

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.



UNIVERSITAT DE BARCELONA

U

B

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

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

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

Directors de Tesi

Dra. M. Isabel Trillas Gay

Dr. Francesc X. Martínez

Autora

M. Dolors Serret Molins

**4. MICROMORFOLOGIA DE LA SUPERFÍCIE
FOLIAR DE GARDENIA JASMINOIDES DURANT
LA MICROPROPAGACIÓ I L'ACLIAMATACIÓ
POSTERIOR**

4. MICROMORFOLOGIA DE LA SUPERFÍCIE FOLIAR DE *GARDENIA JASMINOIDES* DURANT LA MICROPROPAGACIÓ I L'ACLIMATACIÓ POSTERIOR

Com a complement de l'estudi anterior, s'examina aquí la superfície foliar de plantetes de gardènia fetes amb el microscopi de rastreig amb mostres procedents de l'experiment II.

4.1. INTRODUCCIÓ

Les condicions especials en què es desenvolupa el cultiu *in vitro* fan que les plantes resultants tinguin de vegades una morfologia, una fisiologia i una anatomia anormals. Després del traspàs de les plantes a condicions *ex vitro* apareixen certes dificultats, per raó d'un desenvolupament incomplet de la cutícula, de les ceres epicuticulars i de l'aparell estomàtic. Els estomes, amb els seus moviments d'obertura i de tancament, regulen l'intercanvi gasós fotosintètic i transpiratori entre les plantes i l'atmosfera; així doncs, regulen la pèrdua d'aigua per transpiració (Mansfield, 1994). D'aquí que l'estoma esdevingui un òrgan molt important per a la planta durant l'acclimatització degut a que el VPD és elevat en comparació al que existeix *in vitro*. La capacitat de regulació de l'estoma quan la planteta es passa a condicions d'*ex vitro*, és funció de que estiguin desenvolupats els sistemes de captació d'estímuls (a la llum, al CO₂, etc.). Per preparar les plantetes per un traspàs a condicions *ex vitro* hi ha diferents alternatives. L'alternativa objecte d'estudi en el nostre treball de tesi proporcionaria unes condicions de creixement *in vitro* que motivarien el desenvolupament de l'aparell fotosintètic dins el tub. Així, canvis en la concentració de sacarosa i d'agar en el medi, i en la de CO₂ en l'atmosfera dins el tub o flascó, poden afavorir l'acclimatització *ex vitro* (Genoud-Gourichon *et al.*, 1996). Una altra estratègia consisteix a abaixar el potencial osmòtic del medi amb polietilenglicol (Pospíšilová *et al.*, 1999). En aquest sentit, la

micromorfologia de la superfície foliar, que inclou tant la cutícula com els estomes, pot quedar afectada per la inducció ambiental de les característiques autotròfiques de les plantetes *in vitro*. Altres estratègies consisteixen a disminuir la humitat de l'aire durant l'última setmana del cultiu *in vitro*, tot augmentant la irradiància o afavorint la ventilació en els pots de cultiu. Aquestes accions tenen uns riscos potencials importants atès que poden produir una ràpida dessecació de les plantetes. Segons alguns autors (Pospíšilová *et al.*, 1998; Colón-Guasp *et al.*, 1996; Hartung i Abou-Mandour, 1996), l'ABA pot intervenir i provocar un tancament dels estomes, de manera que redueix així les pèrdues d'aigua. El paclobutrazol, l'IBA o el BAP disposats dins el medi de cultiu produirien el mateix efecte.

Després del seu transplantament *ex vitro*, les plantes han de superar les noves condicions ambientals a les quals estan exposades. La taxa de transpiració baixa a mesura que l'estoma regula millor (Pospíšilová *et al.* 1998). Tot això va acompanyat de canvis no únicament en l'anatomia sinó també en la micromorfologia de la superfície foliar, especialment en la distribució i en la densitat estomàtica, mentre que les ceres epicuticulars, però, apareixen més lentament i després que hi hagi una regulació estomàtica efectiva (Drew *et al.* 1992; Romero-Aranda *et al.*, 1994; Noé i Bonini, 1996).

4.2. RESULTATS

No es van observar grans diferències en el desenvolupament de les cèl·lules estomàtiques i en l'acumulació de ceres epicuticulars entre els diferents tractaments, però sí en els diferents estadis del desenvolupament (multiplicació, arrelament i aclimatació).

Solament es van trobar estomes en la cara abaxial de la fulla, és a dir, en el revers. A la cara adaxial no n'hi havia, tot i que hi ha espècies cultivades *in vitro* que presenten estomes en les dues cares, com ara el tabac (Pospíšilová *et al.*, 1998). Les

