (àcid 2,*N*- morfolino-etanosulfònic, Sigma) en 0,2 mM CaCl₂ i pH = 6,5. Aquest aparell mesura tant la fotosíntesi com la respiració a una temperatura constant (22 ± 2°C), la qual cosa assegura l'homogeneïtat tèrmica durant totes les mesures.

2.7. Anatomia i ultraestructura

Tant en l'experiment I com en l'experiment II, es va aplicar el mateix procediment. Després de la mesura de la fluorescència es van tallar les fulles i se'n van extreure seccions del mig d'1-2 mm d'ample. El processament del material, per poder observar-lo al microscopi, òptic i electrònic, va ser el següent:

a) *Fixació*

Es va seguir el mètode tradicional de doble fixació segons el protocol que es detalla a continuació:

- Fixació del material per immersió en paraformaldehid al 2,0 % i glutaraldehid al 2,5 %, en tampó fosfat 0,10 M (pH = 7,4) durant 3 h a 4°C.
- Tres rentats de 20 min cadascun amb tampó fosfat 0,10 M a 4°C.
- Postfixació en tetraòxid d'osmi a l'1,0 % diluït en tampó fosfat 0,10 M durant 1 h a temperatura ambient.
- Tres rentats de 20 min cadascun amb tampó fosfat 0,10 M (pH = 7,4) a temperatura ambient.
- Tres rentats de 5 min amb aigua destil·lada, per tal d'eliminar les sals del tampó.

b) *Deshidratació*

Es van introduir les mostres en acetona a temperatura ambient en concentracions creixents: 50 % 1 x 10 min, 70 % 2 x 10 min, 90 % 3 x 10 min, 96 % 3 x 10 min, 100 % acetona anhidre 3 x 10 min.

c) *Inclusió*

Es va efectuar amb una resina de baixa viscositat (Spurr, 1969), segons el procediment que es detalla a continuació:

- Immersió del material en una barreja d'acetona anhidre/resina Spurr, en proporció 3:1 durant 2 h a temperatura ambient.
- Substitució de la solució anterior per la mateixa barreja però en la proporció 2:2 durant 2h.
- Immersió del material en la mateixa barreja en proporció 1:3 durant 3 h.

- Infiltració amb resina pura durant 48 h fent-hi tres canvis.
- Polimerització de la resina a 60°C durant 48 h. Els blocs es van obtenir en motlles de silicona.
- Les piràmides dels blocs es van efectuar en un piramitom Reichert model TM 60.

d) Obtenció dels talls

Per microscopi òptic. Es van obtenir seccions transversals de la fulla d'un gruix aproximat d'1 µm, adequats per ser observats en microscopi òptic i per poder controlar l'estat del material. Aquests talls es van efectuar amb un ultramicrotom Reichert model UM2, amb ganiveta de vidre. Després es van recollir en un medi aquós i es van dipositar posteriorment en un portaobjectes per contrastar-los amb blau de metil (0,5 % en aigua destil·lada + 0,5 % de bòrax o tetraborat sòdic cristal·lí) amb pH = 10-11.

Per microscopi electrònic de transmissió (MET). A partir dels blocs anteriors i amb un ultramicrotom (Ultracut, Reichert-Jung UM2) amb ganiveta de diamant, es van obtenir talls ultrafins de menys de 60 nm de gruix, que van ser dipositats en reixetes d'or o de coure, tenyides amb acetat d'uranil al 2 % en aigua destil·lada filtrada durant 30 min, seguit de 10 min en citrat de plom.

-Per microscopi electrònic de rastreig (SEM). Vam seguir dos tipus de protocols:

Punt crític: Per assecar el material se'n va procedir a la fixació segons està descrit a l'apartat a), seguida d'una deshidratació en una sèrie de concentracions creixents d'acetona (des de 50 % fins 96 % fent salts de 10 % i durant 10 min en cada concentració) fins arribar al 100 % (dues vegades). Seguidament el material es va posar en una barreja d'acetona/acetat d'amil. Gradualment i a intervals de 30 min, a temperatura ambient, es va augmentar la concentració d'acetat d'amil des d'una proporció 3:1, 2:2, 1:3, i finalment en acetat d'amil pur, on pot estar durant molts dies. Finalment, el material es va dessecar mitjançant la tècnica del punt crític en un aparell Polaron E3000, utilitzant diòxid de carboni que es va solubilitzar en l'acetat d'amil en què estaven

impregnades les mostres. Un cop processat el material es va col·locar sobre uns *stubs* d'alumini amb una gota de plata col·loïdal (Electrodag 1415, Acheson) i es van cobrir amb or en una atmosfera d'argon en un díode de *sputtering* Polaron E5000; la capa d'or va ser d'uns 600 Å.

Aquest tipus de preparació permet estudiar la morfologia i superfície del material a pocs augments. Amb aquesta tècnica, la turgència de les cel·lules es veu molt poc alterada.

Liofilització: Es va liofilitzar el material fresc durant 24 h i posteriorment es va procedir a la preparació, muntatge i recobriment de les mostres com en l'apartat 1). Les mostres preparades amb aquesta tècnica presenten sovint forts replegaments de l'epidermis, però acostuma a respectar la integritat de les ceres epicuticulars (Febrero i Araus, 1994).

e) Observació

Els talls semifins foren observats i fotografiats en un microscopi òptic (Polyvar 2, Reichert-Jung), mentre que els talls ultrafins ho van ser en un microscopi electrònic de transmissió (Philips EM 301) a un voltatge d'acceleració de 80 kV. El microscopi de rastreig utilitzat va ser l'Hitachi Scanning Electron Microscope S-2300, amb una velocitat d'acceleració de 15 kV.

Tots aquests treballs d'anatomia i ultraestructura es van efectuar als Serveis Científicotècnics (Microscopia Electrònica) de la Universitat de Barcelona.

2.8. Determinació del contingut de pigments fotosintètics

2.8.1. Presa de mostres

Les mateixes fulles usades per a les mesures de la fluorescència de la clorofil·la es van fer servir per fer les determinacions dels pigments fotosintètics: clorofil·les a, b i carotenoides. Les mostres es van introduir en nitrogen líquid, prèvia pesada, per ser emmagatzemades posteriorment a -30°C fins al moment del seu processament. Per a

cadascun dels tractaments es van agafar un total de 5-6 mostres de plantes diferents, cadascuna de les quals consistia en una o dues fulletes, amb un pes total d'uns 20 mg.

2.8.2. Extracció i quantificació

Els pigments fotosintètics es van extreure aixafant les fulles amb un homogeneïtzador de vidre amb 2 ml de acetona freda al 80 %. L'extracte es va rasar a 10 ml amb la mateixa acetona al 80 %. Posteriorment es va fer una centrifugació de l'extracte durant 15 min a unes 1000g. Tot aquest procés d'extracció es va fer a les fosques i a 4°C. A continuació, el sobrenedant es recuperà per procedir a la lectura de l'absorbància en un espectrofotòmetre (Schimadzu, model UV-160A). Les lectures es van fer a 470, 645, 646,8, 663,2 i 750 nm. Els continguts de clorofil·les a i b i carotenoides totals (carotens i xantofil·les, *Car*) s'han calculat amb les fórmules de Lichtenthaler (1987). A partir d'aquests valors es va obtenir el contingut de clorofil·la total o clorofil·la a + b (*Chl*) i el quocient *Chl/Car*.

Les mesures descrites als apartats 2.3. i 2.6.1.1. es van efectuar al Servei de Camps Experimentals de la Universitat de Barcelona.

2.9. Anàlisi de dades

El tractament estadístic de totes les dades s'ha fet utilitzant ANOVA del programa Number Crunching Statistical System (NCSS ver.5.03; Hintze, 1991). Les diferències entre els diferents tractaments es van avaluar mitjançant el test de Duncan's (Duncan's Comparison Report del programa esmentat anteriorment), amb un nivell de significació $\alpha = 0,05$.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

1. FOTOAUTOTROFIA I FOTOINHIBICIÓ DURANT LA MICROPROPAGACIÓ

1. FOTOAUTOTROFIA I FOTOINHIBICIÓ DURANT LA MICROPROPAGACIÓ

En aquest apartat s'avalua l'efecte de les condicions de creixement i els diferents estadis de la micropropagació sobre el grau de fotoautotrofia de les plantes de gardènia cultivades *in vitro*, utilitzant tècniques de composició isotòpica en ^{13}C . També s'estudia el grau de fotoinhibició assolit per les plantes sotmeses a aquests diferents factors, mitjançant la fluorescència de la clorofil·la. Tots els resultats avaluats aquí formen part de l'experiment I.

1.1. INTRODUCCIÓ

Si s'estimula el desenvolupament de la capacitat fotosintètica de les plantes *in vitro* podem millorar les condicions de creixement dins els pots de cultiu, com també afavorir l'èxit de l'acimatització posterior a condicions *ex vitro* (Kozai, 1991 b; Kozai *et al.*, 1990 a). Fins fa poc s'havia cregut que les plantes crescudes *in vitro*, durant els estadis de multiplicació i d'arrelament, tenien poca capacitat fotosintètica, i per obtenir un balanç positiu de carboni necessitaven sacarosa com a font d'energia i carbó per al seu creixement heterotròfic o mixotròfic (Grout i Aston, 1978 a). Però, en experiments recents, s'ha demostrat que les plantes *in vitro* poden créixer fotoautotròficament si estan cultivades en condicions favorables per fer fotosíntesi (Kozai, 1991 b; Kozai *et al.*, 1990 a). Per aquest motiu, modificant determinats factors ambientals, com ara la quantitat de sacarosa en el medi, la intensitat de llum o la concentració de CO_2 , es pot modificar el desenvolupament de les característiques fotosintètiques *in vitro* (Hdider i Desjardins, 1994; Kozai, 1991 a; Kubota i Kozai, 1992; Solárová, 1989).

