

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

---

# Capacitatea de adaptare a unor cultivaruri de afin (*Vaccinium corymbosum* L.) la stresul abiotic în condiții in vitro

---

Doctorand **Sabin-Valerian Molnar**

---

Conducător de doctorat **Prof. univ. dr. Claudiu-Ioan Bunea**

---





## Introducere

Afinul cu tufa înaltă (*Vaccinium corymbosum* L.) este o specie din genul *Vaccinium* fiind cel mai frecvent cultivată, cea mai importantă din punct de vedere comercial și mai valoroasă din punct de vedere biologic. În ultimii ani, afinele au devenit din ce în ce mai populare în rândul consumatorilor din întreaga lume datorită aromei lor, valorii nutriționale ridicate și beneficiilor pentru sănătate (RUZIĆ și colab., 2012; MAZUREK și colab., 2021; MUÑOZ-FARIÑA și colab., 2023; SHI și colab., 2023).

În același timp, afinul este una dintre cele mai sensibile specii la deficitul de apă din sol datorită sistemului radicular superficial, lipsit de perișori absorbanți ce pătrunde până la maxim 60 cm în sol (BRYLA & STRIK, 2007; SANDOVAL și colab., 2024), având nevoie de irigare chiar și în climat umed. De asemenea, salinitatea solului devine o problemă din ce în ce mai mare pentru această specie (BRYLA și colab., 2021; MURALITHARAN și colab., 1992), afinul fiind deosebit de vulnerabil la nivelul ridicat de sare din sol. Prin urmare, crearea de varietăți mai tolerante la secetă și la sărături pot contribui la eficientizarea plantațiilor comerciale în condițiile climatice din ce în ce mai severe.

Este cunoscut faptul că identificarea și selecția în teren a genotipurilor care prezintă toleranță la secetă implică timp și resurse și poate fi afectată de sezon. În plus, evaluarea toleranței la salinitate în câmp poate fi perturbată de climă sau poate fi nesigură din cauza problemelor combinate de salinitate și stres hidric. (KHENIFI, și colab., 2011). Datorită acestor inconveniente au fost dezvoltate tehnici de selecție mai fiabile folosind tehnologia culturilor in vitro (screening in vitro). Pentru inducerea stresului hidric, mediile de cultură se suplimentează cu diferite substanțe osmotice cu greutate moleculară mare, cum ar fi polietilenglicolul (PEG) iar stresul salin este simulat prin adăugarea de NaCl. Utilizarea culturilor in vitro oferă o serie de avantaje în comparație cu metodele tradiționale de evaluare toleranței la secetă și salinitate în câmp, cum ar fi: obținerea rapidă a rezultatelor, eliminarea perturbărilor climatice, uniformitatea experimentelor, efectuarea unui număr mare de experimente simultan și într-un spațiu mic precum și economie de forță de muncă, sol sau apă.

Condiția de screening in vitro este considerată benefică în comparație cu screening-ul pe teren, deși efectul stresului poate să nu fie replicat în toate etapele de dezvoltare prin această metodă. Screening-ul in vitro oferă rapoarte preliminare care pot prezice răspunsul plantei la stres, iar validarea ulterioară a răspunsurilor la stres poate fi efectuată în condiții de teren (SAHU et al., 2023). Prin urmare, această metodă este utilizată, în special, pentru a face o evaluare timpurie a răspunsului genotipurilor la diferite tipuri de stres iar datele colectate pot sta la baza viitoarelor programe de ameliorare.

---

Pentru a înțelege răspunsul plantelor la condițiile de stres abiotic sunt abordate o serie de studii interdisciplinare (fiziologice, biochimice, genetice, moleculare, fizice ș.a).

Alături de modificările morfologice ale plantelor aflate sub stres abiotic, unii parametri biochimici precum pigmenții fotosintetici, compușii antioxidanți, markerii de stres oxidativ sau osmoliții pot defini răspunsul plantelor la stresul de secetă (COŞKUN, 2023; EISA și colab., 2023; HABUŠ JERČIĆ; și colab., 2023). De asemenea, aplicațiile spectroscopiei de rezonanță paramagnetică electronică (EPR) în cercetarea plantelor permit caracterizarea diferențelor dintre genotipurile sensibile și cele tolerante atunci când sunt expuse la diferite condiții de stres hidric sau de sare (LABANOWSKA și colab., 2013; STEFFEN-HEINS și STEFFENS, 2015, FILEK și colab., 2016). Spectroscopia EPR permite investigarea țesuturilor biologice datorită prezenței diferiților centri paramagnetici, cum ar fi manganul (Mn), fierul (Fe) și cuprul (Cu), care se găsesc în enzime și alte structuri biologice.

