

<https://doi.org/10.15407/frg2024.01.060>

УДК 581.1:579.6:631.847.211:577.112.3

ВПЛИВ РІЗНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ПРОЛІНУ І ГЛІЦИНУ НА РОСТОВУ АКТИВНІСТЬ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* В УМОВАХ IN VITRO ТА ПРОРОСТАННЯ НАСІННЯ СОЇ

С.Я. КОЦЬ, А.В. ХРАПОВА, К.П. КУКОЛ

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України,
03022, Київ, вул. Васильківська, 31/17
e-mail: khrapova.anastasiia@gmail.com

Використання амінокислот, як компонентів різних препаратів у передпосівній обробці рослин все частіше привертає увагу як у сільськогосподарській сфері, так і серед науковців-біологів та фізіологів рослин. Амінокислоти є одними з найактивніших учасників метаболізму, які здатні стимулювати проростання насіння, регулювати інтенсивність фотосинтезу, сприяти розвитку і росту, збільшувати врожайність та активувати захисні механізми рослин за дії стресорів. Актуальними є дослідження, спрямовані на вивчення можливості їх екзогенного впливу на рослини сої, для забезпечення стабільного розвитку організму, а також формування та функціонування бобово-ризобіального симбіозу. У зв'язку з цим метою роботи було підібрати концентрації амінокислот (проліну та гліцину), які як компоненти середовища культивування бульбочкових бактерій сприяли б підвищенню їх ростової активності в умовах in vitro, та дослідити стимулювальний вплив на розвиток проростків сої. Показано, що внесення у середовище культивування ризобій високих концентрацій проліну та гліцину (15 мМ) негативно впливало на показник оптичної густини бактеріальної суспензії та титр життєздатних клітин *Bradyrhizobium japonicum* 6346. За використання проліну як додаткового компонента у поживному середовищі та збільшення його концентрації до 10 мМ відзначено найістотніше підвищення титру мікробних клітин, порівняно з іншими концентраціями цієї амінокислоти і контрольним варіантом. Проаналізувавши вплив обробки сої розчинами амінокислот на динаміку проростання насіння виявили, що пролін вже з четвертої доби зі збільшенням концентрації інтенсифікував цей процес. З'ясовано, що здебільшого амінокислоти сприяли початковому розвитку проростків сої або ж забезпечували його на рівні контрольних, окрім гліцину, який, починаючи з концентрації 5 мМ, пригнічував ріст кореня. Отримані результати свідчать, що пролін та гліцин у разі їх внесення в концентрації 10 мМ у середовище культивування ризобій забезпечують максимальне підвищення титру мікробних клітин *B. japonicum* 6346 порівняно із застосуванням інших концентрацій цих амінокислот. Водночас обробка насіння сої розчинами проліну та гліцину сприяє початковому розвитку проростків. Таким чином, отримані дані підтверджують перспективність подальшого вивчення способів використання цих амінокислот для обробки посівного матеріалу *Glycine max* (L.) Мегг. спільно з інокулянтами або шляхом залучення їх у

Цитування: Коць С.Я., Храпова А.В., Кукол К.П. Вплив різних концентрацій проліну і гліцину на ростову активність бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* в умовах in vitro та проростання насіння сої. *Фізіологія рослин і генетика*. 2024. 56, № 1. С. 60–73. <https://doi.org/10.15407/frg2024.01.060>

склад мікробних препаратів з метою забезпечення ефективного формування і функціонування бобово-ризобіального симбіозу за впливу стресових чинників.

Ключові слова: *Glycine max* (L.) Merr., *Bradyrhizobium japonicum* 6346, амінокислоти, пролін, гліцин.

