

REZUMAT

INTRODUCERE

Terra este o planetă sărată, aproximativ 71 % din suprafață fiind acoperită de ape sărate și în plus circa 6% din suprafața totală și 20 % din terenurile irigate sunt afectate de salinitate, ceea ce înseamnă mai mult de 800 de milioane de hectare de teren afectate de salinitate la nivel mondial (FAO. 2008. FAO Land and Plant Nutrition Service Management. <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>). Nici în Europa situația nu este mai bună, deoarece există importante areale cu soluri saline, cele mai multe situate în jurul Marii Caspice, în Ucraina, Bazinul Carpatic, Câmpia Panoniei și peninsula Iberică (<http://eusoils.jrc.ec.europa.eu/library/themes/Salinization/>). La nivelul Uniunii Europene salinitatea solurilor afectează în jur de 1 milion de ha, acesta reprezentând principalul motiv al deșertificării. România este una dintre țările europene cu întinse suprafețe afectate de salinitate, caracterizate prin soluri slab productive asociate frecvent cu sărăcia. Problemele determinate de salinitatea solului sunt cel mai adesea asociate și cu alți factori de stres abiotic precum seceta și deficiența de fosfor. Ameliorarea calității acestor soluri prin aplicarea de amendamente însoțite de irigare și drenaj necesită investiții mult prea mari, practic imposibil de susținut prin agricultura de semi-subsistență caracteristică majorității zonelor rurale românești.

Deoarece în partea de Vest a României există numeroase terenuri saline în care concentrația de săruri atinge frecvent valori care depășesc limita de 40 mM NaCl, ne-am propus testarea în vederea identificării unor populații locale de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cu toleranță la salinitate pentru utilizarea lor ulterioară în programe de ameliorare și producerea de material semincer pentru fermieri. De asemenea un aspect important al cercetărilor a fost acela de a contribui la o mai bună cunoaștere a mecanismelor biochimice și fiziologice implicate în toleranța la salinitate a tomatelor.

Teza de doctorat intitulată ”*SCREENING-UL TOLERANȚEI LA SALINITATE A UNOR POPULAȚII LOCALE DE TOMATE CULTIVATE ÎN BANAT*” are ca obiectiv general identificarea unor populații locale de tomate cu toleranță ridicată la salinitate în vederea cultivării lor în areale saline și utilizarea în programele de ameliorare.

Teza și-a propus să parcurgă o serie de etape succesive, într-o ordine cronologică, care în final să conducă la îndeplinirea obiectivelor propuse: identificarea cultivarelor tolerante la salinitatea solului; analiza comportamentul cultivarelor de tomate în condiții de stres salin;

determinarea proceselor de fotosinteză concomitent cu analiza compușilor organici volatili și identificarea corespondenței între salinitatea solului și unii parametri morfologici.

Obiectivele secundare se referă la: studierea modului în care parametri de fotosinteză (viteza netă de asimilație, conductanța stomatală, concentrația CO₂ intracelular) ai plantelor de tomate sunt afectați de către salinitatea solului, dar și identificarea compușilor organici volatili emiși de plantele de tomate supuse stresului salin și studierea modului în care stresul salin afectează pigmentii clorofilieni.

Pentru determinarea parametrilor fotosintetici s-a utilizat un sistem de schimb de gaze portabil Waltz, iar pentru determinarea compușilor de metaboliți secundari pe lângă sistemul bazat pe schimbul de gaze s-a utilizat un cuplaj de GS-MS.

Folosind tehnica cromatografiei de lichide de înaltă performanță (HPLC) s-au determinat pigmentii clorofilieni și carotenoizi din frunzele de tomate.

Dezvoltarea plantelor a fost investigată prin determinarea conținutului de apă și de substanță uscată – prin cântărirea repetată a masei frunzei (după uscare la 70 °C) până la masă constantă, dar și a taliei plantei.

Lucrarea este structurată pe 6 capitole acoperind problematica de cercetare propusă din punct de vedere teoretic, metodologic și practic așa cum se prezintă în continuare pe capitole.