Resulta difícil determinar el grau de fotoautotrofia d'una planta cultivada *in vitro*, perquè els criteris de caracterització senzills, com ara el contingut de clorofil·les no reflecteixen la capacitat fotosintètica de les plantes (Fujiwara *et al.*, 1992). Es fa necessari, doncs, l'ús d'altres tècniques més complicades, com ara la mesura dels patrons

d'intercanvi de CO₂ (Hdider i Desjardins, 1994; Jeong *et al.*, 1993; Kozai, 1991b; Kozai *et al.*, 1990a) per donar una idea aproximada de la contribució total de la fotosíntesi al balanç de carboni d'una planta *in vitro*. Una correcta quantificació de la contribució fotosintètica d'una planta creixuda *in vitro* es fa utilitzant substrats marcats amb isòtops radioactius com ara: ¹⁴C-sacarosa i ¹⁴C-CO₂ (De Riek *et al.*, 1991). Com a alternativa, el seguiment amb isòtops estables, mitjançant l'ús de compostos marcats de forma natural o amb un petit marcatge artificial, ha esdevingut una eina útil en estudis metabòlics en plantes de camp per raó de la gran precisió de les mesures isotòpiques en el rang de valors naturals amb els espectròmetres de masses. Això permet el seguiment de diferents aportacions de carboni (font de marcatge) amb molta exactitud, i és adequat per monitorar a llarg termini processos de distribució d'assimilats (Deléens *et al.*, 1994). A partir de l'anàlisi de composició en isòtops estables de C de les plantes és possible diferenciar la contribució de C aportada per fotosíntesi de la contribució a partir de la sacarosa del medi de cultiu. En aquest experiment es va utilitzar canya de sucre com a font de sacarosa perquè la quantitat de ¹³C respecte a ¹²C, que correspon a una planta C₄, és un valor molt més alt que el d'una planta C₃ (Farquhar *et al.*, 1989), com ara la gardènia.

Com s'ha dit abans, incrementant la intensitat de llum durant el cultiu *in vitro*, es poden augmentar les característiques fotosintètiques de les plantes. Ara bé, hi ha un inconvenient i és que si les fulles absorbeixen un excés d'energia, aquesta pot danyar tant les plantes en condicions naturals (Boyer *et al.*, 1987) com les de cultiu *in vitro* (Aitken-Christie *et al.*, 1992). La combinació de llum alta i temperatures altes pot tenir un efecte sinèrgic per afavorir la fotoinhibició (Ludlow, 1987; Peterson, 1990; Powles, 1984). En el cultiu *in vitro*, se'n pot observar un exemple en l'efecte hivernacle que es produeix dins els tubs de cultiu. Durant la micropropagació s'ha demostrat que poques hores després d'encendre les llums és freqüent que hi hagi una concentració de CO₂ molt baixa dins els tubs (Kozai, 1991b; Kozai *et al.* 1990a; Solárová, 1989), cosa que també pot estimular la fotoinhibició. De fet, una baixa concentració de CO₂ pot afectar el transport d'electrons i limitar el consum d'energia assimiladora (Peterson, 1990).

El fotosistema II (PSII) és particularment sensible a la inhibició (Powles, 1984). La eficiència fotoquímica del PSII (F_v/F_m) oscil·la entre 0,75-0,85 en les plantes no estressades (Bolhàr-Nordenkampf *et al.*, 1989) i està correlacionada altament amb l'eficiència quàntica màxima de la fotosíntesi en fulles intactes amb diferents nivells de fotoinhibició (Björkman i Demming, 1987; Demming i Björkman, 1987). Un descens en el quocient F_v/F_m és un bon indicador de danys per fotoinhibició (Ögren i Öquist, 1985). Però si es tenen en compte aquests canvis de F_v/F_m , s'han de distingir els augments de F_o dels descensos de F_m . Teòricament, la F_o és l'emissió de fluorescència quan tots els centres de reacció estan oberts i la dissipació energètica de caràcter fotoquímic és mínima. Un augment de F_o indica que hi ha destrucció en els centres de reacció del PSII, és a dir, que no hi ha transferència d'energia des de l'emissor cap als centres de reacció. En canvi, un descens de F_m pot indicar un increment de l'extinció no fotoquímica (Bolhàr-Nordenkampf *et al.*, 1989). La fotoinhibició produeix aquests dos tipus de canvis (Baker i Horton, 1987; Björkman, 1986). Ja des de fa anys alguns autors han proposat que aquest terme s'hauria de dir fotoprotecció (Osmond *et al.*, 1987), perquè es creu que proporciona mitjans inofensius per dissipar l'excés d'energia. Cleland *et al.*, (1986) van suggerir que els centres de reacció fotoinhibits són altament eficients en la dissipació no fotoquímica de la llum absorbida (fotoprotecció). A més a més, l'àrea que hi ha sota la corba entre F_o i F_m és proporcional a la mida de tots els acceptors d'electrons en la part reduïda del PSII, indicació que recull el paràmetre $t_{1/2}$, que és el temps que tarda la fluorescència per aconseguir la meitat del pendent des de F_o fins F_m (Bolhàr-Nordenkampf *et al.*, 1989). Les diferències en el grau d'adaptació estructural de les fulles, relacionades amb el desenvolupament de la fotoautotròfia (motivades en aquest cas per les diferents condicions de cultiu o de l'estadi de desenvolupament) també poden afectar la fluorescència primària (F_o , F_m i $t_{1/2}$) fins i tot quan el quocient F_v/F_m presenta o no petites variacions (Araus i Hogan, 1994).

En aquest experiment es van utilitzar isòtops estables en concentracions naturals per verificar que canvis en les condicions de creixement (tres concentracions de sacarosa en el medi de cultiu -S₃, S₁₅ i S₃₀- i tres nivells de llum -L₅₀, L₁₀₀ i L₃₀₀- a les cambres de cultiu) i l'estadi de micropropagació (multiplicació i arrelament) podien afectar el grau

de fotoautotròfia de les plantes de gardènia cultivades *in vitro*. També es van avaluar les diferències d'anatomia, d'ultraestructura dels cloroplasts, d'intercanvi de gasos i de contingut de pigments fotosintètics de les fulles en les mateixes condicions de cultiu i en els mateixos estadis de desenvolupament. A més a més, es va estudiar si les plantetes de gardènia *in vitro* presentaven fotoinhibició durant el cultiu i si el grau de fotoautotròfia d'aquestes plantes mixotròfiques podia afectar la seva susceptibilitat a la fotoinhibició. Fins ara, s'ha postulat, però no s'ha demostrat, que cal afavorir el creixement fotoautotròfic per tal d'evitar una possible fotoinhibició de les plantes crescudes *in vitro* (Dubé i Vidaver, 1992; Hdider i Desjardins, 1994).

1.2. RESULTATS

Desenvolupament de l'autotròfia de les plantes

En la fig. 1.1 observem que en les plantes crescudes a baixa intensitat de llum, la diferència ($\delta^{13}\text{C}$ sacarosa - $\delta^{13}\text{C}$ fulles) va augmentar més del doble, la qual cosa indica que es va produir un fort increment del grau d'autotròfia, a mesura que el contingut de sacarosa del medi disminuïa des de S_{30} fins a S_5 .

Durant la fase d'arrelament, tot el conjunt de plantes crescudes en diferents medis de cultiu i sota intensitat baixa de llum (L_{50}) van presentar valors més alts de la diferència ($\delta^{13}\text{C}$ sacarosa - $\delta^{13}\text{C}$ fulles) que durant la fase de multiplicació. Això vol dir que el metabolisme fotoautotròfic està més desenvolupat durant la fase d'arrelament que en la fase de multiplicació, independentment de la quantitat de sacarosa utilitzada en el medi de cultiu (fig. 1.1). En aquesta fase, el valor de la diferència pràcticament no va canviar (de fet, va disminuir lleugerament) amb l'increment de la llum, però la fiabilitat d'aquest patró no és gaire gran perquè les plantes crescudes a L_{300} no estaven en massa bones condicions. Resumint, l'efecte més gran, com a resposta a l'increment de llum en el desenvolupament de l'autotròfia, es va observar en les plantes més heterotròfiques, és a dir, en les plantes cultivades amb S_{30} en la fase de multiplicació.