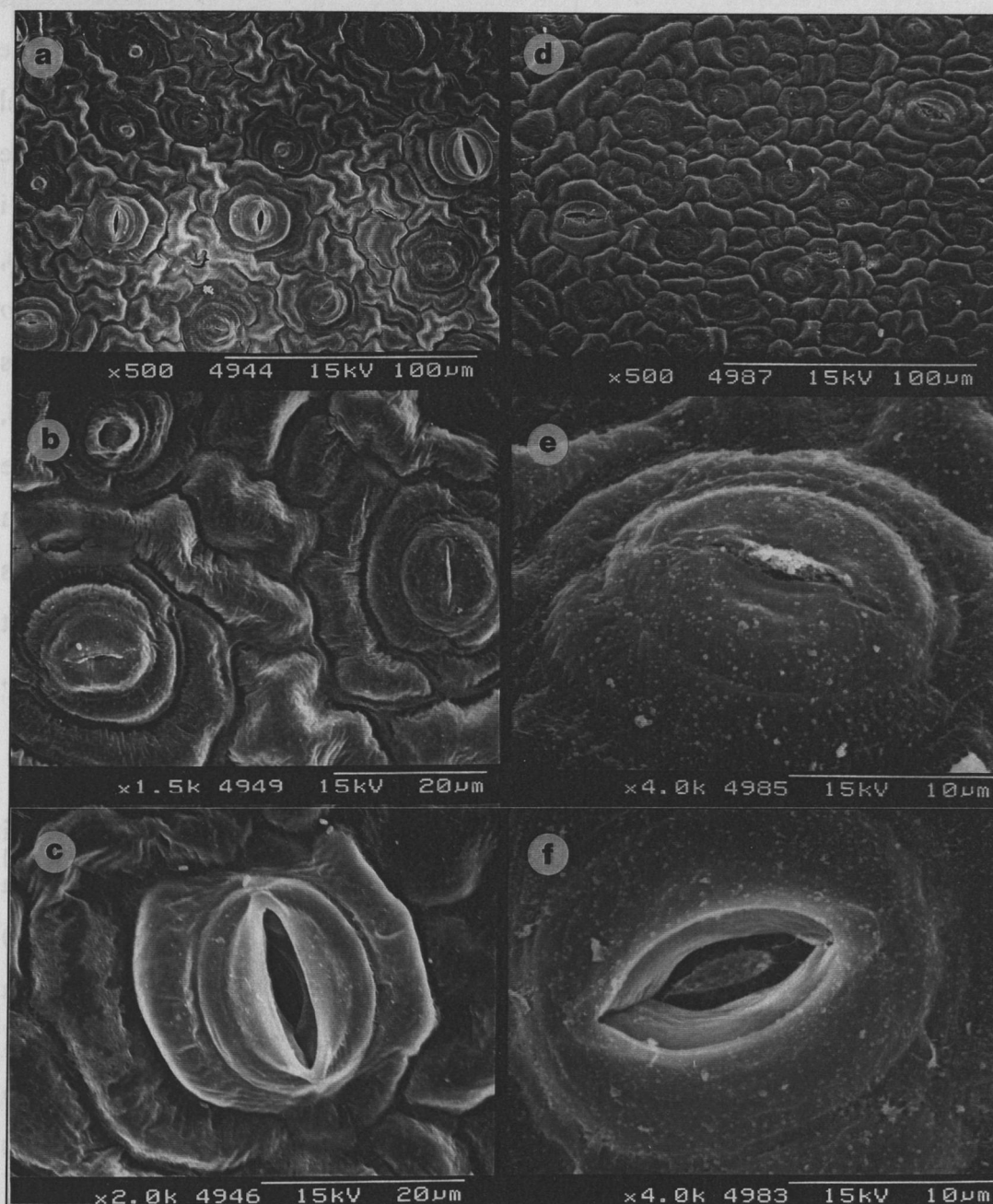


Fig. 4.1. Microfotografies al microscopi electrònic de rastreig, amb la tècnica de punt crític, de la superfície de la cara abaxial de fulles de gardènia desenvolupades durant la fase de multiplicació amb una concentració de sacarosa de 5 g l^{-1} (S_5) i dos PPFD (L_{50} i L_{100}) en tubs permeables al CO_2 . $S_5 - L_{50}$ en A, B, C i $S_5 - L_{100}$ en D, E, F. Es mostren visions generals de l'epidermis i detalls d'estomes. L'escala s'indica a cada microfotografia.

mostres de gardènia utilitzades com a control (plantes perfectament aclimatades a l'ambient extern) també eren hipoestomàtiques.

La fig. 4.1 mostra fotografies generals de l'epidermis i detalls d'estomes fetes amb el microscopi de rastreig i la tècnica de punt crític durant la fase de multiplicació de les plantetes desenvolupades amb S_5 en llum alta i baixa (L_{100} i L_{50}) i tubs permeables al CO_2 . Es poden apreciar estomes ja formats barrejats amb d'altres que estan en fase de desenvolupament. Els estomes són molt rodons, especialment en L_{50} i no tan en L_{100} , i amb una certa tendència a estar tancats, tal com podem apreciar en totes les fotografies, la qual cosa coincideix amb les referències existents en matèria d'ultraestructura *in vitro* (Capellades *et al.*, 1990b; Santamaria *et al.*, 1993 i Zacchini *et al.*, 1997). Les plantetes crescudes en $L_{50} - S_5$ mostren molts estomes, bastant ben desenvolupats (fig. 4.1A, B, C), però en menys quantitat que en les plantetes crescudes en la mateixa concentració de sacarosa (S_5) a llum alta (L_{100}) (fig. 4.1D, E, F), que presenta molts estomes, però la majoria estan en formació i per tant són més petits. Aquí es poden veure ceres epicuticulars i és bastant freqüent que els estomes sobresurtin. Podríem resumir dient que el tractament de L_{100} té més estomes que el de L_{50} , i aquest darrer els té més oberts, cosa que és símptoma de baixa funcionalitat.

A la fig. 4.2 podem apreciar els tractaments de S_{30} amb llum alta i baixa (L_{100} i L_{50}) i CO_2 alt durant la fase de multiplicació. Com en la fotografia anterior s'ha aplicat la tècnica de punt crític. La fig. 4.2 (A, B, C) pertany a $L_{50} - S_{30}$ i la fig. 4.2 (D, E, F) correspon a $L_{100} - S_{30}$. Hi ha molts estomes en formació que envolten els que ja existeixen. Com a la fig. 4.1, els estomes sobresurten i es presenten bastant oberts. A L_{100} , igual que passava en els tractaments de S_5 , hi ha major nombre d'estomes, amb molts estomes que estan en formació. També estan més tancats. Cal pensar que aquests estomes aixecats o inflats són menys funcionals que els que no ho estan. A més, si comparem les figs. 4.1 i 4.2 podem apreciar que quan hi ha poca sacarosa en el medi, el CO_2 sembla estimular el desenvolupament dels estomes, tant pel que fa al nombre com al grau de desenvolupament.