Capitolul 1. intitulat "Actualități ale cercetărilor privind particularitățile ecologice ale tomatelor cultivate în condiții de salinitate", include noțiuni și abordări în literatura de specialitate cum ar fi: importanța cultivării tomatelor și efectele salinității solurilor asupra cultivării tomatelor.

Capitolul 2 - "Stadiul actual al cercetărilor privind efectele stresului abiotic asupra procesului fotosintetic la plante", abordează literatura de specialitate din următoarele perspective: fotosinteza-principalul mecanism de reacție al plantelor la stres; impactul factorilor de stres abiotic asupra plantelor; efectele temperaturilor scăzute asupra fotosintezei; efectele temperaturilor ridicate asupra fotosintezei; efectele salinității solului asupra fotosintezei, dar și efectele deficitului de umiditate asupra fotosintezei,

Capitolul 3 - "Actualități și perspective ale cercetărilor privind influența stresului salin asupra plantelor de tomate" investighează în literatura științifică din domeniu teme cum ar fi: influența salinității asupra productivității tomatelor; strategii de creștere a productivității în condiții de stres salin; tomatele transgenice și toleranța acestora la stresul salin.

Capitolul 4 - "Cercetări privind influența stresului salin asupra parametrilor fotosintetici la plantele de tomate" analizează în literatura științifică de specialitate probleme ca: utilizarea fluorescenței clorofiliene în studiul fotosintezei la plante; determinarea parametrilor de fotosinteză prin schimb de gaze.

Capitolul 5. intitulat "Materiale și metode aplicate în cercetările proprii" cuprinde prezentat detaliat materialele necesare și tipurile de determinări experimentale efectuate.

MATERIALE ȘI METODE APLICATE ÎN CERCETĂRILE PROPRII

Materialul biologic- cultivaruri de tomate folosite în cercetările proprii

Am testat toleranța la stresul salin pentru diverse genotipuri de tomate. În urma cercetărilor preliminare, au fost selectate următoarele populații locale: CHEREȘTUR 60, CHEGLEVICI 161, DOLAȚ 126, RUDNA 124, GIERA 121 și cultivarurile comerciale MARATON F₁ și ACE 55.

Populațiile locale de tomate sunt cultivate în gospodăriile țărănești din zona rurală a Banatului, în județul Timiș, pe areale caracterizate prin prezența terenurilor salinizate de tip soloneț și solonceac. Cele două cultivaruri comerciale au fost selectate datorită suprafețelor importante cultivate, atât în câmp cât mai ales în spații protejate în fermele producătoare de tomate din Banat.

Experimentele efectuate

1. EXPERIMENT I. Privind influența excesului salin asupra parametrilor fotosintetici ai tomatelor imediat după plantare.
2. EXPERIMENT II. Privind influența salinității solului asupra unor indici morfologici și fiziologici ai tomatelor în fenofaza de creștere intensă
3. EXPERIMENT III. Privind influența soluțiilor saline din apa de irigare asupra unor indici fotosintetici și emisiei de compuși organici volatili la tomate.

Determinări:

1. Determinări asupra procesului fotosintetic.
2. Determinarea unor compuși de metabolism secundar.
3. Analiza unor pigmenți asimilatori (clorofilieni și carotenoizi).
4. Analize morfo-fiziologice privitoare la materialul vegetal.

CAPITOLUL 6. prezintă "Rezultatele experimentale obținute" pe parcursul investigațiilor făcute.

Prin măsurătorile de fotosinteză s-au determinat parametrii ce sunt influențați de cantitatea de săruri din sol, determinând dezechilibre ionice, reducerea capacității plantelor de a utiliza apa, precum și unele modificări în procesele metabolice celulare.

Rezultatele obținute în urma cercetărilor sunt prezentate în continuare prin concluziile care s-au desprins, dar și prin recomandările făcute către cultivatori.

CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI

- Parametrii fotosintetici (viteza netă de asimilație și conductanța stomatală la vapori de apă) au scăzut în mod drastic pentru toate plantele tratate cu soluție salină. Deci, salinitatea solului reprezintă unul din factorii de stres major din mediu ce acționează asupra plantelor, care afectează în mod drastic metabolismul și bioproductivitatea.
- Viteza netă de asimilație (A) în funcție de curba concentrației de CO₂ nu a fost influențată de stresul osmotic, spre deosebire de conductanța stomatală care a fost influențată hotărâtor, prin stresul osmotic aplicat. Acest lucru poate fi explicat prin limitarea deschiderii osteolei stomatelor în caz de stres osmotic, adaptare ce protejează deteriorarea aparatului fotosintetic.
- În conformitate cu intensitatea stresului osmotic aplicat, intensitatea luminii și concentrația de CO₂ reprezintă factorii cheie care afectează închiderea stomatelor și asimilarea CO₂ de către plante.
- S-a observat că salinitatea solului afectează conductanța stomatală într-un mod diferit, în funcție de cultivar.
- În general, populațiile locale de tomate evaluate au avut o conductanță stomatală mai mare decât soiul comercial, cum ar fi: $678 \pm 34 \text{ mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ pentru populația locală CHEREȘTUR 60, comparativ cu $359 \pm 34 \text{ mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ pentru soiul comercial ACE 55. Populațiile locale RUDNA 124, DOLAȚ 126 și CHEREȘTUR 60, au cea mai mare conductanță stomatală după aplicarea tratamentului cu soluție salină de concentrații 100 și 200 mM. Alte două populații locale (CHEGLEVICI 161, GIERA 121) au prezentat aceeași conductanță a stomatelor la vapori de apă ca și cea a soiului comercial (ACE 55). În tratamentul aplicat cu soluție de NaCl, de concentrație 400 mM, conductanța stomatală a scăzut semnificativ pentru toate populațiile locale de tomate studiate.
- După aplicarea tratamentului cu soluție salină de concentrații 100 și 200 mM, conductanța stomatală a frunzelor de tomate pentru fiecare populație locală a fost redusă într-o măsură mai mică decât 20% față de martor. Dar, după aplicarea tratamentului cu soluție salină de concentrații 300 și 400 mM, conductanța stomatală a frunzelor de tomate pentru populația locală DOLAȚ 126 a fost redusă până la 7%, față de martor, la fel ca și pentru soiul comercial (ACE 55). Celelalte populații locale înregistrând valori mai mari față de martor. Populația locală RUDNA 124 a prezentat cea mai mare conductanța stomatală în raport cu varianta control.
- Salinitatea solului a afectat viteza netă de asimilație într-un mod diferit, în funcție de cultivar. Viteza netă de asimilație a variantei control a variat de la $23,1 \pm 0,9 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ pentru populația locală CHEGLEVICI 161 la $19,01 \pm 4,5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ pentru populația locală

RUDNA 124. La ACE 55 și două populații locale (CHEGLEVICI 161, GIERA 121), viteza netă de asimilație a scăzut drastic, chiar și pentru tratamentul cu soluție salină de concentrație 100 mM, pe când, pentru populația locală RUDNA 124 viteza netă de asimilație a rămas la un nivel ridicat ($10,1 \pm 1,7 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) chiar și pentru tratamentul cu soluție salină de concentrație 200 mM. În tratamentul aplicat cu soluție de NaCl, de concentrație 400 mM, viteza netă de asimilație a scăzut semnificativ pentru toate populațiile locale de tomate studiate.