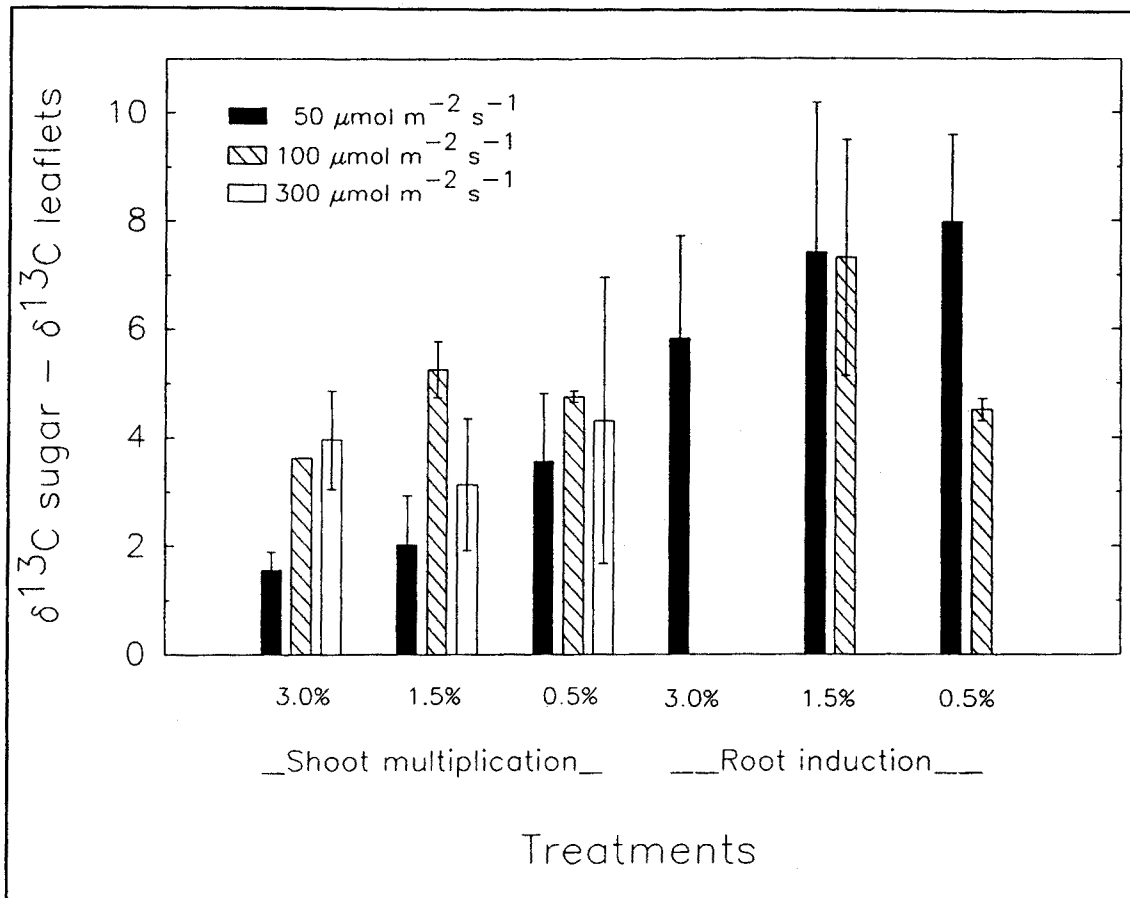


Fig. 1.1 Efecte de la llum i de la concentració de sacarosa en el medi sobre la diferència entre la $\delta^{13}\text{C}$ de la sacarosa del medi de cultiu i la $\delta^{13}\text{C}$ de la matèria seca de gardènia ($\delta^{13}\text{C}$ sacarosa - $\delta^{13}\text{C}$ fulletes) desenvolupades durant les fases de multiplicació i d'arrelament.

La intensitat de llum que s'utilitza durant el cultiu influeix en l'autotrofia de les plantetes, segons podem veure en els valors de ^{13}C a la taula 1.1. Durant la multiplicació amb S_{30} , la contribució dels fotoassimilats en el contingut total de carbó de les fulles va augmentar des de 16,1 % fins a 42,5 % i 56,4 % segons si les plantes eren cultivades a intensitat de llum baixa (L_{50}), mitjana (L_{100}) i alta (L_{300}), respectivament. Per altra banda, una disminució en la concentració de sacarosa en el medi va influir positivament en el desenvolupament de les característiques fotosintètiques. Durant la multiplicació, aquesta diferència també va augmentar amb l'increment de la intensitat de la llum (de baixa a intermèdia). Les plantes de llum alta, sobretot les de S_{15} i S_5 segueixen aquest mateix patró, encara que no tan clarament, i fins i tot és a l'inrevés en les plantes de S_{30} .

Taula 1.1 Composició isotòpica dels fotoassimilats ($\delta^{13}\text{C}$ fotoassimilats) i la contribució relativa dels fotoassimilats (% fotoassimilats) al contingut de carboni de les fulletes de gardènia crescudes a L50, L100 i L300, durant la fase de multiplicació. Les plàntules in vitro es van cultivar en un medi MS amb 3,0 % de sucre de bleda-rave (planta C3) o de canya (planta C4). En els càlculs, els valors de $\delta^{13}\text{C}$ d'ambdós sucres, com també els de les fulletes dels diferents tractaments, es van utilitzar tal com es descriu en les equacions [4] i [5] de materials i mètodes.

	$\delta^{13}\text{C}$ sucrose	leaflets		
		50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
$\delta^{13}\text{C}$ sugar cane (‰)	-11.60	-13.15	-15.22	-15.55
$\delta^{13}\text{C}$ sugar beet (‰)	-23.65	-23.26	-22.15	-20.81
$\delta^{13}\text{C}$ photosynthates (‰)		-21.25	-20.12	-18.61
% photosynthates		16.1	42.5	56.4

A la taula 1.2 podem veure que durant la fase de multiplicació, el contingut de clorofil·les no es veu afectat pel la quantitat de sacarosa present en el medi de cultiu i si que ho està per la intensitat de la llum, presentant el valor més alt a L₁₀₀ - S₃₀ i el més baix a L₃₀₀ - S₁₅. No hi ha diferències en el quocient *Chl a/b* i pel que respecta al quocient *Chl/Car* podríem dir que te tendència a disminuir quan s'incrementa el PPFD.

Ara bé, l'efecte del contingut de sacarosa sobre la quantitat de pigments fotosintètics en les plantes cultivades a més baixa intensitat de llum va ser menys clar encara que a l'arrelament, la tendència era a l'inrevés per als paràmetres de *Chl* total i per al quocient *Chl/Car*. D'aquesta manera, el contingut de clorofil·les va disminuir un 25 % i el quocient *Chl/Car* un 7 % entre les plantes cultivades amb S₃₀ i S₅, respectivament (veure taula 1.2).

L'efecte de la intensitat de llum durant l'arrelament va ser més fort en les plantes crescudes amb més quantitat de sucre. Durant aquesta fase, més que en la de multiplicació, l'increment de llum es tradueix en un contingut de clorofil·les més baix. El mateix s'observa en el quocient *Chl/Car*, mentre que en el quocient *Chl a/b* és menys evident (taula 1.2). Lee *et al.* (1985) van descriure un comportament similar en els canvis de clorofil·la total i una absència de canvis en el quocient *Chl a/b* com a resposta

a variacions en la intensitat de llum en plantes de *Liquidambar* desenvolupades *in vitro*. L'efecte del contingut de sacarosa sobre els pigments fotosintètics va ser més evident en la fase d'arrelament i en un nivell de llum intermèdia. Així, disminuint el contingut de sacarosa (des de S₃₀ fins S₅) a L₁₀₀, el contingut de clorofil·les va augmentar un 60 %, el quocient *Chl a/b* un 23 % i el *Chl/Car* un 47 %. Aquests canvis estarien d'acord amb una capacitat fotosintètica més desenvolupada en les plantes crescudes amb poca sacarosa.

Taula 1.2 Efecte de la concentració de sacarosa en el medi i nivell de llum sobre el contingut total de clorofil·les a i b (*Chl*), el quocient a/b (*Chl a/b*) i el quocient clorofil·les/carotenoides (*Chl/Car*) de les fulletes de gardènia desenvolupades durant les fases de multiplicació i d'arrelament. Els valors són la mitjana ± ES de 5-6 mostres i cada mostra té almenys 2 fulletes. Per a cada període de desenvolupament, les mitjanes dins una mateixa columna que no tenen la mateixa lletra són significativament diferents ($p \leq 0,05$) segons el test de comparació Duncan.

Growth conditions	Chl mg g ⁻¹ FW	Chl a/b	Chl/Car
Shoot multiplication			
3.0% sucrose			
50 μmol m ⁻² s ⁻¹ PPFD	1.36±0.12 ^{ab}	3.02±0.05 ^b	4.58±0.05 ^c
100 μmol m ⁻² s ⁻¹	1.95±0.08 ^c	3.03±0.07 ^b	4.25±0.05 ^c
300 μmol m ⁻² s ⁻¹	1.42±0.13 ^{ab}	2.92±0.11 ^{ab}	–
1.5% sucrose			
50 μmol m ⁻² s ⁻¹ PPFD	1.23±0.15 ^{ab}	3.00±0.07 ^b	4.46±0.07 ^c
100 μmol m ⁻² s ⁻¹	1.20±0.24 ^{ab}	3.05±0.19 ^b	3.72±0.16 ^b
300 μmol m ⁻² s ⁻¹	0.96±0.09 ^a	3.31±0.49 ^b	–
0.5% sucrose			
50 μmol m ⁻² s ⁻¹ PPFD	1.30±0.10 ^{ab}	3.16±0.09 ^b	4.58±0.11 ^c
100 μmol m ⁻² s ⁻¹	1.49±0.18 ^b	2.39±0.36 ^a	3.73±0.24 ^b
300 μmol m ⁻² s ⁻¹	1.08±0.15 ^{ab}	3.09±0.17 ^b	3.34±0.12 ^a
Root induction			
3.0% sucrose			
50 μmol m ⁻² s ⁻¹ PPFD	2.32±0.18 ^d	2.78±0.02 ^b	5.10±0.09 ^d
100 μmol m ⁻² s ⁻¹	0.98±0.08 ^a	2.33±0.18 ^a	3.09±0.18 ^a
1.5% sucrose			
50 μmol m ⁻² s ⁻¹ PPFD	2.26±0.19 ^d	2.91±0.01 ^b	5.05±0.17 ^d
100 μmol m ⁻² s ⁻¹	1.17±0.07 ^{ab}	3.02±0.09 ^b	3.83±0.17 ^b
0.5% sucrose			
50 μmol m ⁻² s ⁻¹ PPFD	1.75±0.13 ^c	2.70±0.06 ^b	4.72±0.09 ^{cd}
100 μmol m ⁻² s ⁻¹	1.57±0.16 ^{bc}	2.87±0.06 ^b	4.55±0.15 ^c

Seguint la mateixa tònica, les taxes de fotosíntesi aparent i de respiració a les fosques durant la fase de multiplicació en una intensitat de llum intermèdia van ser un 13 % i un 80 % més altes, respectivament, en les plantes amb S_5 que en les que tenien S_{30} , mentre que el quocient de fotosíntesi aparent respecte a la respiració a les fosques va disminuir un 37 % (taula 1.3).

Taula 1.3 Fotosíntesi aparent (AP) i respiració a les fosques (Rd) per tub, i concentració estable de CO₂ assolit durant el període de llum ([CO₂]-light) a diferents concentracions de sacarosa del medi. Les mesures es van prendre durant la fase de multiplicació del cultiu de gardènia amb un analitzador portàtil (LICOR 6200) en plantes crescudes amb L100. La fotosíntesi aparent i la concentració estable de CO₂ durant el període de llum es van mesurar a la mateixa intensitat de llum a 20 °C. Els valors són la mitjana de 5-7 mesures.