Les fotografies que es descriuen a continuació s'han fet utilitzant la tècnica de liofilització. La finalitat d'aquesta tècnica és garantir la integritat de les ceres epicuticulars.

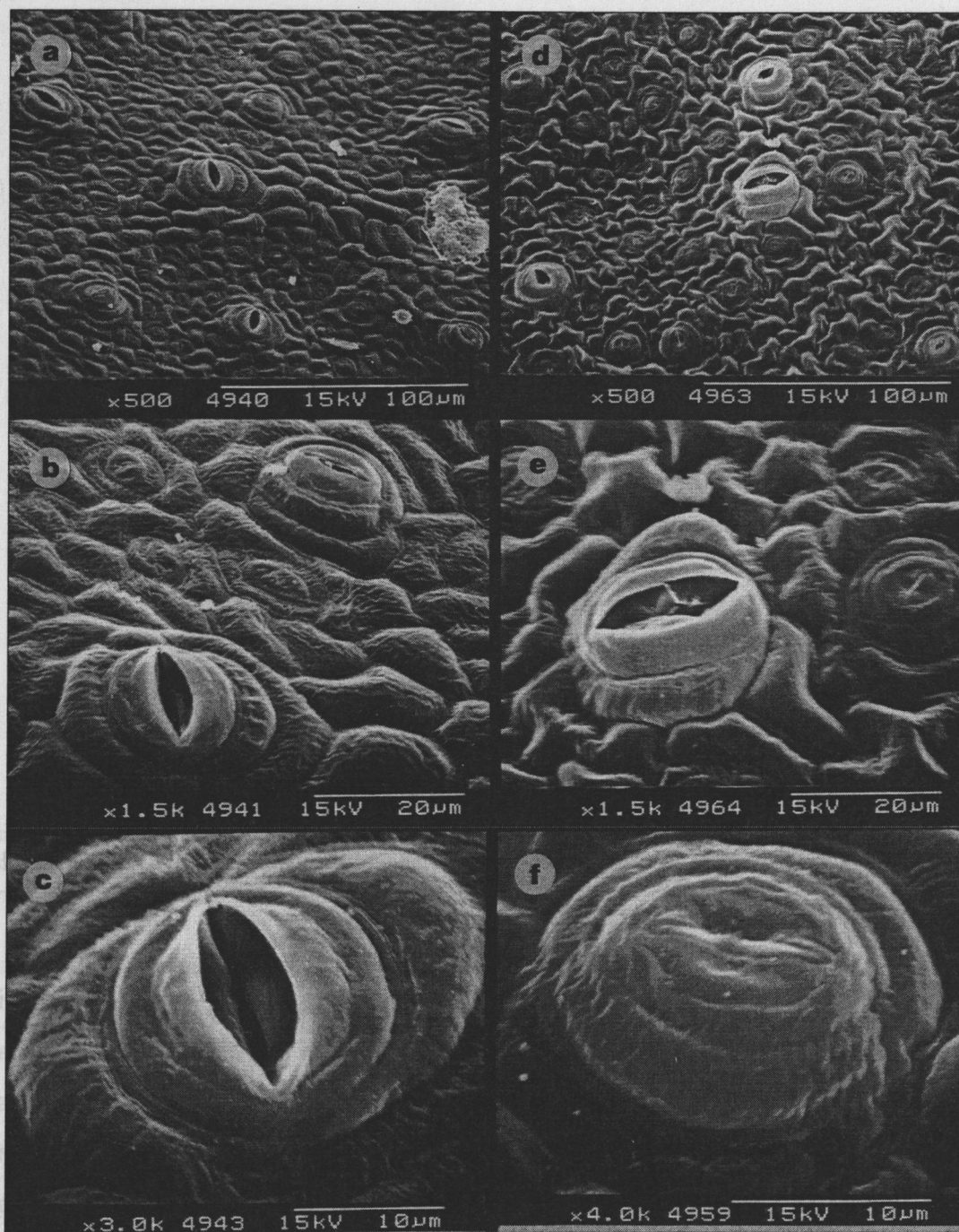


Fig. 4.2. Microfotografies al microscopi electrònic de rastreig, amb la tècnica de punt crític, de la superfície de la cara abaxial de fulles de gardènia desenvolupades durant la fase de multiplicació amb una concentració de sacarosa de 30 g l^{-1} (S_{30}) i dos PPFs (L_{50} i L_{100}) en tubs permeables al CO_2 . $S_{30} - L_{50}$ en A, B, C i $S_{30} - L_{100}$ en D, E, F. Es mostren visions generals de l'epidermis i detalls d'estomes. L'escala s'indica a cada microfotografia.

que ja s'havia dit a la Fig. 4.2. Si comparem les dimensions dels estomes desenvolupats en els diferents tractaments considerem la difusió de l'aigua i el nombre més gran d'estomes, en els mateixos tractaments considerem la

