

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

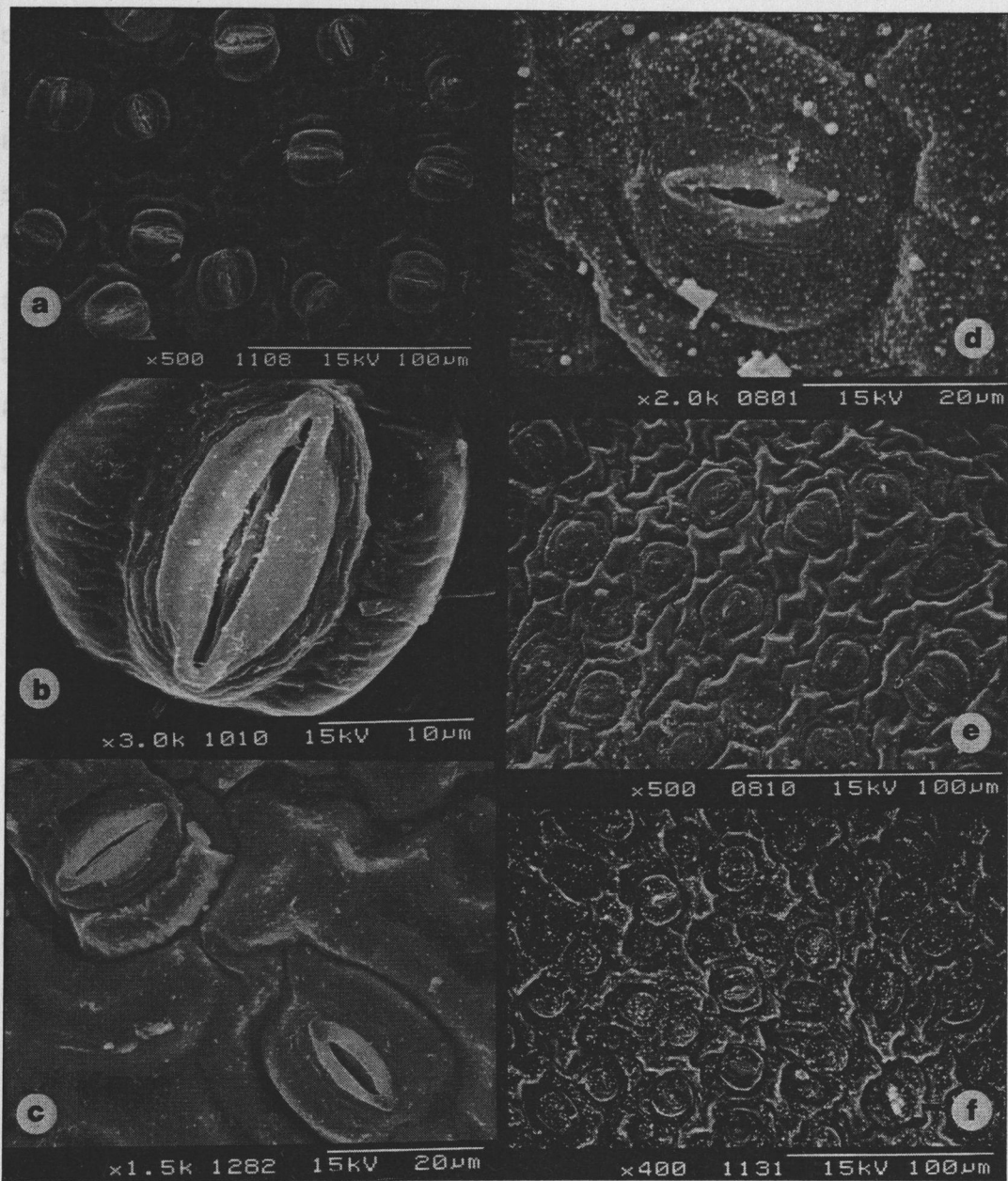


Fig. 4.9. Microfotografies al microscopi electrònic de rastreig, amb la tècnica de liofilització, de la superfície de la cara abaxial de fulles de gardènia durant la fase d'aclimatació. Es van estudiar fulles desenvolupades in vitro (fulles velles) i d'altres totalment desenvolupades durant l'aclimatació (fulles joves). Les plantetes provenien de micropropagació sense sacarosa (S_0) i amb $5 \text{ g } \Gamma^{-1}$ de sacarosa en el medi (S_5) i dos PPFDS (L_{50} i L_{100}) de tubs permeables o no al CO_2 . $S_0 - L_{100}$ permeable i fulla vella en A, B; $S_0 - L_{50}$ permeable i fulla vella en C; $S_0 - L_{100}$ permeable i fulla jove en D; $S_0 - L_{50}$ no permeable i fulla jove en E; $S_5 - L_{50}$ permeable i fulla jove en F. Es mostren visions generals de l'epidermis i detalls d'estomes. L'escala s'indica a cada microfotografia.

en aquesta fase es van prendre mostres de fulles velles (procedents de la fase d'arrelament *in vitro*) i joves (crescudes íntegrament durant l'aclimatació *ex vitro*). A la fig. 4.8 es mostren els tractaments d'alta sacarosa i alta llum, oberts i tapats en fulles velles i joves. Així, la fig. 4.8A, B pertany a $S_{30} - L_{100}$ tub permeable i fulla vella, mentre que la fig. 4.8D, E és de $S_{30} - L_{100}$ tub no permeable i fulla vella. Les figs. 4.8C i F corresponen respectivament als mateixos tractaments, però en fulla jove. En termes generals podem dir que no s'aprecien diferències clares entre els estomes de fulles velles i joves quant a la seva densitat i morfologia (fig. 4.8). Això sembla cert en tots els tractaments. Tots apareixen amb forma i distribució molt regular i situats en un mateix pla. L'única diferència evident és la presència de ceres epicuticulars; les fulles velles en tenen molt poques (fig. 4.8A, D) amb una certa tendència a presentar més ceres en els tractaments que indueixen més autotròfia, sobretot en els de taps permeables (fig. 4.8C).

A la fig. 4.9 podem veure els tractaments sense sacarosa en el medi amb alta i baixa llum, permeables i no permeables, excepte a la fig. 4.9F on es presenta el tractament de S_5 . Així, la fig. 4.9A, B són de tractament $S_0 - L_{100}$ permeable i fulla vella, la fig. 4.9C és de $S_0 - L_{50}$ permeable i fulla vella, la fig. 4.9D és de $S_0 - L_{100}$ permeable i fulla jove, la fig. 4.9E és de $S_0 - L_{50}$ no permeable i fulla jove, mentre que la fig. 4.9F és de $S_5 - L_{50}$ permeable i fulla jove. S'ha d'assenyalar que en aquesta última figura hi ha molts estomes de diferents tamanys. El tractament més autotròfic (fig. 4.9D) presenta pocs estomes, però són grans. Les fulles joves presenten més ceres que les velles, especialment les que procedeixen dels tractaments amb poca sacarosa i amb tap permeable al CO_2 (fig. 4.9D, F). D'aquesta manera, els tractaments que tenen més ceres són S_0 i S_5 amb tap permeable, ja sigui amb alta o baixa llum.

Tan a la fig. 4.8 com a la fig. 4.9 es pot apreciar que els estomes són més el·líptics que els que observàvem durant la micropropagació i per tant més funcionals. Estan situats a nivell d'epidermis, sense sobresortir.

La fig. 4.10 ens mostra una fotografia d'una planta de control completament aclimatada a condicions *ex vitro*, on podem veure una epidermis més uniforme amb estomes completament formats i amb els porus tancats, i que tenen forma més allargada i no sobresurten.

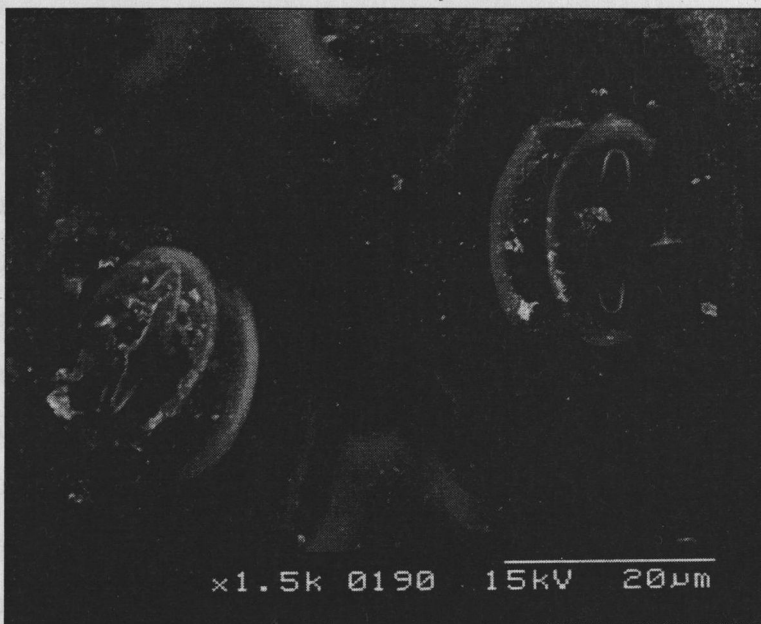


Fig. 4.10 Microfotografia al microscopi electrònic de rastreig, amb la tècnica de liofilització, de la superfície de la cara abaxial d'una fulla de gardènia ja aclimatada a condicions *ex vitro*. El valor de la barra està indicat a la microfotografia.

4.3. DISCUSSIÓ

Plantes de *Rosa multiflora* (Capellades *et al.*, 1990b) cultivades *in vitro* amb $80 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ i 75% HR van presentar modificacions en els estomes, ceres epicuticulars i cèl·lules epidèrmiques similars a les que presenten les fulles de plantes crescudes *ex vitro* en hivernacle. Així doncs, els autors afirmen que en la primera fase del cultiu (multiplicació), els estomes apareixen esfèrics i alçats; durant l'elongació de les tiges hi ha menys estomes i de forma més el·líptica. En aquesta fase d'elongació i en plantes

crescudes amb el 100% d'HR, però, aprecien molts hidatodes que no els veuen quan les plantes estan en un 75% d'HR. Són estomes modificats molt petits i rodons, que estan situats entre els estomes normals. Sembla que intervenen en la regulació d'intercanvi d'aigua, i mantenen un flux d'aigua i de minerals cada cop més alt en condicions de baixa transpiració a causa de la humitat elevada de l'ambient.

Estudis fets en prunera *in vitro* en relació amb l'efecte del fotoperíode, en la diferenciació dels estomes, manifesten que les diferències en el règim diari de llum provoquen diferències en la densitat estomàtica (Morini *et al.*, 1991). En un treball més recent de Zacchini *et al.* (1997), que estudia l'efecte del fotoperíode en el desenvolupament *in vitro* de *Prunus cerasifera*, es conclou que el més favorable pel que fa a la diferenciació dels estomes va ser cicles de 4:2 hores de llum-foscor, i no el cicle habitual de 16:8 hores. Aquests autors també destaquen la forma rodona dels estomes, però no saben si és deguda a les característiques del cultiu *in vitro*. També hi ha més estomes a la zona mitjana i apical de les fulles que a la zona basal; i el nombre va disminuint des de la primera fulla a partir de l'àpex cap baix. És a dir, varia segons l'edat de la fulla i la seva posició en la planta.

Santamaria *et al.*, (1993) diuen que durant el cultiu *in vitro* hi ha poca regulació de l'apertura estomàtica, mentre que la cutícula no sembla jugar cap paper. Els estomes són parcialment funcionals, però hi ha alguna alteració anatòmica i/o fisiològica que impideix que tanquin bé. Per altra banda, hi ha molts més estomes, i són més grans, en les fases *in vitro* que quan les plantes passen a l'aclimatació. Durant l'aclimatació, la densitat estomàtica és més baixa, cosa que es deu a que augmenta la superfície de les fulles. Ells justifiquen aquest fet com a conseqüència de l'addició de BAP al medi. Aquests autors també diuen que, en un ambient alt de CO₂, els estomes estan permanentment més tancats que els que creixen en condicions convencionals. Les plantes procedents de tractaments amb tubs permeables al CO₂ creixen en un ambient més sec i, per tant, tenen més ceres epicuticulars. Alhora, els estomes estan menys

deshidratats. En general, els estomes semblen més desenvolupats i, normalment, n'hi ha menys. El mateixos autors (Santamaría *et al.* 1993) troben que amb gran freqüència, els estomes de plantes *in vitro* són més aixecats i rodons, mentre que en la fase d'aclimatació apareixen en forma el·líptica i disposats a nivell d'epidermis, la qual cosa estaria d'acord amb les nostres observacions.

Els nostres resultats també s'adeqüen a estudis fets amb *Quercus* per Ashton i Berlyn (1994) en condicions naturals al bosc, on demostren que les plantes adaptades a radiació alta tenen major densitat estomàtica que les d'ombra (fig. 4.1), com també la fulla és més petita, més gruixuda i el gruix de la cutícula és més gran (veure figs. 2 i 3 de l'apartat 1 de resultats i discussió). Aquestes diferències fan que les plantes d'alta radiació tinguin una eficiència més gran en l'ús de l'aigua i que perdin menys aigua per evapotranspiració.

Kirdmanee *et al.* (1995), en *Eucalyptus camaldulensis in vitro* cultivat a $80 \mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-2}$, sense sacarosa i hormones en el medi, amb i sense enriquiment de CO_2 , van comprovar que els tractaments que induïen densitat estomàtica baixa, o sigui, els que no tenien enriquiment de CO_2 , presentaven uns estomes i cèl·lules epidèrmiques més grans, cosa que sol ser típica de les plantes que tenen hiperhidricitat. Aquestes plantes poden tenir problemes a l'hora d'aclimatar-se, per raó de la pèrdua incontrolada d'aigua d'aquests estomes deformats. En el nostre experiment, el tractament comparable al descrit per l'autor $S_0 - L_{50}$ sense permeabilitat al CO_2 va presentar uns estomes molt turgents.

Estudis recents en *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* constaten que tant en plantes normals com en les hiperhídriques, la cutícula i la capa de ceres són molt fines, però no són les responsables principals de la pèrdua elevada d'aigua en casos d'estrès (Louro *et al.*, 1999). Nosaltres també trobem molt poques ceres epicuticulars amb independència del tractament, però augmenta una mica la quantitat en els estadis

posteriors de la micropropagació. Moltes vegades els estomes estan localitzats en protuberàncies, la qual cosa fa difícil el seu tancament.

Els nostres estudis d'ultraestructura coincideixen en línies generals amb els que recull la literatura que existeix sobre el tema. Dels resultats obtinguts podríem extreure les conclusions següents:

En la fase de multiplicació s'observa força variabilitat entre els tractaments estudiats. Així, en $S_{30} - L_{100}$ i amb tap permeable vam trobar molts estomes, mentre que en $S_{30} - L_{50}$ amb tap permeable sembla haver-n'hi menys, però més desenvolupats. En $S_5 - L_{100}$ i amb tap permeable hi ha pocs estomes, tancats i poc diferenciats, mentre que en $S_5 - L_{50}$ obert n'hi ha molts. Aquesta variabilitat potser és deguda al fet que es tracta dels primers estadis de la micropropagació.

Durant la fase d'arrelament, en tots els tractaments de S_{30} , independentment de la llum o del CO_2 de creixement estudiats, es poden observar molts estomes en fase de formació que es presenten oberts i tancats, grans i petits. En canvi, en els tractaments de S_0 permeables al CO_2 , s'observen estomes de forma i mida molt regulars i amb un grau de desenvolupament força elevat.

En general, tan a la fase de multiplicació com a la d'arrelament no s'aprecia un efecte clar de la quantitat de sacarosa en el medi de cultiu sobre l'estructura epidèrmica..

En resum, com més avançat és l'estadi de la micropropagació, els estomes són més desenvolupats i presenten una morfologia més uniforme.

En la fase d'aclimatació, els estomes en general estan més tancats. Tots es troben situats en un mateix pla i disposats força regularment. Alguns dels tractaments també presenten ceres.

**5. EFECTE DE LES CONDICIONS DE CULTIU IN
VITRO EN EL DESENVOLUPAMENT
FOTOAUTOTRÒFIC DE PLANTES DE GARDÈNIA
DURANT LA MICROPROPAGACIÓ I
L'ACLIMATITZACIÓ EX VITRO**

5. EFECTE DE LES CONDICIONS DE CULTIU *IN VITRO* EN EL DESENVOLUPAMENT FOTOAUTOTRÒFIC DE PLANTES DE GARDÈNIA DURANT LA MICROPROPAGACIÓ I L'ACLIAMATITZACIÓ *EX VITRO*

En aquest apartat s'avalua el grau de fotoautotròfia de les plantes de gardènia durant les diferents fases de la micropropagació i posterior aclimatització *ex vitro*. Les tècniques emprades són la fluorescència ràpida de la clorofil·la i la composició d'isòtops estables del ^{13}C . Les mostres procedeixen de l'experiment II.

5.1. INTRODUCCIÓ

Tradicionalment, s'havia considerat que les plantes *in vitro* tenien molt poca capacitat fotosintètica per aconseguir un balanç positiu de carboni i que, a més a més, necessitaven sacarosa com a font d'energia i carbó per al seu creixement heterotròfic i mixotròfic durant els estadis de multiplicació i d'arrelament *in vitro* (Grout i Ashton, 1978a). Investigacions més recents van demostrar que les plantes *in vitro* podien créixer fotoautotròficament si les condicions eren favorables per fer fotosíntesi. Actualment, aquests conceptes estan canviant i s'accepta que sota unes condicions de creixement adequades, com poden ser un baix contingut de sacarosa en el medi, un alt PFD i/o una concentració alta de CO_2 dins el tub de cultiu és possible millorar el desenvolupament de les característiques fotosintètiques *in vitro* (Solárová, 1989; Kozai, 1991b; Kubota i Kozai, 1992; Hdider i Desjardins, 1994; apartat 2 de resultats i discussió), com també la contribució relativa de la fotosíntesi a la biomassa total de la planta (Serret *et al.*, 1996, 1997). En canvi, encara no s'ha demostrat quina és la relació (si hi és) entre el grau de fotoautotròfia assolit per una planta *in vitro* i la seva capacitat fotosintètica.

S'ha postulat, però no s'ha demostrat de manera inequívoca, que l'afavoriment del creixement fotoautotròfic *in vitro* és necessari per evitar (o si més no, alleujar) la fotoinhibició potencial de les plantes durant l'aclimatització (Dubé i Vidaver, 1992; Hdider i Desjardins, 1994). Ara bé, un augment de la intensitat de llum pot afavorir les

característiques fotosintètiques de les plantes *in vitro*, però l'absorció d'un excés de llum per les fulletes està reconegut com una font potencial de dany en els cultius *in vitro* (Aitken-Christie *et al.*, 1992) i comporta la fotoinhibició de la fotosíntesi i una baixa contribució dels fotosintetitzats en el carboni total de les plantes (Serret *et al.*, 1996).

En optimitzar el creixement de les plantes a l'interior del tubs, es pot afavorir l'èxit de la seva posterior aclimatització en condicions *ex vitro* (Kozai, 1991 a, b; Kozai *et al.*, 1990 a; Murphy *et al.*, 1998). Per exemple, en diferents espècies, un increment de la quantitat de CO₂ dins els pots de cultiu *in vitro* no solament comporta una millora del creixement *in vitro* sinó que també afavoreix el grau de supervivència i de creixement *ex vitro* (Genoud-Gourichon, 1996; Solárová i Pospíšilová, 1997; Murphy *et al.*, 1998). En canvi, segons els resultats d'altres autors, no es confirma que una planta més fotoautròfica pugui superar millor l'estrès del trasplantament a condicions *ex vitro* (Debergh *et al.*, 1992). Ara bé, mentre que Capellades *et al.* (1990 a, b) van demostrar que les plantes de *Rosa multiflora* menys fotoautròfiques eren les que s'aclimataven millor, Genoud *et al.*, (1999), treballant amb *Rosa hybrida*, van concloure el contrari.