Sucrose concentration	0.5%	1.5%	3.0%
AP (nmol tube ⁻¹ s ⁻¹)	0.86±0.11	0.82±0.17	0.76±0.09
Rd (nmol tube ⁻¹ s ⁻¹)	0.74±0.04	0.57±0.09	0.41±0.05
AP/Rd	1.16	1.45	1.85
(CO ₂)-light (μl l ⁻¹)	117±10	122±10	85±11

Es van observar diferències importants en el grau de desenvolupament de l'anatomia de les fulles en els diferents estadis i tractaments. Les fulles presenten unes característiques fotosintètiques més desenvolupades (figs. 1.2A-D, 1.3) com més avançat és l'estadi de creixement, i/o per raó d'estar cultivades amb intensitat de llum intermèdia (comparades amb les crescudes a llum més baixa) i/o amb quantitat de sacarosa més baixa. De fet, l'anatomia de les plantes crescudes *in vitro* va mostrar els mateixos canvis habitualment trobats en les plantes cultivades *ex vitro* en augmentar la intensitat de llum, és a dir: un augment relatiu de la importància dels espais intercel·lulars dins el mesòfil. També va augmentar el tamany relatiu del parènquima de palissada si es compara amb el parènquima esponjós, amb unes cèl·lules cada vegada amb forma més prismàtica i amb major densitat de cloroplasts dins les cèl·lules. Durant la fase de multiplicació el gruix de les fulles no queda afectat per la quantitat de sacarosa del medi de cultiu. Per cada

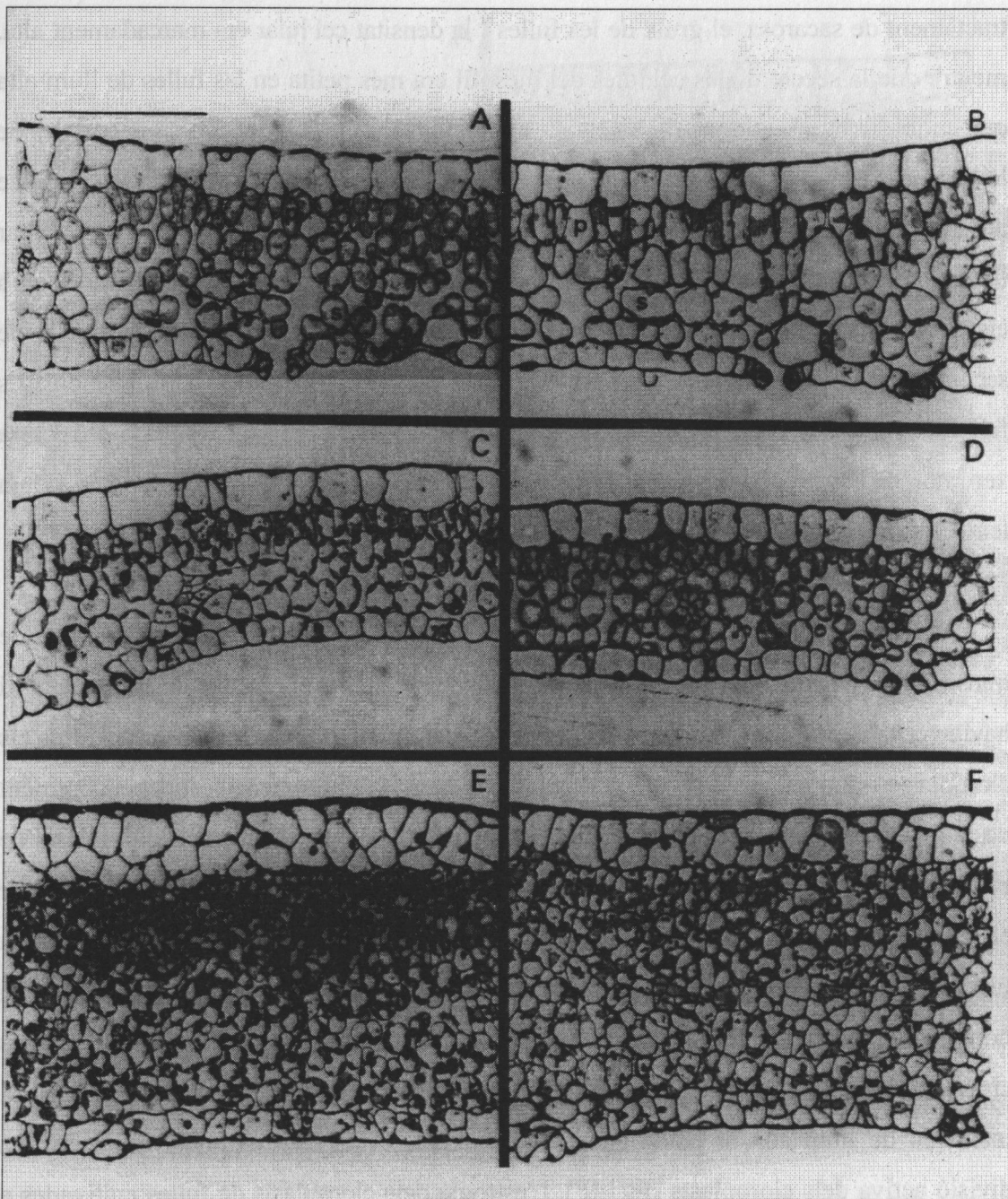


Fig. 1.2 Observació al microscopi d'unes seccions de fulles de gardènia desenvolupades durant la fase de multiplicació a diferents nivells de llum i concentracions de sacarosa en el medi. (A) L_{50} i S_{30} ; (B) L_{50} i S_5 ; (C) L_{100} i S_{30} ; (D) L_{100} i S_5 ; (E) L_{300} i S_{30} ; (F) L_{300} i S_5 . Es poden observar diferències de desenvolupament entre les cèl·lules del parènquima de palissada i del parènquima esponjós, com també diferències entre el gruix total de la fulla i la mida de les cèl·lules del mesòfil. P, parènquima de palissada; S, parènquima esponjós. La barra representa 100 μm .

tractament de sacarosa, el gruix de les fulles i la densitat cel·lular era marcadament alta, mentre que la secció de les cèl·lules del mesòfil era més petita en les fulles de llum alta que en les de llum intermèdia i baixa. Si comparem les fig. 2 i 3 observarem que des de la fase de multiplicació fins a la d'arrelament, el gruix de les fulles i el grau de desenvolupament dels estomes també va variar. Així, el gruix de les fulles va augmentar lleugerament, mentre que les cèl·lules estomàtiques apareixien més desenvolupades amb els porus quasi formats (vegeu les fletxes a la fig. 3) com a resposta als nivells de sacarosa més baixos, o bé, a intensitats de llum més altes. Durant la multiplicació, les fulles de les plantes cultivades a intensitat de llum alta (L_{300}) mostraven una estructura xeromòrfica que pot ser causada per un efecte combinat de la llum alta i de la temperatura elevada (vegeu Araus *et al.*, 1986 a).

L'observació de les cèl·lules del mesòfil amb el microscopi electrònic de transmissió va demostrar que en tots els tractaments i en tots els estadis de creixement hi havia veritables cloroplasts (fig. 4-5), encara que el desenvolupament dels grana dins els cloroplasts i la quantitat de midó era variable. Durant la multiplicació, independentment de la quantitat de sacarosa del medi, era bastant freqüent observar en els cloroplasts de baixa intensitat de llum (L_{50}) els tilacoides inflats, amb la qual cosa era difícil de distingir els grana. Per contra, a un nivell de llum intermedi (L_{100}), els cloroplasts de S_{30} i S_5 tenien tilacoides aparentment normals amb piles de grana clarament visibles. A llum alta, el nombre de tilacoides per grana va descendre molt, sobretot en les fulles de plantes crescudes amb S_{30} (fig. 4E). D'altra banda, en els cloroplasts de fulles de S_5 de sacarosa i intensitat de llum alta hi havia grana ben formats, i fins i tot es podia observar una divisió activa dels cloroplasts (fig. 4F). L'estroma dels cloroplasts de fulles cultivades a llum alta i intermèdia, amb S_5 mostrava una major densitat electrònica, molt més que els crescuts amb S_{30} (fig. 4C-F). A intensitat de llum alta s'havia (fig. 4E-F) acumulat molta quantitat de midó. Durant l'arrelament, a baixa intensitat de llum i en els dos nivells de sacarosa estudiats, els grana apareixien ben desenvolupats (fig. 5). En els dos nivells de llum estudiats, els cloroplasts de plantes cultivades amb S_5 presentaven un estroma molt més dens que les de S_{30} (fig. 5).