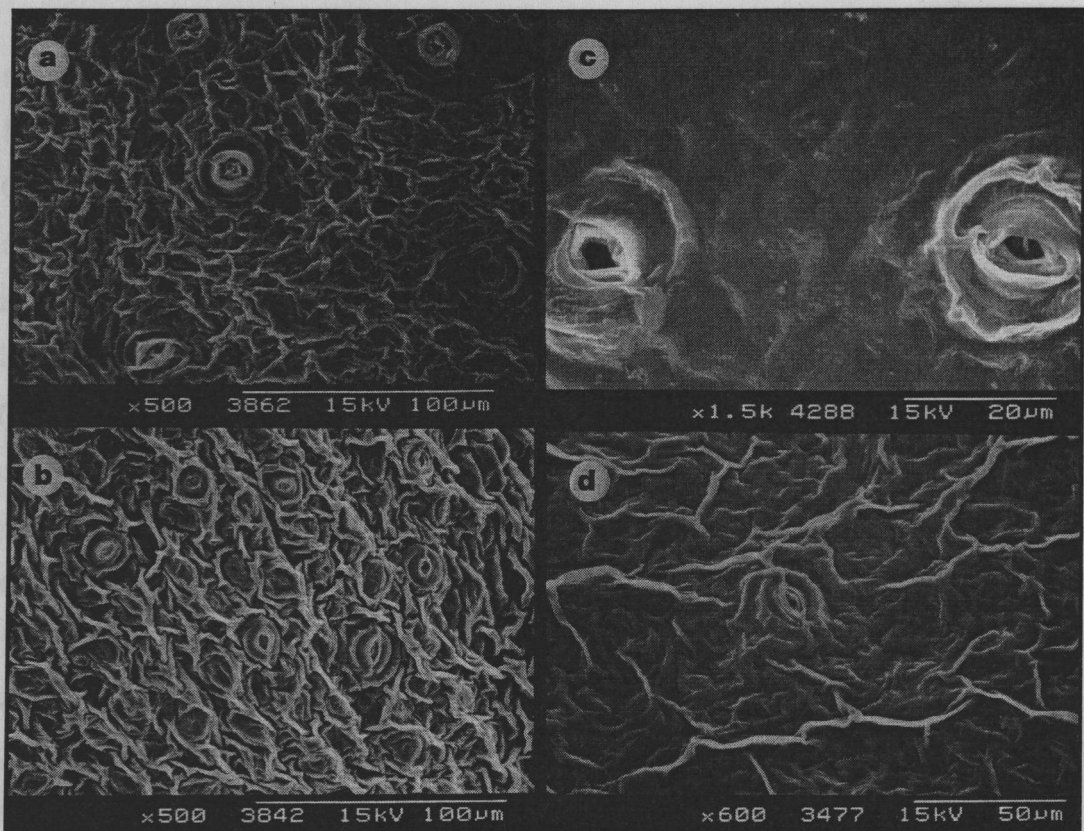


Fig. 4.3. Microfotografies al microscopi electrònic de rastreig, amb la tècnica de liofilització, de la superfície de la cara abaxial de fulles de gardènia desenvolupades durant la fase de multiplicació amb dues concentracions de sacarosa (S_5 i S_{30}) i dos PPFds (L_{50} i L_{100}) en tubs no permeables al CO_2 . $S_{30} - L_{100}$ (A), $S_5 - L_{100}$ (B), $S_{30} - L_{50}$ (C) i $S_5 - L_{50}$ (D). L'escala s'indica a cada microfotografia.

Les microfotografies de la fig. 4.3 són dels tractaments de S_5 i S_{30} amb llum alta i baixa (L_{100} i L_{50}) tapats (no permeables al CO_2), durant la fase de multiplicació. La tècnica de liofilització ha fet que les mostres apareixin molt arrugades amb evidents símptomes de deshidratació associats a la metodologia. Els estomes es veuen bastant oberts cosa que recolça la idea de la seva poca funcionalitat. A la fig. 4.3 (C, D) podem apreciar que en els tractaments de L_{50} la quantitat d'estomes és menor que en els mateixos tractaments de L_{100} (fig. 4.3 A, B). Els estomes estan oberts, una característica habitual en les plantes cultivades *in vitro*. A la fig. 4.3C es reflecteix la ultraestructura d'una planta *in vitro* cultivada en les condicions habituals en que normalment es desenvolupen aquest tipus de cultius ($S_{30} - L_{50}$).

