



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



Biolog Zamfira Dincă

(REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT)

**CERCETĂRI PRIVIND DIVERSITATEA GENETICĂ A
POPULAȚIILOR DE BACTERII RIZOBIALE LA SOIA
DETERMINATĂ PRIN METODE MOLECULARE ȘI
SPECTROSCOPICE**

**Conducător științific:
Prof. univ. dr. ROXANA VIDICAN**

**CLUJ-NAPOCA
2015**

CUPRINS

INTRODUCERE	3
Capitol.1 NOȚIUNI GENERALE PRIVIND CULTURA DE SOIA	3
Capitol.2 FIXAREA AZOTULUI LA SOIA	4
Capitol.3 METODE MOLECULARE ȘI SPECTROSCOPICE UTILIZATE PENTRU CARACTERIZAREA IZOLATELOR RIZOBIALE	4
Capitol.4 OBIECTIVELE TEZEI DE DOCTORAT	5
Capitol.5 MATERIAL ȘI METODĂ	6
Capitol.6 REZULTATE ȘI DISCUȚII	7
6.1. REZULTATE PRIVIND CARACTERELE MORFOLOGICE ALE SOIURILOR DE SOIA (LUNGIMEA RĂDĂCINII, NUMĂRUL DE NODOZITĂȚI, TALIA PLANTEI, NUMĂRUL DE FRUNZE)	7
6.2. REZULTATE PRIVIND STUDIUL NODOZITĂȚILOR, STUDIUL METODELOR DE CONSERVARE A NODOZITĂȚILOR ȘI DE DEZINFECȚIE	9
6.2.1. Rezultate privind studiul caracterelor morfologice a nodozităților	8
6.2.2. Rezultate privind testarea protocoalelor de conservare a nodozităților	9
6.2.3. Rezultate privind testarea protocoalelor de dezinfecție a nodozităților	9
6.3. REZULTATE PRIVIND IZOLAREA BACTERIILOR ÎN CULTURĂ PURĂ ȘI CREȘTEREA ACESTORA PE MEDIU DE CULTURĂ	10
6.4. REZULTATE PRIVIND DETERMINAREA ÎNSUȚIRILOR MOLECULARE ALE IZOLATELOR RIZOBIALE PRIN METODA PCR-RAPD	11
6.5. REZULTATE PRIVIND DETERMINAREA CARACTERISTICILOR SPECTRALE ALE IZOLATELOR RIZOBIALE PRIN FOLOSIREA SPECTROSCOPIEI FT-IR	14
CONCLUZII	16
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	18

INTRODUCERE

Secolul nostru este marcat de necesitatea creșterii producției agricole, obiectiv care, pentru a fi atins, impune eforturi considerabile. În contextul în care suprafețele agricole înregistrează scăderi importante iar necesarul de hrană este tot mai crescut, o mai bună înțelegere și folosire a mecanismelor ecologico-simbionte poate fi o soluție. Amplificarea procesului de fixare biologică a azotului la plante oferă pe deasupra și perspectiva unei agriculturi ecologice.

Derularea unor cercetări asupra genotipurilor de soia autohtone și a unor populații de bacterii rizobiale indigene din sol ar putea argumenta extinderea suprafețelor cultivate cu soia în România, în contextul unei agriculturi durabile.

Populația indigenă de bacterii fixatoare de azot este prea puțin studiată în țara noastră, deși este bine cunoscută importanța acestor microorganisme și marea lor diversitate. Totuși, creșterea suprafețelor cultivate cu soia din ultimii ani și creșterea producțiilor cu până la 47% (221 000 tone) în anul 2014 față de anul 2013 va suscita interesul asupra acestei plante și implicit asupra simbiozei cu bacteriile rizobiale.

CAPITOLUL I

NOȚIUNI GENERALE PRIVIND CULTURA DE SOIA

În primul capitol sunt prezentate noțiuni generale despre cultura de soia și răspândirea acestei culturi în țara noastră și în lume. Totodată, sunt abordate aspecte despre taxonomia și încadrarea sistematică a acestei leguminoase, precum și despre morfologia și fiziologia creșterii acesteia.

Interesul pentru această cultură este motivat de valoarea nutritivă mare a soiei, fiind cea mai importantă sursă de proteine vegetale cunoscută de om. Totodată, soia este cea mai ieftină și la îndemână sursă de proteine (IDRISA și colab., 2010).

Diversitatea genotipică a acestei plante este mare, diferite soiuri fiind cultivate pe tot parcursul anului (DWEVEDI și KAYASTHA, 2011).

CAPITOLUL II

FIXAREA AZOTULUI LA SOIA

În capitolul II este abordată fixarea azotului la soia, fiind explicată noțiunea de “simbioză”, dar și mecanismele de interacțiune dintre plantă și bacteriile rizobiale. Bacteriile rizobiale responsabile de fixarea azotului la soia fac parte cu preponderență din genul *Bradyrhizobium*, iar specia reprezentativă acestui gen pentru soia este *Bradyrhizobium japonicum*.

Capitolul II abordează cele mai importante caracteristici ale acestei specii, sub aspect taxonomic, morfologic și tinctorial dar și prin prisma caracteristicilor nutriționale și de creștere pe mediu de cultură. De asemenea, în ultimul subcapitol sunt prezentate caracteristicile genomice ale bacteriilor din genul *Bradyrhizobium*.

CAPITOLUL III

METODE MOLECULARE ȘI SPECTROSCOPICE UTILIZATE PENTRU CARACTERIZAREA IZOLATELOR RIZOBIALE

Capitolul III descrie în mod sistematic metodele Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) și spectroscopia FT-IR folosite pentru studiul diversității genetice ale izolatelor rizobiale. Principiile acestor metode, precum și avantajele și dezavantajele folosirii acestor metode sunt prezentate în două subcapitole.

Tehnica RAPD se bazează pe utilizarea unor oligonucleotide scurte de secvențe necunoscute ca primeri pentru amplificarea unei cantități de ADN (BARDAKCI, 2001), în timp ce spectroscopia FT-IR are ca principiu general interacțiunea radiațiilor din domeniul infraroșu ($400-4500\text{ cm}^{-1}$) cu proba studiată (BĂDILESCU, 1982).

CAPITOLUL IV

OBIECTIVELE TEZEI DE DOCTORAT

În capitolul IV este argumentată alegerea temei de cercetare și sunt prezentate scopul și obiectivele cercetării. Cadrul natural al zonei experimentale este de asemenea caracterizat din punct de vedere geologic, hidrologic, termic și pluviometric.