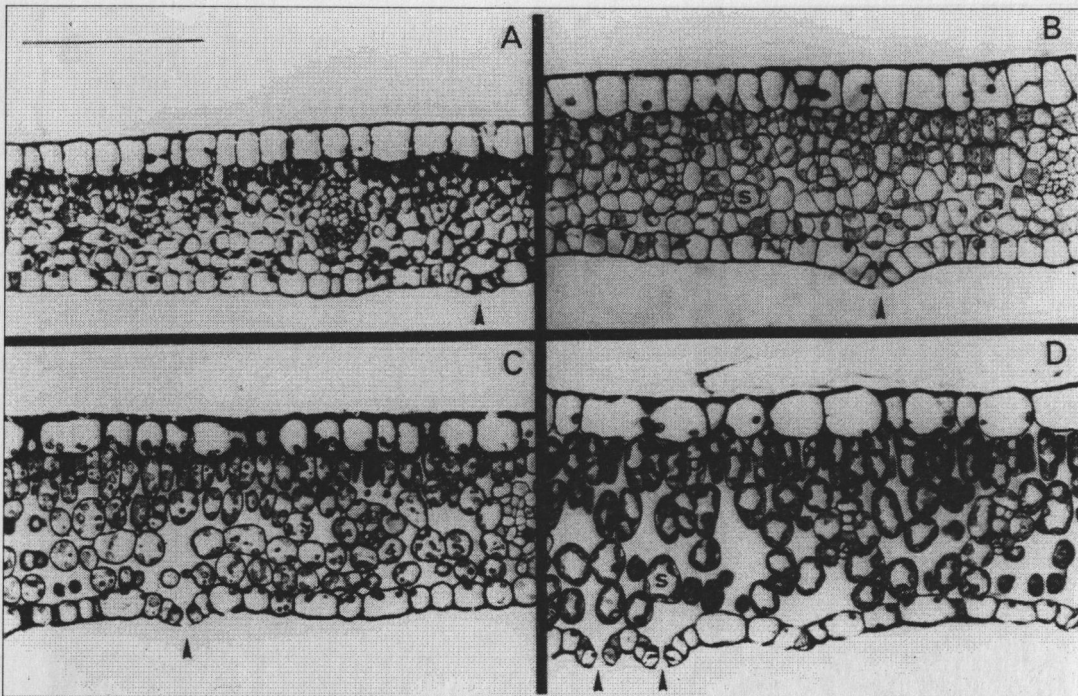


Fig. 1.3 Observació al microscopi d'unes seccions de fulles de gardènia desenvolupades durant la fase d'arrelament a diferents nivells de llum i a diferents concentracions de sacarosa en el medi. (A) L_{50} i S_{30} ; (B) L_{50} i S_5 ; (C) L_{100} i S_{30} ; (D) L_{100} i S_5 . Es poden observar diferències de desenvolupament entre les cèl·lules del parènquima de palissada i del parènquima esponjós com també diferències entre el gruix total de la fulla i la mida de les cèl·lules del mesòfil i el desenvolupament de les cèl·lules de guarda. P, parènquima de palissada; S, parènquima esponjós; fletxes, cèl·lules de guarda. La barra representa 100 μm .

Es podia observar molta acumulació de midó en els cloroplasts dels dos nivells de sacarosa en el nivell de llum intermedi. Els grana es veien una mica desorganitzats, probablement per raó de la presència de midó (fig. 1.5C-D). De fet, durant l'arrelament, a S_5 , la fotoautotròfia no es va estimular (fins i tot la diferència $\delta^{13}\text{C}$ sacarosa - $\delta^{13}\text{C}$ fulles era menor) en la llum intermèdia comparada amb la baixa (fig. 1.1).

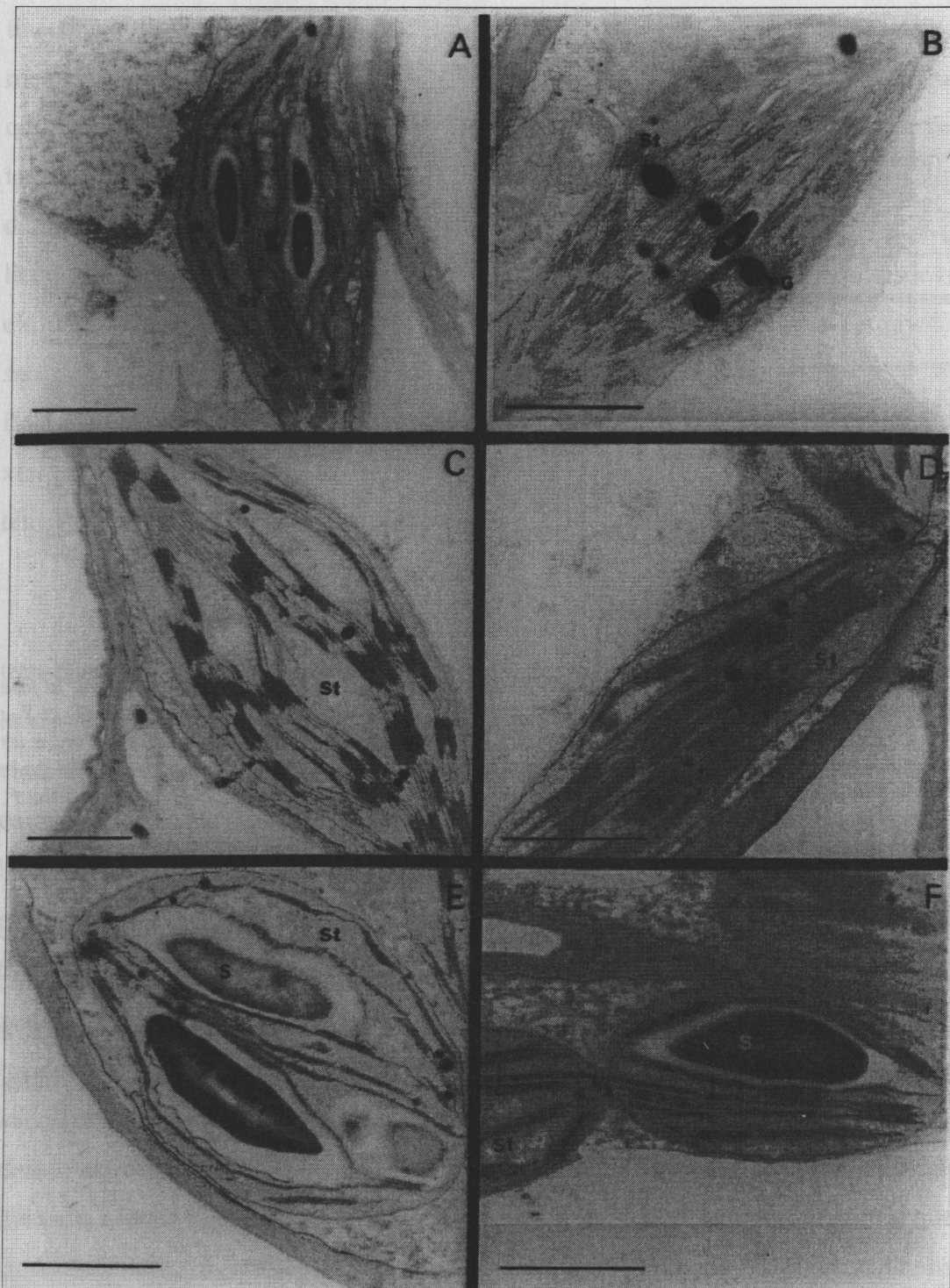


Fig. 1.4 Fotografies al microscopi electrònic de transmissió de cloroplasts de cèl·lules del mesòfil de fulles de gardènia desenvolupades durant la fase de multiplicació a diferents nivells de llum i a diferents concentracions de sacarosa en el medi. (A) L_{50} i S_{30} ; (B) L_{50} i S_5 ; (C) L_{100} i S_{30} ; (D) L_{100} i S_5 ; (E) L_{300} i S_{30} ; (F) L_{300} i S_5 . És interessant observar les diferències entre el desenvolupament dels grana com també en la densitat de l'estroma i en la presència de midó; G, grana; PG, plastoglòbul; S, gra de midó; St, estroma. La barra representa 1 μm .

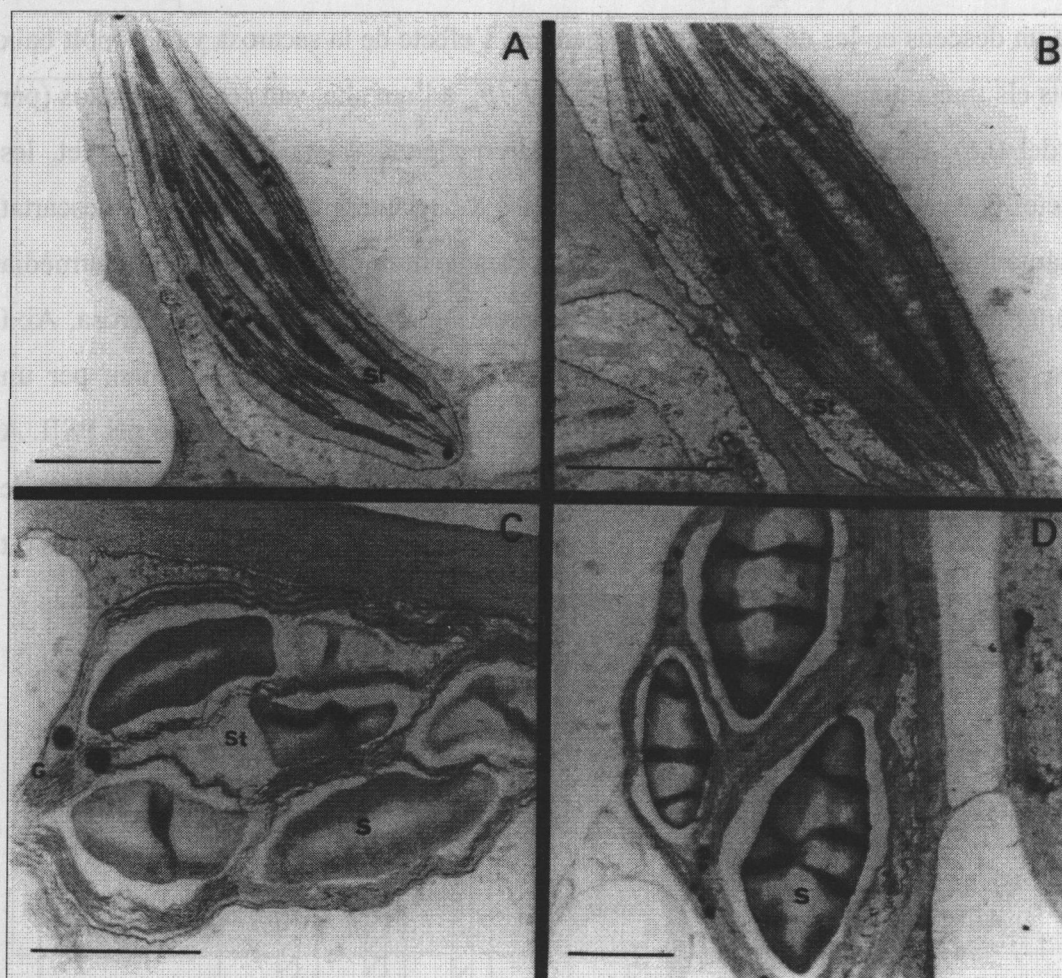


Fig. 1.5 Fotografies al microscopi electrònic de transmissió de cloroplasts de cèl·lules del mesòfil de fulles de gardènia desenvolupades durant la fase d'arrelament a diferents nivells de llum i a diferents concentracions de sacarosa en el medi. (A) L₅₀ i S₃₀; (B) L₅₀ i S₅; (C) L₁₀₀ i S₃₀; (D) L₁₀₀ i S₅. És interessant observar les diferències entre tractaments en l'acumulació de grans de midó com també en la densitat de l'estroma i la desorganització dels grana. G, grana; S, gra de midó; St, estroma. La barra representa 1 μm.