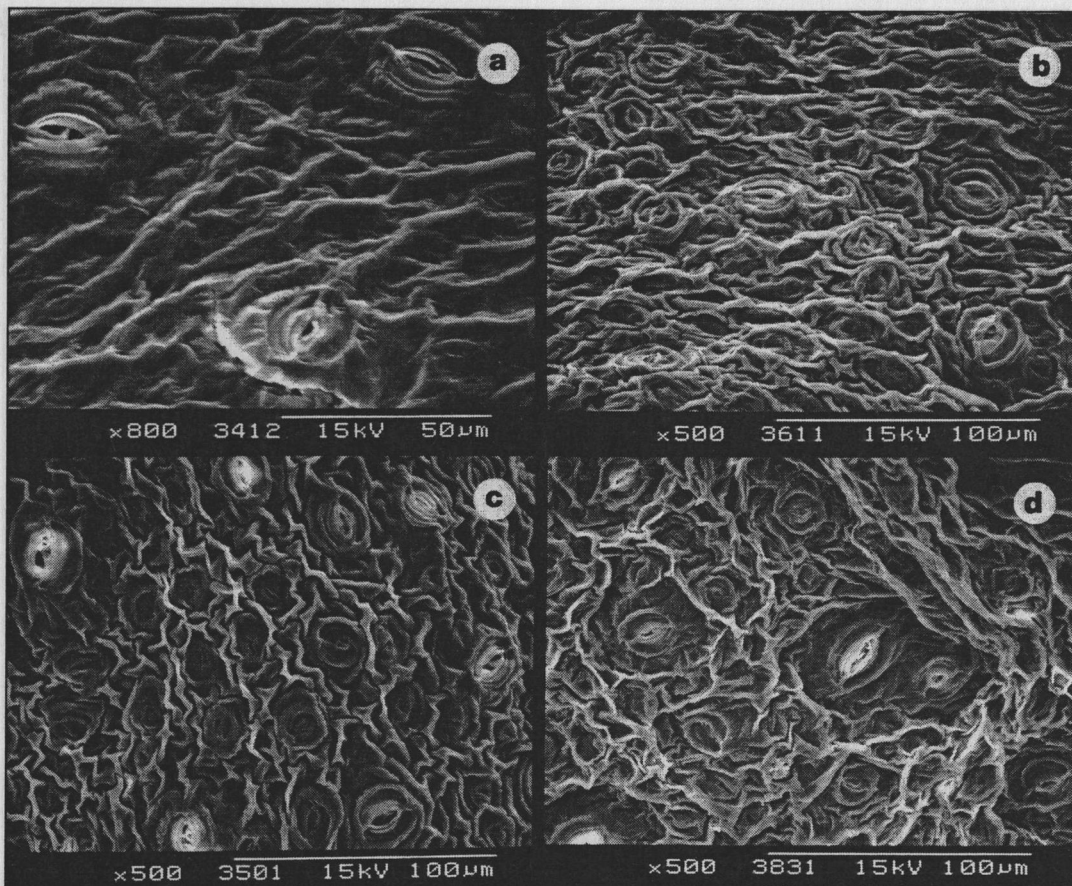


Fig. 4.4 Microfotografies al microscopi electrònic de rastreig, amb la tècnica de liofilització, de la superfície de la cara abaxial de fulles de gardènia desenvolupades durant la fase de multiplicació amb dues concentracions de sacarosa (S_5 i S_{30}) i dos PPFDS (L_{50} i L_{100}) en tubs permeables al CO_2 . $S_{30} - L_{50}$ (A), $S_{30} - L_{100}$ (B), $S_5 - L_{50}$ (C) i $S_5 - L_{100}$ (D). L'escala s'indica a cada microfotografia.

La fig. 4.4 ens mostra els tractaments de S_5 i S_{30} , llums alta i baixa (L_{100} i L_{50}) permeables al CO_2 durant la fase de multiplicació. No s'observen grans diferències entre totes aquestes fotografies. L'epidermis està molt arrugada per raó del procés de liofilització, cosa que fa difícil l'observació. Hi ha molts estomes, però la gran majoria estan en formació. El tractament ($L_{50} - S_{30}$) obert presenta menys estomes (fig. 4.4A) que els altres tractaments que tenen la mateixa quantitat de sacarosa però llum alta (fig. 4.4B) o bé menys sacarosa i llum baixa o alta ($S_5 - L_{50}$ o $S_5 - L_{100}$) (fig. 4.4C, D, respectivament) tot i que es tracta de tubs permeables al CO_2 . Aquesta figura confirma el que ja s'havia dit a la fig. 4.2. Si comparem les fig. 4.3 i 4.4, observem que en aquesta última hi ha un nombre més gran d'estomes, en els mateixos tractaments considerats, la

qual cosa confirma la influència del CO_2 sobre el desenvolupament estomàtic. També els estomes creixuts amb alt CO_2 són més funcionals.

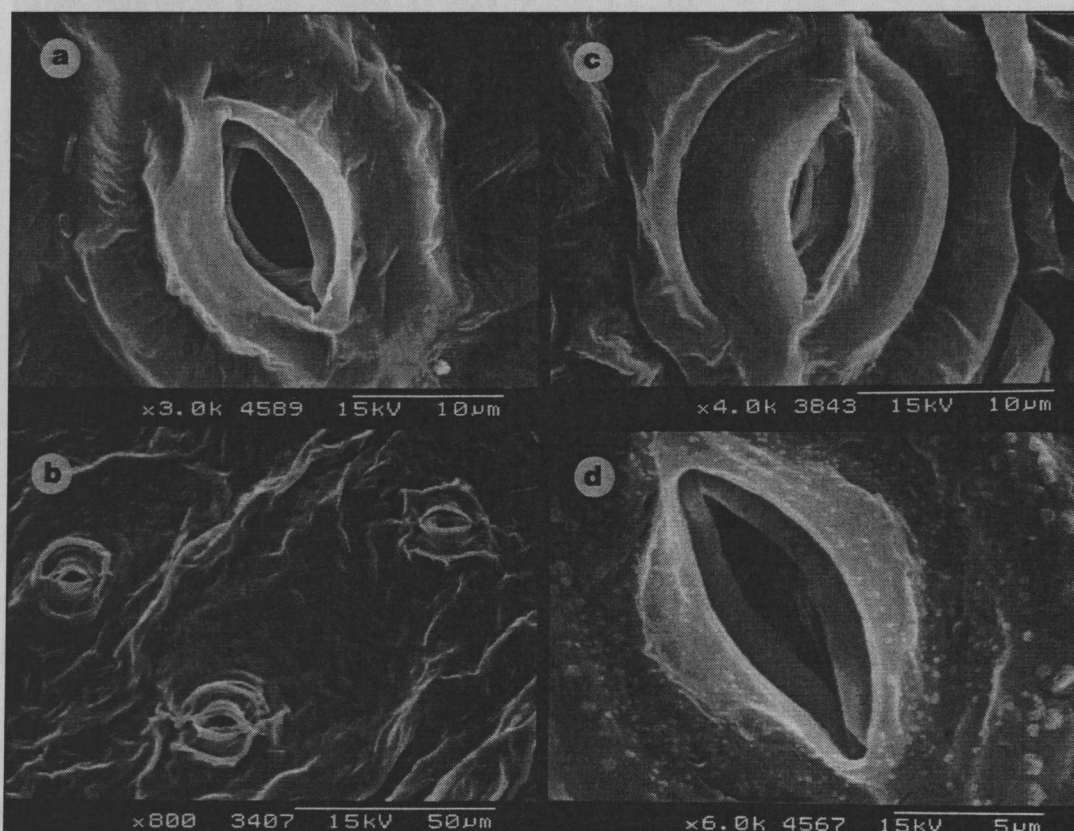


Fig. 4.5. Microfotografies al microscopi electrònic de rastreig, amb la tècnica de liofilització, d'estomes de la cara abaxial de fulles de gardènia desenvolupades durant la fase de multiplicació amb dues concentracions de sacarosa (S_5 i S_{30}) i dos PPFDS (L_{50} i L_{100}) en tubs permeables o no al CO_2 . $S_{30} - L_{100}$ permeable (A), $S_{30} - L_{50}$ no permeable (B), $S_5 - L_{100}$ no permeable (C) i $S_5 - L_{50}$ permeable (D). L'escala s'indica a cada microfotografia.