На сьогодні застосування біологічних препаратів на основі бульбочкових бактерій у процесі вирощування бобових культур, у тому числі сої, характеризується високою ефективністю, екологічною безпечністю, економічною доцільністю, доступністю і перспективністю, що підвищує рентабельність та конкурентоспроможність рослинної продукції [1—3]. Застосування інокулянтів посилює утворення бульбочок на коренях сої, покращує умови азотного живлення внаслідок фіксації молекулярного азоту, сприяє формуванню більшої площі листків, висоти рослин, кількості бічних пагонів, вузлів, бобів, насіння, що й підвищує врожайність [4, 5]. Однак з огляду на постійне біотичне та абіотичне навантаження на рослинний організм, однієї інокуляції буває недостатньо для ефективної реалізації генетичного потенціалу продуктивності. Тому, крім бактеризації насіння, у процесі вирощування бобових все частіше використовують різноманітні агенти біологічного чи хімічного походження для захисту рослин від стресових чинників навколишнього середовища, як з метою забезпечення стабільного очікуваного урожаю, так і з метою його збільшення. Багато наукових досліджень присвячено використанню мікроелементів, фунгіцидів, гербіцидів, нанокарбоксилатів металів, лектинів, вітамінів, регуляторів росту та фітогормонів як речовин, які б сприяли ефективному росту і розвитку рослин за впливу стресорів [6—14].

Використання амінокислот, як компонентів різних препаратів для передпосівної обробки рослин, все частіше привертає увагу фахівців сільського господарства і науковців. Амінокислоти беруть участь у найрізноманітніших біохімічних процесах, у тому числі у синтезі речовин, від яких залежать ростові процеси рослин [15—18].

Для рослинного організму характерні дві групи амінокислот: протеїногенні (або білкові) і непротеїногенні (вільні, небілкові). Вільні амінокислоти в рослинах виконують низку важливих функцій: є транспортною формою азоту, попередниками фітогормонів, захищають від несприятливих абіотичних чинників тощо [19]. Наприклад, у бобових рослин, що ростуть у зоні помірного клімату, домінуючу роль у транспорті азоту відіграють вільні протеїногенні аспарагін і глутамін. У тропічних бобових таку функцію виконує алантоїн або алантоїнова кислота, у деревних порід — аргінін, у арахісу — метилглутамін. Непротеїногенні амінокислоти можуть бути запасною формою азоту і сірки. Так, орнітин, цитрулін, гомоаргінін накопичуються у насінні як резерв азоту, а під час проростання використовуються для утворення необхідних проростку амінокислот. У стресових ситуаціях рослини здатні накопичувати велику кількість вільних амінокислот, які зв'язані в пептиди та білки. Саме ці амінокислоти виконують роль захисного механізму за наявності несприятливих

чинників, оскільки швидко включаються в процес метаболізму. Накопичення вільних амінокислот в умовах стресу на всіх стадіях росту рослин вказує на їх можливу роль в осмотичній модифікації.

Високий рівень засвоєння поживних елементів забезпечують в першу чергу такі амінокислоти, як глутамінова кислота, лізин, гістидин, гліцин, які утворюють хелатні сполуки з мікроелементами. Глутамінова кислота також вважається буферною речовиною для нейтралізації цитоплазми клітин, покращує процес відкриття та закриття продихів [20]. Гліцин є компонентом так званих структурних білків, які вивільнюються під час біотичних стресів. Ці білки зміцнюють клітинні стінки та обмежують проникнення патогенів у тканини рослини. Гліцин підтримує цілісність цитоплазматичної мембрани та тилакоїдів. У свою чергу валін, треонін, серин, пролін, аланін, аргінін і тирозин позитивно впливають на рівень метаболізму, завдяки чому рослини швидше відновлюються в стресових умовах. Аргінін містить найвище співвідношення азоту до вуглецю, що робить його формою зберігання органічного азоту, необхідного рослинам у великих кількостях для створення нуклеїнових кислот і білків [21]. Пролін є осмотично активною захисною сполукою. Також відомо, що пролін може виступати антиоксидантом, а його накопичення в рослинах відбувається за впливу високих і низьких температур, окисативного стресу, дії ультрафіолетового випромінювання, вирощуванні за підвищених концентрацій NaCl та важких металів [22].

