



UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI
MEDICINĂ VETERINARĂ CLUJ NAPOCA
ȘCOALA DOCTORALĂ DE ȘTIINȚE AGRICOLE
INGINEREȘTI
FACULTATEA DE AGRICULTURĂ



Biolog Monica Georgeta NISTE

- Rezumat al tezei de doctorat -

**CERCETĂRI PRIVIND CULTIVAREA *IN VITRO* ȘI
REAȚIA LA FACTORII DE STRES A BACTERIILOR
DIN GENUL *RHIZOBIUM* ȘI *SINORHIZOBIUM***

Conducător științific
Prof. univ. dr. Roxana VIDICAN

CLUJ-NAPOCA
2015

INTRODUCERE

Azotul (N) este un element esențial în susținerea tuturor formelor de viață. Se găsește în aminoacizi și proteine iar o serie de compuși organici sunt derivați în urma procesului de fixare a azotului (Bagali Shrimant Shridhar, 2012). Atmosfera conține aproximativ 10^{15} tone de N_2 , iar circuitul azotului implică transformarea a 3×10^9 tone de N_2 pe an la nivel global (Abd-Alla și colab., 2014). Unul dintre cele mai importante procese care au loc în natură este fixarea biologică a N atmosferic. Procesul în care azotul molecular este transformat în amoniac sau nitrați este cunoscut sub numele de fixarea azotului. Fixarea azotului molecular are o importanță majoră în agricultura sustenabilă, mai ales din perspectiva simbiozei dintre *Rhizobium* și leguminoase. Aceasta duce la formarea unor structuri speciale, aflate de obicei în rădăcinile plantelor, numite noduli, unde bacteria transformă azotul atmosferic în amoniac. Simbioza rezultă prin invazia rădăcinilor plantei de către bacterii în urma căreia se formează un organ extrem de bine organizat numit nodul (Maunoury și colab., 2008). Stabilirea unei simbioze eficiente presupune o serie de etape: colonizarea și supraviețuirea în sol a rizobiilor ca saprofite în concurență cu alte microorganisme endogene; o compatibilitate genetică între gazdă și bacteriile din interiorul nodozităților precum și un mediu favorabil pentru a permite fixarea azotului la maxim (Bordeleau și Prévost, 1994).

O serie de factori abiotici impun limitări în ceea ce privește creșterea și activitatea plantelor fixatoare de azot. Factorii de stres cu care se confruntă cel mai des nodozitățile plantelor leguminoase și bacteria simbiotă sunt salinitatea, seceta, temperaturile extreme, solurile acide cu conținut scăzut de nutrienți și metalele grele. Procesele biologice (fixarea N_2) sunt capabile să îmbunătățească productivitatea agricolă cu o minimizare a pierderilor din sol, iar ameliorarea condițiilor edafice nefavorabile sunt esențiale pentru eficiența plantelor (Zahran, 1999).

În scopul îmbunătățirii randamentului la leguminoase în mai multe medii nefavorabile, cultivarea plantelor tolerante la stres ar trebui să fie combinată cu rizobiile tolerante la stres. Studii asupra biodiversității rizobiilor sunt o abordare importantă în găsirea unor tulpini tolerante, chiar și atunci când mediile nefavorabile sunt eșantion, deoarece populațiile conțin deseori tulpini tolerante capabile să răspundă la problemele viitoare (Giller și colab., 1997).

Activitatea desfășurată pe parcursul tezei de doctorat a fost realizată sub atitudinea înțelegătoare și pasiunea constantă spre cunoaștere a profesorului universitar doctor Roxana VIDICAN. Eforturile doamnei profesor spre insuflarea spiritului de munca și menținerea

integrității profesionale pe lângă alte sugestii valoroase vor servi drept învățături pe parcursul vieții mele.

Aș dori să transmit de asemenea sincere mulțumiri și aprecierea recunoscătoare pentru doamna șef lucrări Rodica POP, pentru furnizarea tuturor facilităților de cercetare și învățare, ghidarea intelectuală, cooperarea, răbdarea, interesul pentru acest subiect și încurajarea morală.

Mulțumiri speciale aș dori de asemenea să le adresez doamnei Șef lucrări Adriana CRISTE pentru sprijinul acordat pe întreaga perioadă de doctorantură, de asemenea și doamnei Șef lucrări Ioana BERINDEAN pentru sprijinul și îndrumarea în cercetările moleculare.

CAPITOLUL I

BACTERIILE FIXATOARE DE AZOT

Formarea unei simbioze cu un grup de bacterii (majoritatea fiind Gram-negative) numite bacterii fixatoare de azot sau simplu rizobii (Fred și colab., 1932; Graham, 2008 citat de Yates, 2008) reprezintă o caracteristică distinctă a leguminoaselor. Aceste bacterii din sol care au abilitatea de a stabili simbioze cu plantele leguminoase și au capacitatea de a forma nodozități implicate în fixarea N_2 aparțin genurilor *Rhizobium*, *Azorhizobium* și *Bradyrhizobium* (Chabot și colab., 1996). Această relație este cunoscută ca o relație simbiotică, deoarece atât plantele cât și bacteriile beneficiază de pe urma acestei coabitări.

1.1 IMPORTANȚĂ

În prezent, rizobiile pot fi definite ca fiind bacterii Gram-negative care au o semnificație profundă din punct de vedere științific și agronomic datorită abilității lor de a stabili simbioze de fixare a azotului cu plantele leguminoase, cu importanță majoră în menținerea fertilității solului (Somasegaran și Hoben, 1994). Cu toate acestea, rizobiile sunt, de asemenea, implicate și în alte interacțiuni ale plantelor altele decât simbioza (Alexandre Ana Isabel, 2010). Bacteriile care aparțin acestui gen sunt aerobe și în general heterotrofe (Yates, 2008).

Rizobiile sunt bacterii din sol, care sunt capabile să invadeze rădăcinile plantelor gazdă, această operațiune presupunând existența unei compatibilități între bacterie și plantă, pentru a iniția și forma noduli. Rizobiile trăiesc ca simbionți intracelulari în interiorul nodulilor dezvoltați, simbionți ce transformă azotul atmosferic în amoniac pentru a putea fi asimilat de către plante (Perret și colab., 2000 citați de Miller și colab., 2007).

1.2 TAXONOMIE

Genul *Rhizobium* a fost înregistrat în *Approved Lists of Names of Bacteria* conținând toate bacteriile capabile să formeze relații simbiotice cu plantele din familia *Fabaceae*. Specii simbiotice sunt: *Rhizobium leguminosarum* (cu diferite tipuri de specii), *Rhizobium japonicum*, *Rhizobium lupini*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium phaseoli* și *Rhizobium trifolii*. Genul *Agrobacterium* cuprinde speciile *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium rubi*, precum și speciile *Phyllobacterium myrsinacearum* și *Phyllobacterium bacterium rubiacearum* care provoacă hipertrofii (tumori) plantelor gazdă (Young și colab., 2001).

1.3 SPECIFICITATEA BACTERIILOR DIN GENUL *RHIZOBIUM* ȘI *SINORHIZOBIUM*

Rizobiile au, în general, un spectru de gazde bine definite. Ele se clasifică în două grupuri:

- ✓ Grupul *Rhizobium* - include specii care cresc rapid: *R. meliloti* (*Medicago*), *R. loti* (*Lotus*, *Lupinus*), *R. leguminosarum* (*Trifolium*, *Phaseolus*, *Pisum*, *Lens*).
- ✓ Grupul *Bradyrhizobium* - conține două specii: *Bradyrhizobium japonicum* (*Glycine max*) și *B. sp.* (*Vigna* și *Lupinus*) (Roxana Vidican, 2007).

1.4 INTERACȚIUNEA SIMBIOTICĂ *RHIZOBIUM*-LEGUMINOASE

Interacțiunea simbiotică începe cu ajutorul unor semnale moleculare specifice ce au loc între plantă și rizobiile libere. Simbioza *Rhizobium*-leguminoase începe cu două organisme vii libere și se termină cu un sistem celular de co-existență (Long, 2001).

1.4.1 Etapele realizării simbiozei

Nodozitățile se formează, de obicei, pe rădăcini, dar, în cazul anumitor specii, și la nivelul tulpinilor. Nodozitățile sunt rezultatul unei creșteri tisulare anormale dar limitate, cu organizare armonioasă și diferențiată (Mihăescu și Gavrilă, 1989).

Proliferarea celulelor în rizosferă

Pentru a iniția interacțiunea cu rădăcinile unei gazde potrivite, celulele de *Rhizobium* trebuie să dobândească accesul la suprafața rădăcinii și să devină numeric preponderente în populația microbială a rizosferei (Mihăescu și Gavrilă, 1989).

Ataşarea la suprafața perilor radiculari

Ataşarea bacteriilor de peretele perilor radiculari implică un contact strâns, obligatoriu, necesar pentru inducția răspunsului morfologic asigurându-se instalarea simbiozei (Roxana Vidican, 2007), după contactul inițial, are loc un proces de recunoaștere specifică, de legare laxă și apoi de legare ireversibilă, în urma unor interacțiuni compatibile.

Răsucirea perilor radiculari

După aderența celulelor de *Rhizobium* la suprafața perilor radiculari care în mod normal sunt drepte și au suprafața netedă, primul efect vizibil este deformarea acestora. Numărul perilor deformați și gradul lor de distorsiune sunt diferite de la o specie la alta, dar întotdeauna este mai mare în cazul interacțiunii dintre partenerii omologi (Gavrilă și Mihăescu, 1989).

Formarea cordonului de infecție

Cordonul de infecție este o structură tubulară prin intermediul căruia celulele infecțioase de *Rhizobium* își dobândesc accesul de la suprafața rădăcinii până la cortexul radicular.

Eliberarea bacteriilor din cordonul infecțios

După ce cordonul infecțios a străbătut primele straturi celulare ale cortexului radicular, are loc eliberarea bacteriilor și înglobarea lor în celule meristemice ale nodozității. Formarea nodozității eficiente este rezultatul succesiunii unui lanț de procese care se condiționează reciproc. Complexitatea procesului de formare a nodozităților presupune existența unor mecanisme fine și eficiente de reglare (Gavrilă și Mihăescu, 1989).

1.5 STRUCTURA NODOZITĂȚILOR

Nodozitățile radiculare reprezintă structuri rezultate dintr-o creștere tisulară anormală, dar limitată, cu organizare armonioasă și diferențiată. Ele sunt organe particulare care diferă calitativ de restul structurilor plantei (Gavrilă și Mihăescu, 1989).

1.5.1 Diferențierea bacteroizilor

Bacteroizii sunt localizați în pachete individuale de 3-4 celule înconjurate de o membrană de origine vegetală și de un citosol bogat în proteine și legHb. Deoarece bacteroizii sunt intracelulari, ei pot fi considerați a fi organite extrem de specializate în fixarea azotului.

1.6 GENETICA FIXĂRII N₂

Genele implicate în fixarea simbiotică a azotului, în sensul cel mai larg pot fi împărțite în: *nod*, *nif* și gene fixe. Producerea genelor *nod* este necesară încă din primii pași în procesul formării nodulilor (Fischer, 1994). La nivelul ADN-ului bacterian, genele *nod* sunt organizate în câțiva operoni localizați fie pe cromozom, fie în plasmide de dimensiuni mari.

CAPITOLUL II

INFLUENȚA FACTORILOR DE STRES ASUPRA FIXĂRII SIMBIOTICE

2.1 FACTORII CARE INFLUENȚEAZĂ PROCESUL SIMBIOTIC

Numeroși factori de stres sunt cauzați de un complex al unor condiții înconjurătoare, cum ar fi: luminozitatea puternică, temperatura prea ridicată sau prea scăzută, înghețul, seceta, salinitatea, metalele grele duc la o scădere a productivității (Boyer, 1982; Mahajan și Tuteja, 2005; Mittler, 2006 citați de Bianco și Defez, 2011).