Scopul tezei de doctorat îl constituie studiul diversității genetice a 25 de izolate rizobiale recoltate din câmpul experimental cultivat cu soia de la SCDA Turda prin metoda Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) și prin spectroscopia cu infraroșu și transformată Fourier (FT-IR).

Obiectivele propuse pentru atingerea scopului vizează:

1 Studiul caracterelor morfologice la soiurile de soia și studiul morfologic al nodozităților:

- studiul caracterelor morfologice la cele 25 de soiuri de soia (lungimea rădăcinii, numărul de nodozități, talia plantei, numărul de frunze);
- studiul morfologic al nodozităților (dimensiunea, forma și culoarea în interior).

1. Elaborarea metodologiei de conservare și de sterilizare a nodozităților de soia și identificarea celor mai bune metode :

- evaluarea metodelor de conservare a nodozităților prin: păstrarea la frigider (4°C), prin uscare la temperatura camerei în gel de siliciu și prin păstrarea în pământ;
- evaluarea metodelor de dezinfecție a nodozităților prin: folosirea hipocloritului de sodiu (4,14%), a clorurii mercurice (0,1%) și a lui Tween 20 (0,002%).

2. Evidențierea caracterelor morfologice și tinctoriale ale izolatelor rizobiale și creșterea acestora pe mediu de cultură:

- studiul morfologic al coloniilor bacteriene pe diferite medii de cultură (Manitol agar cu extract de drojdii și roșu Congo și pe mediul Luria Bertani (LB));
- studiul proprietăților morfologice și tinctoriale ale bacteriilor rizobiale.

3. Evidențierea diversității genetice ale izolatelor rizobiale cu ajutorul markerilor Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD):

- optimizarea protocolului de extracție a ADN-ului și de amplificare cu markerii Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) pentru studiul izolatelor rizobiale;
- evidențierea profilurilor RAPD ale fragmentelor de ADN amplificate;
- diferențierea pe clustere a izolatelor în funcție de distanțele genetice dintre acestea.

4. Evidențierea caracteristicilor spectrale ale izolatelor rizobiale prin folosirea spectroscopiei cu infraroșu (FT-IR).

- evidențierea unor caracteristici spectrale a macromoleculelor care pot fi folosite ca repere în diferențierea izolatelor rizobiale;
- evaluarea capacității spectroscopiei FT-IR de a identifica și caracteriza izolatele rizobiale.

CAPITOLUL V MATERIAL ȘI METODĂ

În capitolul V sunt prezentate materialul biologic dar și metodele de cercetare folosite în câmpul experimental și în laborator.

Materialul biologic folosit pentru câmpul experimental a fost reprezentat de 25 de soiuri de soia (*Glycine max* L. Merr.) de proveniență românească și străină.

Asupra acestor soiuri s-au făcut observații cu privire la lungimea rădăcinii, numărul de nodozități, talia plantei, numărul de frunze, evidențiindu-se corelațiile care se stabilesc între numărul de nodozități și ceilalți indicatori morfologici ai plantei.

Având în vedere că pentru studiile moleculare și spectroscopice s-au folosit nodozități conservate, s-au studiat trei metode de conservare diferite: prin păstrarea nodozităților la frigider la 4°C, păstrarea la temperatura camerei în gel de siliciu și păstrarea în pământ. Totodată, alte trei metode de dezinfectie a nodozităților au fost studiate, în vederea alegerii celei mai eficiente dintre ele (cu hipoclorit de sodiu 4,14%, clorură mercurică 0,1% și Tween20-0,02%). Caracterele morfologice ale nodozităților,

precum și caracteristicile morfologice de creștere a bacteriilor pe mediile CRYEMA și LB au fost de asemenea studiate.

Tehnicile de extracție a ADN-ului și de amplificare prin folosirea primerilor Random Amplified Polimorphic DNA (RAPD) au fost optimizate conform metodei propuse de LODHI și colab., 1994, adaptate de RODICA POP și colab., 2008.

Prin utilizarea spectroscopiei FT-IR pe cultura bacteriană în faza exponențială de creștere s-au obținut spectre caracteristice izolatelor rizobiale. Tehnica de lucru specifică acestui tip de spectroscopie se bazează pe pastilarea probelor cu bromură de potasiu și înregistrarea acestora pe domeniul spectral 400-4000 cm^{-1} .

CAPITOLUL VI

REZULTATE ȘI DISCUȚII

6.1. REZULTATE PRIVIND CARACTERELE MORFOLOGICE ALE SOIURILOR DE SOIA (LUNGIMEA RĂDĂCINII, NUMĂRUL DE NODOZITĂȚI, TALIA PLANTEI, NUMĂRUL DE FRUNZE)

Analizând caracterele morfologice ale celor 25 de genotipuri de soia, se constată în ambii ani experiențiali diferențe semnificative, distinct semnificative și foarte semnificative. Aceste diferențe se constată la toate cele patru caractere morfologice analizate.

Rezultatele obținute indică o mare varietate genetică, varietate care poate fi folosită în ameliorarea genotipurilor prin îmbunătățirea caracterelor morfologice (KUMAR și colab., 2014).

Comparând cei doi ani experimentali, 2012 și 2013, se constată diferențe în anul 2013 față de anul 2012, ceea ce reflectă influența factorilor climatici dar și influența factorilor tehnologici și de asolament asupra expresiilor fenotipice ale soiurilor.

Condițiile climatice nefavorabile culturii de soia din anul 2013 au determinat scăderea taliei plantelor, a numărului de nodozități și a numărului de frunze din acest an față de anul 2012. În schimb, lungimea rădăcinii la soiurile studiate a fost mai mare în anul 2013, aspect care, în condițiile de secetă excesivă din lunile iulie, este explicabil.

În ceea ce privește influența numărului de nodozități asupra caracterelor morfologice ale plantelor (lungimea rădăcinii, talia plantei, numărul de frunze) se constată existența unei corelații puternice între aceste caractere..