L'estudi de la cinètica ràpida de la fluorescència durant el decurs del temps (corba de Kautsky), mesurada en fulles adaptades a la foscor, ens dona una informació essencial per entendre el procés de la fotosíntesi i per comprendre per què es produeix fotoinhibició com a resposta a un estrès que afecta l'activitat fotosintètica (Trillas *et al.*, 1995; Pospíšilová *et al.*, 1999 en estudis d'aclimatització *ex vitro*). Per estudiar l'organització de l'aparell fotosintètic s'apliquen diferents paràmetres com ara el quocient de fluorescència variable ($F_v = F_m - F_o$) respecte a la màxima (F_v/F_m) i a la mínima (F_v/F_o) (Genty *et al.*, 1989). Qualsevol factor que afecti l'eficiència en la captura de l'energia d'excitació mitjançant l'obertura del PSII dels centres de reacció també modificarà els quocients de la fluorescència esmentats abans (Lichtenthaler i Rinderle, 1988; Genty *et al.*, 1989; Schreiber i Bilger, 1993). Com que el PSII és particularment susceptible a la fotoinhibició (Powles, 1984), un descens dels quocients F_v/F_m i F_v/F_o és un bon indicador que existeix fotoinhibició (Ögren i Öquist, 1985;

Lichtenthaler i Rinderle, 1988). El quocient F_v/F_m s'utilitza molt com a indicador de l'estat general de les fulles i el quocient F_v/F_0 ha estat proposat com a indicador de l'estat i eficàcia de la cadena de transport d'electrons (Babani i Lichtenthaler, 1996; Yordanov *et al.*, 1997). Quan estudiem els canvis en aquests quocients, és important distingir els augments de F_0 dels descensos de F_m . Segons Baker i Horton (1987) i Percy i Sims (1994), la fotoinhibició produeix aquests dos tipus de canvis. Ara bé, mentre que el primer està associat amb danys per excés de radiació (Kamaluddin i Grace, 1992; Araus i Hogan, 1994), el segon està relacionat amb la fotoprotecció (Osmond *et al.*, 1987; Kamaluddin i Grace, 1992; Araus i Hogan, 1994; Georgieva i Lichtenthaler, 1999). Teòricament, el nivell F_0 és l'emissió de fluorescència quan tots els centres de reacció estan oberts i l'extinció fotoquímica és mínima. Un increment de F_0 és característic de la destrucció dels centres de reacció del PSII o d'un bloqueig en la transferència de l'energia d'excitació des de l'antena fins als centres de reacció (Bolhár-Nordenkampf *et al.*, 1989). Quan s'inactiva el transport d'electrons en el PSII, s'incrementa la taxa de degradació de la proteïna D1 i aquest fet comporta un augment de F_0 (Rintamaki *et al.*, 1994). D'altra banda, un descens de F_m pot indicar un augment de l'extinció no fotoquímica ((Björkman, 1986; Baker i Horton, 1987; Bolhár-Nordenkampf *et al.*, 1989). Per altra banda, l'àrea sota la corba entre F_0 i F_m és proporcional a la mida del *pool* d'acceptors d'electrons de la banda reduïda del PSII, una simple indicació que ens dóna el paràmetre $t_{1/2}$, que és el temps que necessita la fluorescència per aconseguir la meitat de la distància entre F_0 i F_m (Bolhár-Nordenkampf *et al.*, 1989). A part dels processos de fotoinhibició, l'acclimatització o l'adaptació a la intensitat de llum (Araus i Hogan, 1994; Yordanov *et al.*, 1997) o el desenvolupament de l'aparell fotosintètic ja sigui *ex vitro* (Babani i Lichtenthaler (1996) i d'altres referències esmentades) o *in vitro* (Serret *et al.*, 1996) també pot afectar aquests paràmetres de la fluorescència de la clorofil·la.

Aquest apartat es divideix en dos parts, el primer dels quals fa referència a la micropropagació mentre que el segon ho fa a l'acclimatització. Per una banda, s'estudiarà la capacitat fotosintètica i les respostes ràpides de la fluorescència de la clorofil·la de les plantes de gardènia durant els estadis de multiplicació i d'arrelament *in vitro*. Es determinarà si el grau de fotoautotròfia d'aquestes plantes mixotròfiques té

algun efecte en l'augment de la fotoinhibició durant la micropropagació. A més a més, s'avaluarà la relació entre el grau de fotoautotròfia i la capacitat fotosintètica de les plantes *in vitro*. En aquest apartat, els valors de fotoautotròfia mesurats mitjançant la composició isotòpica ($\delta^{13}\text{C}$) i utilitzats aquí provenen de l'apartat 3 de resultats i discussió. Per una altra banda, es descriurà l'efecte de les condicions de cultiu *in vitro* en la pauta de fluorescència ràpida de la clorofil·la durant la fase d'acclimatització. S'avaluarà si les condicions de cultiu *in vitro* que donen lloc a plantes més fotoautotròfiques esmorteixen la fotoinhibició i afavoreixen així l'acclimatització posterior.

5.2. RESULTATS I DISCUSSIÓ

Els canvis en el quocient F_v/F_o van ser més grans que els del quocient F_v/F_m com a resposta a canvis en les condicions de cultiu o als estadis de micropropagació (taules 5.1 i 5.2). El quocient F_v/F_m es bastant lent i insensible en resposta, mentre que el quocient F_v/F_o és molt més sensible i ràpid de resposta a canvis en les taxes de (Babani i Lichtenthaler, 1996).

A) MICROPROPAGACIÓ

Efecte de l'estadi de micropropagació sobre la fluorescència de la clorofil·la

L'estadi de cultiu va tenir una influència forta sobre la fluorescència de la clorofil·la. Per a cada condició de cultiu, des de l'estadi de multiplicació fins al d'arrelament, els quocients F_v/F_m i F_v/F_o , com també el paràmetre $t_{1/2}$, van augmentar, mentre que F_m i F_o van disminuir significativament (taules 5.1 i 5.2). El fotoperíode no va tenir gairebé efecte en aquests paràmetres, i va presentar petites, però no significants diferències. Les pautes de fotoinhibició passatgeres van ser menys evidents durant els dos estadis de micropropagació (multiplicació i arrelament) i van presentar valors més baixos de F_v/F_m i F_v/F_o i més alts de $t_{1/2}$ després de 6 h de llum, amb petites diferències no significatives. Els valors més baixos de F_v/F_m i F_v/F_o

Taula 5.1. Efecte de la concentració de sacarosa, del PPF, del tipus de tap i del moment de la mesura durant el fotoperíode en els paràmetres de la fluorescència ràpida de la clorofil·la F_v/F_m , F_v/F_o , F_m , F_o i $t_{1/2}$ en fulles de gardènia desenvolupades durant la fase de multiplicació. Els valors són la mitjana de 13-20 fulles.

TREATMENTS	F_v/F_m	F_v/F_o	$t_{1/2}$	F_m	F_o
Sucrose:					
High (3.0%)	0.706±0.0071	2.55±0.059	37.27±1.31	1.23±0.046	0.34±0.016
Low (0.5%)	0.662±0.0072	2.18±0.060	33.60±1.33	1.45±0.047	0.47±0.016
None (0.0%)	0.619±0.0082	1.96±0.069	38.62±1.52	1.37±0.054	0.46±0.018
Significance	***	***	*	**	***
PPFD:					
High (110 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	0.630±0.0063	1.99±0.052	47.22±1.16	1.19±0.041	0.41±0.014
Low (50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	0.694±0.0060	2.47±0.050	25.78±1.10	1.51±0.039	0.44±0.013
Significance	***	***	***	***	n.s.
CO₂:					
Loose tube cap	0.678±0.0059	2.35±0.049	33.52±1.08	1.43±0.038	0.44±0.013
Tight tube cap	0.646±0.0064	2.11±0.053	39.48±1.18	1.27±0.041	0.41±0.014
Significance	***	**	***	*	n.s.
Photoperiod					
Dark	0.667±0.0061	2.30±0.051	31.08±1.12	1.38±0.039	0.42±0.013
Light	0.657±0.0062	2.16±0.051	41.91±1.14	1.32±0.040	0.43±0.013
Significance	n.s.	n.s.	***	n.s.	n.s.
Interactions:					
Sucrose-PPFD	***	***	n.s.	***	n.s.
Sucrose-CO ₂	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.
Sucrose-Time	**	*	n.s.	n.s.	n.s.
PPFD-CO ₂	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.
PPFD-Time	n.s.	n.s.	n.s.	***	**
CO ₂ -Time	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Sucrose-PPFD-CO ₂	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.
Sucrose-PPFD-Time	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Sucrose-CO ₂ -Time	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
PPFD-CO ₂ -Time	**	**	n.s.	n.s.	n.s.
Sucrose-PPFD-CO ₂ -Time	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

n.s., no significant; *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001

Taula. S.2. Efecte de la concentració de sacarosa, del PPF_D, del tipus de tap i del moment de la mesura durant el fotoperíode en els paràmetres de la fluorescència ràpida de la clorofil·la F_v/F_m, F_v/F_o, F_m, F_o i t_{1/2} en fulles de gardènia desenvolupades durant la fase d'arrelament. Els valors són la mitjana de 13-20 fulles.

TREATMENTS	F _v /F _m	F _v /F _o	t _{1/2}	F _m	F _o
Sucrose:					
High (3.0%)	0.751±0.0041	3.18±0.052	118.90±2.80	0.44±0.010	0.11±0.0035
Low (0.5%)	0.740±0.0040	3.02±0.052	99.90±2.77	0.52±0.010	0.14±0.0034
None (0.0%)	0.687±0.0050	2.23±0.064	162.05±3.43	0.37±0.013	0.11±0.0043
Significance	***	***	***	***	***
PPFD:					
High (110 µmol m ⁻² s ⁻¹)	0.712±0.0036	2.58±0.046	140.21±2.48	0.43±0.0092	0.12±0.0031
Low (50 µmol m ⁻² s ⁻¹)	0.740±0.0034	3.04±0.044	113.70±2.36	0.46±0.0088	0.12±0.0029
Significance	***	***	***	n.s.	n.s.
CO₂:					
Loose tube cap	0.768±0.0033	3.42±0.042	112.92±2.26	0.52±0.0084	0.12±0.0028
Tight tube cap	0.684±0.0038	2.21±0.049	140.98±2.61	0.37±0.0097	0.11±0.0032
Significance	***	***	***	***	n.s.
Photoperiod					
Dark	0.733±0.0035	2.89±0.045	121.40±2.40	0.44±0.0090	0.11±0.0030
Light	0.719±0.0035	2.73±0.045	132.51±2.43	0.45±0.0090	0.12±0.0030
Significance	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Interactions:					
Sucrose-PPFD	***	***	n.s.	n.s.	*
Sucrose-CO ₂	***	***	***	***	**
Sucrose-Time	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
PPFD-CO ₂	***	***	*	**	n.s.
PPFD-Time	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CO ₂ -Time	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Sucrose-PPFD-CO ₂	***	***	n.s.	***	n.s.
Sucrose-PPFD-Time	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Sucrose-CO ₂ -Time	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
PPFD-CO ₂ -Time	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Sucrose-PPFD-CO ₂ -Time	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

n.s., no significant; *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001

durant la multiplicació comparats amb l'arrelament es van associar amb un F_o més elevat (taules 5.1 i 5.2), d'acord amb resultats previs en gardènia en unes condicions experimentals molt similars a les de l'experiment II.

Els tres factors de cultiu assajats (tipus de tap, PPFD i sacarosa en el medi) van tenir un efecte significatiu en F_v/F_m , F_v/F_o , $t_{1/2}$ i F_m mesurats en els dos estadis, mentre que el paràmetre F_o solament va quedar afectat per la quantitat de sacarosa en el medi (taules 5.1 i 5.2). En augmentar la concentració de sacarosa s'observà un increment dels quocients F_v/F_m , i F_v/F_o , però per a les altres tres variables la pauta va ser menys clara. Un increment en el nivell de llum va comportar uns valors més baixos de F_v/F_m , F_v/F_o , i de F_m , i un increment de $t_{1/2}$. En els tubs hermètics comparats amb els permeables, els valors de F_v/F_m van ser més baixos, mentre que el $t_{1/2}$ va pujar. No obstant això, el patró de resposta per aquests factors de cultiu va mostrar interaccions significatives, sobretot entre la sacarosa i el PPFD durant la fase de multiplicació. Durant l'arrelament es van observar interaccions significatives entre la sacarosa i el PPFD, entre la sacarosa i el tipus de tap, i entre el PPFD i el tipus de tap.

Normalment, els valors de F_v/F_m oscil·len entre 0,75-0,85 en fulles no estresades *ex vitro* (Bolhár-Nordenkampf *et al.*, 1989). En el nostre cas, els resultats van ser menors, fins i tot en aquells de casos de fulles crescudes en condicions de manca de fotoinhibició durant l'arrelament, com ara un baix PPFD, en tubs permeables al CO_2 (taules 5.1 i 5.2). S'han descrit valors similars del quocient F_v/F_m també baixos en palmeres *in vitro* (Rival *et al.*, 1997). En el nostre experiment, els valors de F_v/F_o també van ser baixos, independentment del tractament considerat, cosa que suggereix que, en general, fins i tot en absència d'estrés, els valors d'aquest quocient eren baixos. També es va observar que el moment de presa de mesures al llarg del fotoperíode no va exercir un efecte important. Aquests valors baixos en els quocients esmentats anteriorment podrien ser una conseqüència d'un desenvolupament incomplet de l'aparell fotosintètic. Un valor baix de F_o durant l'arrelament no s'associaria necessàriament amb fotoinhibició, però podria ser una conseqüència de canvis produïts en l'estructura de l'aparell fotosintètic. En aquest sentit es poden considerar diferents alternatives.

S'ha descrit un descens de F_0 com a conseqüència d'una aclimatització o d'una adaptació a condicions de llum alta, que probablement està relacionat amb una antena petita (Araus i Hogan, 1994; Yordanov *et al.*, 1997). Si una antena és petita, el camí pels quàntums fins al centre de reacció és més curt, cosa que es tradueix en menys pèrdues d'energia, en un F_0 menor i en un quocient F_v/F_0 més alt (Yordanov *et al.*, 1997). També s'han descrit en l'apartat 1 de resultats i discussió valors més alts de $t_{1/2}$ durant l'arrelament que durant la multiplicació (taules 5.1, 5.2) i aquest fet vol dir que hi ha hagut una adaptació a PPFD més alts, on les antenes són més petites i el *pool* de plastoquinones és més gran (Anderson *et al.*, 1988). En canvi, aquesta resposta semblant a una aclimatació a la llum no es recolça amb altres dades; així, el quocient F_v/F_m no acostuma a canviar com a resposta a un augment de F_0 associat a una aclimatació a baixa llum (Araus i Hogan, 1994). En els nostres resultats, i segons una observació general, el descens del quocient *Chl a/b* juntament amb l'increment del de *Chl/Car* des de la fase de multiplicació a la d'arrelament (taula 5.3) semblaria que no està d'acord amb la resposta típica d'una aclimatització progressiva a un alt PPF (Percy i Sims, 1994). No obstant això, alguns canvis en els quocients de pigments estarien relacionats amb un desenvolupament progressiu de l'aparell fotosintètic (Lee *et al.*, 1985), encara que baixin les *Chl* totals.

Un altre model de desenvolupament per comparació seria l'enverdiment de plantes etiolades. Babani i Lichtenthaler (1996) han descrit valors baixos dels quocients F_v/F_m i F_v/F_0 en fulles en procés d'enverdiment *ex vitro* i absència d'estrès. Segons aquests autors, els quocients esmentats i F_m i F_0 van augmentar durant l'enverdiment, sobretot en la primera part del procés, tendint després a estabilitzar-se. En els nostres resultats hi va haver un increment dels dos primers paràmetres, mentre que F_m i F_0 van baixar des de la multiplicació fins a l'arrelament. D'altra banda, durant el desenvolupament de l'aparell fotosintètic associat amb l'enverdiment de les fulles, és habitual observar un increment del contingut total de clorofil·les, com també del quocient *Chl/Car*, mentre que el quocient *Chl a/b* disminueix (Babani i Lichtenthaler, 1996). En les fulles de gardènia *in vitro*, es van observar canvis en els quocients *Chl/Car* i *Chl a/b* relacionats amb el procés d'enverdiment de les fulles,

Taula 5.3. Efecte de la concentració de sa rosa, del PPFD i del tipus de tap en el contingut de clorofil·les total (Chl), en els quocients clorofil·la a respecte a b (Chl a/b) i en clorofil·les respecte a carotenoides (Chl/Car), referits a pes fresc (FM), en fulles de gardènia desenvolupades durant les fases de multiplicació i d'arrelament. Els valors són la mitjana de 5-6 mostres, cadascuna de les quals conté 1-2 fulles.

TREATMENTS	Shoot		Multiplication		Root		Induction		
	Chl mg g ⁻¹ FM	Chl a/b	Chl/Car (a+b)/(x+c)	Chl mg g ⁻¹ FM	Chl a/b	Chl/Car (a+b)/(x+c)	Chl mg g ⁻¹ FM	Chl a/b	Chl/Car (a+b)/(x+c)
Sucrose:									
High (3.0 %)	16.56±1.50	3.06±0.074	4.91±0.11	8.52±0.63	2.80±0.045	4.79±0.066	2.80±0.045	4.79±0.066	4.79±0.066
Low (0.5 %)	9.16±1.47	3.02±0.072	4.50±0.11	5.63±0.60	2.60±0.043	4.72±0.063	2.60±0.043	4.72±0.063	4.72±0.063
None (0.0 %)	7.83±2.08	2.61±0.100	4.12±0.16	7.23±0.83	2.68±0.060	4.69±0.088	2.68±0.060	4.69±0.088	4.69±0.088
Significance	**	n.s.	**	**	**	n.s.	**	**	n.s.
PPFD:									
High (110 µmol m ⁻² s ⁻¹)	12.41±1.34	2.93±0.066	4.43±0.10	4.96±0.53	2.65±0.038	4.60±0.056	4.96±0.53	2.65±0.038	4.60±0.056
Low (50 µmol s ⁻¹)	9.96±1.31	2.86±0.064	4.59±0.099	9.30±0.56	2.73±0.040	4.86±0.059	9.30±0.56	2.73±0.040	4.86±0.059
Significance	n.s.	n.s.	n.s.	***	n.s.	*	***	n.s.	*
CO₂:									
Loose tube cap	12.55±1.22	3.04±0.060	4.56±0.091	7.71±0.49	2.71±0.035	4.76±0.052	7.71±0.49	2.71±0.035	4.76±0.052
Tight tube cap	9.81±1.47	2.75±0.072	4.46±0.11	6.54±0.63	2.67±0.045	4.70±0.066	6.54±0.63	2.67±0.045	4.70±0.066
Significance	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Interactions:									
Sucrose-PPFD	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.
Sucrose-CO ₂	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
PPFD-CO ₂	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.
Sucrose-PPFD-CO ₂	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.

n.s., no significant; *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001

Taula 5.4. Efecte del tipus de tap, del PPFD, del fotoperíode en la temperatura, en el dèficit de pressió de vapor d'aigua (VPD) i en la concentració de CO₂ dins els tubs de cultiu. Cada valor de temperatura, de VPD és la mitjana ± ES de 3-6 mesures, mentre que, per a la concentració de CO₂, els valors representen la mitjana ± ES de 4-5 tubs. Per a més detalls vegeu l'apartat corresponent a materials i mètodes.