În scopul îmbunătățirii randamentului la leguminoase în mai multe medii nefavorabile, cultivarea plantelor tolerante la stres ar trebui să fie combinată cu rizobiile tolerante la stres. Studii asupra biodiversității rizobiilor sunt o abordare importantă în găsirea unor tulpini tolerante, chiar și atunci când mediile nefavorabile sunt eșantion, deoarece populațiile conțin deseori tulpini tolerante capabile să răspundă la problemele viitoare (Giller și colab., 1997).

2.2 SALINITATEA

Salinitatea solului este unul din principalii factori de stres care reduc productivitatea plantelor agricole în multe regiuni ale globului (Boyer, 1982). Astfel, o treime din zonele aride sau de deșert (care reprezintă 25% din suprafața terestră a planetei) și unele terenuri irigate sunt în prezent afectate de salinitate (Hera, 2008 citat de Petcu și colab., 2008).

2.2.1 Sărăturarea solurilor

Fenomenul de sărăturare sau de salinizare a solurilor constă din acumularea sărurilor solubile în orizonturile unde se dezvoltă rădăcinile plantelor, peste limita de toleranță a acestora.

2.2.2 Efectul salinității asupra rizobiilor din sol

Salinitatea poate inhiba etapele inițiale ale simbiozei (procesul infecției și dezvoltarea nodulilor), cu toate acestea, toleranța rizobiilor la salinitate este, de asemenea, importantă pentru

simbioză. Concentrații ridicate de sare ar putea avea un efect negativ asupra populației bacteriilor ca urmare a toxicității directe, precum și prin stres osmotic (Dominguez-Ferreras și colab., 2006).

2.3 FIXAREA SIMBIOTICĂ A AZOTULUI ÎN SOLURI ACIDE ȘI ALCALINE

Majoritatea plantelor leguminoase necesită un sol neutru sau ușor acid pentru creștere, în special când depind de fixarea simbiotică.

2.3.1 Efectul acidității asupra dezvoltării rizobiilor

Solurile acide afectează procesele efectuate de rizobii, nodularea și fixarea azotului, dar și persistența acestora în sol (Cordeiro Clarisse Brígido, 2012).

2.3.2 Efectul alcanității asupra dezvoltării rizobiilor

Alcalinitatea solului este una dintre cele mai comune probleme și este caracterizată prin pH ridicat cu valori între 7,5 și 8,5. În regiunile aride și semi-aride, sărurile sunt mai puțin concentrate iar formele dominante de sodiu sunt în formă de carbonat și bicarbonat, săruri care sporesc formarea de soluri alcaline (Abd-Alla și colab., 2014).

2.4 SECETA

Salinitatea împreună cu seceta, formează principala condiție de amenințare a producției (Bolaños, și colab., 2003), fiind cel mai important factor climatic care limitează producțiile, efectul negativ fiind accentuat de temperaturile ridicate care adesea o însoțesc.

2.4.1 Influența secetei asupra rizobiilor

Efectul secetei asupra fixării biologice a azotului a fost raportată de către Zahran (1999), și este considerat de departe cel mai important factor ce duce la pierderea producției (Marino și colab., 2007). Seceta poate fi diferențiată în trei faze principale: uscure (faza I), depozitare (faza II) și reumezire (stadiul III). Aceste faze pot fi manipulate în mai multe moduri, și anume, prin severitatea și viteza de uscure și reumezire pe durata stocării.

2.5 RĂSPUNSUL RIZOBIILOR LA TEMPERATURI EXTREME

Efectele temperaturii asupra nodulării și fixării azotului au fost recunoscute pentru o lungă perioadă de timp, ca fiind primele studii care abordează acest subiect. Chiar înainte de

formarea nodulului, temperatura influențează rădăcina, supraviețuirea rizobiilor în sol, precum și schimbul de semnale moleculare între cei doi simbioți (Sadowsky, 2005 citat de Alexandre Ana Isabela, 2010).

CAPITOLUL III

OBIECTIVE. METODEDE ȘI MATERIALE DE CERCETARE

3.1 SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI

Obiectiv general

Scopul lucrării a fost de a testa și evalua efectul unor factori climatici și edafici, asupra bacteriilor fixatoare de azot și a simbiozei cu plantele leguminoase. După cum este sugerat în titlul tezei de doctorat, s-a urmărit în principal studierea bacteriilor din genurile *Rhizobium* și *Sinorhizobium* și efectul factorilor de stres asupra tulpinilor bacteriene *in vitro*.

Obiective specifice

Teza de doctorat intitulată “Cercetări privind cultivarea *in vitro* și reacția la factorii de stres a bacteriilor din genul *Rhizobium* și *Sinorhizobium*” și-a propus atingerea următoarelor obiective specifice:

1. Izolarea bacteriilor de pe rădăcinile plantelor de trifoi roșu și lucernă;
2. Studiul cultural, biochimic și molecular al tulpinilor bacteriene;
3. Testarea tulpinilor bacteriene la diferiți factori de stres *in vitro*;
4. Efectul salinității asupra germinăției semințelor de trifoi roșu și lucernă;
5. Evaluarea *in vivo* a plantelor de trifoi roșu și lucernă cultivate la diferite concentrații de salinitate.

Aceste obiective presupun efectuarea de observații, măsurători și determinări privind caracterizarea rizobiilor, urmărirea dezvoltării izolatelor bacteriene la diferiți factori de stres, caracterizarea izolatelor din punct de vedere genetic precum și testarea în casa de vegetație a efectului salinității asupra plantelor de trifoi și lucernă.

3.2 MATERIAL ȘI METODEDE DE CERCETARE

3.2.1 Material biologic

Scopul cercetărilor efectuate a fost acela de a izola rizobiile de pe rădăcinile plantelor gazdă, obținerea de culturi pure, analizarea caracterelor culturale, biochimice și genetice și testarea tulpinilor bacteriene la diferiți factori de stres.

Materialul biologic folosit în studiul bacteriilor de nodozități a fost constituit din tulpinile aparținând genului *Rhizobium* și *Sinorhizobium* prelevate de pe rădăcinile plantelor de trifoi roșu (*Trifolium pratense* L.) și lucernă (*Medicago sativa* L.). Speciile de leguminoase luate în studiu au provenit din trei zone ale Transilvaniei, respectiv Cojocna, Dej și Turda.

Prelevarea bacteriilor s-a realizat de pe un număr de 10 plante de trifoi roșu respectiv 10 plante de lucernă luate aleator din zonele mai sus menționate. De pe rădăcinile acestora s-au izolat tulpinile bacteriene aparținând genului *Rhizobium* și *Sinorhizobium*.

Materialul biologic folosit pentru experimentele *in vivo* privind comportarea în condiții de salinitate a plantelor de trifoi și lucernă s-au selectat două soiuri de trifoi roșu și două soiuri de lucernă:

- a) trifoi roșu: Select 2 și Rotrif
- b) lucernă: Mihaela și Mădălina.

3.2.2 Metode de cercetare

În vederea atingerii obiectivelor specifice propuse prin teza de doctorat, au fost utilizate metode de cercetare care au vizat:

- Determinarea însușirilor solului
- Prelevarea nodozităților de pe rădăcinile plantelor
- Sterilizarea nodozităților
- Izolarea tulpinilor bacteriene
- Obținerea culturilor pure și testarea nodulării
- Observarea caracterelor culturale și morfologice
- Testarea caracterelor biochimice
- Testarea efectului antibioticelor asupra bacteriilor
- Caracterizarea moleculară a izolatelor bacteriene cu ajutorul analizei RFLP
- Testarea factorilor de stres asupra rizobiilor *in vitro*
- Testarea *in vitro* a trifoiului roșu și a lucernei pe mediu de cultură fără azot
- Efectul salinității asupra germinației semințelor de trifoi și lucernă
- Testarea efectului salinității asupra plantelor cultivate *in vivo*.

Prelevarea nodozităților

Recolarea nodozităților s-a făcut după ce plantele au ajuns în perioada de înflorire conform literaturii de specialitate (Somasegaran și Hoben, 1985). Plantele au fost manipulate cu

grijă pentru a evita ruperea rădăcinilor și deranjarea nodozităților formate. S-a îndepărtat solul de pe rădăcinile plantelor și s-au transportat în laborator pentru examinare

Sterilizarea nodozităților

Nodozitățile au fost spălate, după care au fost scufundate într-o soluție de hipoclorit de sodiu, iar ca și soluție de dezinfectare s-a folosit produsul comercial Domestos, în care s-au ținut nodozitățile timp de 5 minute.

Izolarea rizobiilor din nodozități

Pentru sterilizare nodozitățile au fost tratate cu o soluție de hipoclorit de sodiu (NaOCl) în concentrație de 5%, timp de cinci minute. Pentru a îndepărta acțiunea dezinfectantului, nodozitățile au fost supuse la trei spălări repetate cu apă distilată sterilă.

Cultivarea izolatelor pe diferite medii de cultură

După obținerea culturilor pure tulpinile bacteriene ale speciilor *Rhizobium trifolii* și *Sinorhizobium meliloti* acestea au fost însămânțate pe următoarele medii de cultură: mediul cu extract de drojzii, manitol, agar și roșu de Congo (YEMA), mediul pentru microorganismele fixatoare de azot aerobe și mediu pentru rizobii.

Observarea caracterelor culturale și morfologice ale coloniilor

În experiențele efectuate examinarea macroscopică s-a realizat vizual, luându-se în considerare caracterele coloniilor bacteriene dezvoltate pe mediul de cultură. Caracterele culturale urmărite au fost:

- ✓ forma coloniei,
- ✓ culoarea,
- ✓ textura coloniei,
- ✓ aspectul coloniei,
- ✓ ritmul de creștere a coloniei,
- ✓ dimensiunea coloniei.

Observațiile cu privire la creșterea și dezvoltarea coloniilor tulpiniilor de *Rhizobium* pe mediul de cultură s-au efectuat prin măsurarea diametrului acestora, la 24 de ore pentru a stabili rata de creștere a coloniei fiecărui izolat.

Testarea caracterelor biochimice

Examinarea caracterelor biochimice are ca scop identificarea bacteriilor. Testarea izolatelor bacteriene s-a realizat cu ajutorul testelor standard API 20 NE și API 20 E (bioMérieux).

Testarea sensibilității bacteriilor rizobiene la antibiotice

Testarea sensibilității rizobiilor la antibiotice s-a realizat prin tehnica microcomprimatelor, și s-au utilizat un număr de nouă antibiotice în concentrație diferită: penicilina G (P) – 10 µg/ml, eritromicină (E) – 15 µg/ml, ampicilină (AMP) – 10 µg/ml, clorhidrat doxiciclină (DO) – 30 µg/ml, gentamicină (CN) – 10 µg/ml, sulfonamide combinate (S3) – 300 µg/ml, colistin sulfat (CT) – 10 µg/ml, sulfametoxazol (SXT) – 25 µg/ml și nitrofurantoin (F) – 300 µg/ml.

Caracterizarea moleculară a izolatelor rizobiene cu ajutorul metodei RFLP

Secvențierea directă a genelor care codifică ARN ribosomal 16S (regiunile ADN_r) (Laguerre și colab., 1994) și analiza RFLP a acestor secvențe amplificate (Laguerre și colab. 1996) au fost folosite pentru caracterizarea rizobiilor la nivel de specie. Polimorfismul fragmentelor de restricție (metoda RFLP).

Izolarea ADN-ului s-a făcut după protocolul lui Lodhi și colab., (1994) modificat de Rodica Pop și colab. (2003).

Amplificarea ADN-ului bacterian cu primeri specifici.

Pentru a amplifica gena 16S de la tulpinile bacteriene *Rhizobium trifolii* și *Sinorhizobium meliloti* am utilizat un set de primeri specifici (Tabelul 3.7), iar pentru analiza RFLP am utilizat 4 enzime de restricție *Hinf I*, *Taq I*, *Alu I*, *BshF I* selectate din literatură de specialitate (Laguerre și colab., 1994).