- Salinitatea solului a afectat cantitatea de CO₂ intracelular din frunze într-un mod diferit pentru fiecare populație locală de tomate. Dependența CO₂ intracelular de concentrația soluției saline (mM) este total aleatorie în cazul tuturor experimentelor efectuate.
- Vitezele nete de asimilație și conductanța stomatelor la vaporii de apă au scăzut drastic, chiar și la tratamente cu soluții de concentrație 200 mM NaCl. Analiza populațiilor locale studiate a demonstrat că două dintre acestea (RUDNA 124 și CHEREȘTUR 60) au viteze nete de asimilație și conductanța stomatelor la vaporii de apă foarte ridicate în comparație cu martorul. Oricum, la tratamente cu soluție salină de concentrație 200 mM NaCl, doar o singură populație locală (RUDNA 124) a prezentat parametrii mai mari în comparație cu toate celelalte genotipuri studiate. Probabil această varietate de tomate conține gene de toleranță la salinitate.
- În lucrare am demonstrat că compușii organici volatili pot fi folosiți ca un semnal de stres foarte sensibil. (E) -beta-ocimene și beta-phellandrene sunt proporționale cu puterea de stres și ar putea fi utilizate ca markeri ai stresului.
- S-au remarcat deosebiri esențiale din punct de vedere al taliei plantelor în funcție de tratamentul salin aplicat astfel: concentrațiile ridicate de sare (400 mM) afectează creșterea plantelor (acestea au înălțime mai mică).
- Dintre cultivarurile testate, populația locală RUDNA 124, a avut o reacție adaptativă bună pentru cultivarea în condiții de stres salin (viteza netă de asimilație mare, chiar și la plantele udate cu soluție salină de concentrație 200 mM NaCl) față de cultivarurile comerciale. Recomandăm folosirea ei pentru cultivare în fermele și gospodăriile tradiționale localizate în arealuri cu soluri salinizate și ca genitor în programele de ameliorare ale speciei *Solanum lycopersicum* L.

Prin urmare, lucrarea de față este prima care abordează studiul prin termodesorbție a unor compuși de metabolism secundar ai plantelor de tomate.

Partea experimentală s-a realizat în laboratoarele: Institutului de Cercetare-Dezvoltare-Inovare în Științe Tehnice și Naturale ale Universității "Aurel Vlaicu" din Arad și în sera disciplinei de Fiziologie vegetală a Universității De Științe Agricole Și Medicină Veterinară A Banatului „Regele Mihai I al României” Din Timișoara.

Lucrarea totalizează 147 pagini, 10 tabele, 91 figuri și conține 294 repere bibliografice.

Cercetările efectuate au fost susținute financiar și prin proiectul: Screening for salt tolerance of some local vegetable landraces for conservation of genetic potential and biodiversity (PN-II-PT-PCCA-2011-3. Contract. Nr.97/2012, 2012-2016).

ABSTRACT

INTRODUCTION

About 71% of the Earth surface is covered with salty water while about 6% from the total area and 20% of the irrigated lands are affected by salinity, which means more than 800 million hectares of land affected salinity worldwide (FAO. 2008. FAO Land and Plant Nutrition Management Service (<http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>)).

In Europe, the situation is no better, because there are important areas with saline soils, most located around the Caspian Sea, in Ukraine, the Carpathian Basin, Pannonian Plain and the Iberian Peninsula (<http://eusoils.jrc.ec.europa.eu/library/themes/Salinization/>).

At EU level the main cause of desertification is the soil salinity which affects about 1 million ha.

Romania is one of the European countries with the largest areas affected by salinity, characterized by low productivity soils often associated with poverty.

The problems associated with soil salinity, are most often associated with other abiotic stress factors such as drought and phosphorus deficiency.

Improving the quality of these soils by applying irrigation and drainage accompanied amendments require too high investment, practically untenable by semi-subsistence farming characteristic of most Romanian rural areas.

Due to the fact that in the West of Romania there are many fields where salt concentration frequently reaches values exceeding the limit of 40 mM NaCl, our aim is testing local tomato populations (*Solanum lycopersicum* L.) with good tolerance to salinity for subsequent use in breeding programs and seed production material for farmers. An important aspect of the research was to contribute to a better understanding of the biochemical and physiological mechanisms involved in salinity tolerance of the tomatoes.

The general objective of the thesis entitled "**The screening of salinity tolerance of tomato landraces from Banat**" is the identification of local tomato populations with high salinity tolerance in order to be grown in saline area and to use them in breeding programs.

The thesis aims to go through a series of stages, in chronological order, which ultimately lead to the achievement of the following objectives: identify cultivars tolerant to soil salinity; analyze the behavior of tomato cultivars under salt stress; determining the photosynthesis processes concurrently with the analysis of volatile organic compounds and the identification of the correspondence between some morphological parameters and soil salinity.