Fotoinhibició durant el cultiu *in vitro*

Les mesures de la fluorescència de la clorofil·la, en la fase de multiplicació, van mostrar un descens del quocient F_v/F_m i de $t_{1/2}$ segons augmentava la intensitat de llum. Això indica un increment de la fotoinhibició en augmentar la quantitat de llum (fig. 1.6). Així, en augmentar la radiació des de L₅₀ fins L₃₀₀ (fig. 1.6), les plantes crescudes amb S₁₅ i S₃₀ en el medi mostraven un descens gradual del quocient F_v/F_m . Per contra, en les plantes crescudes amb S₅, el quocient F_v/F_m no estava afectat per l'increment de la quantitat de llum des de nivell baix fins a nivell intermedi, però hi

havia un descens en les de llum alta. En general, l'efecte de la sacarosa va ser molt baix en tots els tractaments assajats, i els valors de F_v/F_m a llum alta, van ser molt baixos (per sota del 0,6), excepte els de S_5 , on s'observaren alguns valors més alts. De fet, les plantetes crescudes a L_{300} no van arribar a la fase d'arrelament, ja que s'havien descartat prèviament atès que apareixien molt danyades. Des de llum baixa (L_{50}) a llum intermèdia (L_{100}), el paràmetre F_m va augmentar marcadament en els tres nivells de sacarosa. Així doncs, el descens de F_v/F_m al augmentar la llum va ser causat especialment per un increment de F_o , la qual cosa va indicar la inactivació dels centres de reacció del PSII. A intensitat de llum més alta, aquest increment de F_o anava acompanyat d'un descens de F_m , en relació a llum intermèdia (fig. 1.6). Aquests canvis en F_o i F_m en el nivell més alt de llum van ser menys marcats en les plantes cultivades amb S_5 .

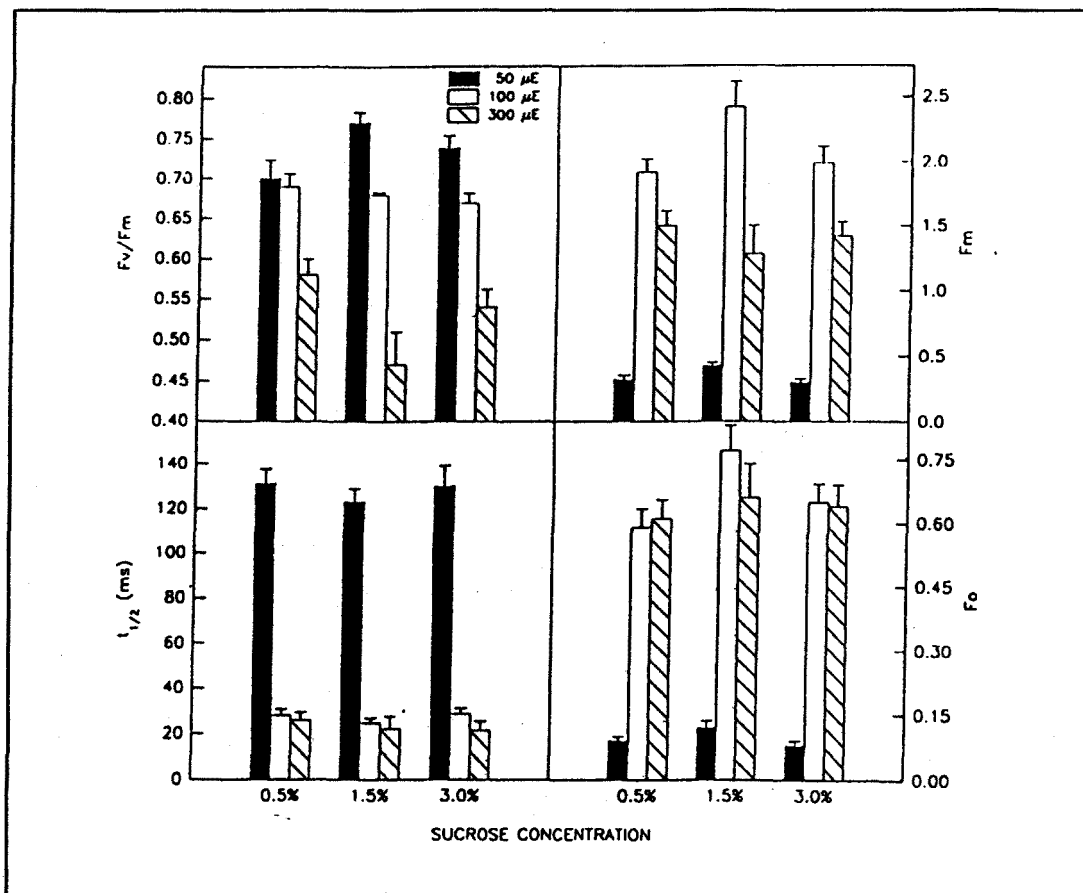


Fig. 1.6 Efecte de la concentració de sacarosa en el medi de cultiu i dels diferents nivells de llum sobre els paràmetres de la fluorescència de la clorofil·la: F_v/F_m , $t_{1/2}$, F_m i F_o , en fulletes de gardènia desenvolupades durant la fase de multiplicació. Els valors són les mitjanes \pm ES d'almenys 13 rèpliques. Les concentracions de sacarosa van ser S_5 , S_{15} i S_{30} , i la intensitat de llum de L_{50} , L_{100} i L_{300} .

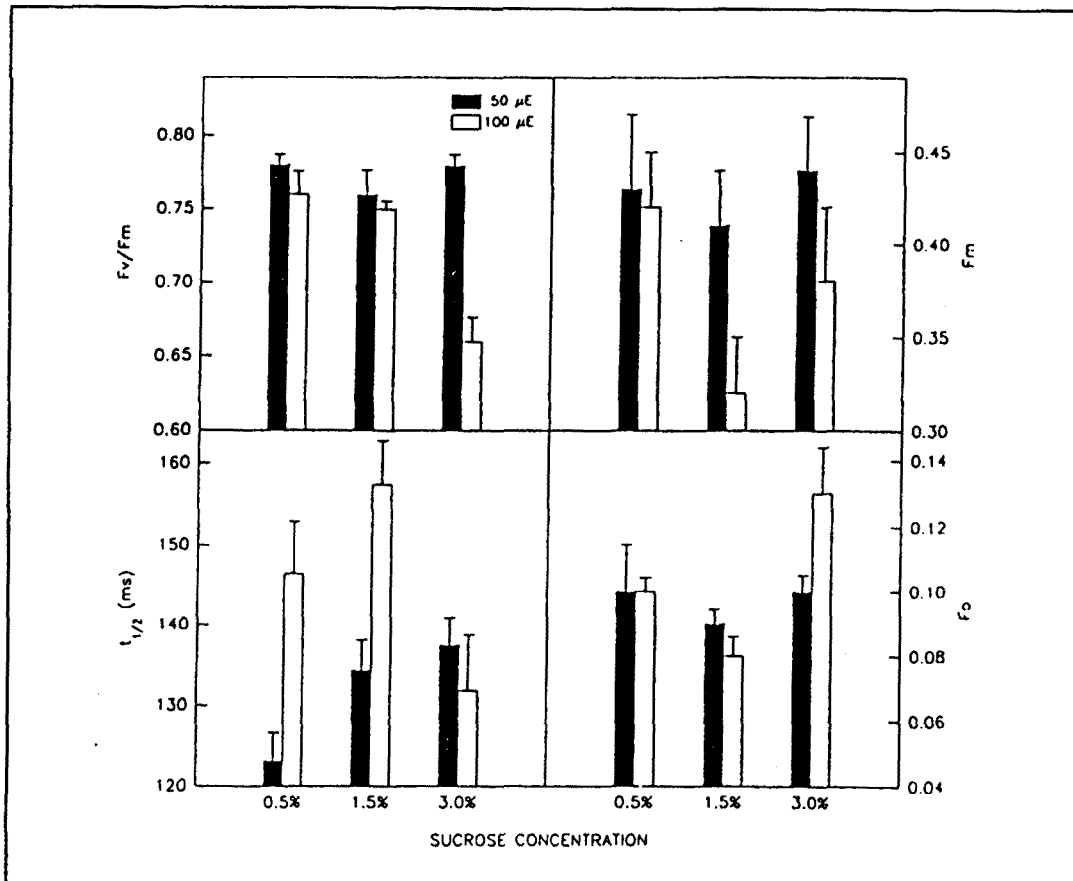


Fig. 1.7 Efecte de la concentració de sacarosa en el medi de cultiu i dels diferents nivells de llum sobre els paràmetres de la fluorescència de la clorofil·la: F_v/F_m , $t_{1/2}$, F_m i F_0 , en fulletes de gardènia desenvolupades durant la fase d'arrelament. Els valors són les mitjanes \pm ES d'almenys 13 rèpliques. Les concentracions de sacarosa van ser S₅, S₁₅ i S₃₀, i la intensitat de llum de L₅₀, L₁₀₀ i L₃₀₀.