Tabelul 3.7

Primeri folosiți pentru amplificarea genei 16S și enzimele de restricție folosite

Cod	Nume	Secvența (5'-3')	Enzimele de restricție
P1	27FB	5'-CTAGCTCTCTTAGTGTTGTGCCCT-3'	<i>Hinf I</i> <i>Taq I</i>
P2	1492R	5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT--3'	<i>Alu I</i> <i>BshF I</i>

Amplificarea a fost realizată cu ajutorul unui termocycler, PalmCycler (Corbett Research) programat după cum urmează:

- 3 minute la 95⁰C – predenaturare,
- 35 de cicluri cu următorul profil de temperatură :
 - 1 minut la 94⁰C – denaturare
 - 1 minut la 55⁰C – fixarea amorsoarelor
 - 2 minute la 72⁰C – extensie
- extensia finală: 7 minute la 72⁰C.

Ca metodă standard de separare, identificare și purificare a fragmentelor de ADN, se utilizează electroforeza în gel de agaroză 2%. În fiecare godeu al gelului s-au pipetat câte 8 μ l din produsul de amplificare, iar primul godeu a fost încărcat cu 3 μ l marker ADN standard (100 bp MidRange DNA Ladder, Jena Bioscience). Colorarea gelului a fost realizată prin imersie într-o soluție de bromură de etidiu 0,8 μ g/ μ l la 150 ml soluție de 0,5x TAE, timp de 20-30 de minute, pe un agitator mecanic. Vizualizarea produșilor de amplificare s-a realizat cu ajutorul aparatul BioSpectrum AC Imaging Sistem, produs de UVP.

Testarea factorilor de stres asupra rizobiilor *in vitro*

Testarea *in vitro* a salinității asupra rizobiilor

Pentru testarea salinității *in vitro* mediul de cultură YEMA a fost suplimentat cu patru concentrații de clorură de sodiu (50, 100, 150 și 300 mM NaCl) iar pentru control s-a utilizat mediul de cultură fără NaCl.

Testarea influenței secetei asupra rizobiilor *in vitro*

Toate izolatele bacteriene au fost testate pentru capacitatea lor de a tolera diferite grade de secetă pe baza dezvoltării acestora în mediu lichid YEMB cu soluție PEG 6000. Soluția PEG 6000 a fost utilizată în cinci concentrații (3%, 6%, 9%, 15% și 30% (w/v) iar ca și control s-a utilizat mediul lichid YEMB fără PEG 6000). pH-ul mediului a fost cuprins între 6,8-7, iar autoclavarea mediului s-a făcut la 121°C 15 minute.

Testarea efectului acidității și alcalinității asupra rizobiilor *in vitro*

Valorile pH-ului testate au fost (3,5; 4; 5; 6; 7,5; 8; și 9) iar ca și martor a fost folosit mediul YEMB cu un pH de 6,8. Ajustarea pH-ului s-a realizat cu soluție de HCl (1N) pentru pH acid, iar pentru un pH cu valorile peste 6 s-a folosit soluția NaOH (1N).

Eprubetele cu mediul de cultură au fost inoculate cu 1 ml de cultură bacteriană diluția 10^{-7} și au fost puse în incubator la 28°C timp de 72 ore pe agitator la 150 rpm. Cuantificarea bacteriilor s-a realizat prin măsurarea densității bacteriene la o lungime de undă de 600 nm.

Testarea efectului temperaturilor extreme *in vitro*

Pentru testarea toleranței bacteriilor din genurile *Rhizobium* și *Sinorhizobium* la diferite temperaturi *in vitro* după inoculare tulpinile au fost păstrate în incubator la (5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C și 45°C), iar ca și control au fost considerate izolatele bacteriene păstrate la o temperatură de 28°C.

Testarea *in vitro* a trifoiului roșu și lucernei pe mediu fără azot

Semințele celor patru soiuri au fost sterilizate conform protocolului, iar apoi s-a testat capacitatea de germinație a acestora pe mediu cu agar. După 3 zile de la germinație, plantulele au fost transferate pe mediu MS fără azot, iar o parte din plantule au fost bacterizate cu tulpini rizobiene.

Efectul salinității asupra germinației semințelor de trifoi și lucernă

Pentru testarea capacității de germinație în condiții de salinitate a celor patru soiuri luate în studiu, s-au folosit semințe întregi, pline și sănătoase. De asemenea s-a testat și capacitatea de germinație în condiții de salinitate pe semințe bacterizate. Bacterizarea semințelor de trifoi și lucernă s-a realizat prin imersarea în suspensie bacteriană

Fiecare soi a fost testat la 4 graduări de salinitate (50 mM, 100 mM, 150 mM și 300 mM NaCl) și varianta martor fără sare. S-au utilizat câte 100 de semințe/soi în patru repetiții și s-au analizat următorii parametri: valoarea medie a timpului de germinare (MTG), valoarea medie de germinare pe zi (MDG), viteza zilnică de germinare (DGS), coeficientul vitezei de germinare (CVG) dar și frecvența patogenilor dezvoltați pe acestea.

3.2.3 Metodele de cercetare în casa de vegetație

Testarea salinității asupra plantelor de trifoi roșu și lucernă *in vivo*

Factorii experimentali au fost:

- ✓ factorul A = soiurile testate
 - Select 2 (S1)
 - Rotrif (S2)
 - Mădălina (S3)- Mihaela (S4)
- ✓ factorul B = cantitatea de NaCl (mM) adăugată în mediul nutritiv fără azot (Tabelul 3.7) cu următoarele concentrații
 - 50 mM NaCl (C1)
 - 100 mM NaCl (C2)- 150 mM NaCl (C3)
 - 300 mM NaCl (C4)- Control (C0)
- ✓ factorul C = bacterizarea plantelor
 - Plante nebacterizate
 - Plante bacterizate cu rhizobii izolate aparținând genului *Rhizobium* și *Sinorhizobium*.

La sfârșitul experimentului au fost efectuate următoarele determinări: numărul de nodozități/plantă (mm), dimensiunea nodozităților/plantă, lungimea rădăcinii (cm) lungime tulpinii (cm), și azotul total (N_t) prin metoda Kjeldal.

CAPITOLUL IV

REZULTATE PRIVIND TESTAREA *IN VITRO* A BACTERIILOR DIN GENUL *RHIZOBIUM* ȘI *SINORHIZOBIUM*

4.1 EXAMINAREA CARACTERELOR MORFOLOGICE ȘI BIOCHIMICE ALE IZOLATELOR BACTERIENE

4.1.1 Caracteristicile solului

Datele cu privire la însușirile solului indică faptul că pH-ul solului variază de la un pH slab acid (6,40) (Dej), un sol cu o reacție neutră cu pH = 6,98 la (Cojocna (6,98)), iar la solul din Turda pH-ul a fost slab alcalin (8,01). Conductivitatea electrică de asemenea variază: conductivitate foarte scăzută ($0,14 \text{ dS m}^{-1}$) pentru solul de la Dej, iar la solul de la Cojocna valorile acestui parametru fiind mari ($0,88 \text{ dS m}^{-1}$).

Conductivitatea electrică de asemenea variază: conductivitate foarte scăzută ($0,14 \text{ dS m}^{-1}$) pentru solul de la Dej, iar la solul de la Cojocna valorile acestui parametru fiind mari ($0,88 \text{ dS m}^{-1}$). Conținutul de azot total (%) are valori apropiate în cazul locațiilor 2 și 3 (0,243% respectiv 0,252%) ceea ce indică o bună aprovizionare, în acest element Cojocna (locația 1) prezintă o aprovizionare slabă cu azot (0,115%). Conținutul de humus (H%) presupune dezagregarea C-total din sol pe calea digestiei acide și titrarea excesului de acid și valoarea cea mai ridicată de 4,43 (Turda), iar după Vintilă și colab., (1984) citați de Mărghitaș și colab., (2011) la solurile cu textură mijlocie și fină se încadrează la un nivel mijlociu al conținutului în humus. Conținutul de fosfor a avut valori scăzute (6 ppm -Turda și 7 ppm - Dej). Solurile provenite din locațiile 1 (Cojocna) și 2 (Dej) au prezentat o aprovizionare slabă cu potasiu (122 ppm și 126 ppm), iar la locația 3 aprovizionarea a fost una foarte bună (290 ppm).

4.1.2 Caracterele morfologice ale nodozităților

Cuantificarea numărului de nodozități examinate de pe plantele de trifoi roșu (*Trifolium pratense* L.) și lucernă (*Medicago sativa* L.) obținute din cele trei locații, s-a realizat cu ajutorul unor clase de frecvență. Clasa I cuprinde 1 – 5 nodozități frecvența nodozităților fiind rară, clasa II cu nodozități între 6 și 10 (frecvență redusă), clasa III cu 10 până la 20 nodozități/plantă frecvența fiind una medie, clasa IV este încadrată la o frecvență abundentă cu nodozități între 20 și 50 , iar clasa V are un număr de > 50 nodozități frecvența fiind una foarte abundentă.

Însă numărul de nodozități examinate la plantele de trifoi roșu a fost mai mare, la lucernă numărul nodozităților a fost mai mic. Dimensiunile nodozităților au fost mai reduse atât la

trifoiului roșu și cât și la lucernă în cazul locației Dej și Turda în comparație cu nodulii colectați de la Cojocna unde dimensiunile acestora au fost mai mari.

Obținerea culturilor pure și testarea nodulării




Autenticitatea culturilor de rizobii s-a realizat *in vitro* în eprubete, iar examinarea plantelor s-a efectuat la 30 de zile după inoculare și s-a urmărit prezența sau absența nodozităților. Prezența nodulilor pe plantele nebacterizate a fost considerată ca fiind un rezultat invalid.

4.1.3 Studiul caracterelor culturale și morfologice al izolatelor bacteriene

Examinarea caracterelor morfologice și tinctoriale ale bacterioizilor

În urma colorării Gram a celulelor nu s-a putut observa nici o diferență între celulele din colonii și cele din nodozități acestea fiind Gram negative și de asemenea s-a evidențiat faptul că rizobiile sunt sub formă de bacili, drept urmare s-a putut confirma încă odată autenticitatea izolatelor bacteriene

Caracterele culturale ale coloniilor rizobiilor

Forma coloniilor de obicei este rotundă dar poate varia de la plat  la bombat  și poate avea chiar și formă conică , marginea coloniilor analizate este netedă. Dimensiunea coloniei poate varia de la 3 mm până la 4-5 mm iar pe plăcile aglomerate coloniile rămân mai mici. În general, 3-5 zile pentru tulpinile cu creștere rapidă (*Rhizobium trifolii*, *Sinorhizobium meliloti*), culoarea coloniilor poate fi de un alb-opac sau pot fi lăptoase chiar și translucide.

Influența mediilor de cultură asupra creșterii tulpinilor de *Rhizobium* și *Sinorhizobium*

Analizând numărul total de tulpini de pe cele patru medii se constată că pentru tulpina *Rhizobium trifolii* diferența de creștere nu a fost semnificativă și toate tulpinile au înregistrat un număr similar de coloni. Pe mediul cu extract de drojdii, manitol, agar și roșu de Congo (M1) s-a observat cel mai mare număr de UFC (77,33), comparativ cu (M2 - mediu pentru microorganismele fixatoare de azot aerobe), care a avut cel mai mic număr de colonii (40,67). Al treilea mediu (M3), cel cu extract de sol, a fost mai simplu din punct de vedere al compoziției sale, fiind, de asemenea, și unul relativ ieftin, realizând un număr de colonii de 56,67. Datorită acestor factori mediul M3 ar putea fi folosit în continuare în cercetare.

4.1.4 Caracterizarea biochimică a izolatelor

La teste biochimice API 20 NE, reducerea nitraților (NO_3) a fost negativă pentru toate izolatele analizate. Testul esculinei (ESC) este un test prezent doar la testele API 20 NE, și a fost pozitiv pentru toate izolatele ceea ce înseamnă că izolatele au consumat substratul și doar un singur izolat din tulpina *Sinorhizobium meliloti* (SmC10) a fost negativ.