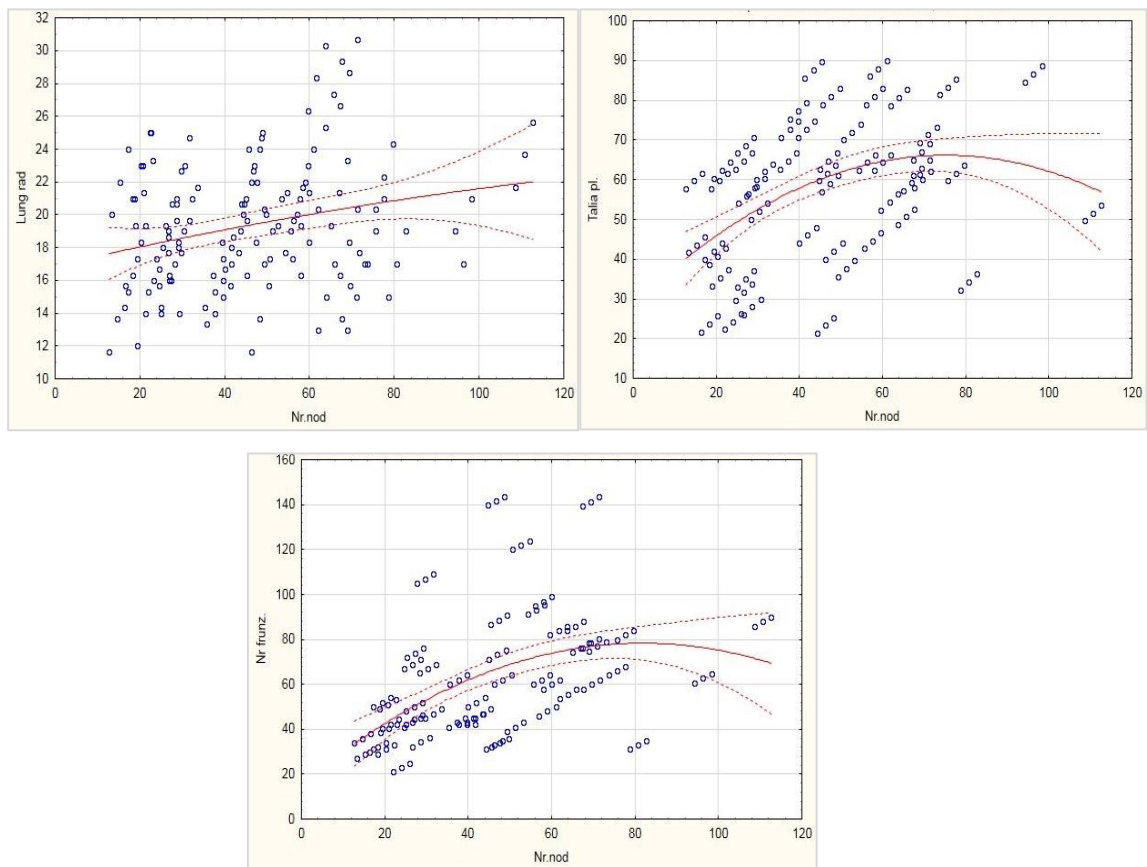


Figura 1. Influența numărului de nodozități asupra lungimii rădăcinii, taliei plantei și numărului de frunze

6.2. REZULTATE PRIVIND STUDIUL NODOZITĂȚILOR, STUDIUL METODELOR DE CONSERVARE A NODOZITĂȚILOR ȘI DE DEZINFECȚIE

6.2.1. Rezultate privind studiul caracterelor morfologice a nodozităților

Observațiile făcute asupra formei, mărimii și culorii în interior au evidențiat că nodozitățile analizate au caracteristicile morfologice specifice plantelor de soia. Forma sferică (COSKAN și DOGAN, 2011) a fost observată la toate izolatele nodulare iar

mărimea acestora a fost cuprinsă între 2,5 și 5,5 cm în concordanță cu cea consemnată de COSKAN și DOGAN, 2011.

6.2.2. Rezultate privind testarea protocoalelor de conservare a nodozităților

Analizând rezultatele obținute prin cele trei metode de conservare, se constată că cea mai bună metodă este cea de păstrare a nodozităților în gel de siliciu la temperatura camerei. Proporția nodozităților neafectate de contaminanți este de 84% în cazul acestei metode față de 36% în cazul celorlalte două metode de conservare (păstrarea în frigider la 4°C sau păstrarea în pământ).

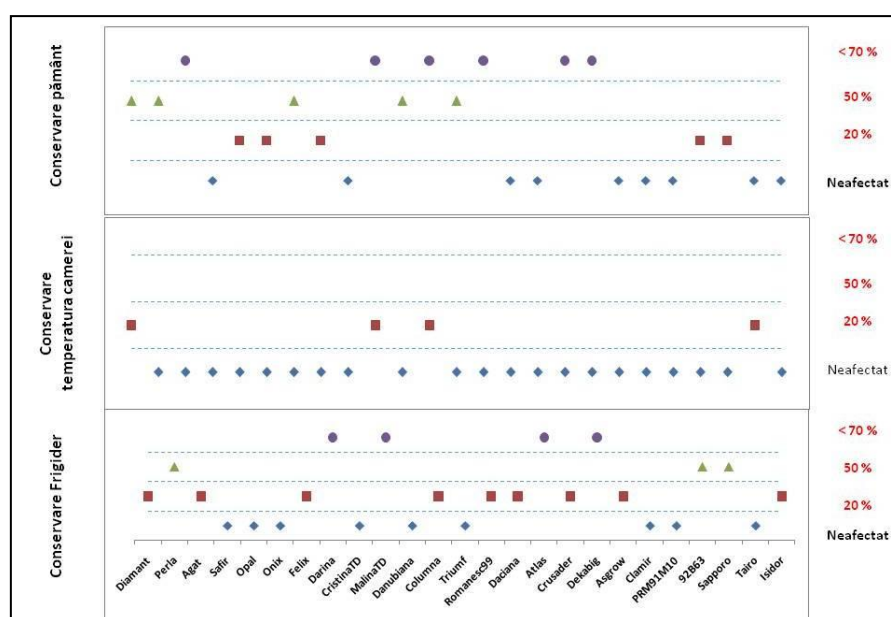


Figura 2. Reprezentarea grafică a rezultatelor obținute prin cele trei metode de conservare a nodozităților

Această metodă este recomandată și de SOMASEGARAN și HOBEN, 1985 și de TALUKDER și colab., 2008. Prin această metodă, nodozitățile pot fi păstrate de la 6 la 12 luni fără a fi afectată viabilitatea bacteriană.