La fig. 4.5 ens mostra amb més detall estomes d'alguns tractaments contrastats en la fase de multiplicació i hi podem apreciar diferències en morfologia estomàtica; així, uns presenten forma irregular ($S_{30} - L_{100}$ obert, fig. 4.5A), d'altres són rodons i oberts, morfologia típica de plantes *in vitro* ($S_{30} - L_{50}$ tapat, fig. 4.5B), d'altres són més rodons i inflats ($S_5 - L_{100}$ tapat, fig. 4.5C) uns amb forma allargada ($S_5 - L_{50}$ obert, fig. 4.5D). Ara bé, en tots els casos veiem que estan oberts.

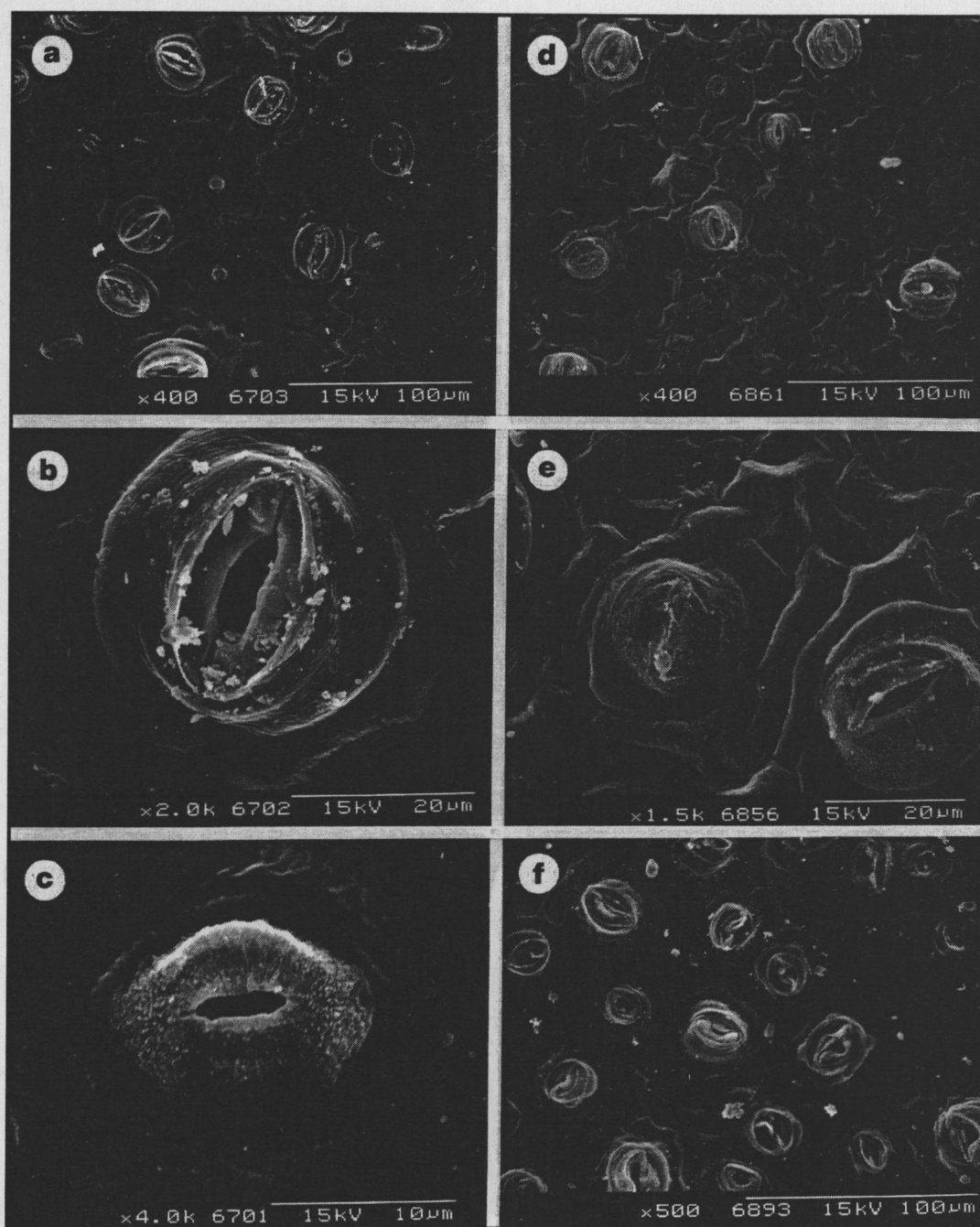


Fig. 4.6. Microfotografies al microscopi electrònic de rastreig, amb la tècnica de liofilització, de la superfície de la cara abaxial de fulles de gardènia desenvolupades durant la fase de arrelament amb una concentració de sacarosa de 30 g l⁻¹ (S₃₀) i dos PFD (L₅₀ i L₁₀₀) en tubs permeables o no al CO₂. S₃₀-L₁₀₀ no permeable en A, B, C; S₃₀-L₁₀₀ permeable en D, E; ; S₃₀-L₅₀ no permeable en F. Es mostren visions generals de l'epidermis i detalls d'estomes. L'escala s'indica a cada microfotografia.

Les microfotografies que es descriuen a continuació i que pertanyen a les fases d'arrelament i aclimatació estan fetes amb la tècnica de liofilització.