Tulpinile de rizobii analizate în acest studiu au arătat că pot crește pe o varietate mare de carbohidrați. Testele de glucoză (GLU), arabinoză (ARA), manoză (MNE), manitol (MAN), N-acetil-glucozamină (NAG) și maltoză (MAL) din sistemul API 20 NE au fost pozitive la majoritatea izolatelor (Figura 4.13).



Figura 4.13 Kitul API 20 NE și răspunsul diferențiat al izolatelor *Sinorhizobium meliloti* la testele biochimice

4.1.5 Efectul antibioticelor asupra tulpinilor bacteriene de *Rhizobium* și *Sinorhizobium*

Izolatele *Rhizobium trifolii* au avut o rezistență ridicată față de ampicilină (AMP), eritromicină (E) În ceea ce privește răspunsul față de gentamicină (CN) numai două izolate bacteriene (RtD5 și RtD9) din locația 2 (Dej) au prezentat o sensibilitate, la fel și în cazul a două izolate RtC 2 și RtC4 din locația 1 (Cojocna) acestea fiind de asemenea ușor sensibile la colistin sulfat (CT). Două izolate (RtC5 și RtT6) au fost puțin sensibile la sulfonamidele compuse (S3) restul izolatelor fiind rezistente.

Tulpina bacteriană *Sinorhizobium meliloti* cu cele treizeci de izolate analizate au prezentat o rezistență ridicată față de trei antibiotice și anume: ampicilină (AMP), penicilină (P) și sulfametoxazol (SXT), procentul rezistenței față de aceste antibiotice fiind de 100% (Figura 4.19).

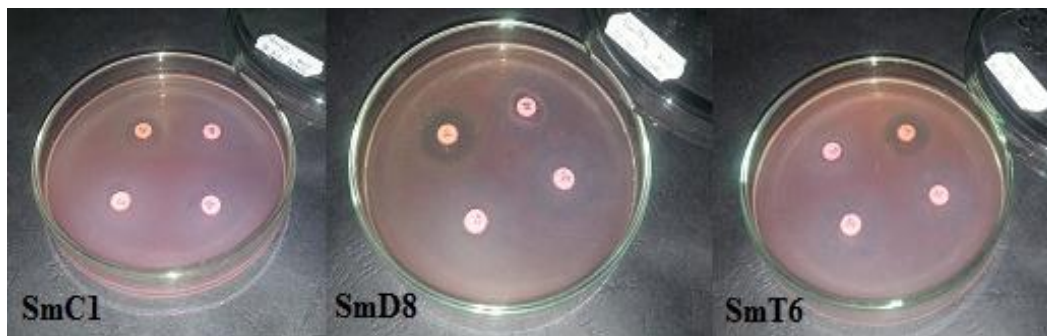


Figura 4.19 Rezistența izolatelor *Sinorhizobium meliloti* la antibiotice

4.1.6 Rezultate privind caracterizarea moleculară a izolatelor bacteriene cu ajutorul metodei RFLP

Primerii PCR utilizați în cadrul prezentei lucrări, au reușit să amplifice și să evidențieze zona de interes 16S – 23S, la aproape toate cele 60 de tulpini izolate, obținându-se o singură bandă, iar după cum se poate observa din Figura 4.21, aceasta are dimensiunea de circa 1500-1600 pb, cu mici variații de mică amplitudine.

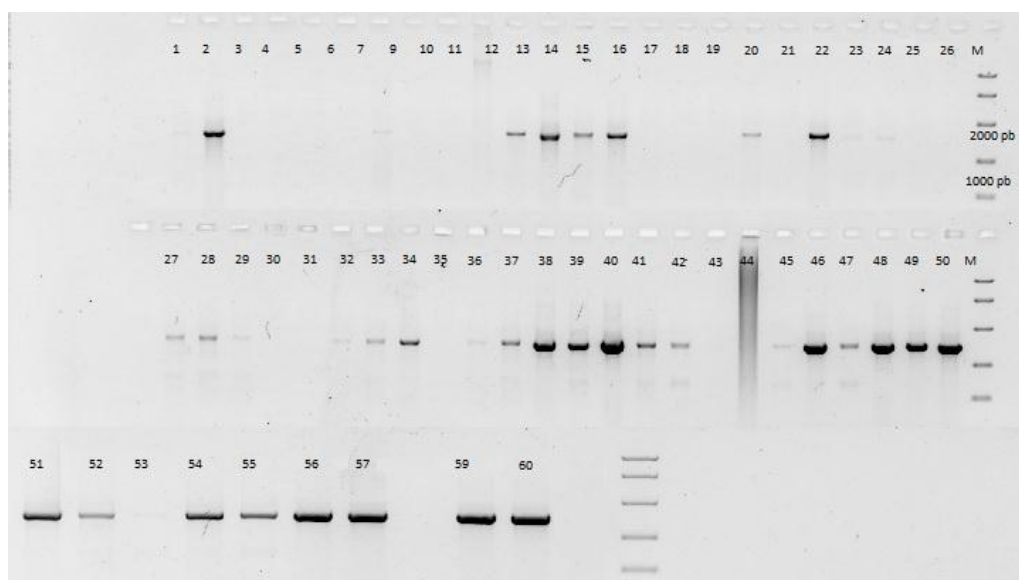


Figura 4.21 Producții rezultate în urma amplificării regiunii 16S ADNr cu ajutorul PCR
Figure 4.21 Amplification products of 16S DNAr region obtained with PCR

Producții de amplificare ai genei pentru ARNr 16S, obținuți de la tulpinile bacteriene *Rhizobium trifolii* și *Sinorhizobium meliloti* izolate de pe plantele de trifoi roșu și lucernă, au fost supuși digestiei enzimatică, utilizând patru enzime de restricție diferite (*Alu I*, *Taq I*, *Hinf I* și *BshF I*), iar fragmentele obținute au fost migrate cu ajutorul electroforezei orizontale, în gel de agaroză. Pentru fiecare enzimă de restricție a fost obținut un profil de migrare electroforetic, ce a fost ulterior analizat statistic, folosind software-ul PAST (PALaeontological STATistics, Hammer și colab., 2001).

4.2 EFECTUL FACTORILOR DE STRES ASUPRA BACTERIILOR RIZOBIENE CULTIVATE *IN VITRO*

4.2.1 Efectul salinității asupra creșterii și dezvoltării rizobiilor *in vitro*

Efectul inhibitor al concentrațiilor de sare aplicate asupra tulpinilor bacteriene s-a putut observa încă de la primele concentrații (Tabelul 4.12). Odată cu aplicarea salinității numărul de colonii a scăzut drastic la concentrațiile de 150 unde cel mai mic număr de colonii s-a observat la izolatele RtD (24,70) și cel mai mare la izolatele SmC (51,20 UFC).

La 300 mM NaCl efectul salinității asupra dezvoltării coloniilor este mai pronunțat la tulpinile bacteriene *Rhizobium trifolii* dar și la concentrațiile de 150 mM, 100 mM de asemenea numărul de colonii a fost mai scăzut comparativ cu tulpinile de *Sinorhizobium*. La concentrația de 300 mM NaCl s-a înregistrat cea mai mare valoare a numărului de colonii în cazul tulpinii SmT (17,30 UFC).

Tabelul 4.12

Efectul unor concentrații diferite de salinitate asupra creșterii tulpinilor bacteriene *Rhizobium trifolii* și *Sinorhizobium meliloti*

Tulpini	Concentrații salinitate				
	Control	50 mM NaCl	100 mM NaCl	150 mM NaCl	300 mM NaCl
RtC	134,27 ^a	90,73 ^{bc}	61,30 ^b	35,73 ^b	3,40 ^c
RtD	102,67 ^b	74,27 ^d	48,00 ^c	24,70 ^c	2,20 ^c
RtT	114,30 ^b	82,10 ^{cd}	54,30 ^{bc}	29,36 ^{bc}	3,50 ^c
SmC	143,23 ^a	99,03 ^{ab}	77,06 ^a	51,20 ^a	14,00 ^{ab}
SmD	134,20 ^a	100,30 ^{ab}	61,30 ^b	37,06 ^b	10,53 ^b
SmT	135,67 ^a	105,16 ^a	78,03 ^a	46,56 ^a	17,30 ^a

4.2.2 Efectul poletilenglicolului (PEG 6000) asupra creșterii tulpinilor *Rhizobium trifolii* și *Sinorhizobium meliloti*

Efectul poletilenglicolului (PEG 6000) asupra dezvoltării bacteriilor *in vitro* este redat în tabelul 4.14. Rezultatele obținute după incubare arată că la concentrația cea mai mică de PEG 6000 (3%) efecte nu au fost semnificative comparativ cu varianta martor. La bacteriile izolate pe plantele de lucernă (*Sinorhizobium meliloti* – SmC, SmD și SmT) s-a observat o descreștere mai pronunțată a numărului de bacterii valorile fiind cuprinse la această concentrație între 0,70 și 0,78 la OD₆₀₀. Concentrația de 6% a prezentat valori între 0,61 și 0,70, de această dată bacteriile tulpinii *Sinorhizobium meliloti* au înregistrat o creștere comparativ cu bacteriile tulpinii *Rhizobium trifolii*, care au prezentat o sensibilitate față de poletilenglicol, creșterea cea mai mică fiind la izolatul RtT (0,61). PEG 6000 la concentrațiile de 9% respectiv 15% a produs o scădere a

bacteriilor comparativ cu varianta martor, iar la concentrația de 30% valorile înregistrate au fost cuprinse între 0,10 și 0,15 la *Rhizobium trifolii*, și între 0,4 și 0,9 la *Sinorhizobium meliloti*.

Tabelul 4.14

Efectul unor concentrații diferite de PEG 6000 asupra creșterii tulpinilor rizobiene						
Tulpina	Graduări ale secetei (PEG 6000) %					
	0%	3%	6%	9%	15%	30%
RtC	0,99 ^a	0,87 ^b	0,64 ^{cd}	0,47 ^b	0,34 ^a	0,15 ^a
RtD	0,98 ^{ab}	0,99 ^a	0,67 ^{abc}	0,49 ^{ab}	0,33 ^a	0,12 ^{ab}
RtT	0,98 ^{ab}	0,92 ^{ab}	0,61 ^d	0,43 ^c	0,33 ^a	0,10 ^{bc}
SmC	0,94 ^b	0,70 ^d	0,68 ^{ab}	0,48 ^b	0,28 ^b	0,04 ^d
SmD	0,96 ^{ab}	0,78 ^c	0,70 ^a	0,52 ^a	0,29 ^b	0,08 ^c
SmT	0,94 ^b	0,73 ^{cd}	0,65 ^{bc}	0,49 ^{ab}	0,26 ^b	0,09 ^{bc}

4.2.3 Efectul pH-ului asupra creșterii și dezvoltării rizobiilor *in vitro*

Rezultatele obținute după incubare la 28°C pe agitator la 120 rpm timp de 72 de ore arată că răspunsul tulpinilor bacteriene variază de la izolat la izolat, de exemplu la valoarea cea mai mică de pH (3,5) creșterea bacteriilor a fost puternic influențată de mediul acid. Izolatul SmT a fost cel mai afectat acesta având o creștere de doar 0,07, acesta fiind izolat de pe plantele de lucernă din zona Turda, unde pH solului a fost unul alcalin (8,01). În cazul tulpinii izolate de pe plantele de trifoi roșu din aceeași locație situația este asemănătoare acestea înregistrând o creștere de doar 0,10, cea mai mică comparativ cu izolatele din același gen analizate la același nivel de pH (Tabelul 4.16).