Prin acest studiu s-a urmărit capacitatea de adaptare a afinului cu tufă înaltă la stresul hidric și salin utilizând culturile in vitro iar evaluarea răspunsurilor morfologice și biochimice obținute oferă date importante pentru a înțelege mecanismele prin care aceste cultivaruri pot tolera acești factori abiotici.

## Structura tezei de doctorat

Teza de doctorat însumează 136 pagini și conține 7 capitole, 8 tabele, 19 figuri și 219 bibliografice, fiind structurată în două părți:

- Stadiul actual al cunoașterii – 24 pagini
- Contribuția personală – 61 pagini

Prima parte (Stadiul actual al cunoașterii) prezintă aspect generale privind *Vaccinium corymbosum*. și factorii de stres biotic și abiotic ce apar în cultură, fiind structurată într-un capitol.

A doua parte a tezei (Contribuția personală) este structurată în 6 capitole care prezintă, obiectivele, metodele de cercetare, rezultate și discuții, concluzii și recomandări, originalitatea și contribuțiile inovative ale cercetării.

## Rezultate și discuții

Cercetarea realizată în cadrul tezei de doctorat a fost publicată în 3 articole publicate în reviste ISI și este prezentată în teza de doctorat în capitolele 3, 4 și 5.

**Capitolul 3.** Obiectivul prezentului capitol a fost evaluarea efectelor secetei asupra creșterii și dezvoltării plantelor la cinci soiuri de afin (Bluecrop, Brigitta Blue,

Duke, Goldtraube și Hortblue Petite) în condiții de stres hidric indus in vitro prin suplimentarea mediilor de cultură cu diferite concentrații de PEG 6000.

Rezultatele obținute au arătat că creșterea concentrației de PEG a dus la o scădere a pigmentilor fotosintetici pentru toate soiurile studiate. Este de remarcat faptul că, din punct de vedere al acestor parametri, Goldtraube a fost cel mai sensibil la stresul hidric indus de PEG.

Lăstarii din mediul de cultură fără PEG (pentru toate cultivarurile) au prezentat cel mai înalt nivel în toți pigmentii fotosintetici ceea ce demonstrează faptul că există o legătură puternică între starea generală de sănătate a plantelor de afin și nivelurile de clorofilă a, clorofilă b și carotenoide. Cele mai mari valori au fost înregistrate la soiul Bluecrop:  $1,91 \pm 0,04$  mg/g FW Chlorofilă a,  $0,75 \pm 0,04$  mg/g FW Chlorofilă b și  $1,19 \pm 0,02$  mg/g FW carotenoide.

**Capitolul 4** a avut ca scop evaluarea toleranței la salinitate a șapte soiuri de afin cu tufă înaltă folosind tehnica in vitro de inducere a stresului salin prin suplimentarea mediilor de cultură cu patru concentrații de NaCl.

Răspunsul la stresul salin s-a determinat prin cuantificarea următorilor parametri: numărul de lăstari obținuți/explant, lungimea lăstarilor, greutatea proaspătă, greutatea uscată și conținutul de apă pentru șapte cultivaruri de afin american în absența și prezența NaCl, în etapa de multiplicare in vitro. De asemenea, s-au calculat următorii indici de toleranță la salinitate: indicele de toleranță la stres (ITS) și indicele McKinney (MKI).

În plus, s-a încercat descoperirea comportamentului celor șapte cultivaruri de afin sub stres salin, utilizând spectroscopie de rezonanță paramagnetică electronică (EPR). Spectrul EPR caracterizat de prezența complexului Mn (II) la diferite concentrații ale factorului de stres NaCl arată o limitare importantă a modalităților conformaționale de legare a ionilor de mangan odată cu creșterea concentrației de NaCl în probele biologice studiate.

Rezultatele acestui studiu au arătat că stresul salin indus în culturile in vitro de afin prin adăugarea de NaCl la mediul de cultură a redus numărul de lăstari obținuți și lungimea lăstarilor la toate soiurile de afin studiate și sub toate concentrațiile de sare.

Atât modificările morfologice, cât și indicii de toleranță la stres, precum și spectrul EPR au arătat că „Goldtraube” a arătat cea mai mare toleranță la stresul salin.