6.2.3. Rezultate privind testarea protocoalelor de dezinfecție a nodozităților

Din analiza rezultatelor obținute prin cele trei metode de dezinfecție (cu hipoclorit de sodiu 4,14%, cu clorură mercurică 0,1%, și cu Tween 20 0,002%) se constată că în cazul primei metode, chiar dacă dezvoltarea bacteriană este bună (52% față de 44%

înregistrată cu celelalte metode) se înregistrează și cei mai mulți contaminanți (8), ceea ce poate însemna o putere prea slabă de acțiune a dezinfectantului.

Dintre cele două metode cu care s-au înregistrat un număr redus de contaminanți, cea mai eficientă din acest punct de vedere este cea care utilizează $HgCl_2$ 0,1% (doar 2 plăci contaminate).

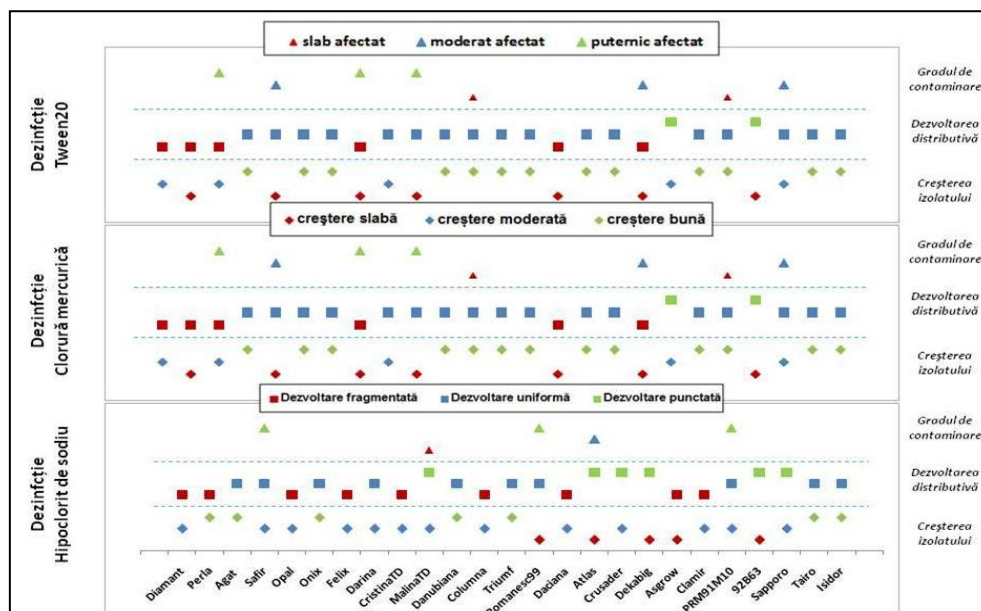


Figura 3. Reprezentarea grafică a rezultatelor obținute prin cele trei metode de dezinfecție (cu hipoclorit de sodiu 4,14%, cu clorură mercurică 0,1%, și cu Tween 20 0,002%)

Chiar dacă toate cele trei metode sunt consemnate în literatură, fiind utilizate ca proceduri de rutină în dezinfecția nodulară, utilizarea clorurii mercurice ca dezinfectant a fost consemnată cu bune rezultate de către TALUKDER și colab., 2008 și RATHORE și colab., 2009; GACHANDE și KHANSOLE, 2011.

6.3. REZULTATE PRIVIND IZOLAREA BACTERIILOR ÎN CULTURĂ PURĂ ȘI CREȘTEREA ACESTORA PE MEDIU DE CULTURĂ

Rezultatele obținute în urma creșterii pe mediul Manitol agar cu extract de drojdii și roșu Congo (CRYEMA) și pe mediul Luria-Bartani (LB) arată că izolatele rizobiale prezintă colonii cu formă rotundă, regulată, convexe, alb-rozalii, mucilaginoase, care

alcalinizează mediul Luria Bertani, acestea fiind caracteristici ale speciilor din genul *Bradyrhizobium*.

6.4. REZULTATE PRIVIND DETERMINAREA ÎNSUȘIRILOR MOLECULARE ALE IZOLATELOR RIZOBIALE PRIN METODA PCR-RAPD

Extracțiile de ADN prin protocolul propus de LODHI și colab., 1994, modificat de RODICA POP și colab., 2008, au avut ca rezultate concentrații și purități care au corespuns din punct de vedere calitativ și cantitativ cu standardele de utilizare impuse de tehnica RAPD.

În urma analizei gelurilor obținute cu toți cei 11 primeri utilizați, s-au constatat profiluri electroforetice diferite ale izolatelor rizobiale.

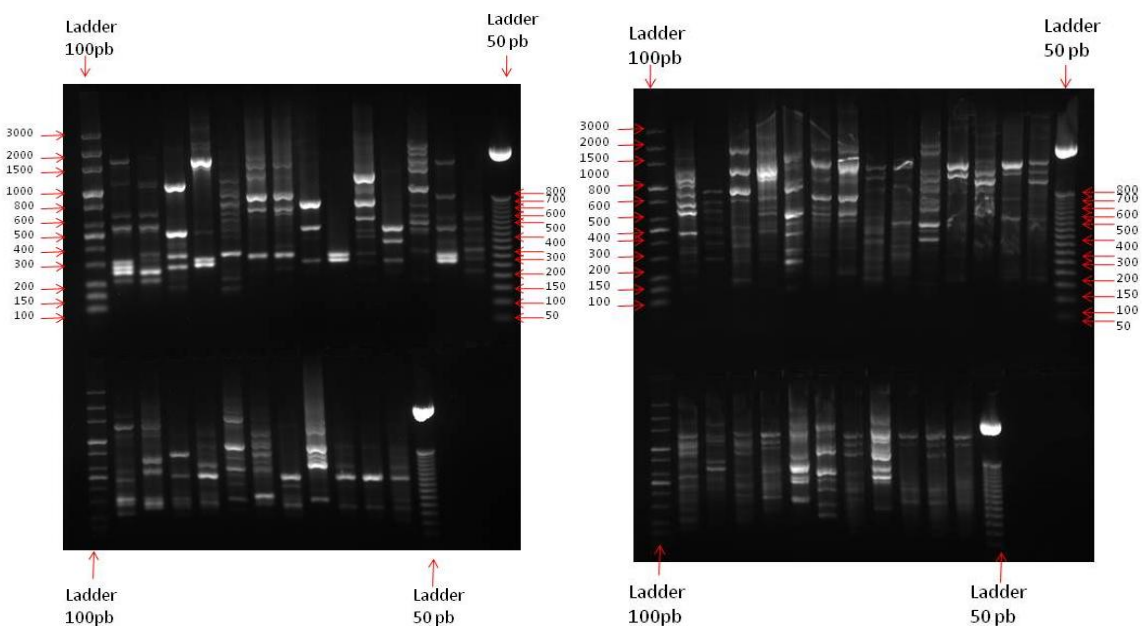


Figura 4. Producții de amplificare RAPD-PCR ai izolatelor rizobiale obținute cu primerii 1 (*923S7) și 2 (*923S8)