Повідомляється про ефективну екзогенну дію амінокислот на рослини при позакореновому підживленні, а також за передпосівного обробітку насіння. Tania et al. [23] встановили, що праймування насіння кукурудзи проліном та гліцинбетаїном позитивно впливає на схожість, довжину пагона та кореня, їхню масу й фотосинтетичні пігменти в умовах дії холодового стресу, при цьому кращі результати отримано за концентрації 20 мМ порівняно з концентрацією 10 мМ. Akinmolayan et al. [24] з'ясували, що при замочуванні насіння вігні упродовж 12 год перед посівом у 2,5, 5 і 10 мМ розчинах проліну і гліцинбетаїну покращується толерантність, ріст і врожайність рослин за умов дефіциту води, особливо за дії гліцинбетаїну 5 мМ і проліну 2,5 мМ. Ghafoor et al. [25] у своїх дослідженнях показали, що за дефіциту води екзогенне застосування проліну значно покращувало ріст рослин вівса, вміст проліну в листках, площу метаксилеми, товщину мезофілу, діаметр кореня, товщину кори кореня, епідермісу кореня, площу перетину судинного пучка і товщину склеренхіми стебла.

Зважаючи на такий широкий спектр функцій амінокислот, особливої актуальності набувають дослідження, спрямовані на вивчення можливості екзогенного їх впливу на рослини сої, як речовин, що могли б забезпечити стабільний розвиток організму, формування і функціонування бобово-ризобіального симбіозу та ефективне формування врожаю, особливо за дії стресових чинників довкілля. Одним із перспективних напрямів вивчення дії амінокислот на бобові рослини є поєднання бактеризації з обробкою амінокислотами, а також оптимізація комбінованих препаратів, як за складом амінокислот, так і за їхньою концентрацією.

Метою роботи було підібрати такі концентрації амінокислот проліну та гліцину, які як компоненти середовища культивування бульбочкових бактерій сприяли б підвищенню їх ростової активності в умовах *in vitro* та дослідити стимулювальний вплив на розвиток проростків сої.

Методика

Об'єктом дослідження були бульбочкові бактерії *B. japonicum* 6346 та насіння сої сорту Самородок, занесений в Реєстр сортів з 2018 р., рекомендований для вирощування у Лісостепу та Степу. Сорт середньоранньостиглий з вегетаційним періодом — 97—108 діб. Вміст білка — 41,0—41,7 %, олії — 21,1—22,6 %. Потенціал урожайності — 5,0 т/га. Тип використання — зерновий. Маса 1000 насінин — 138,8—149,2 г.

Бульбочкові бактерії *B. japonicum* 6346 — активний виробничий штам-стандарт із Колекції штамів симбіотичних та асоціативних азотфіксувальних мікроорганізмів Інституту фізіології рослин і генетики НАН України.

Пролін — $C_5H_9NO_2$ (піролідин- α -карбонова кислота) — амінокислота гетероциклічного ряду, яка входить до складу білків усіх організмів. У чистому вигляді утворює безбарвні легкорозчинні у воді кристали, що плавляться за температури близько 220 °С. Пролін є протейногенною амінокислотою з винятковою конформаційною жорсткістю, яка має важливе значення для первинного метаболізму. Гліцин — $C_2H_5NO_2$ (2-аміноетанова кислота) — одна із двадцяти амінокислот, які входять до складу білків. У чистому вигляді — білий кристалічний порошок, легкорозчинний у воді.

В експерименті використовували розчини амінокислот із концентраціями 2,5; 5; 10 і 15 мМ. Кількість амінокислоти для розчину необхідної концентрації розраховували за формулою: мг/л = мМ × молярна маса/1000. Для проліну молярна маса речовини становить 115,13 г/моль, для гліцину — 75,07 г/моль. Перерахунок здійснювали для 200 мл поживного середовища.

Дослідження проводили у два етапи: 1) вивчали вплив різних концентрацій амінокислот, як компонентів середовища культивування бульбочкових бактерій *B. japonicum* 6346 на їх ростову активність; 2) досліджували вплив різних концентрацій амінокислот на проростання насіння сої.