Durant l'arrelament, les plantes crescudes amb S₅ i S₁₅ no van presentar fotoinhibició quan es van posar sota el nivell més alt de llum assajat per a aquest estadi, que en aquest cas era de L₁₀₀ (llum intermèdia en la fase de multiplicació). Així, no es va observar un descens significatiu en el quocient F_v/F_m que coincidia amb l'increment de la intensitat de la llum, de baixa a intermèdia (fig. 1.7). Les plantes es van adaptar fotosintèticament a l'increment de llum i en aquest cas els valors de F_0 de les plantes de llum intermèdia gairebé no van variar, o fins i tot van disminuir una mica, mentre que el $t_{1/2}$ va ser significativament ($p \leq 0,05$) més alt que en les plantes de llum baixa. Per contra, les plantes crescudes amb S₃₀ estaven força fotoinhibides quan es cultivaven a L₁₀₀. D'aquesta manera, el quocient F_v/F_m va disminuir significativament ($p \leq 0,01$) i F_0 va

augmentar ($p \leq 0,05$) mentre que el $t_{1/2}$ i F_m tenien tendència a disminuir. En aquests dos últims factors els canvis van ser menors que els relacionats amb la fotoinhibició durant el període de multiplicació. Els factors que indueixen la fotoinhibició durant l'arrelament, semblen afectar negativament el creixement de les plantes. En el conjunt dels assaigs, tenint en compte totes les concentracions de sacarosa i els nivells de llum, hi va haver una correlació positiva ($r = 0,82$, $p \leq 0,05$) entre el quocient F_v/F_m i el percentatge (en una escala logarítmica) de les plantes amb arrels d'1 cm o més de longitud (fig. 1.8). El creixement de les arrels era menor quan s'incrementava el PPFD, sobretot en les plantes amb més sacarosa en el medi.

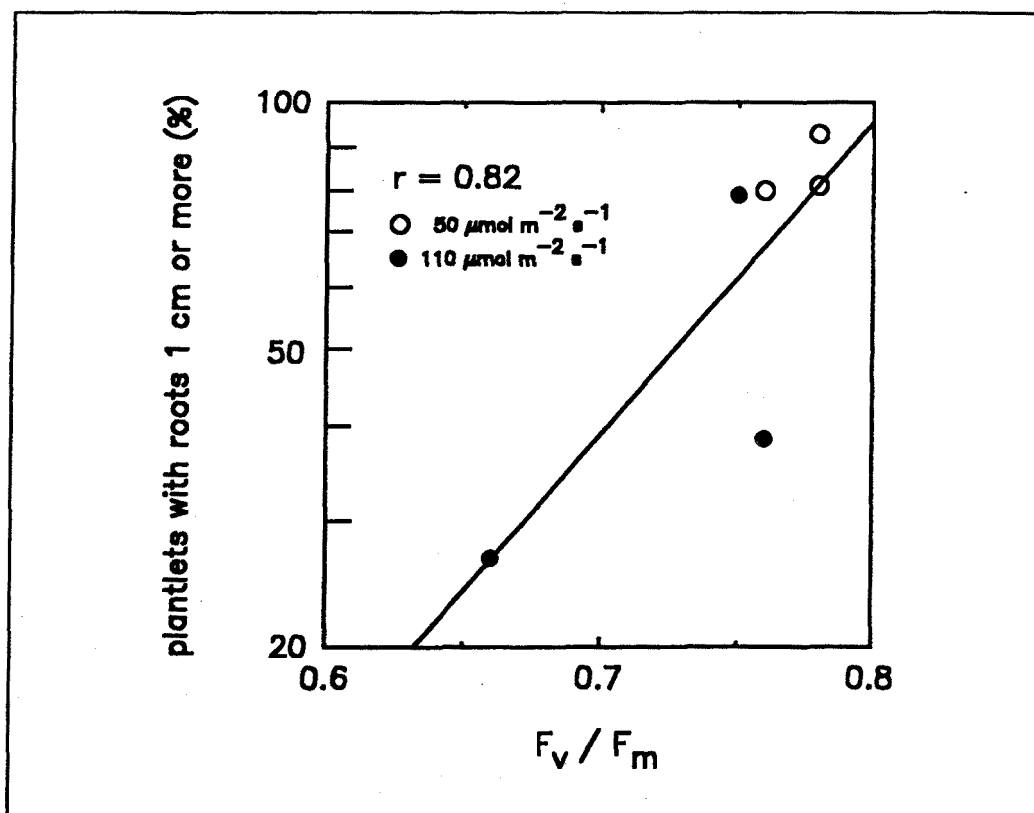


Fig. 1.8 Relació entre el quocient F_v/F_m i el percentatge (% en escala logarítmica) de plantes amb arrels d'1 cm o més de longitud si s'ajuntaven tots els tractaments amb els tres nivells de sacarosa en el medi (S5, S15 i S30) i els dos nivells de llum (L50 i L100) estudiats.

1.3. DISCUSSIÓ

En els cultius fotomixotròfics *in vitro*, l'origen metabòlic del carbó en les fulles pot determinar-se tenint en compte les petites diferències que hi ha entre les fonts de carboni en el rang de composicions isotòpiques naturals. En el nostre cas, les dues fonts de carbó que participen en el cultiu *in vitro* es poden distingir per la seva composició isotòpica natural: productes heterotròfics enriquits en ^{13}C formats a partir del sucre de canya del medi de cultiu ($\delta^{13}\text{C} = -11,60\text{‰}$), i fotoassimilats ($\delta^{13}\text{C}$ al voltant de -23‰), formats a partir de la fotosíntesi, valor típic d'una planta C_3 (Farquar *et al.*, 1989). En aquest cas, basant-se en la composició d'isòtops de ^{13}C , per a un determinat estadi de cultiu, les plantes crescudes amb poca quantitat de sacarosa van ser molt més autotròfiques que les crescudes amb més quantitat de sacarosa, sobretot a llum baixa (fig. 1.1). A més a més, les plantes, en la fase d'arrelament, també van tenir unes característiques fotoautotròfiques més desenvolupades que en les de la fase de multiplicació. L'efecte de la llum va ser menys clar; per exemple, un nivell intermedi de llum afavoreix la fotoautotròfia només durant la multiplicació. En aquest sentit, Dubé i Vidaver (1992) van esmentar que podria ser possible afavorir el creixement fotoautotròfic en condicions de llum altes associades amb altres canvis, com ara un augment de la concentració de CO_2 en l'atmosfera del cultiu.

En les fulles de plantes cultivades a diferents intensitats de llum s'han pogut observar canvis en alguns dels paràmetres estudiats (intercanvi de gasos, estructura, contingut de pigments), similars als indicats per Percy i Sims (1994) en plàntules cultivades *ex vitro*. Els resultats, però, ens mostren que l'estructura i el metabolisme fotosintètic de les fulles *in vitro* estan afectats per altres factors a part de la llum (Lee *et al.*, 1985). Ja s'ha descrit en altres treballs de cultiu *in vitro*, que la baixa intensitat de llum i un aportació excessiva de sacarosa en el medi limiten la fotosíntesi (Kozai, 1991b i d'altres referències citades anteriorment; vegeu també taula 1.2), encara que hi pot haver diferències genètiques com a resposta a l'intercanvi de gasos sobre les condicions fotoautotròfiques (Galzy i Compan, 1992). En aquest treball s'ha observat un increment del contingut de clorofil·les com a resposta a la baixa concentració de sacarosa en el

medi de cultiu durant la fase d'arrelament pel que fa a la llum intermèdia, cosa que també ha estat descrita en altres treballs i en diferents plantes (Kozai, 1991b; Kubota i Kozai, 1992). També, Lee *et al.* (1985) van descriure un patró molt similar al nostre en l'evolució de clorofil·la total i una absència clara de canvis en el quocient *Chl a/b* com a resposta a la variació de la intensitat de la llum en plantes de *Liquidambar in vitro*. Seguint les pautes generals de l'anatomia i la ultraestructura de les fulles, els continguts de pigments fotosintètics i l'intercanvi de gasos de plantes *ex vitro* (Araus *et al.*, 1986b; Pearcy i Sims, 1994) es podria preveure que, en un estadi de cultiu i en una intensitat de llum determinades, les plantetes crescudes amb menys sacarosa en el medi mostren més capacitat fotosintètica que les que han crescut amb continguts més alts. Tanmateix, l'efecte d'un nivell baix de sacarosa en el contingut de clorofil·les de les fulles de les plantes menys fotoautotròfiques (com ara les de la fase de multiplicació o les de llum baixa en l'arrelament) va ser contradictori si es considerava que la quantitat baixa de sacarosa va estimular la fotoautotròfia en aquestes plantes (fig. 1.1). Així, l'acumulació de clorofil·les deguda a la sacarosa no es va notar durant la fase de multiplicació (independentment de la intensitat de llum considerada). En la fase d'arrelament, l'efecte de la concentració de sacarosa en el medi sobre el contingut de clorofil·les i en condicions de llum baixa va ser justament la contrària (taula 1.2). De tot això podem deduir que el contingut de clorofil·les, per si mateix, no és un bon indicador del desenvolupament fotoautotròfic de les plantes.

Ja s'ha comentat que, en les plantes de l'estadi d'arrelament, es van observar unes característiques fotosintètiques més desenvolupades que les que apareixien durant la multiplicació. En aquest cas, les plantes crescudes amb L_{50} durant la multiplicació, comparades amb la fase d'arrelament, presentaven un contingut baix en clorofil·les, un quocient *Chl/Car* també baix, però un quocient *Chl a/b* més alt (taula 1.2). Aquests resultats estan d'acord amb el fet que en la fase de multiplicació, les plantes estan menys desenvolupades fotosintèticament (Lee *et al.*, 1985). Cal esmentar que en la fase d'arrelament les plantetes han estat més temps sotmeses a unes condicions de llum i de sacarosa determinades i, per tant, estan més adaptades. Les diferències en l'anatomia de fulles (fig. 1.2A-B, 1.3A-B) i en la ultraestructura de cloroplasts (fig. 1.4A-B, 1.5A-B)

en els mateixos tractaments també donen suport a aquesta conclusió.