Dezvoltarea bacteriilor a fost afectată la pH-uri extreme (pH 4 și pH 9), tulpina *Rhizobium trifolii* a rezistat mai bine la un pH acid în timp ce tulpina *Sinorhizobium meliloti* a fost mai rezistentă la un pH alcalin.

Tabelul 4.16

Efectul pH-ului asupra creșterii tulpinilor rizobiene <i>in vitro</i>								
Tulpina	Nivele ale pH-ului							
	6,8	3,5	4	5	6	7,5	8	9
RtC	1,05 ^b	0,29 ^a	0,50 ^c	0,72 ^{cd}	0,89 ^c	0,92 ^b	0,77 ^{ab}	0,66 ^a
RtD	1,01 ^b	0,16 ^{bc}	0,51 ^{bc}	0,65 ^{de}	0,93 ^{bc}	0,86 ^c	0,81 ^a	0,65 ^a
RtT	1,02 ^b	0,10 ^c	0,59 ^{abc}	0,61 ^e	0,96 ^b	0,93 ^b	0,77 ^{ab}	0,64 ^a
SmC	1,13 ^a	0,08 ^c	0,63 ^a	0,82 ^{ab}	0,97 ^{ab}	0,95 ^{ab}	0,74 ^{bc}	0,59 ^b
SmD	1,16 ^a	0,20 ^{bc}	0,62 ^a	0,90 ^a	1,03 ^a	0,99 ^a	0,72 ^c	0,56 ^c
SmT	1,06 ^b	0,07 ^c	0,60 ^a	0,78 ^{bc}	0,89 ^c	0,95 ^{ab}	0,75 ^{bc}	0,55 ^c

4.2.4 Efectul temperaturii asupra creșterii bacteriilor *in vitro*

Toate izolatele bacteriene au fost foarte sensibile la temperatura de 5°C, doar izolatul SmT a avut o creștere mai ridicată (0,05), începând cu temperatura de 10°C densitatea optică a creșterii bacteriilor a fost mai ridicată, la fel tulpina SmT a înregistrat cea mai bună

creștere(0,45) pe când izolatele RtC și RtT cele mai mici creșteri (0,39). La 15°C s-a putut observat o dezvoltare bună a tulpinilor bacteriene dar și la 20°C, situația izolatelor fiind asemănătoare, tulpina de *Sinorhizobium* a consemnat o adaptare mai bună la temperaturile joase comparativ cu tulpina *Rhizobium*. Situația creșterii bacteriilor la temperaturile ridicate a avut un impact mai mare asupra dezvoltării, odată cu depășirea temperaturii de 40°C numărul bacteriilor a scăzut drastic, până la 0,26 la izolatele SmC și SmD, iar la 45°C valorile ajungând chiar și la 0,08 și 0,15 la izolatul SmT care s-a diferențiat de restul izolatelor prin capacitatea de adaptare la temperaturile extreme.

Tabelul 4.18
Efectul temperaturii asupra creșterii tulpinilor *Rhizobium trifolii* și *Sinorhizobium meliloti* *in vitro*

Tulpina	Temperatura (°C)								
	28°C	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	35°C	40°C	45°C
RtC	1,18 ^a	0,03 ^b	0,39 ^{bc}	0,57 ^b	0,77 ^b	0,99 ^b	0,68 ^{abc}	0,26 ^b	0,11 ^{ab}
RtD	1,04 ^c	0,04 ^{ab}	0,40 ^{abc}	0,55 ^b	0,77 ^b	0,97 ^b	0,66 ^{bc}	0,27 ^b	0,08 ^b
RtT	1,06 ^{bc}	0,04 ^{ab}	0,39 ^c	0,56 ^b	0,77 ^b	0,99 ^b	0,65 ^c	0,26 ^b	0,08 ^{ab}
SmC	1,21 ^a	0,04 ^{ab}	0,40 ^{abc}	0,64 ^a	0,85 ^a	1,03 ^a	0,70 ^a	0,36 ^a	0,13 ^a
SmD	1,15 ^{ab}	0,04 ^{ab}	0,44 ^{ab}	0,65 ^a	0,84 ^a	0,99 ^b	0,69 ^{ab}	0,35 ^a	0,14 ^a
SmT	1,16 ^{ab}	0,05 ^a	0,45 ^a	0,66 ^a	0,85 ^a	1,01 ^{ab}	0,70 ^a	0,33 ^a	0,15 ^a

4.3 INFLUENȚA MEDIULUI DE CULTURĂ FĂRĂ AZOT ASUPRA RATEI DE CREȘTERE A TRIFOIULUI ROȘU ȘI A LUCERNEI *IN VITRO*

La soiurile nebacterizate în prima zi soiul Rotrif a avut cea mai mare rată de germinare (90,67%) urmat de soiul Mihaela (73,30%). În a doua zi soiurile Mădălina și Rotrif au atins capacitatea maximă de germinare (100%), iar la soiul Select 2 am observat o rată de germinare mai mică (70%). În a treia zi de observații toate cele patru soiuri au germinat complet (100%) (Figura 4.38).

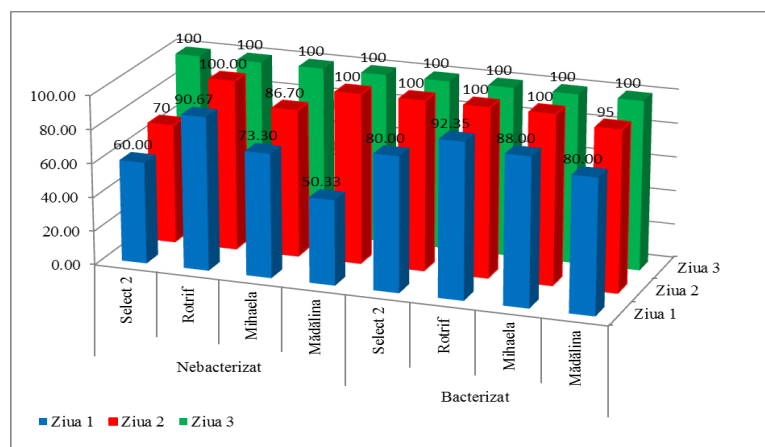


Figura 4.38 Procentul de germinare al semințelor pe mediu cu agar

La soiurile bacterizate germinația semințelor a înregistrat procentaje mai ridicate încă din prima zi comparativ cu semințele nebacterizate, soiurile Select 2 și Mădălina (80%) procent de germinare și Rotrif (92,35%), în ziua a doua de observații doar soiul Mădălina nu a germinat complet procentajul germinării fiind de 95%.

Din datele prezentate în Tabelul 4.20 creșterea răsadurilor nu a înregistrat nici o diferență între cele patru soiuri luate în studiu, în a cincea zi, însă la 10 de zile după inocularea răsadurilor, numai soiul Rotrif (S2) a arătat diferențe semnificative pozitive.

Tabelul 4.20**Cultivarea *in vitro* a plantulelor nebacterizate de trifoi roșu și lucernă**

Perioada	Soiul	Valoarea (cm)	% față de martor	Diferența față de martor	Semnificația diferenței	Testul Duncan
Ziua 5	Media	2.40	100.0	0.00	Mt.	
	S1 (Select 2)	2.31	96.2	-0.09	-	A
	S2 (Rorif)	2.73	113.4	0.32	-	AB
	S3(Mihaela)	2.28	94.7	-0.13	-	A
	S4 (Mădălina)	2.30	95.7	-0.10	-	A
Ziua 10	Media	3.38	100.0	0.00	Mt.	
	S1 (Select 2)	3.45	101.9	0.00	-	CDEF
	S2 (Rorif)	4.13	122.2	0.06	*	FGH
	S3(Mihaela)	3.04	90.0	0.75	-	BC
	S4 (Mădălina)	2.91	86.0	-0.34	-	ABC
Ziua 15	Media	3.70	100.0	0.00	Mt.	
	S1 (Select 2)	3.94	106.6	0.24	-	EFGH
	S2 (Rorif)	4.54	122.9	0.85	**	HI
	S3(Mihaela)	3.22	87.0	-0.48	-	BCD
	S4 (Mădălina)	3.09	83.6	-0.61	-	BCD
Ziua 20	Media	4.01	100.0	0.00	Mt.	
	S1 (Select 2)	4.31	107.4	0.30	-	GHI
	S2 (Rorif)	4.90	122.2	0.89	**	I
	S3(Mihaela)	3.51	87.4	-0.51	-	CDEF
	S4 (Mădălina)	3.33	83.0	-0.68	0	BCDE
Ziua 25	Media	4.04	100.0	0.00	Mt.	
	S1 (Select 2)	4.60	114.1	0.57	-	HI
	S2 (Rorif)	4.93	122.2	0.89	**	I
	S3(Mihaela)	3.79	93.8	-0.25	-	DEFG
	S4 (Mădălina)	2.82	70.0	-1.21	000	ABC
Ziua 30	Media	3.01	100.0	0.57	Mt.	
	S1 (Select 2)	3.99	132.4	0.00	**	EFGH
	S2 (Rorif)	3.46	115.0	0.98	-	CDEF
	S3(Mihaela)	2.35	78.1	0.45	0	A
	S4 (Mădălina)	2.24	74.5	-0.77	0	A
LSD (p 5%)				0.61		
LSD (p 1%)				0.81		DS 0.62-0.77
LSD (p 0.1%)				1.03		

Dupa primele cinci zile de aclimatizare, soiul Rotrif a avut în continuare o dezvoltare foarte bună, aceasta înregistrând o înălțime 2,73 cm, de asemenea au un procentaj mare (60%) de plantuțe au dezvoltat prima frunză adevărată. În ultima zi (ziua 30) frunzele au început să se îngălbenească și se usuce foarte puțin în comparație cu alte soiuri, diferențele între intervalele de

timp nefiind considerate semnificative. La soiul de lucernă (Mihaela), diferențele observate sunt ne semnificative comparativ cu mediile obținute la restul soiurilor analizate. Excepție în ziua 30 de la transplantare, unde soiul a înregistrat o valoare semnificativ mai scăzută (2,35 cm) decât media.

Analizarea soiului Mădălina a indicat o slabă adaptare la factorii experimentali comparativ cu celelalte soiuri studiate. Deși diferențele mediilor din experiment sunt ne semnificative în zilele 5 (2,30 cm), 10 (2,91 cm) și 15 (3,09) după transfer și creșterea în lungime a fost plasată sub medie.

Din datele prezentate în Tabelul 4.21 creșterea la cele patru soiuri bacterizate nu a prezentat nici o diferență. Soiul Rotrif la fel ca și la plantele nebacterizate acesta a avut cea mai bună dezvoltare pe întreaga perioadă de analiză.