Бульбочкові бактерії вирощували у чашках Петрі на манітно-дріжджовому агарі (МДА) г/л: K_2HPO_4 — 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,2; NaCl — 0,1; маніт — 10,0; дріжджовий екстракт — 0,5; агар — 15,0—17,0; рН 6,8—7,0. Чашки Петрі з поживним середовищем МДА витримували в термостаті за температури 28 °С протягом 5 діб із метою виключення появи сторонньої мікрофлори на поверхні агаризованого середовища та видалення конденсату. Для приготування посівної культури біомасу бактерій з поверхні агару змивали, суспендували. Водну суспензію бульбочкових бактерій порівнювали зі стандартом каламутності. Кінцева концентрація бактерій становила 10^8 клітин у 1 мл суспензії.

Схема досліду передбачала внесення амінокислот у концентрації 2,5; 5; 10; 15 мМ у колби Ерленмеєра з 200 мл рідкого манітно-дріжджового середовища та додавання посівної культури *B. japonicum* 6346 (2 % від об'єму поживного середовища). Культивували бульбочкові бактерії із швидкістю обертання качалки 220 об/хв протягом 6 діб за температури +26...+28 °С, що забезпечувало постійну аерацію поживного середовища.

У першому дослідженні контролем слугували ризобії штаму 6346, культивовані на манітно-дріжджовому середовищі без додатково внесених амінокислот. У другому досліді контролем слугувало насіння сої, замочене на 12 год у воді. У дослідних варіантах насіння сої замочували на 12 год у розчинах амінокислот відповідних концентрацій (2,5; 5; 10 і 15 мМ).

Кількість мікробних клітин (за показником оптичної густини) визначали за допомогою стандартної методики із залученням спектрофотометра BIORAD SmartSpecPlus (США) за довжини хвилі 600 нм. Оптичну густину вимірювали на сьому добу культивування.

Для визначення кількості колонієутворювальних одиниць в одиниці об'єму (КУО/мл) висівали на МДА суспензії ризобій, інкубованих із амінокислотами та без їх додавання, за використання методу послідовних розведень, з наступним підрахунком утворених колоній на поверхні поживного середовища на чашках Петрі. Визначали титр мікробних клітин на четверту і восьму добу культивування.

Для вивчення впливу різних концентрацій амінокислот на проростання насіння в чашках Петрі розміщували по 200 (20×10) насінин, які попередньо замочували на 12 год у 5 мл відповідного розчину. Насіння інкубували за контрольованої температури +22 °С. Підрахунок здійснювали на третю, четверту і п'яту доби. На п'яту добу визначали масу проростка та окремо масу і довжину його кореня.

У таблицях і графіках наведено середні арифметичні значення та їхні стандартні похибки ($\bar{x} \pm SE$). Вірогідність відмінностей між вибірками оцінювали методом однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA), за якого відмінності вважаються значущими, при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

За результатами проведених досліджень показано, що амінокислоти, як компоненти середовища культивування, впливають на ріст бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* 6346 в умовах чистої культури, і цей вплив залежить як від виду амінокислот, так і від їх концентрації (табл. 1).

За дії гліцину оптична густина бактеріальної суспензії була дещо вищою порівняно з проліном. Спостерігалось підвищення досліджуваного показника порівняно з контролем на 10 і 12 % за використання проліну у концентрації 10 мМ та гліцину у концентрації 5 мМ. Однак при збільшенні концентрацій амінокислот у бактеріальній суспензії до 15 мМ, показник її оптичної густини знижувався порівняно з контролем на 8 % за додавання проліну і на 20 % за внесення гліцину.