Semnificația benzilor: 1 – Ladder 100 pb; 2 – RI-DI-1; 3 – RI-PE-2; 4 – RI-AG-3; 5 – RI-SA-4; 6 – RI-OP-5; 7 – RI-ON-6; 8 – RI-FE-7; 9 – RI-DA-8; 10 – RI-CR-9; 11 – RI-MA-10; 12 – RI-RI-DA-11; 13- RI-CO-12; 14 – RI-TR-13; 15 – RI-RO-14; 16 – Ladder 50 pb; 17 – Ladder 100 pb; 18 – RI-DA-15; 19 – RI-AT-16; 20 – RI-CR-17; 21 – RI-DE-18; 22 – RI-AS-19; 23 – RI-CL-20; 24 – RI-PR-21; 25 – RI-92-22; 26 – RI-SA-23; 27 – RI-TA-24; 28 – RI-IS-25; 29 – Ladder 50 pb.

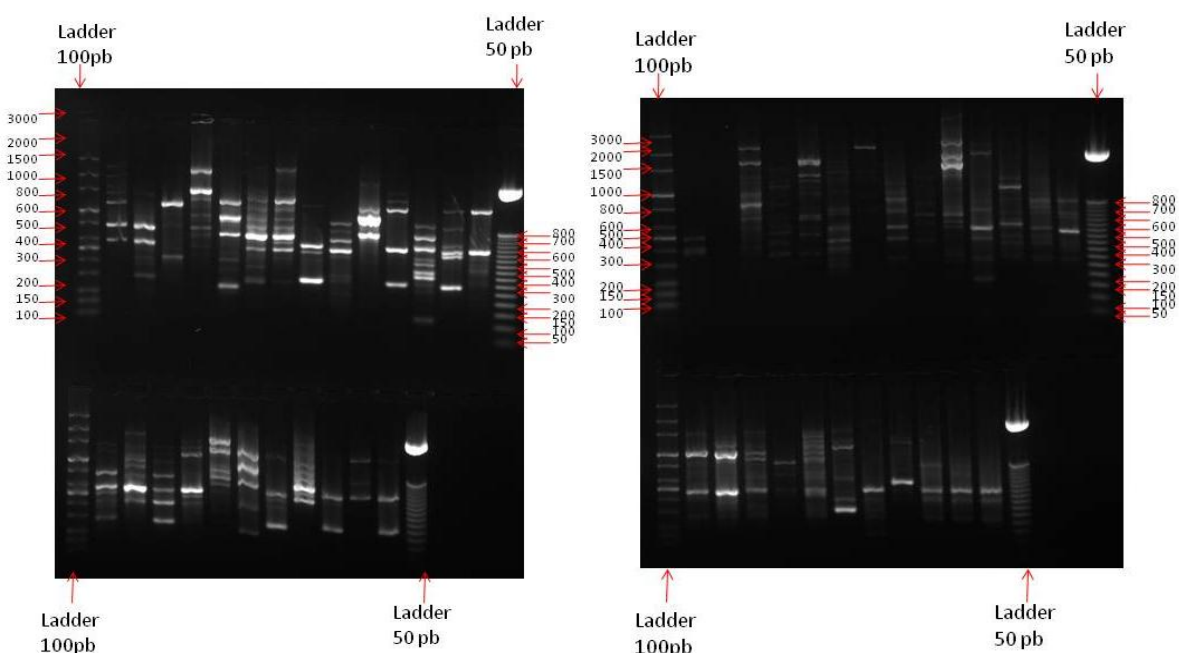


Figura 5. Producții de amplificare RAPD-PCR ai izolatelor rizobiale obținute cu primerii 3 (*923S9) și 4 (*923T0)

Semnificația benzilor: 1 – Ladder 100 pb; 2 – RI-DI-1; 3 – RI-PE-2; 4 – RI-AG-3; 5 – RI-SA-4; 6 – RI-OP-5; 7 – RI-ON-6; 8 – RI-FE-7; 9 – RI-DA-8; 10 – RI-CR-9; 11 – RI-MA-10; 12 – RI-RI-DA-11; 13- RI-CO-12; 14 – RI-TR-13; 15 – RI-RO-14; 16 – Ladder 50 pb; 17 – Ladder 100 pb; 18 – RI-DA-15; 19 – RI-AT-16; 20 – RI-CR-17; 21 – RI-DE-18; 22 – RI-AS-19; 23 – RI-CL-20; 24 – RI-PR-21; 25 – RI-92-22; 26 – RI-SA-23; 27 – RI-TA-24; 28 – RI-IS-25; 29 – Ladder 50 pb.

Rezultatele arată că toate cele 25 de izolate rizobiale au amprente ADN diferite.

Numărul total de fragmente polimorfice care s-a obținut în urma reacției cu primerii RAPD a fost de 301 de fragmente, cu o medie de 27,36 fragmente/primer.

Cei 11 primeri utilizați au emis fragmente polimorfice, monomorfismul nefiind prezent la niciunul dintre primeri.

Dendrogramele obținute prin calcularea coeficienților Jaccard și Nei-Li Dice arată că izolatele rizobiale studiate pot fi divizate în două mari cluster bazate pe profilurile lor RAPD. În ceea ce privește primul mare cluster, în care sunt incluse majoritatea izolatelor (80%), alte două grupuri se pot distinge în cadrul acestui grup. Primul subgroup este reprezentat de un singur izolat, care este total distinct de restul izolatelor, în timp ce majoritatea izolatelor sunt grupate în cadrul celui de-al doilea subgroup.

Celălalt mare cluster este format din cinci izolate apropiate dar care nu sunt identice și care formează un grup foarte distinct, care diferă semnificativ de restul izolatelor apropiate.