Tube	PPFD inside tubes ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	Temperature (°C)			Vapor Pressure Deficit (Pa)		
		chamber	Δt^* ($t_{in}-t_{out}$) inside tubes		chamber	inside tubes	
			lower leaves	upper leaves		lower leaves	upper leaves
Loose	0	20.0 ± 0.1	-0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.2	935 ± 55	50.6 ± 5.1	52.0 ± 2.0
	50	20.1 ± 0.1	1.9 ± 0.4	2.4 ± 0.3	964 ± 81	78.6 ± 8.8	97.2 ± 9.0
	110	20.7 ± 0.2	5.8 ± 0.5	6.5 ± 0.3	1049 ± 47	207.2 ± 8.4	245.7 ± 9.2
Tight	0	20.0 ± 0.1	-0.1 ± 0.2	0.0 ± 0.1	935 ± 55	58.0 ± 2.0	77.8 ± 11.2
	50	20.1 ± 0.1	0.5 ± 0.4	2.0 ± 0.3	964 ± 81	130.6 ± 17.8	180.5 ± 35.8
	120	20.7 ± 0.2	4.5 ± 0.5	6.0 ± 0.4	1049 ± 47	235.8 ± 26.1	290.1 ± 22.6

Tube	CO ₂ ($\mu\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$)									
	cap	Chamber	Shoot multiplication – Light period				Root induction – Light period			
			0 h.	1h.30'	4 h.	6 h.	0 h.	1h.30'	4 h.	6 h.
Loose	380	5600 ± 1119	673 ± 400	131 ± 34	43 ± 5	7531 ± 1169	2820 ± 796	1355 ± 445	80 ± 3	
	380	7267 ± 2250	360 ± 149	132 ± 35	61 ± 8	5492 ± 1226	695 ± 545	197 ± 34	63 ± 6	
Tight	380	1271 ± 153	339 ± 58	327 ± 89	288 ± 39	1013 ± 57	559 ± 49	391 ± 56	321 ± 33	
	380	1154 ± 56	276 ± 35	236 ± 43	248 ± 26	1152 ± 53	309 ± 29	305 ± 37	299 ± 33	

Taula 5.5. Efecte de la concentració de sacarosa, de PPFd i del tipus de tap sobre les taxes de fotosíntesi aparent (AP) i respiració a les fosques (R_d), referides a pes sec (DM), de fulles de gardènia desenvolupades durant les fases de multiplicació i d'arrelament. Els valors són les mitjanes ± ES de 6-10 mostres, cadascuna contenint almenys dues fulletes.

TREATMENTS	Shoot multiplication		Root induction	
	R _d μmol O ₂ gDM ⁻¹ h ⁻¹	AP μmol O ₂ gDM ⁻¹ h ⁻¹	R _d μmol O ₂ gDM ⁻¹ h ⁻¹	AP μmol O ₂ gDM ⁻¹ h ⁻¹
Sucrose:				
High (3.0 %)	105.22±5.04	401.74±37.79	54.60±2.69	332.98±35.43
Low (0.5 %)	128.37±5.29	480.96±42.72	52.48±2.47	282.88±35.43
None (0.0 %)	75.47±6.77	555.03±90.62	66.66±2.84	622.94±69.37
Significance	***	n.s.	n.s.	n.s.
PPFD:				
High (110 μmol m ⁻² s ⁻¹)	108.19±4.61	656.76±39.55	60.93±2.11	528.95±35.43
Low (50 μmol m ⁻² s ⁻¹)	97.84±4.48	301.73±37.00	54.90±2.22	296.92±31.55
Significance	n.s.	***	n.s.	**
CO₂:				
Loose tube cap	119.57±4.23	511.89±35.54	58.55±2.05	420.98±31.55
Tight tube cap	86.47±4.94	446.60±41.58	57.28±2.31	404.89±35.43
Significance	**	n.s.	n.s.	n.s.
Interactions:				
Sucrose-PPFD	n.s.	n.s.	n.s.	*
Sucrose-CO ₂	**	n.s.	n.s.	n.s.
PPFD-CO ₂	***	*	n.s.	n.s.
Sucrose-PPFD-CO ₂	n.s.	n.s.	**	n.s.

n.s., no significant; *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001

però el contingut de clorofil·les totals va baixar notablement (taula 5.3). Aquest descens, que no està d'acord amb altres casos de la bibliografia (Rival et al., 1997), podria ser conseqüència de l'aparició d'un major nombre d'estructures no fotosintètiques, com per exemple teixits estructurals per donar consistència mecànica a les fulles, durant la micropropagació.

Considerat conjuntament, durant les diferents fases de la micropropagació, el patró de canvis en els valors de fluorescència i de pigments no quadra perfectament ni amb el que considera la bibliografia com a típic d'evolució d'enverdiment ni amb res comparable amb l'acimatització a llum alta, i realment suggereix una mica de fotoinhibició. Així, les fulles de l'última fase de cultiu *in vitro* (arrelament) estarien menys fotoinhibides i presentarien uns quocients F_v/F_m i F_v/F_o més grans que les de la primera etapa, i aquesta fotoinhibició estaria associada amb mecanismes de fotoprotecció (descens de F_m) més que amb mecanismes de fotodestrucció (augment de F_o) (Kamaluddin i Grace, 1992; Araus i Hogan, 1994; Percy i Sims, 1994). En comparació, uns quocients F_v/F_m i F_v/F_o baixos durant la fase de multiplicació van dependre dels valors alts de F_o , tot i tenir valors relativament alts de F_m . Per tant, els valors alts de F_m estan associats amb una extinció no fotoquímica i podrien reflectir una utilització activa d'energia en el cicle de Calvin (Georgieva i Yordanov, 1994) o, més probablement, una falta de mecanismes de fotoprotecció durant els estadis primerencs de la micropropagació.

Efecte de les condicions de cultiu sobre la fluorescència de la clorofil·la

Les tres condicions de cultiu assajades (tipus de tap, PPFD i quantitat de sacarosa en el medi) van afectar significativament ($P \leq 0,05$) els paràmetres F_v/F_m , F_v/F_o , $t_{1/2}$ i F_m durant els dos estadis de micropropagació estudiats, mentre que F_o solament va variar segons la quantitat de sacarosa (taules 5.1 i 5.2). Una elevada quantitat de sacarosa en el medi augmentava els quocients F_v/F_m i F_v/F_o mentre que l'efecte sobre el $t_{1/2}$, F_m i F_o era menys clar. Un increment en el PPFD feia disminuir F_v/F_m , F_v/F_o i F_m i augmentava el $t_{1/2}$. Es va observar la mateixa pauta de variació tant en tubs permeables com en els que no ho eren. Ara bé, la resposta a aquestes

condicions de cultiu presentava interaccions significatives ($P \leq 0,05$), especialment entre la sacarosa i el PPFd durant la multiplicació (taula 5.1). Durant l'arrelament també es van presentar interaccions significatives entre la sacarosa i PPFds o el tipus de tap, i entre el PPFd i el tipus de tap (taula 5.2).

Per cada estadi de cultiu, les plantetes crescudes amb poca sacarosa i en menor mesura sota alt PPFd van ser les més fotoinhíbides. Aquestes condicions de cultiu van estimular la fotoautotròfia de gardènies *in vitro* (Serret *et al.*, 1996, 1997). El descens dels quocients F_v/F_m i F_v/F_o associat amb baixa sacarosa no va ser per raó d'una baixada de F_m (aquest paràmetre va mostrar una pauta oposada), però sí per un increment de F_o , mentre que la llum elevada va abaixar F_m , sense canvis en F_o . Com s'ha dit més amunt, una baixada en els quocients de fluorescència causada per un augment de F_o suggereix una inactivació dels centres de reacció del PSII per fotodany, mentre que si era per raó d'un descens de F_m , podria ser el resultat d'un augment de fotoprotecció (Kamaluddin i Grace, 1992; Araus i Hogan, 1994; Pearcy i Sims, 1994; Georgieva i Lichtenthaler, 1999). A més, la poca sacarosa (sobretot a la multiplicació) va fer abaixar el contingut total de clorofil·les (*Chl*), així com els quocients *Chl a/b* i *Chl/Car* (taula 5.3), suggerint menor síntesi i/o major degradació de clorofil·les (Sesták, 1995). En aquest sentit, i segons es diu a l'apartat 2 de resultats i discussió, es mostra que la sacarosa afavoreix la formació de cloroplasts. També s'ha demostrat en altres espècies que la sacarosa influeix sobre el contingut de clorofil·les i l'absència de fotoinhibició durant la micropropagació (Synková, 1997; Tichá *et al.*, 1998). A més, un quocient *Chl a/b* amb elevada sacarosa està d'acord amb uns complexos captadors de llum més petits (Lawlor, 1993), cosa que podria disminuir la fotoinhibició de les fulletes. En canvi, altres estudis no estan d'acord amb aquesta hipòtesi (Capellades *et al.*, 1990a; Aitken-Christie *et al.*, 1992; Hdider i Desjardins, 1994; Van Huylbroeck i Deberg, 1996), encara que els nivells de sacarosa assajats fossin molt alts, entre un 3 % i un 6 %. Altes concentracions de sacarosa en el medi poden minvar el creixement de les plantetes (Wolf *et al.*, 1998).

Un increment de PPFD durant la multiplicació no va tenir efecte en el contingut de clorofil·les (*Chl*) ni en els quocients de pigments (taula 5.3). En canvi, durant l'arrelament, *Chl* va baixar, mentre que *Chl/Car* va augmentar, cosa que vol dir que en aquest estadi tardà de la micropropagació, les plantetes s'havien aclimatat a intensitats de llum més altes (Percy i Sims, 1994). Per tant, medis amb baixa sacarosa o sense, més que un alt PPFD, poden induir fotodany. A l'apartat 2 de resultats i discussió es diu que les plantetes amb una ultraestructura dels cloroplasts més alterada són aquelles cultivades amb poca sacarosa combinat amb baix PPFD. Ademés, la interacció pels paràmetres F_v/F_m i F_v/F_o entre la sacarosa i el PPFD va ser altament significativa en els dos estadis de cultiu assajats. Això està d'acord amb el fet que les plantetes crescudes amb poca sacarosa són menys sensibles a la fotoinhibició associada amb un augment de PPFD. En aquest sentit, Genoud *et al.*, (1999) troben que un increment de PPFD té un efecte positiu sobre el quocient F_v/F_m en plantes cultivades sense sacarosa. Contràriament, Tichá *et al.* (1998) suggereixen que un alt PPFD és beneficiós en cultius fotomixotròfics (amb poca sacarosa) de tabac, però causa fotoinhibició en les totalment fotoautotròfiques (sense sacarosa).

La baixa permeabilitat del tap a l'intercanvi de gasos sembla tenir un efecte negatiu en totes les condicions de cultiu, ja que disminueix la fotoautròfia (apartat 3 de resultats i discussió), i augmenta la fotoinhibició (taules 5.1 i 5.2). Durant la major part del període de llum, la concentració de CO₂ dins els tubs tancats hermèticament (taula 5.4) va ser molt semblant al punt de compensació del CO₂ de plantes C₃ (Lawlor, 1993). Els nostres resultats estan d'acord amb els de diferents autors que troben que una baixa concentració de CO₂ dins els tubs hermèticament tancats s'assoleix després de unes poques hores de llum (Solárová, 1989; Kozai *et al.*, 1990a; Kozai, 1991b). La poca disponibilitat de CO₂ dins els tubs tapats pot afectar el transport d'electrons limitant el consum de poder assimilatori (Peterson, 1990) i així afavorint la fotoinhibició de les plantetes. Un alt PPFD pot a més afavorir l'efecte fotoinhibitori, no sols directament augmentant l'energia rebuda, sinó també perquè la concentració de CO₂ dins els tubs baixa més ràpidament i la temperatura dins els tubs és uns 5°C més alta que a la cambra de cultiu (taula 5.4).

En canvi, l'augment lleuger de VPD sota alts PPFD probablement té menys influència. Extrapolant el que està publicat per plantes *ex vitro*, dins els tubs hermèticament tancats, una combinació d'alta llum i altes temperatures junt amb una baixa concentració de CO₂ pot tenir un efecte sinèrgic sobre la fotoinhibició (Powles, 1984; Ludlow, 1987; Peterson, 1990; Faria *et al.*, 1996). Altres factors poden influir en el creixement de les plantetes dins els tubs permeables a l'intercanvi de gasos, com un augment de la quantitat d'aigua (i consegüentment, nutrients) que entra dins la planta, degut a un VPD més alt (taula 5.4) i una reducció de l'acúmul d'etilè (Righetti *et al.*, 1990; Murphy *et al.*, 1998). No es va observar un efecte significatiu del tipus de tancament del tub sobre el contingut de clorofil·les total (*Chl*) ni en els quocients de clorofil·les i tampoc interaccions entre aquell paràmetre i les altres condicions de cultiu (taula 5.3). Ara bé, d'altres estudis conclueixen que un increment en la disponibilitat de CO₂ estimula marcadament el contingut de clorofil·les i el creixement de les plantetes *in vitro* (Righetti, 1996; Solárová i Pospíšilová, 1997; Mitra *et al.*, 1998), especialment quan es combina amb medis amb poca o gens de sacarosa (Seko i Nishimura, 1996; Tichá, 1996).

Fotosíntesi, respiració i grau de fotoautotròfia

La taxa de fotosíntesi aparent (AP) de les fulles avaluada com a alliberament d'O₂ referida a pes sec a saturació de llum i CO₂ no va presentar un increment clar en els estadis posteriors del cultiu *in vitro* respecte als inicials; de fet, la tendència va ser la contrària (taula 5.5). Altres autors (Sallanon *et al.*, 1995, 1997 i Rival *et al.*, 1997) també han descrit en altres plantes un descens de les taxes d'AP (referides a pes fresc) des de la fase de multiplicació a la fase d'arrelament. Per la major part de condicions de cultiu, la respiració a les fosques (R_d) referida a pes sec va ser gairebé el doble durant la fase de multiplicació que durant la fase d'arrelament. Per altra banda, l'absència de sacarosa en el medi va disminuir la R_d, cosa que indicava una limitació per falta de substrat. Aquest fet estaria d'acord amb altres resultats *in vitro* (Galzy i Compan, 1992; Hdider i Desjardins, 1994).

Les plantetes de gardènia van presentar una fotoautotròfia més desenvolupada a la fase d'arrelament que a la de multiplicació (apartats 1 i 3 de resultats i discussió), cosa que faria pensar en un increment de les taxes d'AP en l'estadi més avançat. La tendència dels valors d'AP i R_d (referides a pes sec) va ser a disminuir des de la fase de multiplicació fins la d'arrelament, cosa que podria ser per raó d'un increment progressiu d'estructures inerts (la major part de suport) en les fulles desenvolupades durant l'últim període de la micropropagació (Jeong *et al.*, 1995; Nguyen i Kozai, 1998). De fet, les taxes d'AP per unitat de clorofil·les van ser, de promig, un 40 % més altes durant l'arrelament que durant la multiplicació, mentre que R_d solament va baixar un 10 % pels mateixos estadis (valors no mostrats). De totes maneres, no hi van haver diferències significatives entre els tractaments, ja fora en l'AP o R_d expressades en base a clorofil·les.

La quantitat de sacarosa en el medi i el tipus de tancament del tub no va tenir un efecte significatiu en cap dels estadis, exceptuant un petit efecte ($P \leq 0,1$) en la fase d'arrelament, on es va observar una tendència a taxes més altes en plantes cultivades tant sense sacarosa com amb taps permeables. El PPFD va ser l'únic factor que va mostrar un efecte significativament positiu sobre les taxes d'AP referides a pes sec, cosa que està d'acord amb els resultats de l'apartat 2 de resultats i discussió en plantes de gardènia durant la fase de multiplicació. L'absència de diferències clares en l'AP segons les condicions de cultiu *in vitro* es va descriure també en *Rosa hybrida* (Genoud-Gourichon, 1996), mentre que en tabac (Tichá *et al.*, 1998) i en café (Nguyen *et al.*, 1999) es va observar un efecte positiu del contingut de sacarosa en el medi.

Per a cada estadi de cultiu, els valors mitjans d'AP i R_d de cadascuna de les condicions de cultiu es van dibuixar junts (12 combinacions), i es van relacionar amb el grau de fotoautotròfia assolit per les mateixes fulles (valors de l'apartat 2 corresponent als resultats i a la discussió). El grau de fotoautotròfia es va mesurar com a diferència absoluta entre la composició isotòpica ($\delta^{13}C$) de les fulletes i la de la sacarosa (del sucre de canya) utilitzat com a font de carboni, amb les diferències més

altes que corresponen a les fulles més fotoautotròfiques. No es van trobar correlacions significatives ni durant la multiplicació ni durant l'arrelament entre l'AP (referida a pes sec o en base a contingut de clorofil·les) i el grau de fotoautotròfia. Pel que fa al paràmetre R_d , (referit a pes sec o a contingut de clorofil·les) i el grau de fotoautotròfia, tampoc no es van observar correlacions en cap dels dos estadis de cultiu. Estudis previs d'altres autors indiquen que les pautes diàries o instantànies d'AP no donen una idea massa clara (integrada en el temps) de la contribució de la fotosíntesi al balanç de carbó d'una planta *in vitro* (Kozai *et al.*, 1990a; Kozai, 1991b; Jeong *et al.*, 1993; Hdider i Desjardins, 1994).

Fotosíntesi i fluorescència de la clorofil·la durant la micropropagació

Les taxes d'AP es van relacionar amb els paràmetres de fluorescència de la clorofil·la mesurats en les mateixes fulles dins de cadascun dels estadis de creixement. Durant la multiplicació, l'AP, per unitat de pes sec, es va correlacionar dèbilment ($P < 0,1$) de forma negativa amb F_v/F_o , i F_m mesurats abans del període de llum, mentre que no hi va haver relació quan les mesures es van fer durant el període de llum. En la fase d'arrelament no es van trobar correlacions significatives entre l'AP per unitat de pes sec i cap dels paràmetres de fluorescència, mesurats tant durant el període de fosc com posteriorment a la llum. Si expressem el resultat d'AP respecte a clorofil·les, durant la fase de multiplicació no hi va haver cap relació entre l'AP i cap dels paràmetres de fluorescència. En canvi, en la fase d'arrelament hi va haver una lleugera correlació negativa ($P < 0,1$) amb F_v/F_m i F_v/F_o mesurats abans o durant el període de llum. Aquests resultats indiquen que les plantes amb una AP més elevada podrien estar més fotoinhíbides. Babani i Lichtenthaler (1996) van trobar una forta correlació entre l'AP (per unitat de superfície) i F_v/F_o , en fulles etiolades d'ordi durant el procés d'enverdiment, però només a partir d'un cert umbral, mentre que no hi va haver correlació amb F_v/F_m . Per altra banda, l'AP, per unitat de pes sec, es va correlacionar positivament ($p < 0,05$) amb el $t_{1/2}$ en la fase de multiplicació (fig. 5.1). La relació entre aquests dos paràmetres en la fase d'arrelament també va ser positiva, però no significant. Aquesta correlació positiva entre l'AP i $t_{1/2}$ podria ser bàsicament per raó d'una resposta d'ambdós paràmetres a alt PPFD durant el transcurs del cultiu.