Tabelul 4.21

Cultivarea *in vitro* a plantulelor bacterizate de trifoi roșu și lucernă

Perioada	Soiul	Valoarea (cm)	% față de martor	Diferența față de martor	Semnificația diferenței	Testul Duncan
Ziua 5	Media	2.80	100.0	0.00	Mt.	
	S1 (Select 2)	2.60	92.9	-0.20	-	A
	S2 (Rorif)	2.99	106.8	0.19	-	A
	S3(Mihaela)	2.68	95.7	-0.12	-	A
	S4 (Mădălina)	2.93	104.6	0.13	-	A
Ziua 10	Media	4.48	100.0	0.00	Mt.	
	S1 (Select 2)	4.03	90.0	-0.45	0	C
	S2 (Rorif)	4.97	111.0	0.49	*	EF
	S3(Mihaela)	4.50	100.3	0.01	-	D
	S4 (Mădălina)	4.43	98.8	-0.06	-	CD
Ziua 15	Media	4.96	100.0	0.00	Mt.	
	S1 (Select 2)	4.96	100.1	0.00	-	EF
	S2 (Rorif)	5.21	105.1	0.25	-	FG
	S3(Mihaela)	4.97	100.2	0.01	-	EF
	S4 (Mădălina)	4.69	94.6	-0.27	-	DE
Ziua 20	Media	5.22	100.0	0.00	Mt.	
	S1 (Select 2)	5.54	106.2	0.32	-	GHI
	S2 (Rorif)	5.94	113.9	0.73	***	I
	S3(Mihaela)	4.96	95.0	-0.26	-	EF
	S4 (Mădălina)	4.43	85.0	-0.78	000	CD
Ziua 25	Media	5.30	100.0	0.00	Mt.	
	S1 (Select 2)	5.36	101.2	0.07	-	FGH
	S2 (Rorif)	5.49	103.6	0.19	-	GH
	S3(Mihaela)	5.69	107.3	0.39	-	HI
	S4 (Mădălina)	4.66	87.9	-0.64	00	DE
Ziua 30	Media	4.11	100.0	0.00	Mt.	
	S1 (Select 2)	4.40	106.9	0.29	-	CD
	S2 (Rorif)	4.94	120.1	0.83	***	EF
	S3(Mihaela)	3.54	86.0	-0.58	00	B
	S4 (Mădălina)	3.58	87.0	-0.53	00	B
LSD (p 5%)				0,39	DS 0,40	
LSD (p 1%)				0,53		
LSD (p 0.1%)				0,70		

Lungimea plantei la acest soi în ziua 20 a înregistrat o medie de creștere de 5,94 cm, diferențele fiind foarte semnificativ pozitive. Chiar și în ultima zi de analiză (ziua 30) soiul a avut cea mai bună dezvoltare 4,94 cm, acesta fiind ușor afectat de lipsa azotului din mediul de cultură comparativ cu varianta nebacterizată.

La soiul de lucernă Mihaela, diferențele observate sunt ne semnificative până în ziua 20, însă la următoarea analiză (ziua 25) soiul s-a remarcat, acesta având cea mai bună dezvoltare 5,69 cm. Situația s-a schimbat drastic acesta în ziua 30 a avut cea mai slabă dezvoltare a plantei doar 3,54 cm, diferențele fiind semnificativ negative.

Analizarea soiului Mădălina a indicat o slabă adaptare la factorii experimentali comparat cu celelalte soiuri studiate. Deși diferențele mediilor din experiment sunt ne semnificative până în ziua 15 de analiză, soiul s-a deosebit de restul soiurilor printr-o diferență semnificativ negativă în zilele 20, 25 și respectiv 30 de analiză acesta având o medie de creștere de doar 4,43 (ziua 20), 4,66 cm (ziua 21) și 3,58 cm (ziua 30).

CAPITOLUL V

EFFECTUL SALINITĂȚII ASUPRA PLANTELOR DE TRIFOI ROȘU ȘI LUCERNĂ

5.1 GERMINAȚIA SEMINȚELOR DE TRIFOI ROȘU ȘI LUCERNĂ

Efectul salinității (C0 - 0 mM NaCl varianta martor, C1 – 50 mM, C2 – 100 mM, C3 – 150 mM și C4 - 300 mM NaCl) asupra germinației semințelor celor patru soiuri a fost observat timp de 12 zile, în fiecare zi s-au notat diferențele apărute. La varianta martor (0 mM NaCl) s-au observat diferențe între varianta nebacterizată și bacterizată la soiurile analizate. Soiul cu cea mai mare rată de germinare (98%) a fost Rotrif la varianta nebacterizată urmat de soiul Mihaela cu un procent de germinare de 97,5% de această dată la varianta bacterizată. La soiul Select 2 am observat cea mai mică rată de germinare de doar 81,50%. Cea mai mică valoare medie a timpului de germinare (MTG) a fost observat la soiul Mihaela varianta bacterizată și cea mai mare la Select 2 iar valoarea medie de germinare pe zi (MDG) cea mai mare (16,33) a fost observată la soiul Rotrif. Valorile cele mai ridicate ale lungii rădăcinii s-au observat la ambele soiurile de lucernă analizate (Mădălina și Mihaela) atât la varianta bacterizată cât și nebacterizată. Situația s-a păstrat aceeași și în cazul lungimii tulpinii.

La concentrația de 50 mM (C1) rata de germinare a fost de doar 45,0 % la varianta nebacterizată și 53,5% la varianta bacterizată, semințele tratate au rezistat mai bine la salinitate (Tabelul 5.2). La soiul Mihaela am observat la fel ca și în cazul variantei martor cea mai mare

rată de germinare (97 %) la varianta bacterizată și 92,5 % la varianta nebacterizată. Soiul Mădălina de asemenea s-a dezvoltat foarte bine la prima concentrație de sare utilizată, diferențele dintre cele două soiuri de lucernă fiind ne semnificative.

Odată cu creșterea concentrației de sare se poate observa o descreștere a germinației la toate cele patru soiuri analizate (Tabelul 5.3). La o concentrație de 100 mM NaCl germinația semințelor a fost încetinită, valoarea cea mai mare fiind observată la soiul Mihaela varianta bacterizată (94,75%) în timp ce rata cea mai mică de germinare s-a observat la soiul Select 2 varianta nebacterizată (14,5%).

Tabelul 5.2
Valorile medii ale germinației semințelor și plantulelor la concentrația 50 mM NaCl

Soi	Tratament	Lungime rădăcină	Lungime tulpină	Germinație	MTG	MDG	DGS	CVG
Select 2	nebacterizat	1,11 ^f	2,17 ^b	45,0 ^c	3,92 ^{abc}	7,50 ^c	0,13 ^a	0,25 ^{bcd}
	bacterizat	1,22 ^{ef}	2,58 ^b	53,5 ^{bc}	4,53 ^a	8,91 ^{bc}	0,11 ^{ab}	0,22 ^d
Rotrif	nebacterizat	2,15 ^{cde}	2,71 ^{ab}	73,5 ^{ab}	4,33 ^{ab}	12,25 ^{ab}	0,09 ^{bc}	0,23 ^{cd}
	bacterizat	1,83 ^{def}	2,91 ^{ab}	77,5 ^{ab}	4,48 ^a	12,91 ^{ab}	0,08 ^{bc}	0,22 ^d
Mihaela	nebacterizat	2,80 ^{bcd}	3,52 ^a	92,5 ^a	3,03 ^{bc}	15,41 ^a	0,06 ^c	0,33 ^{abc}
	bacterizat	3,58 ^{ab}	2,77 ^{ab}	97,0 ^a	2,86 ^c	16,16 ^a	0,07 ^c	0,35 ^{ab}
Mădălina	nebacterizat	2,98 ^{abc}	3,43 ^a	89,0 ^a	3,14 ^{abc}	14,83 ^a	0,07 ^c	0,31 ^{abcd}
	bacterizat	3,89 ^a	2,85 ^{ab}	87,5 ^a	2,77 ^c	14,58 ^a	0,07 ^c	0,36 ^a

Tabelul 5.3
Valorile medii ale germinației semințelor și plantulelor la concentrația 100 mM NaCl

Soi	Tratament	Lungime rădăcină	Lungime tulpină	Germinație	MTG	MDG	DGS	CVG
Select 2	nebacterizat	0,69 ^c	1,15 ^e	14,5 ^e	2,52 ^a	2,41 ^e	0,49 ^a	0,58 ^a
	bacterizat	0,80 ^c	1,47 ^{de}	25,0 ^{de}	4,33 ^a	4,16 ^{de}	0,26 ^{ab}	0,24 ^a
Rotrif	nebacterizat	0,77 ^c	1,84 ^{cde}	46,0 ^{cd}	3,76 ^a	7,66 ^{cd}	0,13 ^b	0,27 ^a
	bacterizat	0,92 ^c	2,00 ^{bcd}	49,0 ^{cd}	4,15 ^a	8,16 ^{cd}	0,12 ^b	0,25 ^a
Mihaela	nebacterizat	1,48 ^{bc}	2,66 ^{ab}	65,5 ^{bc}	3,64 ^a	10,91 ^{bc}	0,09 ^b	0,27 ^a
	bacterizat	3,35 ^a	2,50 ^{abc}	94,75 ^a	3,27 ^a	15,80 ^a	0,06 ^b	0,30 ^a
Mădălina	nebacterizat	2,39 ^{ab}	3,07 ^a	86,0 ^{ab}	3,72 ^a	14,33 ^{ab}	0,07 ^b	0,27 ^a
	bacterizat	3,36 ^a	2,45 ^{abc}	88,2 ^{ab}	3,59 ^a	14,70 ^{ab}	0,07 ^b	0,28 ^a

La concentrația C3 (150 mM NaCl) s-au observat diferențe între varianta nebacterizată și bacterizată la soiurile analizate (Tabelul 5.4). Rata de germinare observată la concentrația anterioară (100 mM) s-a păstrat și la concentrația de 150 mM. Cea mai mică valoare medie a timpului de germinare (MTG) a fost observat la soiul Rotrif varianta nebacterizată (1,44) și cea mai mare la soiul Mihaela tot la varianta nebacterizată (6,03). Valoarea medie de germinare pe zi (MDG) a fost direct proporțională cu rata de germinare.

Viteza zilnică de germinare (DGS) a avut cea mai mică valoare la soiul Mădălina (0,08) și cea mai mare la soiul Rotrif (0,87). Coeficientul vitezei de germinare (CVG) a fost de

asemenea analizat și am observat cele mai mici valori la soiul Mihaela varianta nebacterizată precum și la soiul Rotrif varianta bacterizată.

Tabelul 5.4
Valorile medii ale germinației semințelor și plantulelor la concentrația 150 mM NaCl

Soi	Tratament	Lungime rădăcină	Lungime tulpină	Germinație	MTG	MDG	DGS	CVG
Select 2	nebacterizat	0,64 ^{bc}	0,64 ^b	3,50 ^c	3,79 ^{ab}	0,58 ^c	2,12 ^a	0,28 ^a
	bacterizat	0,54 ^c	0,51 ^b	16,5 ^c	1,44 ^b	0,58 ^c	1,31 ^{ab}	0,39 ^a
Rotrif	nebacterizat	0,59 ^{bc}	0,58 ^b	11,0 ^c	3,06 ^{ab}	1,83 ^c	0,55 ^b	0,33 ^a
	bacterizat	0,15 ^c	0,12 ^b	4,0 ^c	3,04 ^{ab}	0,67 ^c	0,87 ^{ab}	0,18 ^a
Mihaela	nebacterizat	1,15 ^{abc}	1,17 ^{ab}	33,5 ^{bc}	6,03 ^a	5,58 ^{bc}	0,20 ^b	0,17 ^a
	bacterizat	2,31 ^{ab}	2,26 ^a	60,0 ^{ab}	4,31 ^{ab}	10,00 ^{ab}	0,10 ^b	0,23 ^a
Mădălina	nebacterizat	1,30 ^{abc}	1,29 ^{ab}	51,5 ^{ab}	4,38 ^{ab}	8,58 ^{ab}	0,12 ^b	0,22 ^a
	bacterizat	2,83 ^a	2,21 ^a	73,7 ^a	4,00 ^{ab}	12,29 ^a	0,08 ^b	0,25 ^a

La concentrația de sare cea mai ridicată (300 mM NaCl), s-a putut observa efectul acestuia atât asupra germinației cât și a dezvoltării plantulelor, de asemenea s-au observat și diferențele dintre variantele bacterizate și nebacterizate (Tabelul 5.5).

Toate soiurile nebacterizate analizate nu au reușit să germineze la această concentrație de sare, iar la varianta de tratament bacterizat soiurile au germinat însă rata acesteia este foarte mică la toate soiurile. Cu toate acestea soiurile Mădălina și Select 2 au înregistrat cele mai mari valori (10% respectiv 3,5%), iar cea mai mică rată de germinare s-a observat la soiul Rotrif doar 0,50%. În urma analizării ratei de germinare s-a putut observa efectul inhibitor asupra germinației ba chiar și întreruperea procesului de germinare la această concentrație, deși prin bacterizarea semințelor acestea au reușit să germineze la o concentrație mare de NaCl.