**Capitolul 5** a avut ca scop studiul modificărilor biochimice alături de cele morfologice, care au la soiului Hortblue Petite cultivat in vitro în condiții de stres hidric indus cu ajutorul PEG 6000. Cei mai semnificativi parametri morfologici și biochimici care au răspuns la stresul cauzat de secetă au fost: lungimea lăstarilor, numărul lăstarilor, conținutul de pigmenti fotosintetici, prolină, malondialdehidă și peroxid de hidrogen. O reducere a lungimii lăstarilor proliferați și o creștere a numărului de

---

lăstari au fost observate pe mediul de cultură WPM + 1 mg/l Z suplimentat cu 10, 20, 30, 40 și 50 g/l PEG. Conținutul de pigmenți fotosintetici a scăzut, în timp ce conținutul de prolină, malondialdehidă și peroxid de hidrogen a crescut odată cu creșterea concentrației de PEG 6000 în mediul de cultură.

Rezultatele obținute sugerează că tehnica de screening in vitro a afinului cu tufă înaltă pentru toleranța la secetă și salinitate utilizând PEG, respectiv NaCl ca agenți de stres ar putea servi ca metodă alternativă pentru selecția mai rapidă a soiurilor tolerante la acești factori abiotici iar evaluarea răspunsurilor morfologice și biochimice obținute oferă date importante pentru a înțelege mecanismele prin care aceste soiuri pot tolera acești factori abiotici.

Cu toate acestea, pentru o validare precisă, cercetarea de teren este recomandată în conformitate cu practicile pentru alte specii.

## Concluzii generale și recomandări

Teza de doctorat are la se bază pe patru studii de cercetare după cum urmează:

**Capitolul 1** prezintă starea actuală și perspectivele industriei de afin, provocările creșterii afinului din cauza factorilor biotici și abiotici și a condițiilor recomandate de creștere.

**Capitolul 3** prezintă un studiu care a testat potențiala toleranță la secetă a cinci varietăți de afine (Duke, Bluecrop, Brigitta Blue, Goldtraube și Hortblue Petite) supuse unor condiții de stres asemănătoare secetei create prin adăugarea a cinci concentrații de PEG 6000 (10, 20, 30, 40 și 50 g/l PEG.) în mediile de cultură in vitro, examinându-le parametrii morfologici, fiziologici și biochimici. Rezultatele obținute au arătat că creșterea concentrației de PEG a dus la o scădere a pigmentilor fotosintetici pentru toate cultivarurile studiate.

**Capitolul 4** prezintă o investigație a toleranței la salinitate a șapte cultivaruri de afine (Bluecrop, Blueray, Brigitta Blue Duke, Goldtraube, Hortblue Petite și Patriot) în condiții in vitro. Condițiile de stres salin au fost create prin adăugarea a patru concentrații de NaCl (10, 50, 100 și 150 mM) în mediul de cultură in vitro. Parametrii monitorizați au fost numărul de lăstari obținuți/explant, lungimea lăstarilor, greutatea proaspătă, greutatea uscată și conținutul de apă. Pentru o analiză aprofundată, au fost calculați indicele de toleranță la stres (ITS) și indicele McKinney (MKI). Frunzele proaspete obținute in vitro au fost utilizate pentru măsurătorile rezonanței electron paramagnetice (EPR) pentru a evalua comportamentul celor șapte varietăți de afine sub stres salin folosind spectroscopia de rezonanță electronică paramagnetică (EPR).

**Capitolul 5** prezintă modul în care markerii biochimici implicați în rezistența

plantelor la stresul abiotic pot furniza date despre mecanismele de răspuns la stresul de secetă ale varietății de afin Hortblue Petit. Cei mai semnificativi parametri biochimici care au răspuns la stresul cauzat de secetă au fost: conținutul de pigmenți fotosintetici (Chl a, Chl b, Caro), compuși fenolici totali (TPC), conținutul total de flavonoizi (TFC), prolină (Pro), malondialdehidă (MDA) și peroxid de hidrogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