The secondary objectives study how the parameters of photosynthesis (the net assimilation rate stomatal conductance, intracellular CO₂ concentration) of tomato plants are affected by the salinity of the soil, and the identification of volatile organic compounds emitted from tomato plants under saline stress and studying how this stress affects chlorophyll pigments.

For the determination of the photosynthetic parameters and sampling for volatile organic compounds we used a portable gas exchange system. For volatile organic compounds determination a GC-MS system has been used. The chlorophylls and carotenoids in the leaves of tomato were determined using high performance liquid chromatography technique (HPLC).

The development of the plants was investigated by determining the water content and dry matter (by weighing the mass of the leaf repeated after drying at 70° C) to constant weight and also the plant size.

The thesis is divided into six sections covering the proposed research issue in terms of theoretical and practical methodology as described in the chapters below.

Chapter 1 entitled "News of research on ecological peculiarities of tomatoes grown under salinity" includes concepts and approaches from the literature such as tomatoes growing importance and the effects of soil salinity on tomato cultivation.

Chapter 2 - "Current status of research on the effects of abiotic stress on photosynthetic process in plants", addresses the art from the following perspectives: photosynthesis, the main mechanism of plant stress reaction; the impact of the abiotic stress factors on the plants; the effects of low temperatures on photosynthesis; the effects of high temperatures on photosynthesis; the effects of soil salinity on photosynthesis, but also the effects of moisture on photosynthesis deficiency.

Chapter 3 - "News and perspectives of research on the influence of salt stress on tomato plants" investigations in the scientific literature of topics such as: the influence of salinity on the productivity of tomatoes; strategies to increase productivity under stress saline; transgenic tomatoes and their tolerance to salt stress.

Chapter 4 - "Research on the influence of salt stress on photosynthetic parameters of the tomato plants" analyze in the scientific literature the problems such as: the use of chlorophyll fluorescence in the study of plant photosynthesis; determining the parameters of the photosynthetic by gas exchange systems.

Chapter 5 entitled "Materials and methods used in the present research" includes materials and the type of experimental determinations made.

MATERIALS AND METHODS USED IN THE PRESENT RESEARCH

Biological materials - tomato cultivars used in the present research.

Various tomato genotypes were tested for tolerance to salt stress. After preliminary investigations, the following local populations: CHEREȘTUR 60, Cheglevici 161, Dolat 126, Rudná 124, and GIERA 121, MARATHON F1 commercial cultivars and ACE 55, were selected.

The local tomatoes populations have been grown in rural farms from Timis county, in areas characterized by the presence of saline land as solonchak or solonetz type. The two commercial cultivars were selected due to important areas cultivated both in the field and in the farms which are growing tomatoes in Banat.

Experiments done:

1. EXPERIMENT I. The influence of the excess of salt on photosynthetic parameters immediately after tomatoes planting.
2. EXPERIMENT II. The influence of the soil salinity on morphological and physiological indices of tomatoes in the intensive growth pheno - phase .
3. EXPERIMENT III. The influence of the salts solution from irrigation water on the photosynthetic parameters and emission of volatile organic compounds from tomato leaves.

Determinations:

1. Determining the photosynthetic parameters.
2. Determination of the secondary metabolic compounds.
3. Analysis of assimilating pigments (chlorophylls and carotenoids).
4. The morphological and physiological analyzes relating to the plant material.

Chapter 6 presents "experimental results" during experiments. The parameters which are influenced by the amount of salts in the soil causing ion imbalance, reducing the capacity to use water plants, as well as some changes in cellular metabolic processes were determined by the photosynthetic measurements. The research results are presented in the conclusions that have emerged together with growers recommendations.

CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

- The photosynthetic parameters (net assimilation rate and stomatal conductance to water vapor) decreased drastically in all plants treated with saline solutions. Thus, soil salinity is one of the major environmental stress factors acting on the plant, which drastically affect the metabolism and bio-productivity.
- The dependence of net assimilation rate (A) on the CO₂ has been shown not affected by osmotic stress, but the stomatal conductance has been influenced decisively by the applied

osmotic stress. This can be explained by limiting the opening of stomata in case of osmotic stress. The adaptation protects the photosynthetic apparatus damage.