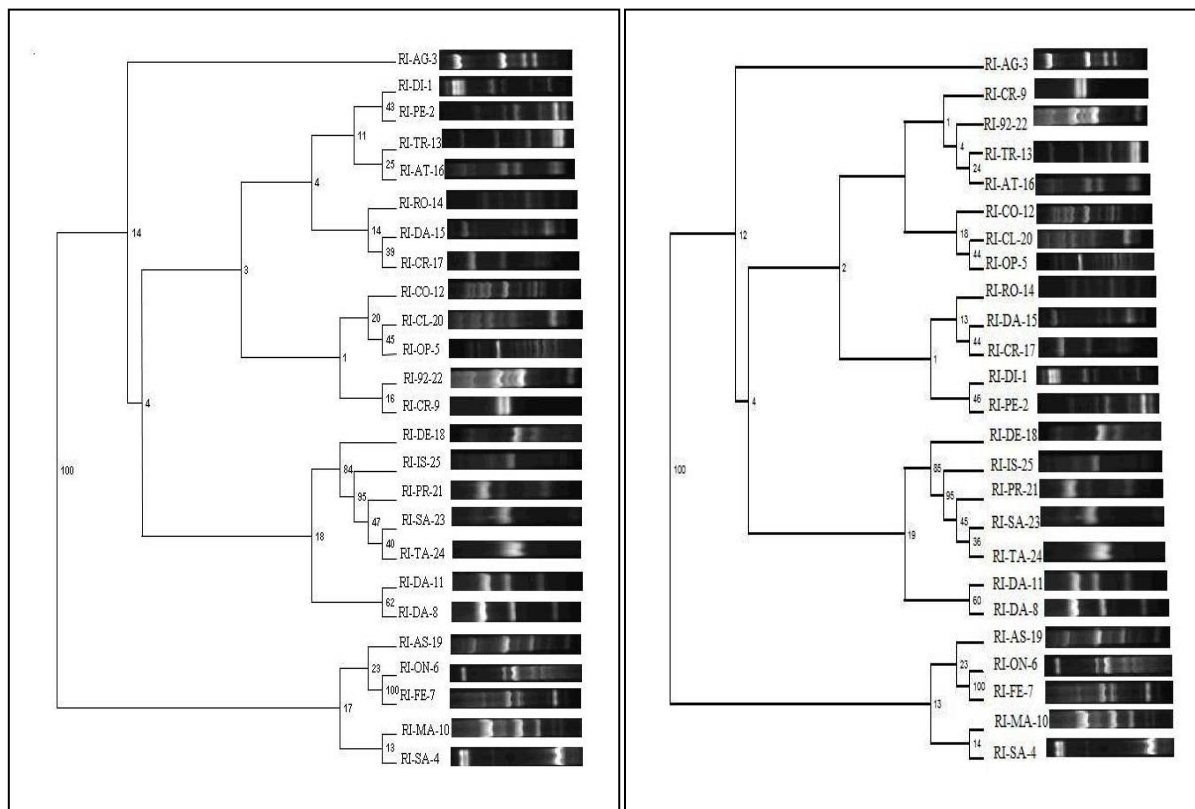


Figura 6. Dendrograma UPGMA (generată de programul TreeView (PAGE, 1996) pe baza matricei de distanțe genetice calculată cu indicii Jaccard și Nei-Li/Dice (Programul FreeTree HAMPL și colab., 2001)

Identificarea unei mari diversități a izolatelor rizobiale poate fi explicată prin diferențele geografice și climatice ale zonelor de proveniență a acestora, dar și de diversitatea plantelor gazdă (SAEKI, 2011). Astfel, comunitatea bacteriilor rizobiale se poate modifica în funcție de soiul gazdă și de temperatură, în cadrul aceleiași zone cultivate sau în zone diferite, în funcție de condițiile geografice, textura solului, pH-ul solului, salinitatea, etc. (HOWIESON și BALLARD, 2004).

6.5. REZULTATE PRIVIND DETERMINAREA CARACTERISTICILOR SPECTRALE ALE IZOLATELOR RIZOBIALE PRIN FOLOSIREA SPECTROSCOPIEI FT-IR

Studiul celor 25 de izolate rizobiale prin spectroscopia FT-IR pe domeniul spectral $\sim 800-1800 \text{ cm}^{-1}$ a relevat un număr de 8 benzi la următoarele lungimi de undă: ~ 1034 , ~ 1072 , ~ 1153 , ~ 1240 , ~ 1398 , ~ 1453 , ~ 1545 , ~ 1659 .

Aceste frecvențe de undă sunt în concordanță cu cele prezentate de ZEROUAL și colab., 1994 și sunt caracteristice speciei *Bradyrhizobium japonicum*. Aceste frecvențe sunt fie la aceeași intensitate ($\sim 1659 \text{ cm}^{-1}$ sau $\sim 1080 \text{ cm}^{-1}$), fie la câteva unități apropiere de acestea, o marjă a diferenței de 4 cm^{-1} fiind determinată de sensibilitatea spectrofotometru cu care se analizează probele. Totuși, modificări mai mari ale frecvențelor de undă pot indica transformări celulare, vibrații ce au loc în structura amidei I, amidei II, precum și datorită vibrațiilor grupării PO_2^- , a grupării COOH și a legăturii C-N (MARIA BINDEA, 2013).

Alte diferențe spectrale care s-au obținut față de ZEROUAL și colab., 1994 au fost identificate la $\sim 889 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 980 \text{ cm}^{-1}$ și $\sim 1738 \text{ cm}^{-1}$. Benzile de la $\sim 1738 \text{ cm}^{-1}$ au fost consemnate la *Bradyrhizobium japonicum* de LÓPEZ GARCÍA și colab., 2001 și sunt benzi atribuite P(3HB) (Poli-3-hidroxibutirat).

Diferențele obținute în jurul acestor unde spectrale indică modificări metabolice care au loc în celulă (AL-QADIRI și colab., 2008) și care pot fi caracteristice fiecărui izolat rizobial în parte.