### **Principalele concluzii obținute în urma cercetării efectuate au fost:**

- La toate cultivarurile de afine studiate, următorii indicatori de creștere – lungimea lăstarilor (SL), numărul mediu de lăstari per ghiveci de cultură (NS), rata de proliferare (PR) și greutatea proaspătă (FW) – au fost influențați de stresul de secetă simulat în vitro prin PEG 6000.
- Un singur indicator de creștere (SL) a scăzut odată cu creșterea concentrațiilor de PEG în toate cele cinci varietăți, indicând efectele dăunătoare ale stresului de secetă indus de PEG.
- Concentrația crescută de PEG a dus la o scădere a pigmentilor fotosintetici pentru toate cultivarurile studiate.
- Goldtraube a fost cel mai sensibil la stresul hidric in vitro indus de PEG 6000.
- Culturile in vitro de afin expuse la NaCl (10, 50, 100 și 150 mM) timp de 10 săptămâni au arătat diferențe statistice în ceea ce privește numărul de lăstari, lungimea lăstarilor, greutatea proaspătă și uscată și conținutul de apă, chiar și la cea mai mică concentrația de sare în mediul de cultură (10 mM NaCl).
- La toate varietățile studiate, numărul de lăstari per explant a scăzut pe măsură ce concentrația de NaCl din mediul de cultură a crescut.
- Cultivarul Brigitta Blue a fost cel mai afectat de stresul salin, având cel mai mare număr de lăstari per explant pe mediile de cultură fără NaCl iar numărul de lăstari/explant a scăzut sub toate concentrațiile de NaCl.
- Investigația asupra influenței concentrațiilor de clorură de sodiu (NaCl) asupra lungimii lăstarilor a relevat un impact vizibil, cu efect dependent de concentrație.
- În mod similar, față de numărul de lăstari proliferați per explant, lungimea lăstarilor a fost cea mai afectată sub toate concentrațiile de sare la varietatea Brigitta Blue.
- Lăstarii de afine expuși in vitro la diferite concentrații de NaCl au prezentat o scădere semnificativă a FW, în special evidentă la concentrații mari de sare (100 și 150 mM NaCl). Cel mai afectat cultivar a fost Brigitta Blue.
- Toleranța la sare, așa cum este exprimată prin indicii de toleranță la sare

---

(STI), a avut o tendință generală de a scădea odată cu creșterea nivelurilor de salinitate. STI a confirmat că Brigitta Blue a fost cea mai sensibilă la stresul de salinitate, prezentând cele mai scăzute valori.

- Indicele McKinney (MKI), care indică nivelul de cloroză și necroză a lăstarilor, a arătat o creștere semnificativă a necrozei odată cu creșterea concentrației de NaCl la toate varietățile.
- Spectrele EPR ale frunzelor proaspete din lăstarii de afine cultivați in vitro sub stres salin au arătat o schimbare semnificativă a sextetului caracteristic Mn(II).
- Atât modificările morfologice, cât și indicii de toleranță la stres, precum și spectrele EPR au arătat că cultivarul Goldtraube a prezentat cea mai mare toleranță la stresul salin.
- Markerii de stres oxidativ, malondialdehida (MDA) și peroxidul de hidrogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), au arătat o creștere semnificativă a lăstarilor de afine cultivați pe medii expuse la toate concentrațiile de PEG 6000.
- Rezultatele obținute au arătat o corelație pozitivă între acumularea de prolină și creșterea nivelului de secetă.
- În general, conținutul total de flavonoide (TFC) și conținutul total de fenolici (TPC) din lăstarii de afine au fost reduse la stres ușor și au crescut în condiții de stres intens. Cel mai înalt nivel în ambele trăsături a fost obținut la lăstarii tratați cu 50 g/l PEG.
- Studiile efectuate au urmărit capacitatea de adaptare a afinului cu tufă înaltă la stresul hidric și salin utilizând culturile in vitro iar evaluarea răspunsurilor morfologice și biochimice obținute oferă date importante pentru a înțelege mecanismele prin care aceste cultivaruri pot tolera acești factori abiotici.
- Rezultatele obținute confirmă faptul că tehnica de screening in vitro poate fi aplicată și la afinul cu tufa înaltă și ar putea servi ca metodă alternativă pentru selecția timpurie a cultivarurilor tolerante stresul hidric și salin .

## Recomandări

Rezultatele obținute arată o sensibilitate crescută a plantelor de afin cultivate in vitro la concentrații crescute de NaCl (stres salin) și PEG 6000 (stres hidric), subliniind necesitatea controlului precis al salinității și deficitului de apă în mediul lor de cultivare.

Utilizarea PEG 6000 și NaCl ca factor de stres in vitro este o modalitate convenabilă de a evalua, în condiții controlate, efectele stresului abiotic asupra creșterii și dezvoltării plantelor de afin și s-ar putea dovedi de mare importanță în reducerea timpului și a costului studiilor ulterioare.



Se recomandă efectuarea cercetărilor de teren, urmând practicile folosite la alte specii, pentru validarea soiurilor de afin tolerante la stresul hidric și salin prin screening in vitro.

## Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Pentru prima data s-a evaluat capacitatea de adaptarea la condiții de stress hidric indus in vitro cu PEG 6000 a varietăților de afin Duke, Bluecrop, Brigitta Blue, Goldtraube, și Hortblue Petite.

Acesta este primul studiu în care este utilizată tehnologia culturilor in vitro pentru a evalua toleranța la salinitate a cultivarelor de afin Bluecrop, Blueray, Brigitta Blue Duke, Goldtraube, Hortblue Petite și Patriot.