En aquest estudi, els valors de $\delta^{13}\text{C}$ dels fotoassimilats (al voltant de -20 ‰ , taula 1.1) estan a la zona més alta en les plantes C_3 (Farquar *et al.*, 1989), cosa que pot ser deguda a la poca difusió del CO_2 a través del tub de cultiu. Encara que la concentració de CO_2 dins la cambra de cultiu era l'atmosfèrica ($355\ \mu\text{l l}^{-1}$), després de 2-3 h de llum, la concentració dins els tubs descendia fins a uns $100\ \mu\text{l l}^{-1}$ (taula 1.3). Diferents autors (Fujiwara *et al.*, 1992; Kozai, 1991b; Kozai *et al.*, 1990a; Kubota i Kozai, 1992; Righetti *et al.*, 1993; Solárová, 1989) han descrit una concentració estable de CO_2 en els tubs de cultiu entre $100\text{-}200\ \mu\text{l l}^{-1}$. Aquests valors alts de $\delta^{13}\text{C}$ en els fotoassimilats també poden ser deguts a altres mecanismes de fixació de CO_2 diferents del de la ribulosa 1,6 bifosfat carboxilasa. L'enzim fosfoenolpiruvat-carboxilasa no discrimina contra el ^{13}C (Farquhar *et al.*, 1989) i sembla que és molt actiu en els teixits joves de les plantes C_3 durant l'estadi de multiplicació (Hdider i Desjardins, 1994).

Els valors més alts de fotosíntesi aparent en les plantes cultivades amb S_5 (taula 1.3) estan d'acord amb treballs previs en què es descriu un augment de la fotosíntesi quan es cultivaven les plantes en medis amb concentració molt baixa o lliures de sacarosa (Kozai, 1991b). L'increment de les taxes de respiració a les fosques en els cultius amb poca concentració de sacarosa contrasta amb la majoria de la literatura (veure Galzy i Compan, 1992; Hdider i Desjardins, 1994). Ara bé, el fort desenvolupament de la maquinària fotosintètica en els nivells baixos de sacarosa podria estar associar-se no solament a altes taxes de fotosíntesi aparent sinó també a un augment de la taxa de respiració a les fosques. Aquestes alteracions en l'intercanvi de gasos en les plantes de l'esmentat tractament són comparables a aquells que esmenten Percy i Sims (1994) en plantes aclimatades *ex vitro* en ambients amb nivells alts de llum. Kozai *et al.* (1988) ja havien descrit en cultiu *in vitro* de patata que les plantes crescudes en concentració baixa de sacarosa, llum alta i enriquiment de CO_2 , tenien més tendència, amb el temps, a mostrar taxes més altes de respiració a les fosques que les plantes crescudes en condicions més heterotròfiques (fins i tot les cultivades en els mateixos nivells de llum i CO_2 , però augmentant la concentració de sacarosa). A més a

més, aquestes diferències de respiració entre tractaments es van assolir al mateix temps que les diferències en taxes de fotosíntesi aparent.

Durant els dos estadis de creixement *in vitro*, a baix PPFD, no es va observar fotoinhibició, independentment de la concentració de sacarosa del medi de cultiu. De fet, el cultiu de baixa intensitat de llum (aprox. $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) és el que predomina en molts experiments i en cambres de cultiu *in vitro* (Lee *et al.*, 1985; Thorpe i Patel, 1984). En el nostre treball, la llum baixa associada amb les dues concentracions més altes de sacarosa (S_{15} i S_{30}) ha conduït al creixement més gran de les plantes de gardènia durant els dos estadis de creixement (Serret *et al.*, 1995). En canvi, Hdider i Desjardins (1994) van observar en plantes de maduixa micropropagades sota condicions de llum de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (encara que amb un fotoperíode de 16:8 h) un descens del quocient F_v/F_m quan posaven 3,0 % de sacarosa comparat amb 1,0 %. Un excés d'energia absorbida per les fulles, sobretot quan s'utilitzen tubs hermètics, com en aquest cas, redueix l'intercanvi de CO_2 amb l'exterior i comporta que durant el període de llum hi hagi concentracions baixes de CO_2 dins els tubs. Aquest fet pot incrementar els danys produïts a les plantes crescudes en nivells alts de llum. L'excés de llum durant el cultiu *in vitro* pot no tenir un efecte positiu o fins i tot pot ser perillós, en particular quan hi falta CO_2 . Les plantes de gardènia, durant l'estadi de multiplicació, i en condicions de llum alta, van tenir uns valors molt baixos de F_v/F_m , com també un fort descens de $t_{1/2}$ i un considerable augment de F_o , la qual cosa ens indica que hi va haver una gran fotoinhibició en aquelles fulles. Aquest fet està d'acord amb la baixa taxa de supervivència que van presentar les plantes d'aquest tractament. El quocient F_v/F_m és un indicador dels canvis en l'eficiència quàntica per raó de la fotoinhibició de la fotosíntesi (Björkman i Demmig, 1987). El paràmetre $t_{1/2}$ és funció de la taxa de reaccions fotoquímiques i del tamany de l'acceptor d'electrons en la banda reductora del PSII, incloent-hi el *pool* de la plastoquinona (Öquist i Wass, 1988). Un increment de F_o , com el que es va observar durant la multiplicació en els nivells de llum alts i intermedis, és característic d'una destrucció dels centres de reacció del PSII, i probablement condueix a una destrucció de la maquinària fotosintètica (fig. 1.4E-F). Aquest descens de F_v/F_m , acompanyat d'un increment de F_o , està d'acord amb altres estudis de fotoinhibició i suggereixen que hi ha més danys que

fotoprotecció (Araus i Hogan, 1994; Demmig i Bjorkman, 1987; Kamaluddin i Grace, 1992). En canvi, en l'arrelament, en les plantes cultivades a llum més alta i per a S_{15} i S_{30} , el descens de F_v/F_m no anava associat solament amb un augment de F_o , però sí amb un descens de F_m . La baixada de F_v/F_m indica un increment de fotoprotecció en aquest experiment i, en general, aquest fet s'associa amb una lleugera fotoinhibició (Ludlow i Bjorkman, 1984). Així doncs, en aquestes plantes, uns valors baixos de F_m es poden associar amb un increment de l'extinció no fotoquímica dels cloroplasts. Addicionalment, la disminució del flux d'electrons del complex dissociatiu d'aigua podria conduir a un deteriorament de la banda del donador d'electrons, probablement baixant F_m i allargant el $t_{1/2}$ (Demming-Adams *et al.*, 1989) sense notar canvis aparents en F_v/F_m , tal com es va observar en la fase d'arrelament amb S_{15} i L_{100} . Per altra banda, un augment de $t_{1/2}$, sense canvis en cap dels altres paràmetres de fluorescència, o fins i tot amb un petit descens de F_o , és esperable si s'incrementa el nombre de centres desactivadors de calor (Krause, 1988) o si s'afavoreix la distribució d'energia cap al PSI (estat 1-estat 2). Aquest patró es va observar en la fase d'arrelament en les plantes crescudes amb les dues concentracions més baixes de sacarosa (S_5 i S_{15}) com a resposta a l'increment del nivell de llum (fig. 1.7); aquest fet suggereix que aquestes plantes són les que estan fotosintèticament més ben adaptades als nivells de llum. A més, en règim de llum intermèdia, els valors alts de $t_{1/2}$ durant l'arrelament, comparats amb els de la fase de multiplicació, són deguts probablement (almenys en part) a unes dimensions més petites de l'antena i a un *pool* més gran de plastoquinones (Anderson *et al.*, 1988) en els cloroplasts més adaptats a irradiancies altes. De fet, les diferències en la ultraestructura dels cloroplasts (fig. 1.4-1.5) i potser en l'anatomia de les fulles (figs. 1.2-1.3) poden justificar també algunes de les diferències de valors de fluorescència que s'observen entre els diferents estadis i, en menor mesura, en les diferents condicions de cultiu *in vitro*.

Els anteriors resultats demostren que, en uns determinats nivells de llum i de sacarosa, la fotoinhibició va ser molt més forta durant la fase de multiplicació que durant la fase d'arrelament. Aquest fet pot ser degut a un desenvolupament menor dels mecanismes de protecció involucrats en la dissipació de l'excés d'energia durant la

primera fase del cultiu. D'aquesta manera, el quocient Chl/Car més petit es va observar en la fase de multiplicació i per l'arrelament en els nivells més baixos de sacarosa i les llums més altes (taula 1.2). A més, la fotoinhibició, durant l'estadi d'arrelament, no estava associada amb canvis significatius de F_o , però sí amb un descens de F_m . Per altra banda, el grau de fotoinhibició en les plantes de llum més alta sembla disminuir quan les plantes creixen amb menys quantitat de sacarosa. Les plantes d'un medi més fotoautotròfic (S_5) es van adaptar bé als nivells de llum intermedis, i fins i tot a llum alta, i mostraven menys fotoinhibició que les que havien crescut en un medi més heterotròfic (S_{30}). Estudis en plantes de pi micropropagat (Aitken-Christie *et al.*, 1992) i de maduixa (Hdider i Desjardins, 1994) van presentar valors més alts del quocient F_v/F_m en les tiges cultivades amb 0 % i 1 % de sacarosa en el medi comparats amb els de 3 % i 5 %. En resum, els nostres resultats donen suport a la hipòtesi segons la qual les plantes més afectades per nivells alts de llum durant el cultiu *in vitro* són les que tenen menys desenvolupades les característiques fotosintètiques, ja sigui a causa de les condicions del cultiu o perquè es troben en estadis primerencs de la micropropagació.