- The light intensity and CO₂ concentration are key factors affecting stomatal closure and CO₂ uptake by plants according with the intensity of the osmotic stress applied.
- It was observed that the soil salinity affect stomatal conductance in a different way, depending on the cultivar.
- In general, the local tomato populations were assessed stomatal conductance higher than the commercial variety, such as $678 \pm 34 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ for the local population CHEREȘTUR 60 compared to $359 \pm 34 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ for commercial variety. RUDNA 124, DOLAȚ 126 and CHEREȘTUR 60 have been shown highest stomatal conductance after treatment with saline concentrations of 100 and 200 mM. Other two local populations (Cheglevici 161 and GIERA 121) had the same stomatal conductance to water vapor as the commercial hybrid (ACE 55). The treatment with a solution of NaCl having a concentration of 400 mM, significantly decreased stomatal conductance for all local tomato populations studied.
- After being treated with saline concentrations of 100 and 200 mM, the stomatal conductance of the tomato leaves for each local population has been reduced to an extent lower than 20% compared to the control. After treatment with saline concentrations of 300 and 400 mm, the stomatal conductance of the tomato leaf for the local population DOLAT 126 has been reduced to 7%, compared to the control, as well as the commercial variety (ACE 55). Other local populations registering higher values compared to the control. The Rudna 124 local population showed the highest stomatal conductance in comparison with control hybrid.
- Soil salinity affects the net assimilation rate in a different way, depending on the cultivar. The net assimilation rates of the control plants vary from $23.1 \pm 0.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ in local population Cheglevici 161 to $19.01 \pm 4.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ in local population RUDNA 124. In ACE 55 and two other local population (Cheglevici 161, GIERA121) net assimilation rate decreased significantly, even to treatment with a saline concentration of 100 mM, while, for the local landrace RUDNA 124 net assimilation rate remained high ($10.1 \pm 1.7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), even for treatment with saline concentration of 200 mM. The treatment with a NaCl solution having a concentration of 400 mM determine a significantly decreased the net assimilation rates in all tomato populations.
- The soil salinity affects the intracellular CO₂ of the leaves in a different way for each local population of tomatoes. The intracellular CO₂ dependence of the saline solution concentrations (mM) is completely random in all experiments.

- Net assimilation rates and stomatal conductance to water vapor decreased drastically, even at the treatment with a solution of 200 mM NaCl. Local population analysis study showed that the two of them (CHEREȘTUR 124 and RUDNA 60) have net assimilation rates and stomatal conductance to water vapor very high in comparison with the control. However, only one local population (RUDNA 60) shown largest parameters to the treatment with the saline solution of 200 mM NaCl concentration comparing with other genotypes studied. Perhaps this tomato variety contains genes for tolerance to salinity.
- In this paper it has been shown that the volatile organic compounds can be used as a signal highly sensitive to stress. (E) -beta-ocimene and beta-phellandrene are proportional to the strength of stress and may be used as markers of stress.
- The essential differences were observed in terms of the size of the plants according to the saline treatment applied as follows: high salt concentration (400 mM) affects the growth of plants (which have lower height).
- One of the local populations, RUDNA 124 has been shown to have a better adaptation to the salinity conditions (net rate assimilation higher, even to the plants treated with saline concentrations of 300 mM NaCl) from all other cultivars tested. It is recommended for cultivation on saline areas in traditional farms and for using in breeding programs of *Solanum lycopersicum* L. specie.

However, the present study is the first which studied volatile emission compounds from tomato leaves under osmotic stress.

The experiments was performed in laboratories of: Institute for Research and Development and Innovation in Technical Sciences and Natural of the University "Aurel Vlaicu" of Arad and in the greenhouse of Plant Physiology speciality from University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine of Banat "King Michael I of Romania " Timisoara.

The work totals 147 pages, 10 tables, 91 figures and 294 bibliographic contains.

Research has been funded through the project: Screening for salt tolerance of Some local vegetable landraces for conservation of biodiversity and genetic potential (PN-II-PT-PCCA-2011-3. Contract. No. 97/2012, 2012-2016).