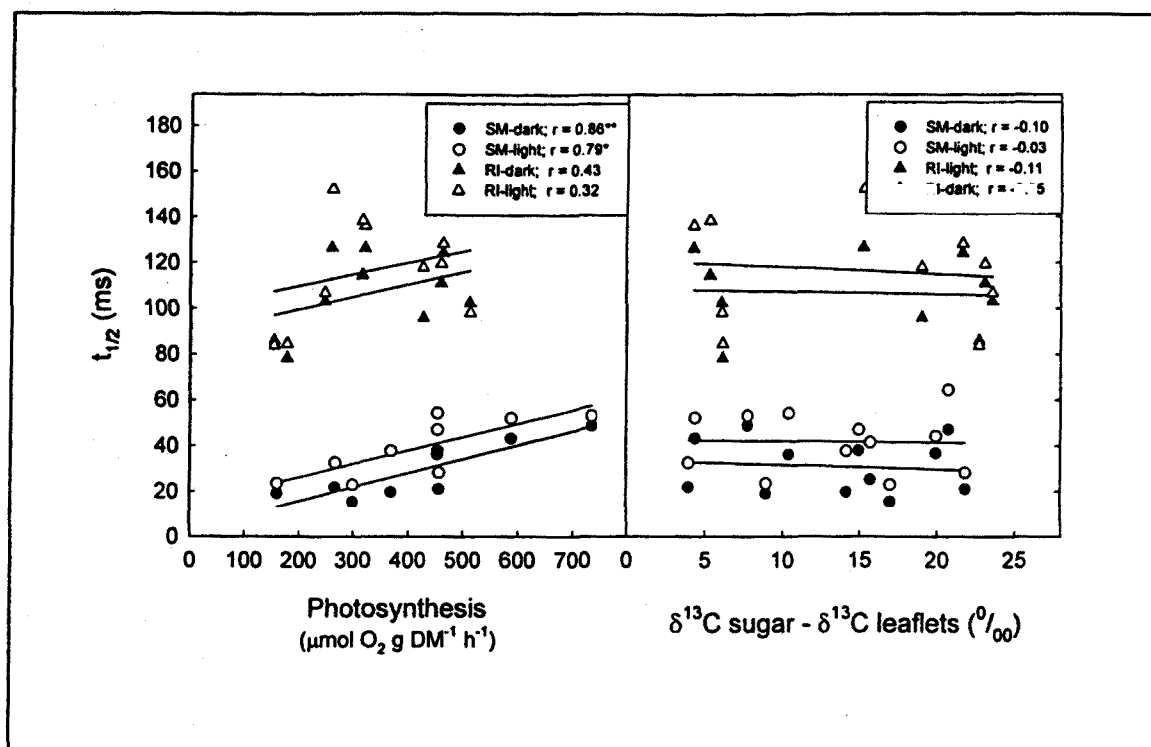


Figura 5.1 Esquerra: Relacions entre la taxa de fotosíntesi aparent (AP) de les fulles expressada per unitat de pes sec a saturació de PPFD i CO₂, i la meitat del temps que es necessita perquè la fluorescència augmenti des de F₀ fins F_m (t_{1/2}). **Dreta:** Relacions entre el grau de fotoautotròfia mesurat com diferència absoluta entre la composició isotòpica del carboni (δ¹³C) de les fulletes i la de la sacarosa (del sucre de canya) utilitzat com a font de carboni (δ¹³C sacarosa - δ¹³C fulletes) i t_{1/2}. Entre cada estadi de cultiu, les condicions de cultiu es van plotejar juntes i cada punt representa el valor mig per cada combinació de PPFD, sacarosa i tipus de tap. Els símbols blancs i negres corresponen a les mesures de t_{1/2} fetes abans del període de llum (dark) i després de 6 h de fotoperíode (light), respectivament. Els cercles i triangles corresponen a mesures fetes durant la fase de multiplicació (SM) i la fase d'arrelament (SR), respectivament. Per a més detalls veure materials i mètodes.

A mesura que augmentava el PPFD, no només incrementava AP (taula 5.5), però també ho feia el t_{1/2} (taules 5.1 i 5.2). De fet, la llum va ser l'únic factor amb efecte positiu en els dos estadis de cultiu *in vitro*, sobre les taxes d'AP per unitat de pes sec, sinó que també va exercir l'efecte més gran sobre el t_{1/2} durant la fase de multiplicació. El paràmetre t_{1/2} és funció de la taxa de reaccions fotoquímiques i de la mida del pool d'acceptors d'electrons al lloc reductor del PSII, incloent-hi el pool de plastoquinones (Öquist i Wass, 1988; Bolhár-Nordenkampf *et al.*, 1989). Un increment del t_{1/2} és esperable durant l'aclimatació a llum més elevada (Araus i Hogan, 1994 i referències anteriors).

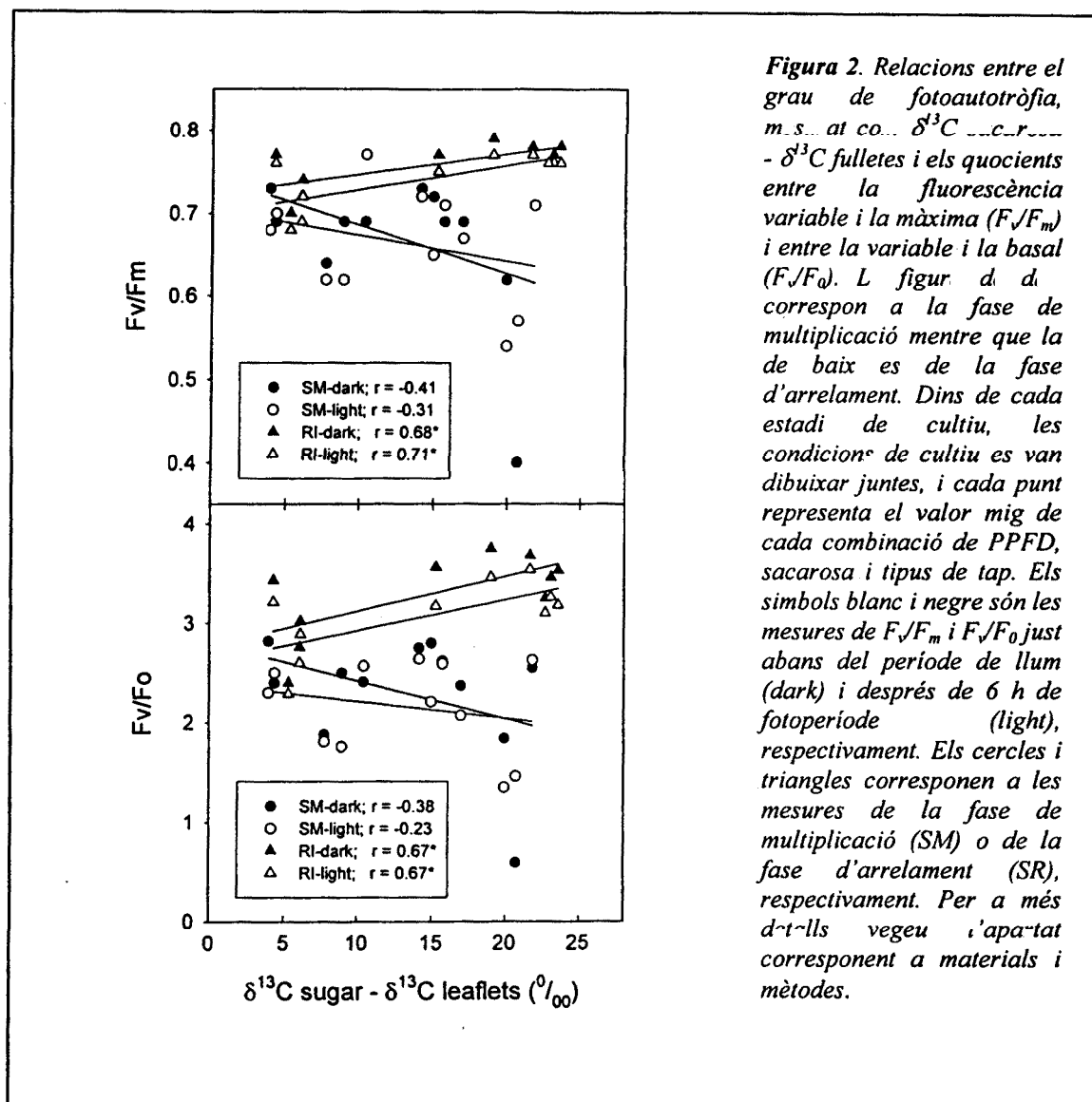


Figura 2. Relacions entre el grau de fotoautotròfia, m.s. at co. $\delta^{13}C$... $\delta^{13}C$ fulletes i els quocients entre la fluorescència variable i la màxima (F_v/F_m) i entre la variable i la basal (F_v/F_o). La figura de dreta correspon a la fase de multiplicació mentre que la de baix es de la fase d'arrelament. Dins de cada estadi de cultiu, les condicions de cultiu es van dibuixar juntes, i cada punt representa el valor mig de cada combinació de PPFd, sacarosa i tipus de tap. Els símbols blanc i negre són les mesures de F_v/F_m i F_v/F_o just abans del període de llum (dark) i després de 6 h de fotoperíode (light), respectivament. Els cercles i triangles corresponen a les mesures de la fase de multiplicació (SM) o de la fase d'arrelament (SR), respectivament. Per a més detalls vegeu l'apartat corresponent a materials i mètodes.

Grau de fotoautotròfia i fluorescència de la clorofil·la

No es va trobar cap relació entre el grau de fotoautotròfia i el $t_{1/2}$ en cap dels dos estadis de la micropropagació (fig. 5.1), cosa que recolça de nou la manca de similituds entre la pauta d'aclimatació a la llum i la fotoautotròfia. Durant la fase d'arrelament, el grau de fotoautotròfia es va correlacionar positivament ($P < 0,05$) amb els quocients F_v/F_m i F_v/F_o (fig. 5.2). En canvi, durant la fase de multiplicació, hi va haver una relació petita, no significativa, però amb tendència negativa. F_m , es va correlacionar positivament, però de forma débil ($P < 0,1$) amb el grau de

fotoautotròfia durant l'arrelament, però no durant la multiplicació. Alternativament, F_o mesurada en la fase de multiplicació durant el període de llum presentava una correlació feble ($P < 0,1$) positiva amb el grau de fotoautotròfia, mentre que no hi havia correlació durant la fase d'arrelament. Les correlacions positives trobades durant l'arrelament entre el grau de fotoautotròfia i els paràmetres F_v/F_m , F_v/F_o i F_m podrien semblar *a priori*, contradictòries amb el patró que es despren de la taula 5.2, en la que s'observa una major fotoinhibició en aquelles plantes cultivades en condicions més fotoautotròfiques, com ara poca sacarosa i llum alta. En canvi, de fet, no hi ha cap contradicció. Així, mentre cada punt dibuixat a les figures representa una combinació particular de PPF, sacarosa i tipus de tap, els valors de la taula representen les mitjanes de totes les fulletes d'un mateix tractament. A més, en la fase de multiplicació no hi va haver interacció entre la sacarosa, el PPF i el tipus de tap (taula 5.1) mentre que es va observar una interacció altament significativa entre aquestes tres condicions de cultiu en la fase d'arrelament (taula 5.2).

Com a conclusió, els resultats suggereixen que durant els estadis tardans de la micropropagació, les plantetes amb un grau de fotoautotròfia més elevat estan menys fotoinhibides, mentre que una pauta contrària sembla passar durant els primers estadis. Els resultats de desenvolupament de cloroplasts de gardènia durant la multiplicació estarien d'acord amb l'efecte negatiu de les condicions de cultiu sobre la fotoautotròfia (apartat 2 de resultats i discussió). Un increment de la fotoautotròfia pot ser beneficiós, afavorint la fotosíntesi i l'aclimatació posterior a condicions *ex vitro* (part B d'aquest apartat), solament en estadis tardans de la micropropagació.

B) ACLIMATITZACIÓ

Patró de fotoinhibició durant l'acclimatització

Amb independència de les condicions de micropropagació, totes les plantetes van presentar la mateixa pauta en els diferents paràmetres de la fluorescència de la clorofil·la durant el període d'acclimatització *ex vitro*. La major part dels canvis van tenir lloc durant la segona meitat d'aquesta fase, és a dir, durant les setmanes tres i quatre del període. Així, F_v/F_m (taula 5.6), F_v/F_o (fig. 5.3), F_m , amb excepcions (fig. 5.5), i una mica menys $t_{1/2}$ (fig. 5.6) van augmentar, mentre que F_o (fig. 5.4) va disminuir.

Taula 5.6. Efecte de la concentració de sacarosa, del PPFD i del tipus de tap durant l'arrelament *in vitro* en el quocient F_v/F_m mesurat en fulles de gardènia durant el període d'acclimatització a condicions *ex vitro*. Les mesures es van fer al final del període de foscor (dark) i després de 6 h de fotoperíode (light), respectivament. Els valors són la mitjana \pm ES de 7-20 fulles

Growing conditions <i>in vitro</i>		F_v/F_m - Days of acclimation					
		Day 0	Day 1	Day 3	Day 7	Day 14	Day 28
Sucrose	30 g l ⁻¹	0.754±0.009	0.742±0.007	0.777±0.008	0.769±0.008	0.739±0.007	0.829±0.002
	5 g l ⁻¹	0.601±0.008	0.650±0.007	0.642±0.007	0.630±0.008	0.637±0.006	0.768±0.002
	0 g l ⁻¹	0.637±0.01	0.667±0.009	0.631±0.01	0.651±0.01	0.638±0.009	0.736±0.003
	Significance	***	***	***	***	***	***
PPFD	100 μmol m ⁻² s ⁻²	0.656±0.007	0.697±0.006	0.666±0.007	0.693±0.007	0.701±0.006	0.759±0.002
	50 μmol m ⁻² s ⁻²	0.672±0.007	0.675±0.006	0.700±0.007	0.673±0.007	0.641±0.006	0.797±0.002
	Significance	n.s.	n.s.	*	n.s.	***	***
CO ₂	Loose tube cap	0.738±0.006	0.751±0.005	0.745±0.006	0.746±0.006	0.745±0.005	0.808±0.001
	Tight tube cap	0.590±0.008	0.622±0.008	0.622±0.009	0.620±0.009	0.597±0.008	0.748±0.002
	Significance	***	***	***	***	***	***
Photoperiod	Dark	0.656±0.007	0.699±0.006	0.676±0.007	0.684±0.007	0.671±0.006	0.801±0.002
	Light	0.672±0.007	0.674±0.006	0.690±0.007	0.682±0.007	0.672±0.006	0.755±0.002
	Significance	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	***
Interactions	Sucrose-PPFD	n.s.	n.s.	***	***	n.s.	n.s.
	Sucrose-CO ₂	***	*	***	***	***	***
	Sucrose-Time	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	***
	PPFD-CO ₂	***	*	***	n.s.	***	***
	CO ₂ -Time	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.
	PPFD-Time	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

n.s., not significant; *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001

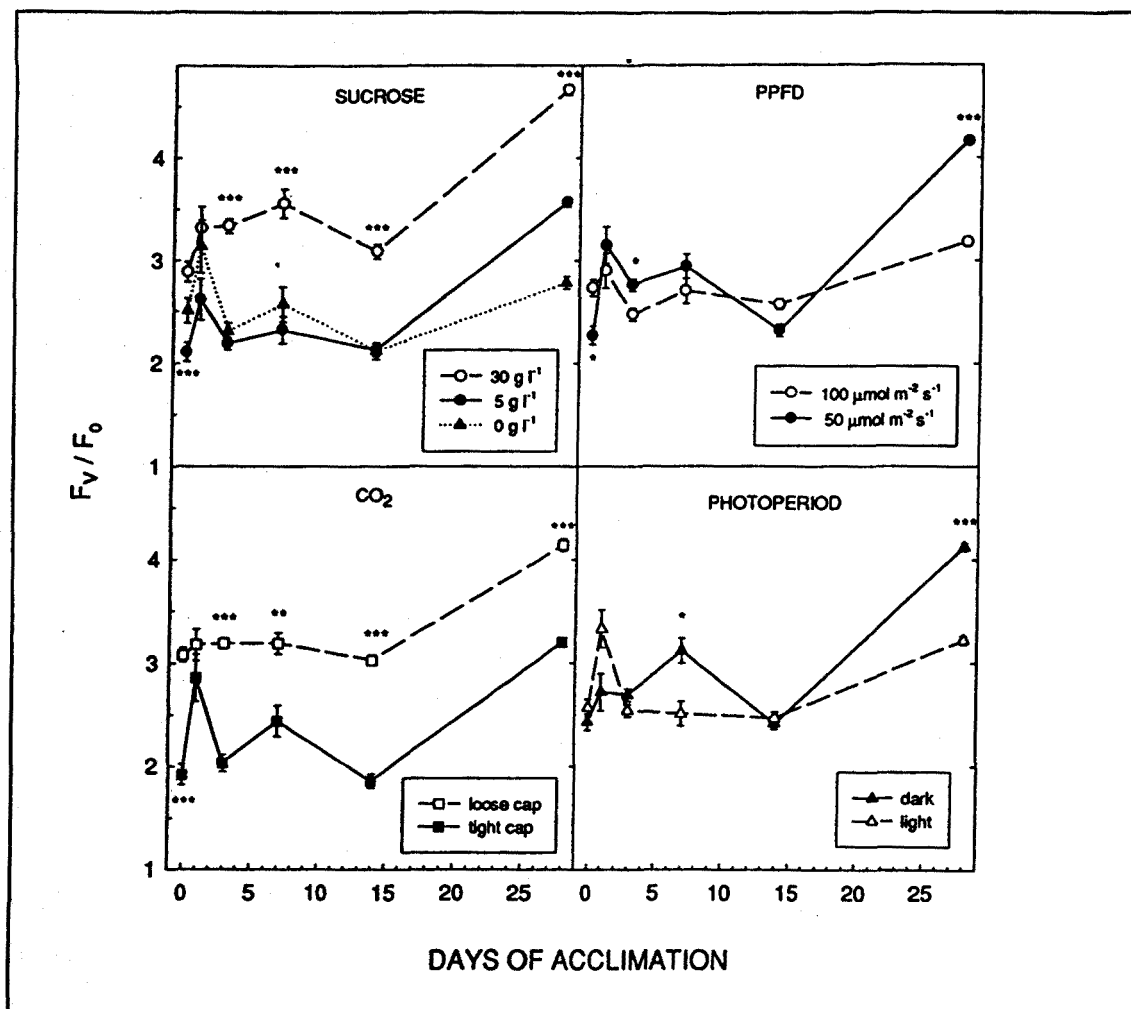


Figura 5.3. Efecte de la concentració de sacarosa, del PPFD i del tipus de tap durant l'arrelament in vitro en el quocient F_v/F_0 , mesurat en fulles de gardènia durant l'acclimatització a condicions ex vitro. Les mesures es van fer al final del període de fosc (dark) i després de 6 h de fotoperíode (light), respectivament. Els valors són la mitjana \pm ES de 7-20 fulles.

La pauta de canvis observada en els paràmetres de la fluorescència de la clorofil·la és la típica d'una progressiva acclimatització *ex vitro*, amb una forta fotoinhibició al començament del període que s'alleugeria a mesura que els dies passaven (Jorba, 1994; Trillas *et al.*, 1995). Araus i Hogan (1994), en plantes *ex vitro*, van observar pautes similars tant pel que fa a fluorescència com a la resposta a la llum. En el nostre estudi, mentre que el PPFD va anar augmentant progressivament (a mida que eren retirades les malles) durant l'acclimatització, el paràmetre $t_{1/2}$, indicador simple de la mida d'acceptors d'electrons en la part reductora del PSII (Bolhár-

Nordenkampf *et al.*, 1989), també va augmentar. Per altra banda, un augment de F_v/F_m i de F_v/F_0 ocasionat per un descens de F_0 podria indicar una menor inactivació dels centres de reacció del PSII per danys produïts a causa de la llum, però si aquell augment fos provocat per un augment de F_m , seria la conseqüència d'una menor necessitat que funcionin els mecanismes de fotoprotecció (extinció no fotoquímica) de la planta (Kamaluddin i Grace, 1992; Araus i Hogan, 1994; Pearcy i Sims, 1994; Georgieva i Lichtenthaler, 1999).