Spectroscopia electronică de rezonanță paramagnetică (EPR) a fost utilizată pentru prima dată pentru caracterizarea diferențelor dintre varietățile de afin expuse la diferite condiții de stres hidric salin.

## Bibliografie selective

1. Bryla DR, Scagel CF, Lukas SB, Sullivan DM (2021). Ion-specific limitations of sodium chloride and calcium chloride on growth, nutrient uptake, and mycorrhizal colonization in northern and southern highbush blueberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 146(6), 399–410. <https://doi.org/10.21273/JASHS05084-21>
2. Bryla, D. R., & Strik, B. C. (2007). Effects of cultivar and plant spacing on the seasonal water requirements of highbush blueberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132(2), 270-277.
3. Coşkun, Ö. F. (2023). The effect of grafting on morphological, physiological and molecular changes induced by drought stress in cucumber. *Sustainability*, 15(1), 875.
4. Eisa, E. A., Honfi, P., Tilly-Mándy, A., & Gururani, M. A. (2023). Exogenous Application of Melatonin Alleviates Drought Stress in *Ranunculus asiaticus* by Improving Its Morphophysiological and Biochemical Attributes. *Horticulturae*, 9(2), 262.
5. Filek M, Łabanowska M, Kurdziel M, Wesełucha-Birczyńska A, Bednarska-Kozakiewicz E (2016). Structural and biochemical response of chloroplasts in tolerant and sensitive barley genotypes to drought stress. *Journal of Plant Physiology*, 207, 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.09.012>
6. Habuš Jerčić, I., Bošnjak Mihovilović, A., Matković Stanković, A., Lazarević, B., Goreta Ban, S., Ban, D., ... & Kereša, S. (2023). Garlic ecotypes utilise different morphological, physiological and biochemical mechanisms to cope with drought stress. *Plants*, 12(9), 1824.

- 
7. Khenifi ML, Boudjeniba M, Kameli A (2011). Effects of salt stress on micropropagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). African Journal of Biotechnology, 10(40), 7840–7845. <https://doi.org/10.5897/AJB10.982>
  8. Labanowska M, Filek M, Kurdziel M, Bidzińska E, Miszański Z, Hartikainen H. (2013). EPR spectroscopy as a tool for investigation of differences in radical status in wheat plants of various tolerances to osmotic stress induced by NaCl and PEG-treatment. Journal of Plant Physiology, 170(2), 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.09.013>
  9. Mazurek, M., Siekierzyńska, A., Jacek, B., & Litwińczuk, W. (2021). Differences in response to drought stress among highbush blueberry plants propagated conventionally and by tissue culture. Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology, 155(1), 172-178
  10. Muñoz-Fariña, O., López-Casanova, V., García-Figueroa, O., Roman-Benn, A., Ah-Hen, K., Bastias-Montes, J. M., ... & Ravanal-Espinosa, M. C. (2023). Bioaccessibility of phenolic compounds in fresh and dehydrated blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). Food Chemistry Advances, 2, 100171.
  11. Muralitharan M, Chandler S, and Van SR (1992). Effects of NaCl and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on Growth and Solute Composition of Highbush Blueberry (*Vaccinium corymbosum*). Functional Plant Biology, 19(2), 155. <https://doi.org/10.1071/PP9920155>
  12. Ružić, D., Vujović, T., Libiakova, G., Cerović, R., & Gajdošova, A. (2012). Micropropagation in vitro of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). Journal of berry research, 2(2), 97-103
  13. Sahu, M., Maurya, S., & Jha, Z. (2023). In vitro selection for drought and salt stress tolerance in rice: An overview. Plant Physiology Reports, 28(1), 8-33
  14. Sandoval, Y., Tighe-Neira, R., Inostroza-Blancheteau, C., Soto-Cerda, B., & González-Villagra, J. (2024). Melatonin improves plant water status, photosynthetic performance, and antioxidant defense system in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) plants subjected to drought stress. Scientia Horticulturae, 323, 112528.
  15. Shi, J., Xiao, Y., Jia, C., Zhang, H., Gan, Z., Li, X., ... & Wang, Q. (2023). Physiological and biochemical changes during fruit maturation and ripening in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). Food Chemistry, 410, 135299.
  16. Steffen-Heins A, Steffens B (2015). EPR spectroscopy and its use in planta-a promising technique to disentangle the origin of specific ROS. Frontiers in Environmental Science, 3(MAR), 128489. <https://doi.org/10.3389/FENVS.2015.00015/BIBTEX>