La fig. 4.6 correspon a la fase d'arrelament dels tractaments $S_{30} - L_{100}$ tapat (fig. 4.6A, B, C), $S_{30} - L_{100}$ obert (fig. 4.6D, E) i $S_{30} - L_{30}$ tapat (fig. 4.6F). Tot i que són tractaments contrastats, podem veure que no hi ha moltes diferències en la morfologia dels estomes. Aquest fet podria ser degut a que es tracta d'un estat més avançat de micropropagació. Si comparem, però, les figs. 4.6A i 4.6D ($L_{100} - S_{30}$, tapat o obert, respectivament), observem que en aquest últim hi ha més estomes i són més petits. En general, observem que els estomes encara apareixen oberts durant la fase d'arrelament. Els estomes de la fig. 4.6F apareixen amb una de les cèl·lules de guarda una mica deformada i cal observar que es tracta del tractament utilitzat en les condicions habituals del cultiu *in vitro*. En un mateix tractament alternen zones amb ceres epicuticulars i d'altres sense (fig. 4.6A, D, F).

La fig. 4.7 mostra els tractaments sense sacarosa en el medi de cultiu amb llum baixa i alta: $S_0 - L_{30}$ tapat (fig. 4.7A, B), $S_0 - L_{100}$ tapat (fig. 4.7C), $S_0 - L_{30}$ obert (fig. 4.7D, E) i $S_0 - L_{100}$ obert (fig. 4.7F) en la fase d'arrelament. Com podem apreciar a la fig. 4.7A, B el tractament sense sacarosa, tapat i amb llum baixa afavoreix la formació d'estomes anormals, amb els porus molt oberts. Quan augmentem la permeabilitat del tub (major entrada de CO_2 i més evapotranspiració), s'observa un major nombre d'estomes d'un aspecte més normal (fig. 4.7D, E) i si a més a més augmenta la radiació, observem un afavoriment de l'increment del nombre d'estomes (fig. 4.7F), malgrat que no hi ha sacarosa en el medi.

Les fig. 4.8 i 4.9 pertanyen a la fase d'aclimatació. Cal aclarir que en aquestes figures quan es parla de tractaments, es vol referir a mostres procedents d'aquell tractament durant la micropropagació. Com ja hem dit a l'apartat de materials i mètodes