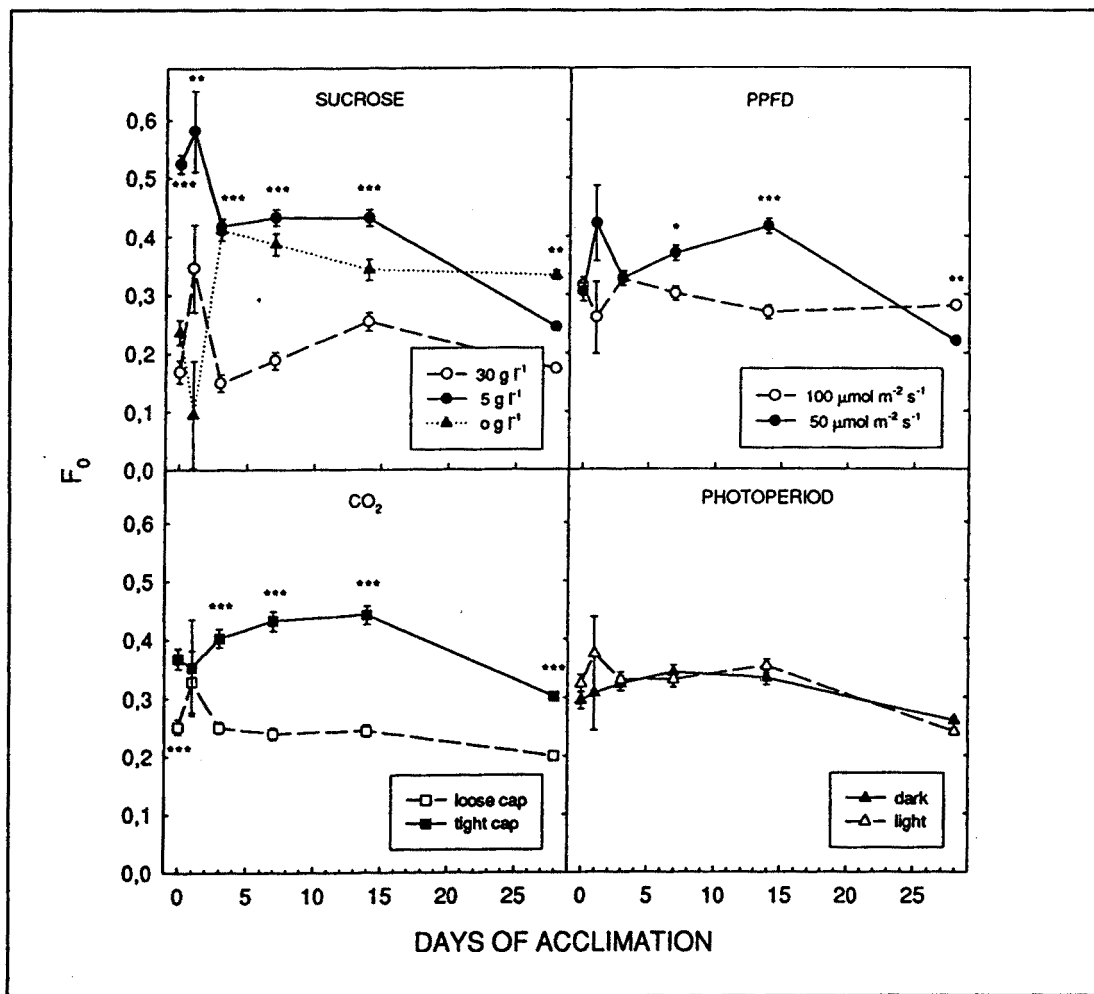


Figura 5.4. Efecte de la concentració de sacarosa, del PPFD i del tipus de tap durant l'arrelament in vitro en el paràmetre F_0 , mesurat en fulles de gardènia durant l'acclimatització a condicions ex vitro. Les mesures es van fer al final del període de foscor (dark) i després de 6 h de fotoperíode (light), respectivament. Els valors són la mitjana \pm ES de 7-20 fulles.

Els canvis en els paràmetres de fluorescència durant el fotoperíode (entre mesures fetes just abans de començar el període de llum i altres fetes 6 h després) van ser significatius solament al final de la fase d'acclimatització. F_v/F_m , F_v/F_o i F_m van disminuir durant la fase de llum, mentre que el $t_{1/2}$ va augmentar i F_o no va presentar canvis. Els paràmetres F_v/F_m i F_v/F_o van mostrar petits canvis reversibles a curt termini motivats per mecanismes de fotoprotecció (descensos de F_m) i no motivats per un dany de la fotoinhibició associada amb un augment de F_o (Kamaluddin i Grace, 1992; Araus i Hogan, 1994; Percy i Sims, 1994). A l'inici de l'acclimatització, els valors constants (i menors) dels quocients F_v/F_m i F_v/F_o al llarg del fotoperíode podrien ser una conseqüència d'un desenvolupament incomplet dels mecanismes de fotoprotecció a causa d'un dany fotoinhibitori permanent.

Efecte de les condicions de cultiu

Durant tot el procés d'acclimatització es van observar grans diferències en els valors d'aquests paràmetres de fluorescència, en funció de les condicions *in vitro* prèvies. La quantitat de sacarosa en el medi i el tipus de tap van ser els factors que van influir més en la fluorescència de la clorofil·la durant l'acclimatització posterior, mentre que l'efecte de la llum va ser menor. Al llarg de tot el procés d'acclimatització, un nivell de sacarosa més alt i un tap permeable van produir fulles amb quocients F_v/F_m , F_v/F_o i $t_{1/2}$ significativament més alts i un F_o menor, sobretot entre els dies 14 i 28. El paràmetre F_m (Fig. 5.5) va presentar una pauta diferent segons el tractament. Presentava valors inferiors en fulles crescudes en concentracions altes de sacarosa i va augmentar en fulles procedents de tubs no permeables al CO_2 . La intensitat de llum no va tenir un efecte clar en els diferents paràmetres al començament del període d'acclimatització. Ara bé, entre el dia 14 i el 28 es van observar certes diferències; el dia 14, la llum alta va provocar un augment de F_v/F_o i del $t_{1/2}$ i una disminució de F_o i de F_m , mentre que el dia 28 va ser al contrari. El dia 28, les fulles crescudes a llum baixa presentaven valors similars en els diferents paràmetres de fluorescència estudiats als de les fulles crescudes en tubs permeables.

El contingut de clorofil·les per unitat de pes fresc al final del període d'acclimatització (dia 28) va ser significativament més alt en plantes cultivades amb

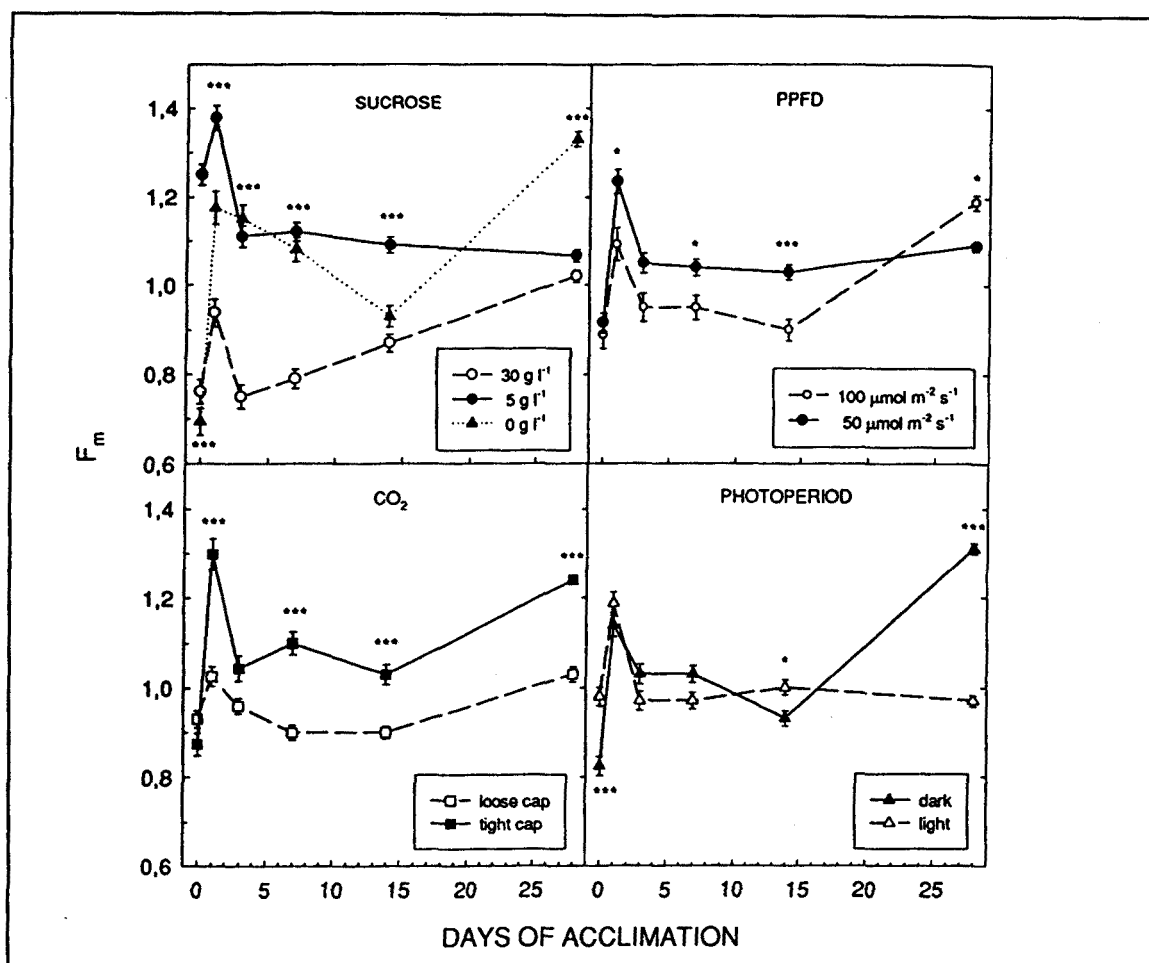


Figura 5.5. Efecte de la concentració de sacarosa, del PPFD i del tipus de tap durant l'arrelament in vitro en el paràmetre F_m mesurat en fulles de gardènia durant l'acclimatització a condicions ex vitro. Les mesures es van fer al final del període de foscor (dark) i després de 6 h de fotoperíode (light), respectivament. Els valors són la mitjana \pm ES de 7-20 fulles.

més quantitat de sacarosa (taula 5.7). El mateix efecte positiu es va observar en el contingut de clorofil·les per àrea de fulla. Els altres dos factors de creixement *in vitro* (PPFD i tipus de tap) no van tenir un efecte significatiu en el contingut de clorofil·les durant l'acclimatització, pel que es refereix a pes fresc. Ara bé, si referim el contingut de clorofil·les a unitat de superfície (valors del SPAD), va ser major en les mostres provinents, durant la micropropagació, de la intensitat de llum baixa o de tubs permeables. Les fulles de S₃₀ també van presentar un quocient clorofil·les/carotenoides més alt. No es va observar cap altre efecte, a causa de les

condicions de cultiu *in vitro*, en aquest paràmetre o en el quocient clorofil·la a/clorofil·la b.

La millora del funcionament fotosintètic d'algunes plantes durant l'acclimatització podria ser una conseqüència del seu desenvolupament iniciat *in vitro*. Per tant, caldria esperar que les plantes que estan menys fotoinhibides durant la micropropagació, a causa de les condicions del cultiu, progressessin millor durant l'acclimatització (Van Huylenbroeck i Debergh, 1996; Genoud *et al.*, 1999). D'aquesta manera, el cultiu de gardènia dins tubs permeables al CO₂ disminueix la fotoinhibició (veure A, d'aquest apartat) i augmenta la fotoautotròfia durant la micropropagació (Serret *et al.*, 1997). Alternativament, l'addició de sacarosa en el medi també fa disminuir la fotoinhibició i comporta un increment en el contingut total de clorofil·les,

Taula 5.7. Efecte de la concentració de sacarosa, del PPFD i del tipus de tap durant l'arrelament in vitro en el contingut total de clorofil·les (a + b) referit a pes fresc (FM) i els quocients clorofil·la a/b i clorofil·les/carotenoides mesurats en fulles de gardènia després de 4 setmanes d'acclimatització. Els valors són les mitjanes ± ES de 5-6 mostres, cadascuna de les quals contenia 1-2 fulles. També es mostra el contingut de clorofil·les total referit a superfície de fulla (unitats arbitràries) mesurades el mateix dia amb un aparell portàtil. Aquests valors són les mitjanes ± ES d'aproximadament 10 fulles i tres mesures per fulla.

PARAMETERS		Total Chlorophyll on fresh weight basis (mg g ⁻¹ FW)	Chlorophyll a/b	Chlorophylls /Carotenoids (a+b)/(x+c)	Total Chlorophyll on leaf area basis (arbitrary units)
Sucrose	30 g l ⁻¹	21.42±1.71	2.72±0.04	5.13±0.07	57.06±1.22
	5 g l ⁻¹	12.21±1.82	2.81±0.04	4.89±0.08	37.55±1.17
	0g l ⁻¹	8.08±2.10	2.79±0.05	4.35±0.09	35.10±1.50
	Significance	*	n.s.	*	***
PPFD	100 μmol m ⁻² s ⁻¹	11.57±1.48	2.79±0.03	4.82±0.06	39.52±1.02
	50 μmol m ⁻² s ⁻¹	16.23±1.55	2.76±0.03	4.76±0.07	46.95±1.06
	Significance	n.s.	n.s.	n.s.	**
CO ₂	Loose tube cap	10.94±2.10	2.73±0.05	4.69±0.09	47.45±0.87
	Tight tube cap	16.86±1.25	2.82±0.03	4.90±0.05	39.02±1.40
	Significance	n.s.	n.s.	n.s.	**
Interactions	Sucrose-PPFD	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Sucrose-CO ₂	n.s.	n.s.	n.s.	*
	PPFD-CO ₂	n.s.	n.s.	n.s.	**

n.s., no significant; *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001

com també en el quocient clorofil·les/carotenoides, fins i tot quan les condicions de cultiu provoquen un desenvolupament menys fotoautotròfic (Serret *et al.*, 1996, 1997). A més, segons es va dir a l'apartat 2 corresponent als resultats i a la discussió, les fulles de gardènia que presentaven la ultraestructura dels cloroplasts més alterada eren les que estaven cultivades amb baixa quantitat de sacarosa i amb llum baixa a la vegada (apartat 2 de resultats i discussió). En altres espècies, poca o gens quantitat de sacarosa en el medi de cultiu va afectar negativament la fotosíntesi durant l'aclimatització, i va provocar més fotoinhibició (Capellades *et al.*, 1990a; Desjardins, 1995; Synková, 1997). En un extrem oposat, medis amb nivells de sacarosa damunt

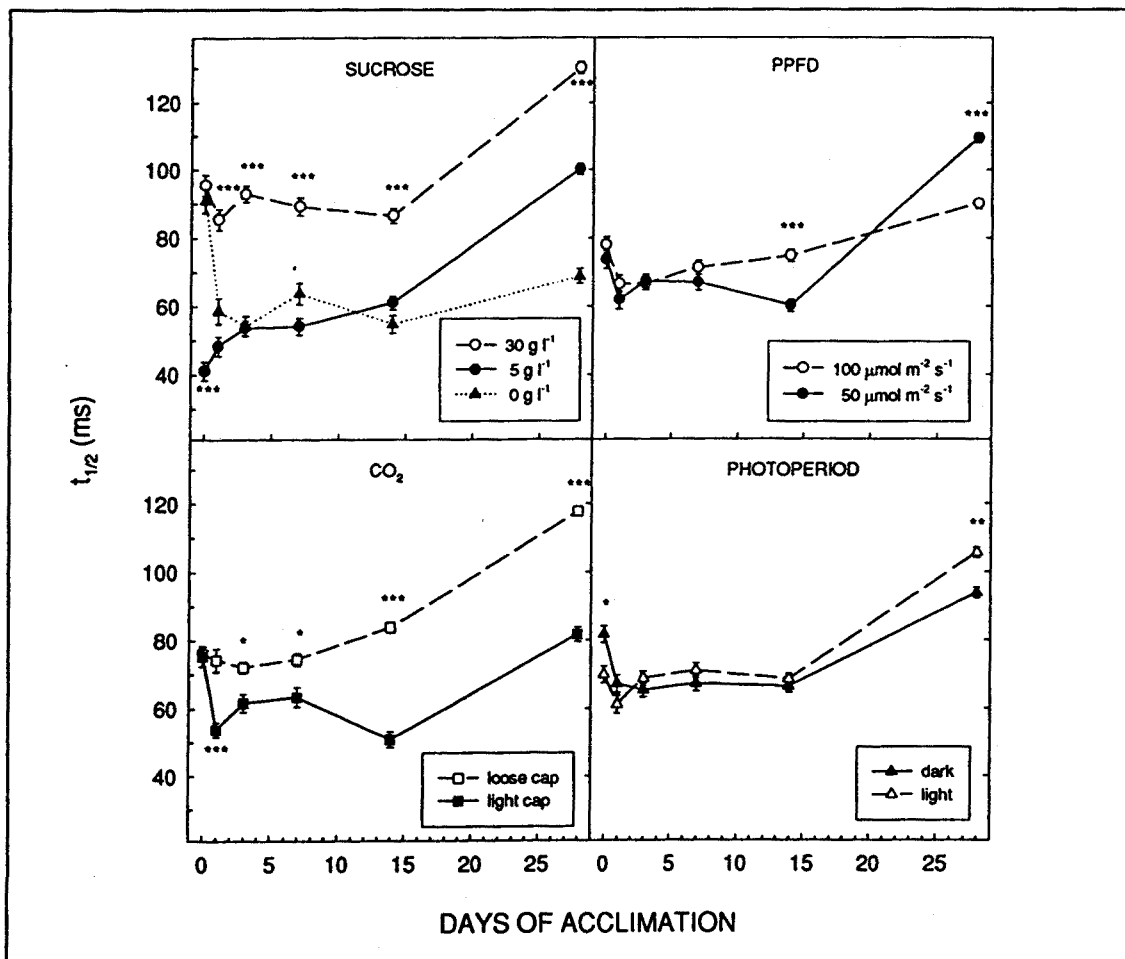


Figura 5.6. Efecte de la concentració de sacarosa, del PPFD i del tipus de tap durant l'arrelament in vitro en el paràmetre $t_{1/2}$, mesurat en fulles de gardènia durant l'aclimatització a condicions ex vitro. Les mesures es van fer al final del període de foscor (dark) i després de 6 h de fotoperíode (light), respectivament. Els valors són la mitjana \pm ES de 7-20 fulles.

d'un 3 % també poden provocar més fotoinhibició i un contingut de clorofil·les total menor durant l'acclimatització (Van Huylenbroeck i Debergh, 1996, i les referències que esmenten) fins i tot quan el creixement és afavorit per determinades condicions (Van Huylenbroeck i Debergh, 1996; Vorácková *et al.*, 1998).