Підвищення оптичної густини бактеріальної суспензії, визначене спектрофотометрично, не завжди свідчить про безпосереднє збіль-

ВПЛИВ РІЗНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ПРОЛІНУ І ГЛІЦИНУ

ТАБЛИЦЯ 1. Вплив різних концентрацій амінокислот на оптичну густину бактеріальної суспензії

Варіант	Концентрація амінокислот, мМ	Оптична густина $D_{600\text{ нм}}$, відносні одиниці
<i>B. japonicum</i> 6346 (контроль)	—	1,463±0,003
<i>B. japonicum</i> 6346 + пролін	2,5	1,441±0,006
	5	1,490±0,005
	10	1,603±0,006
	15	1,345±0,004
<i>B. japonicum</i> 6346 + гліцин	2,5	1,531±0,005
	5	1,638±0,006
	10	1,520±0,004
	15	1,167±0,007

шення кількості життєздатних мікробних клітин за впливу сполук, додатково внесених у середовище культивування. Тому, крім виявлення впливу різних концентрацій проліну та гліцину на показник оптичної густини бактеріальної суспензії, ми також підраховували сформовані ризобіальні колонії на чашках Петрі з агаризованим середовищем (табл. 2).

Пролін за концентрацій 2,5; 5 та 10 мМ сприяв зростанню титру клітин *B. japonicum* 6346. З'ясовано, що зі збільшенням його концентрації, їхня кількість також зростала і перевищувала контроль на четверту добу на 31, 53 і 87 % відповідно. На восьму добу культивування за внесення 5 і 10 мМ проліну показники зростали на 52 і 64 % відповідно. Використання цієї амінокислоти у концентрації 15 мМ значно пригнічувало ріст колоній бульбочкових бактерій порівняно з контрольним варіантом. При цьому відзначили зниження титру життєздатних мікробних клітин на четверту та восьму доби на 54 та 50 % відповідно (див. табл. 2).

Гліцин негативно впливав на титр ризобіальних клітин як порівняно з дією проліну, так і з контрольним варіантом *B. japonicum* 6346 без внесення амінокислот. Інгібувальний вплив гліцину на життєздатність ризобій був найменшим за його застосування у концентрації 10 мМ.

Таким чином, використання проліну як додаткового компонента у середовищі культивування ризобій ефективніше, ніж гліцину. Зі збільшенням концентрації проліну до 10 мМ чисельність життєздатних ризобій *B. japonicum* 6346 підвищується. У концентрації 10 мМ досліджувані амінокислоти чинили найістотніший вплив на титр мікробних клітин.

Після виявлення найефективніших концентрацій амінокислот, які підвищували ростову активність бульбочкових бактерій у чистій культурі, нами був досліджений їх вплив на проростання насіння сої

ТАБЛИЦЯ 2. Вплив різних концентрацій амінокислот (мМ) на кількість колоній *B. japonicum* 6346

Варіант	Титр мікробних клітин <i>B. japonicum</i> , КУО/мл	
	4 доба	8 доба
<i>B. japonicum</i> 6346 (контроль)	$(7,47 \pm 0,35) \cdot 10^7$	$(12,27 \pm 0,38) \cdot 10^8$
<i>B. japonicum</i> 6346 + пролін 2,5	$(9,76 \pm 0,44) \cdot 10^7$	$(11,67 \pm 0,53) \cdot 10^8$
<i>B. japonicum</i> 6346 + пролін 5	$(11,43 \pm 1,10) \cdot 10^7$	$(18,65 \pm 0,67) \cdot 10^8$
<i>B. japonicum</i> 6346 + пролін 10	$(13,97 \pm 1,25) \cdot 10^7$	$(20,12 \pm 1,02) \cdot 10^8$
<i>B. japonicum</i> 6346 + пролін 15	$(4,03 \pm 0,14) \cdot 10^7$	$(6,07 \pm 0,36) \cdot 10^8$
<i>B. japonicum</i> 6346 + гліцин 2,5	$(5,36 \pm 0,29) \cdot 10^7$	$(7,90 \pm 0,33) \cdot 10^8$
<i>B. japonicum</i> 6346 + гліцин 5	$(6,57 \pm 0,32) \cdot 10^7$	$(8,97 \pm 0,40) \cdot 10^8$
<i>B. japonicum</i> 6346 + гліцин 10	$(7,11 \pm 0,49) \cdot 10^7$	$(9,50 \pm 0,51) \cdot 10^8$
<i>B. japonicum</i> 6346 + гліцин 15	$(2,53 \pm 0,11) \cdot 10^7$	$(2,57 \pm 0,09) \cdot 10^8$