Cea mai mare valoare medie a timpului de germinare (MTG) a fost observat la soiul Mădălina (4,39) și cea mai mică la soiul Rotrif (0,50). Valoarea medie de germinare pe zi (MDG) a fost direct proporțională cu procentul de germinare la toate soiurile analizate.

Tabelul 5.5
Valorile medii ale germinației semințelor și plantulelor la concentrația 300 mM NaCl

Soi	Tratament	Lungime rădăcină	Lungime tulpină	Germinație	MTG	MDG	DGS	CVG
Select 2	nebacterizat	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^a	0,00 ^b
	bacterizat	0,11 ^{ab}	0,18 ^a	3,50 ^{ab}	1,73 ^{ab}	2,75 ^a	0,36 ^a	0,58 ^a
Rotrif	nebacterizat	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^a	0,00 ^b
	bacterizat	0,02 ^b	0,02 ^{ab}	0,50 ^b	0,50 ^b	0,09 ^b	0,75 ^a	0,13 ^{ab}
Mihaela	nebacterizat	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^a	0,00 ^b
	bacterizat	0,05 ^b	0,04 ^{ab}	1,00 ^b	2,00 ^{ab}	0,17 ^b	1,50 ^a	0,13 ^{ab}
Mădălina	nebacterizat	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^a	0,00 ^b
	bacterizat	0,28 ^a	0,00 ^b	10,00 ^a	4,39 ^a	1,66 ^{ab}	0,77 ^a	0,22 ^{ab}

5.2 CREȘTEREA ȘI NODULAREA PLANTELOR DE TRIFOI (*TRIFOLIUM PRATENSE* L.) ȘI LUCERNĂ (*MEDICAGO SATIVA* L) ÎN CASA DE VEGETAȚIE

Răspunsuri diferite ale numărului de nodozități se poate observa în figura 5.9. S-au folosit clase de frecvență (clasa I: 1 – 5, clasa II : 6 - 10, clasa III: 10 - 20, clasa IV: 20 – 50, clasa V: > 50 pentru cunatificarea numărului de nodozități recoltate de pe variantele cu sare nebacterizate cât și de pe cele bacterizate. La varianta martor precum și la concentrația 50 mM NaCl s-au observat o frecvență foarte abundentă a nodozităților, însă pe măsura creșterii concentrației de sare numărul nodozităților scade considerabil la ultima concentrație de 300 mM doar soiurile Mădălina și Mihaela au reușit să dezvolte nodozități, salinitatea afectând restul soiurilor în întregime (Figura 5.9).

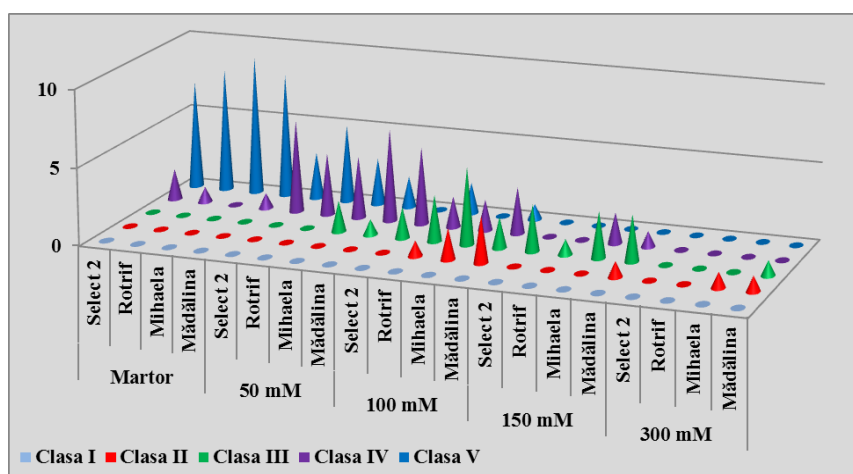


Figura 5.9 Clasele de frecvență a numărului de nodozități la varianta nebacterizată în funcție de concentrațiile de salinitate

La varianta bacterizată s-au observat diferențe în ceea ce privește numărul de nodozități comparativ cu varianta nebacterizată. Un număr mai mare de soiuri au avut o frecvență foarte abundentă la o salinitate destul de ridicată (100 mM NaCl) (Figura 5.10).

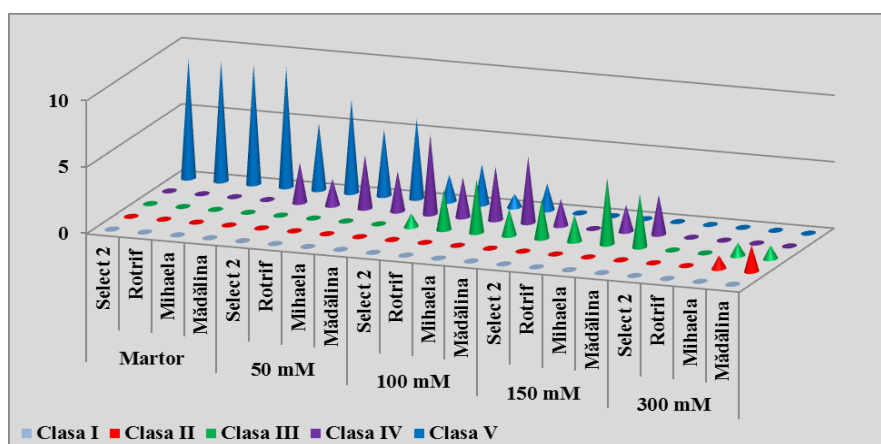


Figura 5.10 Clasele de frecvență a numărului de nodozități la varianta bacterizată în funcție de concentrațiile de salinitate

În urma analizării dimensiunii nodozităților atât la varianta nebacterizată cât și cea bacterizată s-au observat diferențe, dimensiunile fiind mai mari la varianta bacterizată la toate concentrațiile de sare (Figura 5.15).

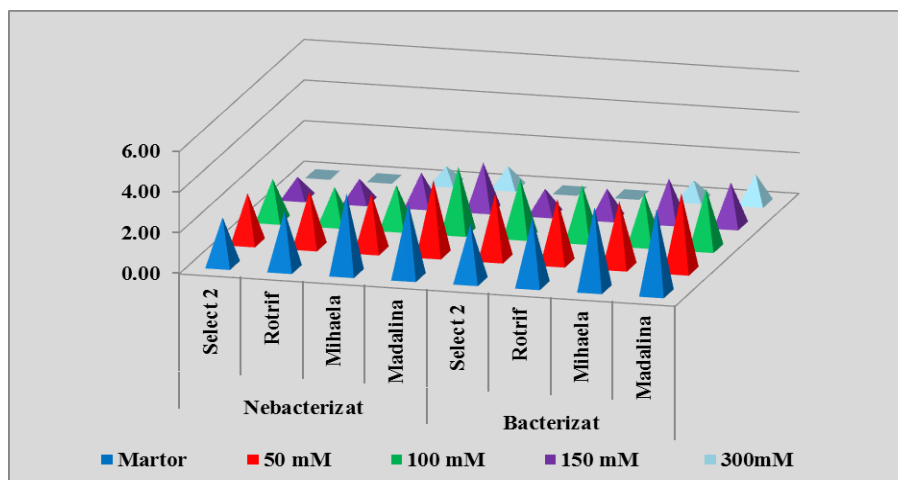


Figura 5.15 Dimensiunea nodozităților analizate de pe plantele la diferite salinități

Cu privire la influența tratamentului (nebacterizat/bacterizat) asupra lungimii rădăcinii soiurilor de lucernă și trifoi din tabelul 5.8 se poate observa cu ușurință influența bacterizării asupra dezvoltării rădăcinii la cele patru soiuri utilizate în experiență.

Tabelul 5.7

Influența tratamentului asupra lungimii rădăcinii soiurilor de lucernă și trifoi

Varianta	Soiul	Lungime rădăcină	% față de martor	Diferența față de martor	Semnificația diferenței	Testul Duncan
Nebacterizat	Media	15,04	100,0	0,00	Mt.	
	Select 2	13,70	91,1	-1,34	-	A
	Rotrif	13,46	89,5	-1,58	-	A
	Mihaela	15,88	105,6	0,84	-	AB
	Mădălina	17,11	113,8	2,07	-	B
Bacterizat	Media	19,68	100,0	0,00	Mt.	
	Select 2	16,53	84,0	-3,15	-	B
	Rotrif	15,88	80,7	-3,80	0	AB
	Mihaela	20,09	102,1	0,41	-	C
	Mădălina	26,21	133,2	6,53	**	D
DL (p 5%)				3,61		
DL (p 1%)				5,28		
DL (p 0,1%)				8,11		

Cu privire la influența tratamentului asupra lungimii tulpinii celor patru soiuri de lucernă și trifoi roșu luate în studiu se poate observa faptul că (Tabelul 5.9) la varianta nebacterizată valorile lungimii tulpinii au variat de la 6,87 cm la soiul Rotrif până la 17,13 cm la soiul Mădălina, acesta din urmă înregistrând diferențe asigurate statistic ca fiind foarte semnificativ pozitive.

Tabelul 5.9

Influența tratamentului asupra lungimii tulpinii soiurilor de lucernă și trifoi roșu

Varianta	Soiul	Lungime tulpină	% față de martor	Diferența față de martor	Semnificația diferenței	Testul Duncan
Nebacterizat	Media	11,65	100,0	0,00	Mt.	
	Select 2	7,53	64,6	-4,13	00	AB
	Rotrif	6,87	59,0	-4,78	00	A
	Mihaela	15,09	129,5	3,43	*	C
	Mădălina	17,13	147,0	5,48	***	D
Bacterizat	Media	14,82	100,0	0,00	Mt.	
	Select 2	9,11	61,5	-5,71	000	B
	Rotrif	8,43	56,9	-6,39	000	AB
	Mihaela	19,64	132,5	4,82	**	E
	Mădălina	22,10	149,1	7,28	***	F
DL (p 5%)				2,40		
DL (p 1%)				3,50		
DL (p 0,1%)				5,30		

În ceea ce privește cantitatea de azot total aflată sub influența concentrațiilor de sare, se poate observa în tabelul 5.11 faptul că soiurile Mihaela și Mădălina au înregistrat în general diferențe foarte semnificativ pozitive indiferent de concentrația de NaCl aplicată.

Tabelul 5.11

Influența concentrației de NaCl asupra conținutului de N total la soiurile analizate

Concentrația	Soiul	Conținutul de azot total	% față de martor	Diferența față de martor	Semnificația diferenței	Testul Duncan
0 mM NaCl	Media	1,31	100,0	0,00	Mt.	
	Select 2	1,09	83,8	-0,21	000	E
	Rotrif	0,96	73,9	-0,34	000	C
	Mihaela	1,60	122,6	0,29	***	L
	Mădălina	1,56	119,7	0,26	***	K
50 mM NaCl	Media	1,54	100,0	0,00	Mt.	
	Select 2	1,23	79,4	-0,32	000	G
	Rotrif	1,01	65,4	-0,53	000	D
	Mihaela	1,38	89,5	-0,16	000	I
	Mădălina	2,56	165,7	1,01	***	P
100 mM NaCl	Media	1,46	100,0	0,00	Mt.	
	Select 2	1,00	68,7	-0,46	000	D
	Rotrif	1,21	82,6	-0,25	000	F
	Mihaela	1,43	97,9	-0,03	000	J
	Mădălina	2,20	150,8	0,74	***	N
150 mM NaCl	Media	1,41	100,0	0,00	Mt.	
	Select 2	0,64	45,3	-0,77	000	B
	Rotrif	1,28	91,2	-0,12	000	H
	Mihaela	1,39	99,2	-0,01	-	I
	Mădălina	2,31	164,3	0,90	***	O
300 mM NaCl	Media	1,37	100,0	0,00	Mt.	
	Select 2	0,00	0,1	-1,37	000	A
	Rotrif	0,00	0,1	-1,37	000	A
	Mihaela	1,97	143,9	0,60	***	M
	Mădălina	3,50	255,9	2,13	***	Q
DL (p 5%)				0,01		
DL (p 1%)				0,02		
DL (p 0,1%)				0,03		

CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI

În baza cercetărilor efectuate se pot formula următoarele concluzii:

1. **Caracterizarea morfologică a nodozităților** și obținerea culturilor pure confirmă autenticitatea izolatelor bacteriene. În urma testării efectuate izolatele bacteriene pot fi considerate ca fiind culturi autentice de rizobii.