Ara bé, es van observar interaccions significatives entre les diferents condicions de cultiu *in vitro* al final del període d'acclimatització (taula 5.6 i figs. 5.3-5.6). Les interaccions més fortes van ser entre la sacarosa i el tipus de tap, seguides de les interaccions entre PPFD i cadascuna de les altres dues condicions. Aquests resultats són conseqüents amb el fet que, per exemple, plantes crescudes *in vitro* en medis amb baixa sacarosa mostren poca susceptibilitat a la fotoinhibició durant l'acclimatització quan es cultiven en tubs permeables al CO₂ o amb llum alta. En aquest sentit, Genoud-Gourichon *et al.*, (1996), treballant amb *Rosa hybrida*, van trobar un efecte positiu entre una major disponibilitat de CO₂ i la llum (en combinació amb un medi sense sacarosa) durant el cultiu *in vitro*, i el creixement posterior durant l'acclimatització *ex vitro*. D'això podem deduir que les interaccions entre les condicions de creixement durant la micropropagació poden també manifestar-se durant la fase d'acclimatització.

Durada del període d'acclimatització

Els valors típics del quocient F_v/F_m oscil·len entre 0.75-0.85 en fulles no estressades (Bolhár-Nordenkampf *et al.*, 1989). En el nostre experiment, el dia 28, les fulles procedents de medis amb concentracions altes de sacarosa o de tubs permeables al CO₂ presentaven valors més alts de 0.80, cosa que ens indica que hi ha una absència de fotoinhibició, mentre que en altres fulles, amb valors de 0.75, sembla que hi havia un cert grau de fotoinhibició. De totes maneres, i amb independència del tractament *in vitro* considerat, el quocient F_v/F_m , al final del període d'acclimatització va ser sempre més alt que l'obtingut *in vitro* (Serret *et al.*, 1996), cosa que està d'acord amb el que s'ha descrit en altres espècies (Trillas *et al.*, 1995; Rival *et al.*, 1997). Un període d'acclimatització de 3-4 setmanes és un procés habitual en plantes de gardènia i és comparable al que s'utilitza en altres plantes herbàcies (Van Huylenbroeck i Debergh, 1996; Synková, 1997; Pospíšilová *et al.*, 1999). De fet, Van Huylenbroeck i Debergh

(1996), en *Spathiphyllum* comproven que el fet que les plantes siguin o no activament fotosintètiques en el moment del seu trasplantament *ex vitro* té una importància secundària i no hi havia diferències ni en F_v/F_m ni en els altres paràmetres de fluorescència després d'unes quantes setmanes d'acclimatització.

CONCLUSIONS

Metodologia

1. El grau de fotoautotròfia assolit durant el cultiu *in vitro* es pot avaluar de forma senzilla mitjançant anàlisis de $\delta^{13}\text{C}$ del material vegetal.
2. Ni el contingut de clorofil·les ni les taxes fotosintètiques s'han mostrat bons indicadors del desenvolupament fotoautotròfic *in vitro*.
3. Les anàlisis de $\delta^{13}\text{C}$ poden ser útils per avaluar l'estat hídric de les plantetes durant l'aclimatació.
4. Les mesures de la fluorescència de la clorofil·la han estat un bon indicador de la fotoinhibició de l'aparell fotosintètic.

Estadi de micropropagació

1. El grau de fotoautotròfia de les plantetes en l'estadi d'arrelament és superior al que s'observa durant l'estadi de multiplicació.
2. La major fotoautotròfia durant l'arrelament va associada amb un augment del grau de desenvolupament de la morfologia estomàtica, de l'anatomia del mesòfil i de la ultraestructura cloroplàstica.
3. Els quocients F_v/F_m i F_v/F_o van ser baixos durant la micropropagació per totes les condicions de cultiu i estadis de multiplicació i arrelament, la qual cosa sembla indicar un desenvolupament incomplet de l'aparell fotosintètic i/o una fotoinhibició permanent.
4. Tot i així, durant la fase d'arrelament, les plantes van mostrar menys fotoinhibició que durant la fase de multiplicació. Els majors valors en els

quocients F/F_m i F/F_0 en la fase d'arrelament van estar associats a un descens de F_0 i a un increment de F_m .

Condicions de creixement

1. La utilització de taps permeables va ser el tractament que més va estimular el desenvolupament de la fotoautotròfia a les plantetes. Un nivell baix de sacarosa o radiacions intermèdies (L_{100}), especialment quan es combinen amb taps permeables, també van induir més fotoautotròfia.
2. Un increment de PPFD fins a valors moderats (de l'ordre del doble del que s'utilitza habitualment) combinat amb concentracions baixes de sacarosa té un efecte positiu en el desenvolupament dels teixits fotosintètics. Contràriament, una concentració baixa de sacarosa combinada amb baix PPFD va provocar el desenvolupament d'alteracions en els teixits fotosintètics.
3. Condicions de creixement que indueixen la fotoautotròfia a les plantetes, com ara poca concentració de sacarosa o alt PPFD van induir major fotoinhibició a les plantetes, mentre que el creixement dins tubs permeables al CO_2 va produir plantes menys fotoinhibides. Una concentració baixa de sacarosa va reduir la susceptibilitat de fotoinhibició causada per increments de PPFD.
4. El PPFD va ser l'únic factor de creixement que va afectar de forma significativa i positivament a les taxes de fotosíntesi.
5. El grau de fotoautotròfia es va correlacionar positivament amb F/F_m i F/F_0 durant l'arrelament, mentre que no es va observar correlació durant la multiplicació. L'anterior comportament indica que solament durant l'estadi d'arrelament les plantes amb major grau de fotoautotròfia són les menys fotoinhibides.

Aclimatació

1. De les condicions que estimulen la fotoautotròfia *in vitro*, solament les plantes dels tubs de tap permeable van mostrar menor fotoinhibició durant l'aclimatació, mentre que les plantes provinents de cultius amb poca o sense sacarosa i alta radiació van ser les més fotoinhibides. Les plantes cultivades *in vitro* en condicions de baix PPFD i alta sacarosa van ser les menys fotoinhibides durant l'aclimatació.
2. Les plantetes provinents de tubs amb tap permeable també van ser les que van mostrar un major pes fresc i un estat hídric més favorable.

BIBLIOGRAFIA

- Adkins, S.W., Shiraishi, T. and McComb, J.A. (1990) Rice callus physiology - Identification of volatile emissions and their effects on culture growth. *Physiol.Plant.* 78:526-531.
- Aitken-Christie, J., Kozai, T. and Takayama, S. (1995) Automation in plant tissue culture -general introduction and overview. pp. 1-18. In: Automation and environmental control in plant tissue culture. Aitken-Christie, J., Kozai, T. and Smith, M.A.L. (eds.) Kluwer Academic Publishers, Dordrech. 574 pp.
- Aitken-Christie, J., Davies, H.E., Holland, L., Kubota, C. and Fujiwara, K. (1992) Effect of nutrient media composition on sugar-free growth and chlorophyll fluorescence of *Pinus radiata* shoots *in vitro*. *Acta Hort.* 319:125-130.
- Anderson, J.M., Chow, W.S. and Goodchild, D.J. (1988) Thylakoid membrane organization in sun/shade acclimation. In: Evans, J.R., von Caemmerer, S. and Adams III W.W. (eds.) Ecology of Photosynthesis in Sun and Shade (pp.11-26). CSIRO, Melbourne.
- Appelgren, M. (1991) Effects of light quality on stem elongation of *Pelargonium in vitro*. *Sci.Hort.* 45:345-351.
- Araus, J.L. and Hogan, K.P. (1994) Comparative leaf structure and patterns of photoinhibition of the neotropical palms *Scheelea zonensis* and *Socratea durissima* growing in clearings and forest understory during the dry season in Panama. *Am.J.Bot.* 81:726-738.
- Araus, J.L., Alegre, L., Tapia, L. and Calafell, R. (1986a) Relationship between leaf structure and gas exchange in wheat leaves at different insertion levels *J.Exp.Bot.* 37:1323-1333.
- Araus, J.L., Alegre, L., Tapia, L., Calafell, R. and Serret, M.D. (1986b) Relationships between photosynthetic capacity and leaf structure in several shade plants. *Am.J.Bot.* 73:1760-1770.
- Araus, J.L., Brown, H.R., Febrero, A., Bort, J. and Serret, M.D. (1993) Ear photosynthesis, carbon isotope discrimination and the contribution of respiratory CO₂ to differences in grain mass in durum wheat. *Plant Cell Environ.* 16:383-392.
- Araus, J.L., Amaro, T., Voltas, J., Nakkoul, H. and Nachit, M.M. (1998) Chlorophyll fluorescence as a selection for grain yield in durum wheat under Mediterranean conditions. *Field Crops Res.* 55:209-223.

Ashton, P.M.S. and Berlyn, G.P. (1994) A comparison of leaf physiology and anatomy of *Quercus* (Section *Erythrobalanus*-Fagaceae) species in different light environments. *Am.J.Bot.* 81(5):589-597.

Augé, R. (1995) The physiological phenomena related to the realisation of cultures *in vitro*. In: *In vitro* culture and its applications in horticulture. Coordinated by Vidalie, H. Science Publishers, Inc. NH., USA.

Azcón-Bieto, J. (1983) Inhibition of photosynthesis by carbohydrates in wheat leaves. *Plant Physiol.* 73:681-686.

Babani, F., Lichtenthaler, H.K. (1996) Light-induced and age-dependent development of chloroplasts in etiolated barley leaves as visualized by determination of photosynthetic pigments, CO₂ assimilation rates and different kinds of chlorophyll fluorescence ratios. *J.Plant Physiol.* 148:555-556

Baker, N.R. and Horton, P. (1987) Chlorophyll fluorescence quenching during photoinhibition. In: Kyle D.J., Osmond, C.B. and Arntzen, C.J. (eds.) *Photoinhibition* (pp.145-168). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.

Beruto, M., Beruto, D. and Debergh, P. (1999) Influence of agar on *in vitro* cultures: I. Physicochemical properties of agar and agar gelled media. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 35:86-93.

Bidwell, R.G.S. and McLachlan (1983) Effects of coloured light on the growth and metabolism of *Fucus* embryos and apices in culture. *Can.J.Bot.* 61:1993-2003.

Björkman, O. (1981) Response to different quantum flux densities. pp. 57-107 in Lange, O.L. Nobel, P.S., Osmond C.B., Ziegler, H., (eds). *Physiological Plant Ecology I. Encyclopedia of Plant Physiology Vol. 12A.* Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.

Björkman, O. (1986) High-irradiance stress in higher plants and interaction with other stress factors. In: Biggins, J. (ed.) *Progress in Photosynthesis Research. Vol. 4* (pp.11-18) Martinus Nijhoff. Dordrecht.

Björkman, O. and Demming, B. (1987) Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170:489-504.

Blanke, M.M. and Belcher, A.R. (1989) Stomata of apple leaves cultured *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ*

Cult. 19:85-89.

Blazková, A., Ullman, J., Josefusova, Z. and Machackova, I. (1989) The influence of gaseous phase on growth of plants *in vitro* the effect of different types of stoppers. Acta Hortic. 251:209-214.

Boardman, N.K. (1977) Comparative photosynthesis of sun and shade plants. Ann.Rev. Plant.Physiol. 28:355-377.

Bockers, M., Capková, V., Tichá, I., and Schäfer, C. (1997) Growth at high CO₂ affects the chloroplast number but not the photosynthetic efficiency of photoautotrophic *Marchantia polymorpha* culture cells. Plant Cell Tiss.Org.Cult. 48:103-110.

Bolhár-Nordenkamp, H.R. and Öquist, G. (1993) Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: Photosynthesis and Production in a Changing Environment: a field and laboratory manual. Hall, D.O., Scurlock, J.M.O., Bolhár-Nordenkamp, H.R., Leegood, R.C., Long, S.P. (eds.) Chapman & Hall, London, pp. 193-206.

Bolhár-Nordenkamp, H.R., Long, S.P., Baker, N.R., Öquist, G., Schreibers, U. and Lechner, E.G. (1989) Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. Functional Ecology 3:497-514.

Bornman, C.H. (1974) Cytodifferentiation in tissue culture. In: Tissue Culture and Plant Science, Proc. 3d Intl.Cong. Plant Tissue and Cell Culture, Leicester. H.E.Street, ed. pp.43-70. Academic Press, London and New York.

Boxus, P. (1974) The production of strawberry plants by *in vitro* micropropagation. J.Hort.Sci. 49:209-210.

Boyer, J.S., Armand, P.A. and Sharp, R.E. (1987) Light stress and leaf water relations. In: Kyle, D.J., Osmond, C.B. and Arntzen, C.J. (eds.) Photoinhibition pp.111-122. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.

Brainerd, K.E. and Fuchigami, L.H. (1982) Stomatal functioning of *in vitro* and greenhouse apple leaves in darkness, mannitol, ABA and CO₂. J.Exp.Bot. 33:388-392.

- Bressan, P.H., Kim, Y.J., Hyndman, S.S., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A. (1982) Factors affecting *in vitro* propagation of rose. *J.Am.Soc.Hort.Sci.* 107:979-990.
- Bubenheim, D.L., Bugbee, B. and Salisbury, F.B. (1988) Radiation in the controlled environments: influence of lamp type and filter material. *J.Am.Soc.Hort.Sci.* 113:468-474.
- Bula, R.J., Morrow, R.C., Tibbits, T.W., Barta, B.J., Ignatius, R.W. and Martin, T.S. (1991) Light-emitting diode as a radiation source for plants. *HortScience* 26:203-205.
- Cachita, C.D. and Cracium, C. (1990) Ultrastructural studies on some ornamentals. In: *Handbook of Plant Cell Culture*. Vol. 5. Ammirato i alt. (eds.) McGraw-Hill, New York pp. 57-94.
- Capellades, M., Lemeur, R. and Debergh, P.C. (1990a) kinetics of chloropyll fluorecence in micropropagated roses shootlets. *Photosynthetica* 24:190-193.
- Capellades, M., Fontarnau, R., Carulla, C. and Debergh, P.C. (1990b) Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosa multiflora*. *J.Am.Soc.Hort.Sci.* 115:141-145.
- Capellades, M., Lemeur, R. and Debergh, P.C. (1991) Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured *in vitro*. *Plant Cell Tiss.Organ Cult.* 25:21-26.
- Cleland, R.E., Melis, A. and Neale, P.J. (1986) Mechanism of photoinhibition: photochemical reaction center inactivation in system II of chloroplasts. *Photosynthesis Res.* 9:79-88.
- Colón-Guasp, W., Nell, T.A., Kane, M.E. and Barret, J.E. (1996) Effects of abscisic acid on *ex vitro* acclimatization of *Aronia arbutifolia* (L.) Pers. *J.Am.Soc.Hort.Science* 121:101-104.
- Condon, A.G., Farquhar, G.D. and Richards, R.A. (1990) Genotypic variation in carbon isotope discrimination and transpiration efficiency in wheat. Leaf gas exchange and whole plant studies. *Aust.J.Plant Physiol.* 17:9-22.
- Condon, A.G., Richards, R.A. and Farquhar, G.D. (1992) The effect of variation in soil water availability, vapor pressure deficit and nitrogen nutrition on carbon isotope discrimination in wheat. *Aust.J.Agric.Res.* 43:935-947.

- Conover, C.A. and Poole, R.T. (1984) Acclimatization of indoor foliage plants. *Hortic.Rev.* 6:120-154.
- De Proft, M.P., Maene, L.J. and Debergh P.C. (1985) Carbon dioxide and ethylene evolution in the culture atmosphere of *Magnolia* cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.* 65:375-379.
- De Riek, J., Van Cleemput, O. and Debergh, P.C. (1991) Carbon metabolism of micropropagated *Rosa multiflora* L. *In vitro Cell.Dev.Biol.* 27P:57-63.
- Debergh, P.C. (1994) *In vitro* culture of ornamentals. A: Plant Cell and Tissue Culture. Indra K.Vasil and Trevor A.Thorpe (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Debergh, P.C. and Maene, L.J. (1977) Rapid clonal propagation of pathogen-free *pelargonium* plants starting from shoot tips and apical meristem. *Acta Hort.* 78:449-454.
- Debergh, P.C. and Maene, L.J. (1981) A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Sci.Hortic.* 14:335-345.
- Debergh, P.C. and Maene, L.J. (1984) Pathological and physiological problems related to the *in vitro* culture of plants. *Parasitica* 40:69-75.
- Debergh, P.C., De Meester, J., De Riek, J., Gillis, S. and van Huylenbroeck, J. (1992) Ecological and physiological aspects of tissue-cultured plants. *Acta Bot.Neerl.* 41:417-423.
- Deléens, E., Cliquet, J.B. and Prioul, J.L. (1994) Use of ¹³C and ¹⁵N plant label near natural abundance for monitoring carbon and nitrogen partitioning. *Aust.J.Plant Physiol.* 2:133-146.
- Demming, B. and Björkman, O (1987) Comparison of the effect of excessive light on chlorophyll fluorescence (77K) and photon yield of O₂ evolution in leaves of higher plants. *Planta* 171:171-184.
- Demming-Adams, B., Adams III W.W., Winter, K., Meyer, A., Schreiber, U., Pereira, J.S., Krüger, A. Czygan, F.C. and Lange, O.L. (1989) Photochemical efficiency of photosystem II, photon yield of O₂ evolution, photosynthetic capacity, and carotenoid composition during the midday depression of net CO₂ uptake in *Arbutus unedo* growing in Portugal. *Planta* 177:377-387.

- Desjardins, Y. (1995) Overview of factors influencing photosynthesis of micropropagated plantlets and their effect on acclimatization. In: Carre, F. and Chagvardieff, P. (eds.) Ecophysiology and Photosynthetic *in vitro* Cultures. (pp.145-160). CEA, Cadarache.
- Desjardins, Y., Gosselin, A. and Lamarre, M. (1987) Utilisation de l'enrichissement carbone et de l'eclairage d'appoint lors de l'acclimatation *ex vitro* de fraisiers, de framboisiers et d'asperges. Symp. Plant micropropagation in horticultural industries. Arlon, Belgium pp. 176-184.
- Desjardins, Y., Laforge, F., Lussier, C. and Gosselin, A. (1988) Effect of CO₂ enrichment and high photosynthetic photon flux on the development of autotrophy and growth of tissue-cultured strawberry, raspberry and asparagus plants. Acta Hort. 230:45-53.
- Dimassi-Theriou, K. and Bosabalidis, A.M. (1997) Effects of light, magnesium and sucrose on leaf anatomy, photosynthesis, starch and total sugar accumulation, in kiwifruit cultured *in vitro*. Plant Cell Tiss.Org.Cult. 47:127-134.
- D'Onofrio, C., Morini, S. and Bellocchi, G. (1998) Effect of light quality on somatic embryogenesis of quince leaves. Plant Cell Tiss.Org.Cult. 53:91-98.
- Drew, A.P., Kavanagh, K.L. and Maynard, C.A. (1992) Acclimatizing micropropagated black cherry by comparison with half-sib seedlings. Physiol.Plant. 86:459-464.
- Dubé, S.L. and Vidaver, W. (1992) Photosynthetic competence of plantlets grown *in vitro*. An automated system for measurement of photosynthesis *in vitro*. Physiol.Plant. 84:409-416.
- Economou, A.S. and Read, P.A. (1986) Influence of light duration and irradiance on micropropagation of a hardy deciduous azalea. J.Am.Soc.Hort.Sci. 111:146-149.
- Economou, A.S. and Read, P.A. (1987) Light treatments to improve efficiency of *in vitro* propagation systems. HortScience 22:751-754.
- Endress, R. (1994) Plant Cell Biotechnology. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-Neww York. 353 pp.
- Faria, T., Wilkins, D., Besford, R.T., Vaz, M., Pereira, J.S. and Chaves, M.M. (1996) Growth at elevated

CO₂ leads to down-regulation of photosynthesis and altered response to high temperature in *Quercus suber* L. seedlings. *J.Exp.Bot.* 47(304):1755-1761.