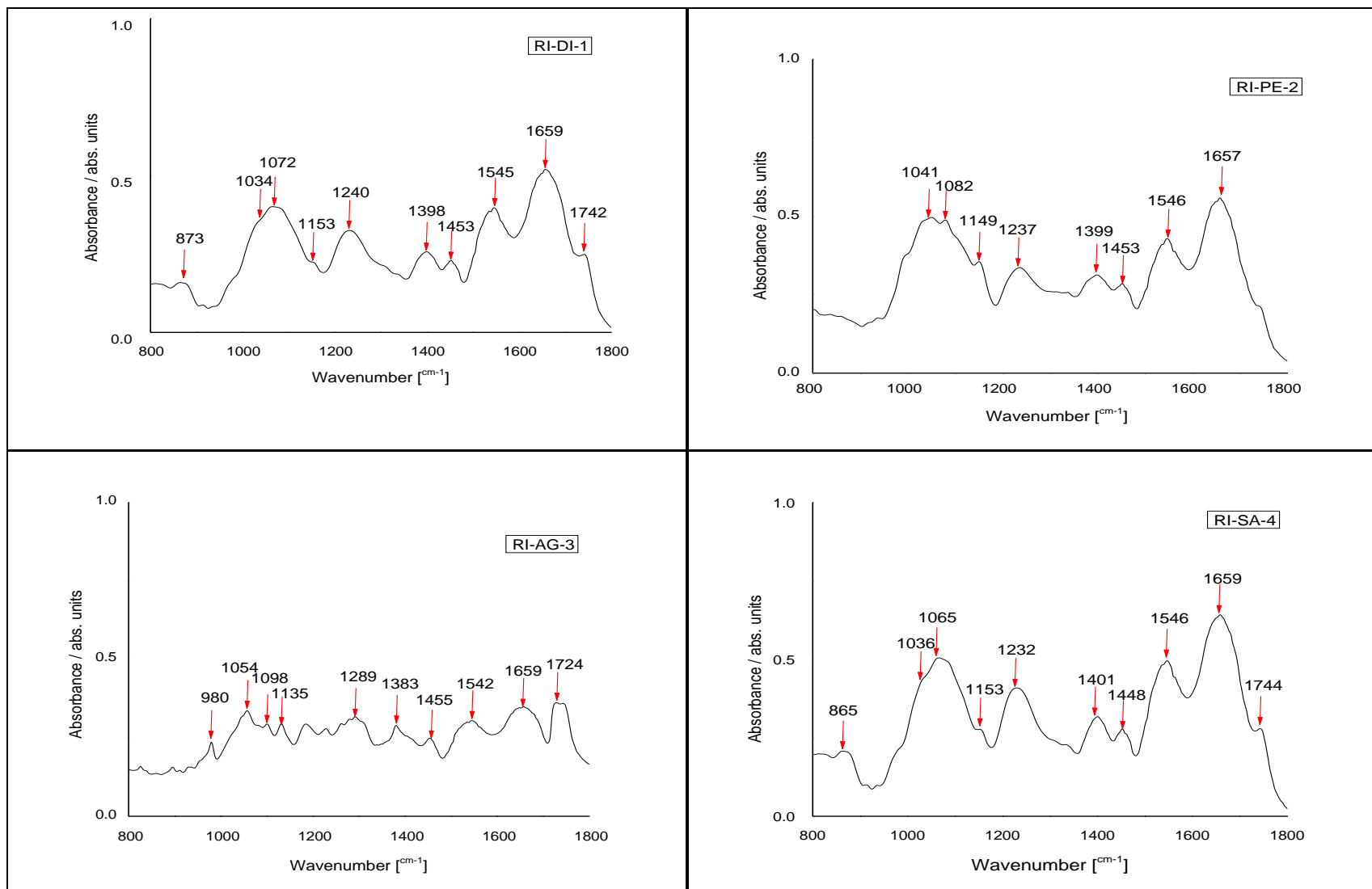


Figura 7 – Spectrele FT-IR ale izolatelor rizobiale RI-DI-1, RI-PE-2, RI-AG-3 și RI-SA-4 în domeniul spectral ~ 800-1800 cm⁻¹

CONCLUZII

1. Tematica abordată prin prezenta lucrare de doctorat și care vizează studiul molecular și spectroscopic al bacteriilor rizobiale este o premieră în România. De asemenea, izolarea bacteriilor rizobiale din nodozitățile conservate, pentru studii moleculare și spectroscopice, nu s-a mai făcut în țara noastră.

2. În prezenta cercetare, au fost testate două metode noi de conservare a nodozităților iar izolatele rizobiale au provenit de la 25 de soiuri cultivate în același câmp experimental.

3. Datele referitoare la caracterele morfologice la soia obținute în doi ani experimentali (2012-2013) au evidențiat existența unor diferențe semnificative între cele 25 de soiuri. Acest fapt dovedește pe de-o parte, o mare variabilitate genetică a soiurilor, iar pe de altă parte, influența factorilor pedo-climatici, tehnologici și de asolament asupra expresiilor fenotipice ale soiurilor. Sub aspectul influenței numărului de nodozități asupra caracterelor morfologice ale plantelor (lungimea rădăcinii, talia plantei, numărul de frunze) se constată existența unei corelații puternice între aceste caractere.

4. Morfologia nodozităților, sub aspectul formei și mărimii acestora, s-a dovedit a fi specifică nodozităților de soia, deși forme particulare, nespecifice dar totuși consemnate în literatură, au fost observate.

5. Conservarea nodozităților pe o perioadă mai lungă de timp este o variantă demnă de luat în calcul în contextul în care materialul proaspăt este greu de procurat. Modul de păstrare, în vederea eliminării apei din țesut este foarte important. Tocmai de aceea, din cele trei metode de conservare testate, cea de păstrare a nodozităților la temperatura camerei în gel de siliciu a avut cele mai bune rezultate.

6. Dezinfecția nodozităților în vederea izolării bacteriene are un rol extrem de important mai ales când se folosesc nodozități conservate. Infestarea plăcilor cu contaminanți proveniți de pe suprafața nodozităților poate fi preîntâmpinată dacă nodozitățile sunt dezinfectate cu clorură mercurică (0,1%). Datorită toxicității mari, această substanță trebuie foarte bine îndepărtată de pe suprafața nodozităților.

7. Studiul caracterelor morfologice pe diferite medii de cultură, caracteristicile tinctoriale și de motilitate ale izolatelor rizobiale, au demonstrat apartenența taxonomică a acestora la genul *Bradyrhizobium*. Totuși, câteva caractere nespecifice acestui gen au fost observate la unele izolate, ceea ce dovedește trăsătura distinctă ale acestora față de restul izolatelor.

8. Adaptarea metodei de extracție a ADN-ului de la plante la bacteriile rizobiale și optimizarea metodei de amplificare cu markeri RAPD s-au putut realiza, exigențele de validitate ale metodei fiind îndeplinite.

9. Polimorfismul izolatelor rizobiale obținut cu markerii RAPD, demonstrează atât prezența unor tulpini indigene specifice zonei, cât și o posibilă specificitate a acestor izolate pentru fiecare soi în parte. Diversitatea mare a izolatelor s-ar putea explica prin transferul lateral de material genetic între un inocul care a fost introdus la un moment dat și tulpinile indigene, precum și rearanjării acestor tulpini de-a lungul adaptării la condițiile zonale.