2. **Mediul de cultură** cu manitol, extract de drojdii și roșu de Congo a fost cel mai eficient pentru creșterea tulpinilor izolate. Asimilarea de roșu de Congo variază de la cele două tulpini luate în studiu: *Rhizobium trifolii* și *Sinorhizobium meliloti*, acesta nu are proprietatea de a distinge tulpinile bacteriene, dar poate fi utilizat ca marker.

3. **Cultivarea bacteriilor din nodozități** pe un mediu nutritiv cu manitol-agar-extract de drojdii și roșu de Congo, determină obținerea de colonii mucilaginoase, conice, albicioase, cu marginea întreagă, caracteristici specifice tulpinilor bacteriene.

4. În urma colorării Gram a celulelor nu s-a observat nici o diferență între celulele din colonii și cele din nodozități, acestea fiind Gram negative, și cu o formă bacilară, drept urmare s-a putut confirma încă odată **autenticitatea izolatelor bacteriene**.

5. **Dimensiunea nodozităților** celor două specii este diferită, cele aparținând specie *Sinorhizobium meliloti* fiind mai mari. Se constată diferențe între dimensiunea nodozităților și chiar a numărului lor în funcție de locație: la Cojocna (pH 6,8) numărul de nodozități a fost cuprins între 20 și 50, iar la Dej (pH 6,4) și Turda (pH 8,0) numărul nodozităților a fost cuprins între 10 și 20.

6. **Caracterele biochimice** determinate de galeriile API 20 NE și API 20 E au evidențiat diferențe între izolatele bacteriene:

- testului de hidroliză a ureei este negativ la *Sinorhizobium meliloti* și pozitiv la *Rhizobium trifolii*;
- testul de descompunere a argininei este negativ pentru izolatele analizate;
- testul de evidențiere a capacității de reducere a nitraților este negativ, deci bacteriile izolate din nodozități nu au capacitatea de a reduce nitrații la niciuna dintre cele două specii;
- niciuna dintre izolatele studiate nu au capacitatea de a produce hidrogen sulfurat;
- testul citratului de sodiu arată că bacteriile nu posedă capacitatea de a utiliza acest substrat ca sursă unică de carbon;
- testul de hidroliză al amidonului - este pozitiv, ambele specii prezentând capacitatea de a hidroliza acest compus;

- bacteriile aparținând ambelor specii au capacitatea de a degrada glucoza (GLU), arabinoza (ARA), manoza (MNE), manitolul (MAN), N-acetil-glucozamina (NAG). Astfel se poate concluziona că aceste caractere biochimice sunt definatorii pentru tulpinile din fiecare specie.

7. **Rezistența la antibiotice** – toate izolatele au fost rezistente la ampicilină, penicilină G, eritromicină, sulfonamide compuse, gentamicină și colistin sulfat, și au fost sensibile la doxiciclină și nitrofurantoin; astfel, unele antibiotice ar putea fi utilizate în mediile de cultură în vederea izolării tulpinilor rezistente de *Rhizobium trifolii* și *Sinorhizobium meliloti* direct din sol.

8. Conform analizei **PCR-RFLP** se constată:

- tulpinile celor două specii se grupează în două mari clustere conform speciilor cărora aparțin;
- o mare parte a izolatelor provenite de pe plantele de lucernă sunt identice din punct de vedere al profilurilor de restricție, fiind probabil aceeași specie bacteriană;
- conform dendrogramelor sugerează existența unor comunități diferite conform speciilor la care bacteriile aparțin.

9. Condițiile de **salinitate** pot afecta bacteriile din sol, dar nu și din nodozități, toate izolatele au crescut pe YEMA și au tolerat o concentrație de 300 mM NaCl, însă tulpina *Rhizobium trifolii* pare să fie mai sensibilă la salinitate. În cazul tulpinii *Sinorhizobium meliloti* izolatul SmT a avut cea mai mare creștere a numărului de colonii fapt pentru care, acest izolat ar putea fi folosit pentru a inocula plantele de cultură *in situ*. Aceasta ar putea reprezenta o strategie importantă pentru îmbunătățirea eficienței simbiozei *Rhizobium* – leguminoase.

10. Efectul produs de **polietilenglicol PEG 6000** care simulează *in vitro* condițiile de seceta, este unul de scădere a numărului de bacterii *Rhizobium trifolii* de la trifoi, comparativ cu tulpinile izolate de la lucernă care, așa cum arată și literatura de specialitate au o toleranță mai ridicată la secetă.

11. Dezvoltarea bacteriilor a fost afectată la **pH-uri extreme** (pH 4 și pH 9), tulpina *Rhizobium trifolii* fiind mai rezistentă la un pH acid, în timp ce tulpina *Sinorhizobium meliloti* a prezentat rezistență la un pH alcalin, confirmând de asemenea rezultatele existente privind comportarea acestor specii cultivate pe soluri cu pH acid (trifoi), respectiv alcalin (lucerna).

12. Condițiile climatice (**temperaturile extreme**) au un efect sever asupra creșterii și dezvoltării izolatelor *in vitro*, tulpina *Sinorhizobium meliloti* a înregistrat o creștere mai bună la toate valorile de temperatură aceasta fiind mai tolerantă. Izolatele tulpinii *Rhizobium trifolii*, au

prezentat o sensibilitate mai ridicată față de temperaturile extreme în special față de temperatura de 45°C.

13. Analizând comportamentul celor două specii la creșterea pe **mediul MS fără azot** se constată că soiul Mădălina (lucernă) a fost cel mai sensibil și a avut o dezvoltare apropiată de a mediei experienței în intervalul de 30 de zile în care s-au efectuat observațiile. Dintre soiurile de trifoi roșu, soiul Rotrif s-a dezvoltat cel mai bine pe mediul MS fără azot.

14. În urma testării **germinației** la diferite concentrații de clorură de sodiu s-a observat o reducere a procentului de germinație la toate cele patru soiuri analizate odată cu creșterea concentrației de NaCl. În cazul semințelor bacterizate cu tulpinile rizobacteriene, timpul de germinare a fost mai scurt și rata de germinare mai ridicată, comparativ cu semințele nebacterizate.

15. La **testarea *in vivo*** a efectului salinității asupra plantelor se poate remarca o reducere semnificativă a dezvoltării acestora, diferențele observate în studiul nostru confirmă faptul că specii din aceeași familie pot avea toleranță diferită la stresul salin. Testarea salinității asupra nodulării și a creșterii plantelor de trifoi roșu și lucernă în casa de vegetație a demonstrat faptul că, pe măsura creșterii concentrației de NaCl, numărul nodozităților scade considerabil la concentrația de 300 mM; doar soiurile Mădălina și Mihaela reușind să dezvolte nodozități. Din punct de vedere agronomic acest lucru poate avea implicații importante în ceea ce privește selectarea soiurilor pentru cultivarea în condiții de salinitate.

16. Influența **tratamentului (nebacterizat/bacterizat)** asupra lungimii rădăcinii și tulpinii soiurilor de lucernă și trifoi a fost observată cu ușurință. Cele mai ridicate valori s-au semnalat în cazul soiurilor Rotrif și Mădălina la varianta bacterizată. Analiza indicilor biometrici în experiența în care s-a testat efectul salinității *in vivo*, demonstrează o stimulare a proceselor de creștere și dezvoltare a plantelor luate în studiu în cazul bacterizării. Plantele bacterizate s-au dezvoltat mai bine, au avut o rezistență mai ridicată la clorura de sodiu, au prezentat un număr mai mare de frunze, și un număr mai mare de nodozități fixatoare de azot.

17. În ceea ce privește **cantitatea de azot total** fixată sub influența concentrațiilor de sare, se poate observa faptul că lucerna (soiurile Mihaela și Mădălina) a înregistrat în general diferențe foarte semnificativ pozitive indiferent de concentrația de NaCl aplicată. Soiul Mădălina a înregistrat cele mai ridicate valori ale conținutului de azot total indiferent de varianta de tratament.

Recomandări

Cercetări suplimentare cu privire la caracterizarea moleculară a izolatelor bacteriene tolerante sau rezistente la salinitate și la alți factori de stres sunt necesare pentru a putea identifica tulpini rizobiene care să poată fi utilizate în vederea bacterizării plantelor cultivate pe terenuri defavorizate.

În vederea valorificării potențialului rizobiilor pentru fixarea simbiotică a azotului atmosferic, se recomandă cultivarea în funcție de pH-ul solului, analizele de sol fiind o etapă obligatorie pentru înființarea unei culturi.

De asemenea recomandăm continuarea cercetărilor cu privire la eficacitatea bacterizării cu rizobii și la alte specii de leguminoase datorită importanței cruciale a acestora în creșterea productivității.

Selecția soiurilor de trifoi roșu și lucernă ar trebui să fie o componentă majoră a activității viitoare legate de simbioza rizobii - leguminoase în țara noastră în special în zonele afectate de factorii de stres.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Abd-Alla M. H., A.A. Issa, T. Ohyama, 2014, Impact of harsh environmental conditions on nodule formation and dinitrogen fixation of legumes, In book: *Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation*, Ed. InTech, p. 131-190.
2. Beijerinck, M. W., 1888, Die Bacterien der Papilionaceenknöllchen, The root-nodule bacteria, *Botanische Zeitung*, Vol 46: 725-804.
3. Bordeleau, L.M., D. Prévost, 1994, Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments, *Plant and Soil*, 161:115-125.
4. Fauri M.Y., Y.E. El-Mahi, G. A. El-Hassan, 2001, Effects of some salts and sodicity on the growth of a *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain isolated from a salt-affected soil, *Canadian Journal of Microbiology*, 47(9):807-812.
5. Graham P.H., 1969, Selective medium for growth of *Rhizobium*, *Applied Microbiology*, 17(5):769-770.
6. Hagedron C., 1979, Relationship of antibiotic resistance to effectiveness in *Rhizobium trifolii* populations. *Soil Sciences and Society of America.*, 43: 921-925.
7. Hamdia M.A., M.A.K. Shaddad, 2010, Salt tolerance in crop plants, *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 6(3):64-90.
8. Hasanuzzaman Mirza, Kamrun Nahar, Masayuki Fujita, 2013, Plant response to salt stress and role of exogenous protectants to mitigate salt-induced damages, in *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress* (eds P. Ahmad, M.M. Azooz, and M.N.V. Prasad), Springer, New York, pp. 25-87.
9. Laguerre, G., Marie-Reine Allard, Françoise Revoy, Amarger Noelle, 1994, Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(1):56-63.
10. Mohammadi, K., Y. Sohrabi, G. Heidari, Shiva Khalesro, M. Majidi, 2012, Effective factors on biological nitrogen fixation, *African Journal of Agricultural Research*, 7(12):1782-1788.

11. Pop Rodica, 2006, Microbiologie generală. Aplicații practice, Ed. Toderescu, Cluj-Napoca, p. 118.
12. Somasegaran, P., H.J. Hoben, 1985, Methods in legume-*Rhizobium* technology, University of Hawaii, NifTAL project.
13. Vidican R., R. Pop, D. Pamfil, and I. Rotar, 2004, The study of *Rhizobium* bacteria with some species from the *Fabaceae* family. Buletin USAMV/CN., 60:48-52.
14. Zahran Hamdi Hussein, 1999, *Rhizobium*-Legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 63(4):968-989.
15. Zarnea, G., 1984, Tratat de microbiologie generală, Vol. II, Ed. Academiei Republicii Socialiste România, p. 226-255.