Farquhar, G.D. and Richards, R.A. (1984) Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Aust.J.Plant Physiol.* 11:539-552.

Farquhar, G.D., O'Leary, M.H. and Berry, J.A. (1982) On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Aust.J.Plant Physiol.* 9:121-137.

Farquhar, G.D., Ehleringer, J.R., and Hubick, K.T. (1989) Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annu.Rev.Plant Physiol. Mol.Biol.* 40:503-537.

Febrero, A. and Araus, J.L. (1994) Epicuticular wax load, yield, carbon isotope discrimination, canopy reflectance and epidermal conductance of near-isogenic barley lines differing in glaucousness. *Scanning Microscopy* 8:735-748.

Figueira, A. and Janick, J. (1994) Optimizing carbon dioxide and light levels during *in vitro* culture of *Theobroma cacao*. *J.Am.Soc.Hort.Sci.* 119:865-871.

Figueira, A., Whipkey, A. and Janick, J. (1991) Increased CO₂ and light promote *in vitro* shoot growth and development of *Theobroma cacao*. *J.Am.Soc.Hort.Sci.* 116:585-589.

Forney, C.F. and Brandl, D.G. (1992) Control of humidity in small controlled-environmental chambers using glicerol-water solutions. *HortTechnology* 2:52-54.

Fuchigami, L.H., Cheng, T.Y., and Soeldner, A. (1981) Abaxial transpiration and water loss in aseptically cultured plum. *J.Am.Soc.Hort.Sci.* 106:519-522.

Fujiwara, K. and Kozai, T. (1995) Control of environmental factors for plantlet production -with some mathematical simulation. In: F.Carre and P. Chagvardieff (eds.) *Ecophysiology and Photosynthetic in vitro cultures*. pp. 109-120. CEA, Cadarache.

Fujiwara, K., Kozai, T., and Watanabe, I. (1987) Fundamental studies on environments in plant tissue

culture vessels. (3) Measurements on carbon dioxide gas concentration in closed vessels containing tissue cultured plantlets and estimates of net photosynthetic rates of the plantlets. *J.Agr.Meteorol.* 43:21-30.

Fujiwara, K., Kozai, T. and Watanabe, I. (1988) Development of a photoautotrophic tissue culture system for shoots and/or plantlets at rooting and acclimatization stages. *Acta Hort.* 230:153-158.

Fujiwara, K., Kozai, T., Nakajyo, Y. and Watanabe, I. (1989) Effects of closures and vessels on light intensities in plant tissue culture vessels. *J.Agr.Meteorol.* 45:143-149.

Fujiwara, K., Kira, S. and Kozai, T. (1992) Time course of CO₂ exchange of potato cultures *in vitro* with different sucrose concentrations in the culture medium. *J.Agr.Met.* 48:49-56.

Fujiwara, K., Aitken-Christie, J. and Kozai, T. (1993) Water potential of radiata pine shoots cultured *in vitro* under different relative humidities. *Plant Tissue Cult. Lett.* 10(2):144-150.

Galzy, R. and Compan, D. (1992) Remarks on mixotrophic and autotrophic carbon nutrition of *Vitis* plantlets cultured *in vitro*. *Plant Cell Tiss.Org.Cul.* 31:239-244.

Gautheret, R.J. (1966) Factors affecting differentiation of plant tissues grown *in vitro*. In: *Cell Differentiation and Morphogenesis*. Beermann, ed. pp. 57-71, North Holland Publishing.

Gautheret, R.J. (1985) In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Vasil, ed. Vol. 2. pp. 1-59. Academic Press, London.

Genoud-Gourichon, C., Sallanon, H. and Coudret, A. (1996) Effects of sucrose, agar, irradiance and CO₂ concentration during the rooting phase on the acclimation of *Rosa hybrida* plantlets to *ex vitro* conditions. *Photosynthetica* 32(2):263-270.

Genoud, C., Coudret, A., Amalric, C. and Sallanon, H. (1999) Effects of micropropagation conditions of rose shootlets on chlorophyll fluorescence. *Photosynthetica* 36(1-2):243-251.

Genty, B., Briantais, J.M. and Baker, N.R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenchers of chlorophyll fluorescence. *Biochem.biophys.Acta* 990:87-92.

- George, E.F. and Sherington, P.D. (1984) Plant propagation by tissue culture: Handbook and directory of Commercial Laboratories. Exegetics Ltd., Eversley, United Kingdom. 709 pp.
- Georgieva, K. and Yordanov, I. (1994) Temperature dependence of photochemical and non-photochemical fluorescence quenching in intact pea leaves. *J.Plant Physiol.* 144:754-759.
- Georgieva, K. and Lichtenthaler, H.K. (1999) Photosynthetic activity and acclimation ability of pea plants to low and high temperature treatment as studied by means of chlorophyll fluorescence. *J.Plant Physiol.* 155: 416-423.
- Grout, B.W.W. (1975) Wax development on leaf surfaces of *Brassica oleracea* var. botrytis cv. Currawong regenerated from meristem culture. *Plant Science Letters.* 5:401-405.
- Grout, B.W.W. and Aston, M.J. (1977) Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. *Hort.Res.* 17:1-7.
- Grout, B.W.W. and Aston, M.J. (1978a) Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. II. Carbon dioxide fixation and the development of photosynthetic ability. *Hort.Res.* 17:65-71.
- Grout, B.W.W. and Aston, M.J. (1978b) Modified leaf anatomy of cauliflower plantlets regenerated from meristem culture. *Ann.Bot.* 42:993-995.
- Guy, R.D., Reid, D.M. and Krause, H.R. (1980) Shifts in carbon isotope ratio ratios of two C₃ halophytes under natural and artificial conditions. *Oecologia* 44:241-247.
- Hartung, W. and Abou-Mandour, A.A. (1996) A beneficial role of abscisic acid for regenerates of *Ruta graveolens* ssp. *Divaricata* (Tenore) gams suffering from transplant shock. *Angewandte Botanik* 70:221-223.
- Hayashi, M., Kano, A. i Goto, E. (eds.) (1992a) *Acta Horticulture* 319 (Proceedings of the International ISHS Symposium on Transplant Production Systems, Yokohama, Japan) Wageningen, 694 pp.
- Hayashi, M., Fujita, N., Kitaya, Y. and Kozai, T. (1992b) Effect of sideward lighting on the growth of

potato plantlets *in vitro*. Acta Hort. 319:163-166.

Hazel, Y., Wetzstein, H.Y. and Sommer, H.E. (1983) Scanning electron microscopy of *in vitro* cultured *Liquidambar styraciflua* plantlets during acclimatization. J.Am.Soc.Hortic.Sci. 108:475-480.

Hdider, C. and Desjardins, Y. (1994) Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* culture strawberry plantlets. Plant Cell Tis.Org.Cul. 36:27-33.

Hintze, J. (1991) NCSS 5.X series 8087, version 5.03. Utah.

Hubick, K.T. and Farquhar, G.D. (1989) Carbon isotope discrimination and the ratio of carbon gains to water lost in barley cultivars. Plant Cell and Environ. 12:795-804.

Hughes, K.W. (1981) *In vitro* ecology: exogenous factors affecting growth and morphogenesis in plant culture systems. Environ.Expt.Bot. 21:281-288.

Hunter, S.A., Foxe, M.J. and Hennerty, M.J. (1983) The influence of temperature and light intensity on the *in vitro* propagation of the strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) cv. Cambridge Favourite. Acta Hort. 131:153-161.

Hussey, G. (1978) The application of tissue culture to the vegetative propagation of plants. Sci.Prog. 65:185-208.

Infante, R., Magnanini, E., and Righetti, B. (1989) The role of light and CO₂ in optimizing the conditions for shoot proliferation of *Actinida deliciosa in vitro*. Physiol. Plant. 77:191-195.

Jackson, M.B., Abbott, A.J., Belcher, A.R., and Hall, K.C. (1987) Gas exchange in plant tissue cultures. Monograph British Plant Growth Regulator Group. 16:57-71

Jackson, M.B., Abbott, A.J., Belcher, A.R., Hall, K.C., Butler, R. and Cameron, J. (1991) Ventilation in plant tissue cultures and effects of poor aeration on ethylene and carbon dioxide accumulation oxygen depletion and explant development. Ann. Bot. 67:229-237.

Jackson, M.B., Belcher, A.R. and Brain, P. (1994) Measuring shortcomings in tissue culture aeration and

their consequences for explant development. In: Lumsden, P.J., Nicholas, J.R. and Davies, W.J. (eds.) *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture* (pp. 191-203). Kluwer Academic Publ., Dordrecht, Netherland.

Jeong, B.R., Fujiwara, K. and Kozai, T. (1993) Carbon dioxide enrichment in autotrophic micropropagation: methods and advantages. *HortTechnology* 3:332-334.

Jeong, B.R., Fujiwara, K. and Kozai, T. (1995) Environmental Control and Photoautotrophic Micropropagation. J.Janick ed. *Horticultural Reviews*. 17:125-172. John Wiley & Sons, Inc.

Jorba, J. (1994) Canvis fisiològics i estructurals en l'hibrid presseguer x ametller (*Prunus persica* x *Prunus dulcis*) durant la fase d'aclimatació en plantes procedents de cultius *in vitro*. Tesi de doctorat del Departament de Biologia Vegetal. Universitat de Barcelona. 247 pp.

Junhong, M.A. (1990) Anatomical studies on plantlets of tissue-cultured apple. In: XXIII International Horticultural Congress, Firenze, pp. 3013.

Kamaluddin, M. and Grace, J. (1992) Photoinhibition and light acclimation in seedlings of *Bischofia javanica*, a tropical forest tree from Asia. *Ann.Bot.* 69:47-52.

Kautsky, H. and Hirsch, A. (1931) Neue versuche zur Kohlensäureassimilation. *Naturwissenschaften*, 19:964.

Kautsky, H. and Hirsch, A. (1934) Chlorophyllfluoreszenz und Kohlensäureassimilation. I. Mitteilung: Das Fluoreszenzverhalten grüner Pflanzen. *Biochem.* 247:423-434.

Kimmerer, T.W. and Kozłowski, T.T. (1982) Ethylene, ethane, acetaldehyde and ethanol production by plants under stress. *Plant Physiol.* 69:840-847.

Kinoshita, T., Kozai, T. and Fujiwara, K. (1988) Time course of osmotic potential of the MS liquid medium at the multiplication stage in strawberry shoots. In: Abstr. Japan Soc. Hort. Sci. Spring Meeting, Tokyo pp. 234-235.

Kirdmanee, C., Kitaya, Y. and Kozai, T. (1995) Effects of CO₂ enrichment and supporting material *in*

in vitro on photoautotrophic growth of Eucaliptus plantlets *in vitro* and *ex vitro*: anatomical comparisons. Acta Horticulturae, 393:680-687.

Klein, P.D., Boutton, T.W., Hachey, D.L., Irving, C.S. and Wong, W.W. (1986) The use of stable isotopes in metabolism studies. J.Anim.Sci. 63(Suppl.2):102-110.

Kozai, T. (1990) Environmental control and automation in micropropagation. Proc. 4th. Toyota Conf. Automation Biotechnol. Aichi-Ken, Japan, p.201-227.

Kozai, T. (1991a) Controlled environments in conventional and automated micropropagation p.213-230. In: I.Vasil (ed.) Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol. 8. Academic Press, New York.

Kozai, T. (1991b) Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: Debergh, P.C. and Zimmerman R.H. (eds.) Micropropagation: Technology and Application pp. 447-469. Kluwer Academic Publ., Dordrecht.

Kozai, T. (1991c) Photoautotrophic micropropagation. In Vitro Cell.Dev.Biol. 27P:47-51.

Kozai, T. and Iwanami, Y. (1988) Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plantlet growth of carnation (*Dianthus caryophyllus* L) in tissue culture during the preparation stage. J.Jap.Soc.Hort.Sci. 57:279-288.

Kozai, T. and Smith, M.A.L. (1995) Environmental control in plant tissue culture - general introduction and overview. pp. 301-318. In: Automation and environmental control in plant tissue culture. Aitken-Christie, J., Kozai, T. and Smith, M.A.L. (eds.) Kluwer Academic Publishers, Dordrech. 574 pp.

Kozai, T., Iwanami, Y. and Fujiwara, K. (1987) Effects of CO₂ enrichment on the plantlet growth during the multiplication stage. Plant Tissue Cult. Lett. 4:22-26.

Kozai, T., Koyama, Y. and Watanabe, I. (1988) Multiplication and rooting of potato plantlets *in vitro* with sugar-free medium under high photosynthetic photon flux. Acta Hort. 230:121-127.

Kozai, T., Oki, H. and Fujiwara, K. (1990a) Photosynthetic characteristics of *Cymbidium* plantlet *in vitro*. Plant Cell Tiss.Org.Cul. 22:205-211.

Kozai, T., Takazawa, A., Watanabe, I. and Sugi, J. (1990b) Growth of tobacco seedlings and plantlets *in vitro* as affected by *in vitro* environment. *Environ.Control Biol.* 28:31-40.

Kozai, T., Iwabuchi, K., Watanabe, K. and Watanabe, I. (1991a) Photoautotrophic and photomixotrophic growth of strawberry plantlets *in vitro* and changes in nutrient composition of the medium. *Plant Cell Tiss.Org.Cult.* 25:107-116.

Kozai, T., Ohde, N. and Kubota, C. (1991b) Similarity of growth patterns between plantlets and seedlings of *Brassica campestris* L. under different *in vitro* environmental conditions. *Plant Cell Tiss.Org.Cult.* 24:181-186.

Kozai, T., Kushihashi, S., Kubota, C. and Fujiwara, K. (1992a) Effect of the difference between photoperiod and dark period temperatures, and photosynthetic photon flux density on the shoot length and growth of potato plantlets *in vitro*. *J.Jpn.Soc.Hort.Sci.* 61:93-98.

Kozai, T., Fujiwara, J., Hayashi, M. and Aitken-Christie, J. (1992b) The *in vitro* environment and its control in micropropagation, A: Kurata, K. and Kozai, T.(eds). *Transplant production systems*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

Kozai, T., Tanaka, K., Jeong, B.R. and Fujiwara, K. (1993) Effect of relative humidity in the culture vessel on the growth and shoot elongation of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlets *in vitro*. *J.Jpn.Soc.Hort.Sci.* 62:413-417.

Kozai, T., Kubota, C. and Jeong, B.R. (1997) Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell Tiss.Org.Cult.* 51:49-56.

Krause, G.H. (1988) Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. *Physiol.Plant.* 74:566-574.

Kubota, C. and Kozai, T. (1992) Growth and net photosynthetic rate of *Solanum tuberosum in vitro* under forced and natural ventilation. *HortScience* 27:1312-1314.

Lakso, A.N., Reisch, B.I., Mortensen, J. and Roberts, M.H. (1986) Carbon dioxide enrichment for stimulation of growth of *in vitro* propagated grapevines after transfer from culture. *J.Am.Soc.Hortic.Sci.*

111(4):634-638.

Langford, P.J. and Wainwright, H. (1988) Influence of sucrose concentration on the photosynthetic ability of *in vitro* grown rose shoots. *Acta Hort.* 227:305-310.

Lawlor, D. (1993) *Photosynthesis: Molecular, Physiological and Environmental Processes*. Second edition. Longman Group UK Limited, Harlow.

Lee, N., and De Fossard, R.A. (1975) Regeneration of strawberry plants from tissue cultures. *Comb.Proc.Int. Plant Prop.Soc.* 25:277-285.

Lee, N., Wetzstein, H.Y. and Sommer, H. (1985) Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. *Plant Physiol.* 78:637-641.

Lentini, Z., Mussell, H. and Earle, E. (1987) Ethylene effects on *in vitro* development of *Brassica campestris*. *Plant Physiol.* 83(S): 154 (abstr.).

Lichtenthaler, H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148:350-382.

Lichtenthaler, H.K. and Rinderle, U. (1988) The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *CRC crit.Rev.anal.Chem.* 19 Suppl. 1:29-85.

Louro, R.P., Dos Santos, A.V., Machado, R.D. (1999) Ultrastructure of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus Urophylla*. I. Shoots cultivated *in vitro* in multiplication and elongation-rooting media. *Int.J.Plant Sci.* 160(2):217-227.

Ludlow, M.M. (1987) Light stress at high temperature. In: Kyle, D.J., Osmond, C.B. and Arntzen C.J. (eds.) *Photoinhibition* pp.89-110. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam.

Ludlow, M.M. and Björkman, O. (1984) Paraheliotropic leaf movement in *Siratro* as a protective mechanism against drought-induced damage to primary photosynthetic reactions: damage by excessive light and heat. *Planta* 161:505-518.

Lumsden, P.J., Nicholas, J.R. and Davies, W.J. (eds.) (1994) Physiology, growth and development of plants in culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 427 pp.

Mansfield, T.A. (1994) Some aspects of stomatal physiology relevant to plants cultured *in vitro*. In: Lumsden, P.J., Nicholas, J.R. and Davies, W.J. (eds.) Physiology, growth and development of plants in culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 120-131.

McHale, N.A., Zelitch, I. and Peterson, R.B. (1987) Effect of CO₂ and O₂ on photosynthesis and growth of autotrophic tobacco callus. *Plant Physiol.* 84:1055-1058.

McKinney, C.R., McCrea, J.M., Epstein, S., Allen, H.A. and Urey, H.C. (1950) Improvement in mass spectrometers for the measurement of small differences in isotope abundance ratios. *Rev.Sci.Instrum.* 21:724-730.

Melé, E., Messeguer, J. and Camprubí, P. (1982) Effect of ethylene on carnation explants grown in sealed vessels. *Proc.5th Intl.Cong. Plant Tissue & Cell Culture.* pp.69-70.

Mitra, A., Dey, S. and Sawarkar, S.K. (1998) Photoautotrophic *in vitro* multiplication of the orchid *Dendrobium* under CO₂ enrichment. *Biol. Plant.* 41:145-148.

Mizukami, H. (1989) *Gardenia jasminoides* Ellis: *In vitro* propagation and the formation of iridoid glucosides. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.7 Medicinal and Aromatic Plants II*, pp.213-226 (Y.P.S.Bajaj, ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg

Morgan, J.A., LeCain, D.R., McCaig, T.N., Quick, J.N. (1993) Gas exchange, carbon isotope discrimination, and productivity in winter wheat. *Crop Science* 33:178-186.

Morini, S., Fortuna, P., Sciutti, R. and Muleo, R. (1990) Effect of different light-dark cycles on growth of fruit tree shoots cultured *in vitro*. *Adv.Hort.Sci.* 4:163-166.

Morini, S., Trinci, M. and Zacchini, M. (1991) Effect of different photoperiods on *in vitro* growth of Mr.S.2/5 plum rootstock. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 25:141-145.

Murashige, T. (1974) Plant propagation through tissue cultures. *Annu.Rev.Plant Physiol.* 25:135-166.

- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol.Plant.* 15:473-497.
- Murashige, T. and Jones, J.B. (1974) Cell and organ culture methods in virus disease therapy. *Acta Hort.* 36:206-221.
- Murphy, K.P., Santamaria, J.M., Davies, W.J. and Lumsden, P.J. (1998) Ventilation of culture vessels. I. Increased growth *in vitro* and survival *ex vitro* of *Delphinium*. *J.Hort.Sci. & Biotech* 73:725-729.
- Neumann, K.H. and Bender, L. (1987) Photosynthesis in cell and tissue culture systems. Pages 151-168 in Green, C.E., (ed.) *Plant Tissue and Cell Culture*. Alan R. Liss Inc. New York.
- Nguyen, Q.T. and Kozai, T. (1998) Environmental effects on the growth of plantlets in micropropagation. *Environ. Control in Biol.* 36:59-75.
- Nguyen, Q.T., Kozai, T., Niu, G. and Nguyen, U.V. (1999) Photosynthetic characteristics of coffee (*Coffea arabusta*) plantlets *in vitro* in response to different CO₂ concentrations and light intensities. *Plant Cell Tiss.Org.Cult.* 55:133-139.
- Noé, N. and Bonini, L. (1996) Leaf anatomy of highbush blueberry grown *in vitro* and during acclimatization to *ex vitro* conditions. *Biol.Plant.* 38:19-25.
- Novello, V. and Roberts, A.V. (1992) Effects of paclobutrazol and reduced humidity on stomatal conductance of micropropagated grapevines. *Acta Hort.* 319:65-70.
- Ögren, E. and Öquist, G. (1985) Effects of drought on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and photoinhibition susceptibility in intact willow leaves. *Planta* 166:380-388.
- O'Leary, M.H. (1981) Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry* 20:553-567.
- O'Leary, M.H. (1988) Carbon isotopes in photosynthesis. *BioScience* 38:328-336.
- Öquist, G. and Wass, R. (1988) A portable, microprocessor-operated instrument for measuring chlorophyll fluorescence kinetics in stress physiology. *Physiol.Plant.* 73:211-217.

Osmond, C.B., Gui-Ying, B., Lin-Ke, H. and Sharkey, T.D. (1987) Determining the role of light and stress effects on photosynthesis. In: Current topics in Plant Biochemistry and Physiology, Vol. 6 (pp.134-146). Interdisciplinary Plant Group, University of Missouri-Columbia, Columbia.

Pearcy, R.W. and Sims, D.A. (1994) Photosynthetic acclimation to changing light environments: scaling from the leaf to the whole plant. In: Caldwell, M.M. and Pearcy, R.W. (eds.) Exploitation of Environmental Heterogeneity by Plants. Ecophysiological Processes Above- and Belowground (pp. 145-174). Academic Press, Inc., San Diego.

Peterson, R.B. (1990) Effects of water vapor deficit on photochemical and fluorescence yields in tobacco leaf tissue. *Plant Physiol.* 92:608-614.

Pospíšilová, J., Wilhelmová, N., Synková, H., Catsky, J., Krebs, D., Tichá, I., Hanacková, B. and Snopek, J. (1998) Acclimation of tobacco plantlets to *ex vitro* conditions as affected by application of abscisic acid. *J.Exp.Bot.* 49(322):863-869.

Pospíšilová, J., Synková, H., Haisel, D., Catsky, J., Wilhelmová, N. and Sránek, F. (1999) Effect of elevated CO₂ concentration on acclimation of tobacco plantlets to *ex vitro* conditions. *J.Exp.Bot.* 50(330):119-126.

Powles, S.B. (1984) Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annu.Rev.Plant Physiol.* 35:15-44.

Read, P.E. (1990) Environmental effects in micropropagation. pp. 95-125. A: Ammirato, P.V., Evans, D.A., Sharp, W.R. and Bajaj, Y.P.S.(eds.) Handbook of plant cell culture. Vol.5 McGraw-Hill Pub., New York, N.Y., U.S.A.

Reinert, J., Bajaj, Y.P.S., Zbell, B. (1977) Aspects of organization, organogenesis and embryogenesis, cytodifferentiation. In: Handbook of Plant Tissue and Cell Culture. H.E.Street, ed., 2d. ed., pp.389-427.

Reuther, G. (1991) Stimulation of the photoautotrophy of *in vitro* plants. *Acta Hort.* 300:59-75.

Righetti, B. (1990) Air pollutants from hydrocarbons and derivatives in micropropagation laboratories: toxicity symptoms on tissue culture of the cherry rootstock Colt (*Prunus avium* x *P. pseudocerasus*). *Plant*

Cell Report 9:374-377.

Righetti, B. (1996) Chlorophyll, ethylene and biomass determination in *Prunus avium* cv. Victoria cultivated *in vitro* under different atmospheric conditions. J.Hort.Sci. 71:249-255.

Righetti, B., Magnanini, E. and Maccaferri, M. (1988) Ethylene and other volatile substances produced by *in vitro* cultured *Prunus avium*. Acta Hort. 227:402-404.

Righetti, B., Magnanini, E., Infante, R. and Predieri, S. (1990) Ethylene, ethanol, acetaldehyde and carbon dioxide released by *Prunus avium* shoot cultures. Physiol.Plant.78:507-510.

Righetti, B., Magnanini, E. and Rossi, F. (1993) Photosynthetic carbon dioxide uptake and oxygen accumulation during *in vitro* culture of *Actinida deliciosa* cv Tomuri. Environ.Exp.Bot. 33:523-528.

Rintamaki, E., Salo, R., Aro, E.M. (1994) Rapid turnover of the D1 reaction-centre protein of Photosystem II as a protection mechanism against photoinhibition in a moss, *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. Planta 193:520-529.

Rival, A., Beulé, T., Lavergne, D., Nato, A., Havaux, M. and Puard, M. (1997) Development of photosynthetic characteristics in oil palm during *in vitro* micropropagation. J.Plant Physiol. 150:520-527.

Roberts, A.V., Walker, S., Horan, I., Smith, E.F. and Mottley, J. (1992) The effects of growth retardants, humidity and lighting at stage III on stage IV of micropropagation in chrysanthemum and rose. Acta Hort. 319:153-158.

Roberts, A.V., Smith, E.F., Horan, I., Walker, S., Matthews, D. and Mottley, J. (1994) Stage III techniques for improving water relations and autotrophy in micropropagated plants. A: Plant Cell and Tissue Culture .Indra K.Vasil and Trevor A.Thorpe (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

Romero-Aranda, R., Cantó-Garay, R. and Martínez, P.F. (1994) Distribution and density of stomata in two cultivars of *Gerbera jasmesonii* and its relation to leaf conductance. Sci.Hort. 58:167-173.

Rundel, P.W., Ehleringer, J.R. and Nagy, K.A. (eds.) (1989) Stable isotopes in Ecological Research. Springer Verlag, New York.

- Sallanon, H. and Coudret, A. (1990) Water fluxes between *in vitro* plants and atmosphere in micropropagation. C.R.Acad.Sci., Paris. 310(III):607-613.
- Sallanon, H., Dimon, B., Carrier, P. and Chagvardieff, P. (1995) Effects of CO₂ concentration and irradiance on growth and photosynthesis of *Juglans regia* plantlets grown *in vitro*. Photosynthetica 31(2):241-249.
- Sallanon, H., Isaka, H., Dimon, B., Ravel, C. and Chagvardieff, P. (1997) CO₂ exchanges and nutrient uptake during multiplication and rooting of micropropagated *Juglans regia* plantlets. Plant Science 124:107-116.
- Santamaria, J.M., Davies, W.J. and Atkinson, C.J. (1993) Stomata of micropropagated *Delphinium* plants respond to ABA, CO₂, light and water potential, but fail to close fully. J.Exp.Bot. 44(258):99-107.
- Schloupf, R.M., Barringer, S.A. and Splittstoesser, W.E. (1995) A review of hyperhydricity (vitrification) in tissue culture. Plant Growth Regul.Soc. of Amer.Quarterly. 23 (3):149-158.
- Schreiber, U., Bilger, W. (1993) Progress in chlorophyll fluorescence research: Major developments during the past years in retrospect. Prog.Bot. 54:150-175
- Seko, Y. and Nishimura, M. (1996) Effect of CO₂ and light on survival and growth of rice regenerants grown *in vitro* on sugar-free medium. Plant Cell Tiss.Org.Cult. 46:257-264.
- Serret, M.D., Trillas, M.I. and Araus, J.L. (1995) The effect of sucrose and light levels on stable carbon isotope composition and photosynthetic pigments of *Gardenia* leaflets *in vitro*. In: Carre, F. and Chagvardieff, P. (eds.) Ecophysiology and Photosynthetic *in vitro* Cultures (pp.169-172). CEA, Cadarache.
- Serret, M.D., Trillas, M.I., Matas, J. and Araus, J. (1996) Development of photoautotrophy and photoinhibition of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation. Plant Cell Tiss.Org.Cult. 45:1-16.
- Serret, M.D., Trillas, M., Matas, J. and Araus, J.L. (1997) The effect of different closure types, light, and sucrose concentrations on carbon isotope composition and growth of *Gardenia jasminoides* plantlets

during micropropagation and subsequent acclimation *ex vitro* Plant Cell Tiss.Org.Cult. 47:217-230.

Sesták, Z. (1985) Photosynthesis during leaf development. Task for vegetation science 11. Dr. W.Junk Publishers, Dordrecht.

Shimada, N., Tanaka, F. and Kozai, T. (1988) Effects of low O₂ concentration on net photosynthesis of C₃ plantlets *in vitro*. Acta Hort. 230:171-175.

Singha, S. (1982) Influence of agar concentration on *in vitro* shoot proliferation of *Malus* sp. "Almey" and *Pyrus communis* "Seckel". J.Am.Soc.Hort.Sci. 107:657-660.

Skirvin, R.M., Chu, M.C., Mann, M.L., Young, H., Sullivan, J. and Fermanian, T. (1986) Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time, and cultured plant material. Plant Cell Rep. 5:292-294.

Smith, M.A. and McClelland, M.T. (1991) Gauging the influence of *in vitro* conditions on *in vivo* quality and performance of woody plants. In vitro Cell and Develop.Biol. 27P:52-56.

Smith, E.F., Roberts, A.V. and Mottley, J. (1990) The preparation *in vitro* of chrysanthemum for transplantation to soil. 2. Improved resistance to desiccation conferred by reduced humidity. Plant Cell Tissue Organ Cult. 21:141-145.

Smith, E.F., Gribaudo, I., Roberts, A.V. and Mottley, J. (1992) Paclobutazol and reduced humidity improve resistance to wilting of micropropagated grapevine. HortScience 27:111-113.

Solárová, J. (1989) Photosynthesis of plant regenerants. Diurnal variation in CO₂ concentration in cultivation vessels resulting from plantlets photosynthetic activity. Photosynthetica 23:100-107.

Solárová, J. and Pospíšilová, J. (1997) Effect of carbon dioxide enrichment during *in vitro* cultivation and acclimation to *ex vitro* conditions. Biol.Plant. 39:23-30.

Solárová, J., Pospíšilová, J., Catsky, J. and Santrucek, J. (1989) Photosynthesis and growth of tobacco plantlets in dependence on carbon supply. Photosynthetica 23:629-637.

- Solárová, J., Souckova, D., Ullmann, J. and Pospíšilová, J. (1996) *In vitro* culture: environmental conditions and plantlet growth as affected by vessel and stopper types. Hort.Sci. 23(2):51-58.
- Spurr, A.R. (1969) A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J.Ultras.Res. 26:31-43.
- Stern, K. (1921) Über die Fluoreszenz des Chlorophylls und ihre Bedeutung beim Assimilationsproce . Z.Bot. 13:193-232.
- Stuiver, M. (1982) The history of the recorded atmosphere as recorded by carbon isotopes. pp.159-179. In: Atmospheric chemistry. Goldberg, E.D.(ed.). Springer-Verlag, New York.
- Sutter, E., and Langhans, R.W. (1979) Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. J.Am.Soc.Hort.Sci. 104:493-496.
- Sutter, E. (1983) Chemical composition of epicuticular wax in cabbage plant grown *in vitro*. Can.J.Bot. 62:74-77.
- Synková, H. (1997) Sucrose affects the photosynthetic apparatus and the acclimation of transgenic tobacco to *ex vitro* culture. Photosynthetica 33(3-4):403-412.
- Tanaka, K., Fujiwara, K. and Kozai, T. (1992) Effects of relative humidity in the culture vessel on the transpiration and net photosynthetic rates of potato plantlets *in vitro*. Acta Hort. 319:59-64.
- Thorpe, T.A. and Patel, K.R. (1984) Clonal propagation: adventitious buds. In: Vasil, I.K. (ed.) Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Laboratory Procedures and Their Applications, Vol.1 (pp.49-60). Academic Press, Inc., Orlando.
- Tichá, I. (1996) Optimization of photoautotrophic tobacco *in vitro* culture: effect of suncaps closures on plantlet growth. Photosynthetica 32(3):475-479.
- Tichá, I., Cáp, F., Pacovská, D., Hofman, P., Haisel, D., Capková, V. and Schäfer, C. (1998) Culture on sugar medium enhances photosynthetic capacity and high light resistance of plants grown *in vitro*.

Physiol.Plant. 102:155-162.

Trillas, M.I., Serret, M.D., Jorba, J. and Araus, J.L. (1995) Leaf chlorophyll fluorescence changes during acclimatization of the rootstock GF677(Peach x Almond) and propagation of *Gardenia jasminoides*. In: Carre, E.F. and Chagvardieff P. (eds.) Ecophysiology and Photosynthetic *in vitro* Cultures. (pp. 161-166). CEA, Cadarache.

Urban, L. and Jaffrin, A. (1990) Steady state thermal conditions inside plant tissue culture vessels submitted to a constant level of irradiation. Biotronics 19:71-81.

Vanderschaeghe, A. and Debergh, P.C. (1987) Technological aspects of the control of the relative humidity in tissue culture containers. p.68-76. In: G.Ducate, M.Jacobs and A.Simeon (eds.). Symposium florizel: plant micropropagation in horticultural industries, Arnon, Belgium.

Van Huylenbroeck, J.M. and Debergh, P.C. (1996) Impact of sugar concentration *in vitro* on photosynthesis and carbon metabolism during *ex vitro* acclimatization of *Spathiphyllum* plantlets. Physiol.Plant. 96:298-304.

Vasil, I.K. and Thorpe T.A. (1994) Preface. A: Plant Cell and Tissue Culture. Indra K.Vasil and Trevor A.Thorpe (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. 593 pp.

Vieitez i alt. (1987) Propagación de plantas leñosas por cultivo *in vitro*. Excma. Diputación de Pontevedra.

Vilaplana-Marshall, M. and Mullins, M.G. (1986) Establishment of grapevine plantlets. Dept.Agron.Hort.Univ.Syd.Res.Rep. 14:28-29.

Vorácková, Z., Lipavská, H. and Konečný, P. (1998) The efficiency of transfer of plants cultivated *in vitro* to *ex vitro* conditions as affected by sugar supply. Biol.Plant. 41:507-513.

Waithaka, K., Hildebrandt, A.C., and Dana, M.N. (1980) Hormonal control of strawberry axillary bud development *in vitro*. J.Am.Soc.Hort.Sci. 105:428-430.

Wardle, K. and Short, K.C. (1983) Stomatal response of *in vitro* plantlets. Responses in epidermal strips of *Chrysanthemum* to environmental factors and growth regulators. Biochemie und Physiologie der Pflanzen.

178:619-624.

Wardle, K., Dobbs, E.B. and Short, K.C. (1983) *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. *J.Am.Soc.Hort.Sci.* 108:386-389.

Watanabe, K., Jeong, B.R., Kitaya, Y. and Kozai, T. (1992) Control of plant height *in vitro* by photoperiod/dark period. *Int. Symp. Transplant Production Systems*, July, Yokohama, Japan. p.182 (abstr.)

Wetzstein, H.Y. and Sommer, H.E. (1982) Leaf anatomy of tissue cultured *Liquidambar styraciflua* during acclimation. *Am.J.Bot.* 69:1579-1586.

Whish, J.P.M., Williams, R.R. and Taji, A.M. (1992) Acclimatization-Effects of reduced humidity *in vitro*. *Acta Hort.* 319:231-236.

White, P.R. (1943) A handbook of plant tissue culture. The Ronald Press Company, New York.

Wolf, S., Kalman-Rotem, M., Yakir, D. and Ziv, M. (1998) Autotrophic and heterotrophic carbon assimilation of *in vitro* grown potato (*Solanum tuberosum* L.) plants. *Plant Physiol.* 153:574-580.

Woltering, E.J. (1989) Effect of the gaseous composition on development of *Gerbera* plantlets grown *in vitro*. *Acta Hort.* 261:377-383.

Woltering, E.J. (1990) Beneficial effects of carbon dioxide on development of gerbera and rose plantlets grown *in vitro*. *Sci.Hort.* 44:341-345.

Yae, B.W., Zimmerman R.H. and Fordham, I. (1987) Influence of photoperiod, apical meristem, and explant orientation on axillary shoot proliferation of apple cultivars *in vitro*. *J.Am.Soc.Hort.Sci.* 112:588-592.

Yang, C.S., Kozai, T. and Jeong, B.R. (1993) Growth of *Solanum tuberosum* L. *in vitro* with addition and omission of organic materials at 3 initial sucrose levels in the medium. *First Asia-Pacific Conf. on Plant Cell Tissue Culture*, Sept. 5-9 Taejon, Korea (abstr.).

-
- Yordanov, I., Tsonev, T., Goltsev, V., Kruleva, L. and Velikova, V. (1997) Interactive effect of water deficit and high temperature on photosynthesis of sunflower and maiza plants 1. Changes in parameters of chlorophyll fluorescence induction kinetics and fluorescence quenching. *Photosynthetica* 33:391-402.
- Young, M.J. and Cameron, J.S. (1985) Effect of light on blueberry shoot and callus cultures. *Plant Prop.* 31:14-16.
- Zacchini, M., Morini, S. and Vitagliano, C. (1997) Effect of photoperiod on some stomatal characteristics of *in vitro* cultured fruit tree shoots. *Plant Cell Tiss.Org.Cult.* 49:195-200.
- Zelitch, I. (1975) Improving the efficiency of photosynthesis. *Science* 188:626-633.
- Ziv, M., Schwartz, A. and Fleminger, D. (1987) Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated *in vitro*; implications for hardening. *Plant Science*, 52:127-134.
- Zobayed, S.M.A., Afreen-Zobayed, F., Kubota, C. and Kozai, T. (1999) Stomatal characteristics and leaf anatomy of potato plantlets cultured *in vitro* under photoautotrophic and photomixotrophic conditions. In *Vitro Cell.Dev.Biol.Plant.* 35:183-188.

LLISTA DE PUBLICACIONS

El treball que s'ha descrit en aquesta tesi ha estat publicat en:

Serret, M.D., Trillas, M.I. and Araus, J.L. (1995) The effect of sucrose and light levels on stable carbon isotope composition and photosynthetic pigments of *Gardenia* leaflets *in vitro*. In: Carre, F. and Chagvardieff, P. (eds.) *Ecophysiology and Photosynthetic in vitro Cultures* (pp.169-172). CEA, Cadarache.

Serret, M.D., Trillas, M.I., Matas, J. and Araus, J. (1996) Development of photoautotrophy and photoinhibition of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation. *Plant Cell Tiss.Org.Cult.* 45:1-16.

Serret, M.D., Trillas, M., Matas, J. and Araus, J.L. (1997) The effect of different closure types, light, and sucrose concentrations on carbon isotope composition and growth of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation and subsequent acclimation *ex vitro* *Plant Cell Tiss.Org.Cult.* 47:217-230.

Serret, M.D. and Trillas, M.I. (2000) Effects of light and sucrose levels on the anatomy, ultrastructure, and photosynthesis of *Gardenia jasminoides* Ellis leaflets cultured *in vitro* *Int.J.Plant Sci.*161 (2) 281-289.

Serret, M.D., Trillas, M.I. and Araus, J.L. (2001) The effect of *in vitro* culture conditions on the pattern of photoinhibition during acclimation of gardenia plantlets to *ex vitro* conditions. *Photosynthetica* 39, en premsa.

Serret, M.D., Trillas, M.I., Matas, J. and Araus, J.L. (2001) The effect of photoautotrophy on photosynthesis and photoinhibition of gardenia plantlets during micropropagation. *Photosynthetica* , en premsa.



11
12
13
14
15
16

17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