10. Gruparea izolatelor rizobiale pe baza distanțelor genetice dintre acestea a evidențiat două mari cluster. Primul cluster include 80% din izolate, fiind divizat în alte două grupuri. Celălalt cluster este format din cinci izolate apropiate dar care nu sunt identice.

11. Din analiza spectroscopică FT-IR s-a putut observa profilul diferit al izolatelor rizobiale analizate. Totuși, benzile caracteristice bacteriei *Bradyrhizobium japonicum* au fost prezente la toate cele 25 de izolate rizobiale.

12. Variațiile apropiate benzilor caracteristice pot indica modificări metabolice care au loc în celulă și care pot fi caracteristice fiecărui izolat rizobial în parte.

13. Analizele microbiologice, moleculare și spectroscopice ale izolatelor rizobiale au demonstrat profilurile diferite ale acestora. Înțelegerea și explicarea diversității genetice mari ale bacteriilor rizobiale, sub aspect molecular și nu numai, necesită studii de genomică mult mai amănunțite.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. AL-QADIRI H. M., AL-ALAMI N. I., LIN M., AL-HOLY A. G., CAVINATO A. G., RASCO B. A., 2008. Studying the bacterial growth phases using Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis. *J. Rapid. Meth. Aut. Mic*: 16: 73-79.
2. BARDAKCI F., 2001. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Review Article. *Turk. J. Biol.* :25: 185-196.
3. BĂDILESCU S., TOADER M., GIURGICĂ M., TĂLPUȘ V. 1982. Spectroscopia în infraroșu a polimerilor și auxiliarelor. Editura Tehnică, București.
4. BINDEA MARIA, 2013. Studiul comparativ prin metode fizice moderne al unor bacterii cu risc zoonotic, taxonomic diferite (*Escherichia coli* și *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Teză de doctorat, Cluj Napoca: 43-56.
5. COSKAN A., DOGAN K., 2011. Symbiotic nitrogen fixation in soybean: SOYBEAN physiology and Biochemistry. Hany El-Shemy (Ed). Available from www.intechopen.com :167-182.
6. DWEVEDI A., KAYASTHA M., 2011. Soybean: a multifaceted legume with enormous economic capabilities. Soybean-biochemistry, chemistry and physiology, prof. Tzi-Bun Ng (Ed.). In tech. Available from: <http://www.intechopen.com/books/soybean-biochemistry-chemistry-and-physiology/soybean-a-multifaceted-legume-with-enormous-economic-capabilities>.
7. EL-FIKI A., 2006. Genetic diversity in rhizobia determined by Random amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of Agriculture & Social Sciences*, 1813- 2235.
8. GACHANDE B. D., KHANSOLE G. S., 2011. Morphological, cultural and biochemical characteristics of *Rhizobium japonicum* syn and *Bradyrhizobium japonicum* of soybean. *Bioscience Discovery*: Vol. 02, No.1.
9. HOWIESON J., BALLARD R., 2004. Optimising the legume symbiosis in stressful and competitive environments within southern Australia – some contemporary thoughts. *Soil. Biol. Biocem.*:36:1261-1273.

10. KUMAR A., PANDEY A., AOCHEN C., PATTANAYAK A., 2014. Evaluation of genetic diversity and interrelationships of agro-morphological characters in soybean (*Glycine max*) genotypes. Proc. Natl. Acad. Sci., India. Sect. B Biol. Sci.: 1746-2250.
11. IDRISA Y. L., OGUNBAMERU N. B. O., AMAZA P. S., 2010. Influence of farmers socio-economic and technological characteristics on soybean seeds technology adoption in southern Borno State, Nigeria. Agro-Science Journal of Tropical Agriculture, Food, Environmental and Extension. Vol. 9. No. 3: 209-214.
12. LODHI M., A., GUANG-NING Z., WEEDEN F., N., F., REISCH B., I., 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species and *Ampelopsis*. Plant Molecular Biology Report:12 (1): 6-13.
13. LOPEZ-GARCIA SILVINA L., VAZQUEZ T., E., E., FAVELUKES G., LODEIRO A., R., 2001. Improved soybean association of N-starved *Bradyrhizobium japonicum*. Journal of Bacteriology Volume 183, No. 24: 7241-7252.
14. NAUMANN D., KELLER S., HELM D., SCHULTZ CH., SCHEIDER B., 1995. FT-IR spectroscopy and FT-Raman spectroscopy are powerful analytical tools for the non-invasive characterization of intact microbial cells. Journal of Molecular Structure. Vol. 347: 399-405.
15. POP RODICA, 2008. Studiul variabilității somaclonale la vița de vie cu ajutorul markerilor molecular. Teză de doctorat, Cluj Napoca: 91-100.
16. RATHORE M., S., SHEKHAWAT N. S., GEHLOT H. S., 2009. Need of assessing rhizobia from their plant growth promoting activities associated with native wild legume inhabiting aravalli ranges of Rajasthan, India. Botany Research International: 2 (2):115-122.
17. SAEKI YUICHI, 2011. Characterization of soybean-nodulating rhizobial communities and diversity-Soybean-Molecular aspect of breeding. In tech. <http://www.intechopen.com>.
18. SIKORA S., REDZEPOVIC S., PEJIC I., KOZUMPLIK V., 1997. Genetic diversity of *Bradyrhizobium japonicum* field population revealed by RAPD fingerprinting. Journal of Applied Microbiology, 82: 527-531.

19. SOMASEGARAN P., HOBEN H. J., 1985. Methods in legume-Rhizobium technology. University of Hawaii NifTAL Project and MIRCEN. <http://www.ctahr.hawaii.edu/bnf/Downloads/Training/Rhizobium%20technology/Title%20Page.PDF>: 10-53.
20. TALUKDER M. S., SOLAIMAN A. R. M., KHANAM D., RABBANI M. G., 2008. Characterization of some *Rhizobium* isolates and their effectiveness on pea. Bangladesh J. Microbiol.: Volume 25. Number 1: 45-48.
21. ZEROUAL W., CHOISY C., SYLVIA MARIA DOGLIA, HELENE BOBICHON, ANGIBOUST J., F., MANFAIT M., 1994. Monitoring of bacterial growth and structural analysis as probed by FT-IR spectroscopy. Biochimica et Biophysica. Acta 1222: 171-178.