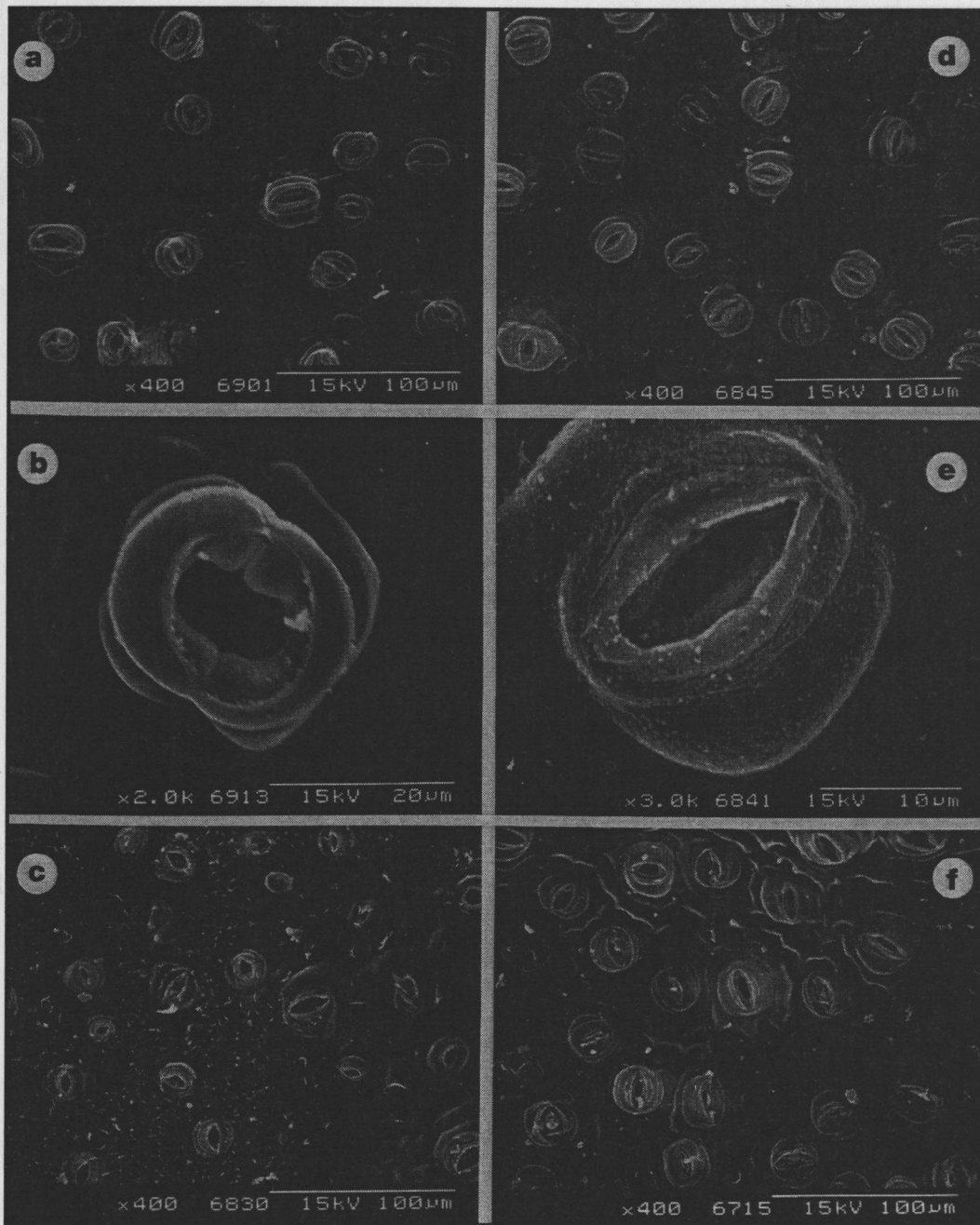


Fig. 4.7. Microfotografies al microscopi electrònic de rastreig, amb la tècnica de liofilització, de la superfície de la cara abaxial de fulles de gardènia desenvolupades durant la fase de arrelament sense sacarosa en el medi (S_0) i dos PPFd (L_{50} i L_{100}) en tubs permeables o no al CO_2 . $S_0 - L_{50}$ no permeable en A, B; $S_0 - L_{100}$ no permeable en C; $S_0 - L_{50}$ permeable en D, E; $S_0 - L_{100}$ permeable en F. Es mostren visions generals de l'epidermis i detalls d'estomes. L'escala s'indica a cada microfotografia.

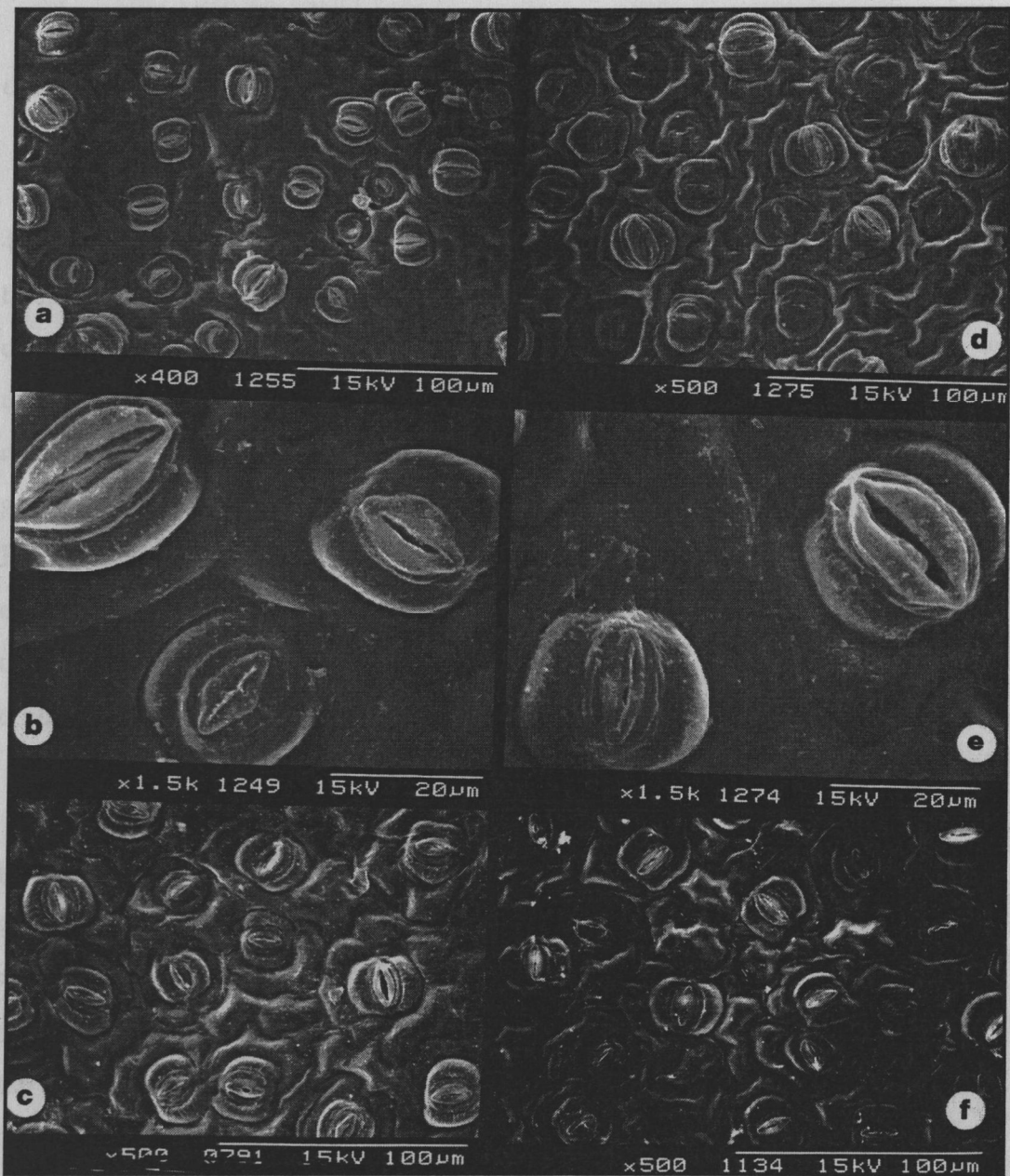


Fig. 4.8. Microfotografies al microscopi electrònic de rastreig, amb la tècnica de liofilització, de la superfície de la cara abaxial de fulles de gardènia durant la fase d'acclimatació. Es van estudiar fulles desenvolupades in vitro (fulles velles) i d'altres totalment desenvolupades durant l'acclimatació (fulles joves). Les plantetes provenien de micropropagació amb 30 g l⁻¹ de sacarosa en el medi (S₃₀) i un PPFd (L₁₀₀) de tubs permeables o no al CO₂. S₃₀ - L₁₀₀ permeable i fulla vella en A, B; S₃₀ - L₁₀₀ permeable i fulla jove en C; S₃₀ - L₁₀₀ no permeable i fulla vella en D, E; S₃₀ - L₁₀₀ no permeable i fulla jove en F. Es mostren visions generals de l'epidermis i detalls d'estomes. L'escala s'indica a cada microfotografia.