

Key words: Physiology, micropropagation, liquid medium, enzymes.

8.8 Growth Analysis of *In Vitro*-Regenerated Chestnuts During the Acclimatization Stage Using Elevated CO₂

Análisis del crecimiento en castañas Vitro-Regeneradas durante la etapa de la aclimatación usando el CO₂ elevado

Maria Teresa Coelho, Maria da Graça Diogo and José Carlos Gonçalves
Instituto Politécnico de Castelo Branco, Escola Superior Agrária de Castelo Branco, Laboratório de Biologia Vegetal,
Quinta da Senhora de Mércules, Apartado 119, 6001-909 Castelo Branco, Portugal.
mteresacoelho@esa.ipcb.pt

Abstract

Great advances have been made but some cultured plantlets still having a poor performance during the *ex vitro* stages and more specifically during the acclimatization and the nursery establishment stages. The problem is highly complex and requires the fast adaptation of plants growing in artificial conditions when transferred to the natural conditions. Until now, there is no consensus on the better strategy to obtain a higher efficiency of the propagation protocols while optimising acclimatization success. In this study we present the results of growth analysis of *in vitro*-regenerated chestnut hybrid plantlets (*Castanea sativa* x *C. crenata*), during the acclimatization stage, using two CO₂ concentrations (350 μLL^{-1} and 700 μLL^{-1}) at 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ as irradiance level (PPFD). Elevated CO₂ did not affect the survival rate and it was susceptible to increase progressive autotrophy, expressed by a significant increase in relative growth, shoot/root ratio and leaf area ratio (LAR). For both CO₂ concentrations, the plants are successfully acclimatized and they are in good conditions to be transferred to a greenhouse to continue their development for the rest of the season, and in the next winter/spring they can go to the field. The plants under elevated CO₂ showed a higher stomatal frequency but the new leaves developed at the end of acclimatization revealed a gradual normal stomatal morphology and they reduced the stomatal frequency. Their morphology showed an effective water loss control, which is one of the most important problems during this critical phase of the autotrophic competence acquiring process. The net photosynthesis rate (A) was similar in both treatments but the plants acclimatized at elevated CO₂ showed an increase in maximum photosynthetic rate (A_{max}), and this can lead to a better physiological development. The different analysed leaf types showed a marked increment of the maximum photosynthetic rate as the new leaves developed during the acclimatization stage. Net photosynthesis rate and the maximum photosynthetic rate are light dependent, and are positively affected by the highest irradiance level. We think that the gains that we have achieved with the use of elevated CO₂ can be more significant if a higher light intensity can be used instead because they have a better response capacity to an increment of the level of irradiance.

Keywords: acclimatization, chestnut, growth analysis, CO₂, autotrophy

Resumen

Se han hecho de los grandes avances mas algunas de las plántulas todavía tenían un pobre desempeño durante las etapas *ex vitro* y más específicamente durante las etapas de aclimatación y el establecimiento en vivero. El problema es altamente complejo y requiere la rápida adaptación de las plantas desarrolladas en condiciones artificiales cuando transferidas a las condiciones naturales. Hasta este momento no hay consenso en la mejor estrategia para obtener una más alta eficiencia en los protocolos de propagación a la vez que se optimiza la aclimatación. En este estudio presentamos los resultados del análisis del crecimiento en híbridos vitro-regenerados de la castaña (*Castanea sativa* x *C. crenata*), durante la etapa de la aclimatación, usando dos

concentraciones del CO_2 ($350 \mu\text{LL}^{-1}$ y $700 \mu\text{LL}^{-1}$) en $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ como nivel del irradiancia (PPFD). El CO_2 elevado no afectó la tarifa de la supervivencia y fuera susceptible de aumentar progresivo autotrophia, expresado en un aumento significativo en crecimiento relativo, cociente de aereo/raíz y en el cociente del área de la hoja (LAR). Para ambas concentraciones del CO_2 , las plantas se aclimatan con éxito y están en las buenas condiciones para se transferirán a un invernadero para proceder su desarrollo para el resto de la estación, y en el invierno / resorte siguiente pueden ir al campo. Las plantas debajo del CO_2 elevado demostraron una frecuencia stomatal más alta pero las hojas nuevas desarrolladas en el final de la aclimatación revelaron una gradual normal morfología stomatal y redujeron la frecuencia stomatal. Su morfología demostró el control eficaz de pérdida de agua lo cuál es uno dos problemas más importantes durante esta fase crítica de adquirir la capacidad autotrophica. La tarifa neta de la fotosíntesis (A) fuera similar en ambos tratamientos pero las plantas aclimatadas en el CO_2 elevado demostraron un aumento en la tarifa fotosintética máxima (A_{max}), y ésta puede conducir a un mejor desarrollo fisiológico. Los diversos tipos de hoja analizados demostraron un incremento marcado de la tarifa fotosintética máxima con las nuevas hojas desarrolladas durante la etapa de la aclimatación. La tarifa neta de la fotosíntesis y la tarifa fotosintética máxima son dependientes de la luz y son afectadas positivamente por el nivel más alto del irradiancia. Pensamos que los aumentos que hemos alcanzado con el uso del CO_2 elevado pueden ser más significativos si una intensidad de luz más alta puede ser utilizada porque esto plantas tienen una mejor capacidad de respuesta a un incremento del nivel del irradiancia.

Palabras claves: aclimatación, castaña, análisis del crecimiento, CO_2 , autotrofia

Cartel

8.9 Cultivo fotomixotrófico de la piña (*Ananas comosus* L. merr).

Luis A. Molina El Hage¹, Romelio Rodríguez², Iris Capote², Conroy Huggins², Danilo Pina², Maritza Escalona, Justo L. González-Olmedo². Email: justo@bioplantas.cu

¹CEASE, Santa Cruz de la Sierra, Bolivia.

²Centro de Bioplantas. UNICA, Ciego de Avila, Cuba.

Resumen:

La aclimatización *in vitro* se define como el control de las condiciones *in vitro* (manejo de la humedad relativa, luz, CO_2 y sacarosa) y su efecto en la estructura y desarrollo de las plántulas, con el objetivo de disminuir los costos de producción y mejorar la calidad de éstas. En términos prácticos se basa en los cambios de las condiciones ambientales y de cultivo *in vitro* imperantes, generalmente por reducción de los niveles de azúcares, aumentos en las intensidades de luz, y elevación de los niveles de CO_2 , entre otros. De esta forma las plantas se hacen menos dependientes de las condiciones heterotróficas y comienzan a realizar con mayor efectividad sus funciones fisiológicas; así un mayor fotomixotrofismo las prepara para el tránsito a las condiciones *ex vitro*. El cultivo de la piña en biorreactores de inmersión temporal permitió variar las concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo (1 y 3 g.L^{-1}), de CO_2 ambiental (350 y $1200 \mu\text{molCO}_2\text{-mol}^{-1}$) y de luz, expresada como flujo de fotones fotosintéticos, FFF, (80 y $250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). De los tres factores evaluados sólo la sacarosa influyó significativamente sobre el número de hojas; también la sacarosa y el CO_2 ejercieron efectos significativos sobre el número de raíces, pero ninguno de los tres factores provocó diferencias en la longitud y la masa fresca de las plántulas. En la interacción de estos factores ni la masa fresca ni el número de hojas recibieron influencias que significaran diferencias estadísticas, pero si sobre el número de raíces y la longitud de las plántulas. En ambas variables la combinación de los mayores niveles de sacarosa y CO_2 juntos al menor FFF provocó el mejor comportamiento del número de raíces, pero con el mayor FFF se