у лабораторних умовах (табл. 3). За обробки амінокислотами, на третю добу найбільше насіння (12 %) проросло у варіанті з концентрацією проліну 15 мМ, що на 33 % більше, ніж у контролі. За інших концентрацій кількість пророслого насіння сої була меншою за контрольні значення на 11—22 %. Така тенденція простежується і на четверту добу, однак з меншою відсотковою різницею. Кількість пророслого насіння сої за обробки проліном 2,5—10 мМ була на 7—9 % меншою від контрольного варіанта, а за використання 15 мМ проліну — на 7 % більшою. На п'яту добу відсоток пророслих насінин у всіх варіантах, де застосовували пролін, був більшим за контроль залежно від внесеної концентрації: за концентрації 2,5 мМ — на 10 %, 5 мМ — на 16 %, 10 мМ — на 22 %, 15 мМ — на 17 %.

Слід зазначити, що за використання гліцину кількість пророслого насіння сої упродовж досліджуваного періоду, на відміну від проліну, була нижчою. Тільки на п'яту добу за концентрації 5 мМ цей показник сягнув контрольного рівня, що становив 77 % (див. табл. 3).

ТАБЛИЦЯ 3. Кількість пророслого насіння сої у лабораторних умовах за обробки проліном та гліцином у різних концентраціях (мМ)

Варіант	3 доба	4 доба	5 доба
	% пророслого насіння сої		
Контроль (насіння + вода)	9	74	77
Насіння + пролін, 2,5	7	67	85
Насіння + пролін, 5	8	68	89
Насіння + пролін, 10	8	69	94
Насіння + пролін, 15	12	79	90
Насіння + гліцин, 2,5	0	65	69
Насіння + гліцин, 5	0	63	77
Насіння + гліцин, 10	2	69	71
Насіння + гліцин, 15	3	54	59

Таким чином, амінокислоти пролін і гліцин по-різному впливали на проростання насіння сої сорту Самородок у лабораторних умовах. Максимальне підвищення кількості пророслих насінин (на 22 % порівняно з контролем) зафіксовано за впливу розчину проліну у концентрації 10 мМ.

При дослідженні впливу амінокислот у лабораторних умовах на ростові процеси сої встановлено, що пролін сприяв збільшенню маси проростків сої. За внесення амінокислоти у концентрації 2,5, 5, 10 і 15 мМ вона була більшою за масу контрольних проростків на 8, 9, 13 і 7 %, відповідно (рис. 1). Маса проростків сої за дії гліцину у концентрації 2,5 мМ була на рівні контрольних проростків, і перевищувала контроль на 6, 10 і 8 % за концентрації 5, 10 і 15 мМ, відповідно.

Маса коренів проростків сої була на рівні контролю незалежно від застосованої концентрації обраних нами амінокислот, крім оброблених 15 мМ розчином проліну, де показники були на 11 % більшими за контроль (рис. 2).

Довжина коренів проростків сої за обробки проліном була на рівні контролю, крім варіанта із застосуванням 10 мМ цієї амінокислоти, що перевищувала його на 12 %. Довжина кореня проростків сої за концентрації гліцину 2,5 мМ була на рівні контролю. В усіх інших варіантах вона була меншою на 6–10 % порівняно з контрольними проростками (рис. 3).

Таким чином, у більшості випадків амінокислоти за різних концентрацій сприяли початковому розвитку проростків сої, або ж зберігали його на рівні контролю, крім гліцину, який починаючи з концентрації 5 мМ пригнічував довжину кореня.

Застосування бактеріальних препаратів на основі бульбочкових бактерій на сьогодні є ефективним способом забезпечення бобових рослин необхідними речовинами протягом їх росту і розвитку, економічно доступнішими за мінеральні добрива, та одним із шляхів екологізації сучасного землеробства, оскільки дає змогу зменшити хімічне навантаження на агросферу [26]. Комплекс амінокислот із мік-

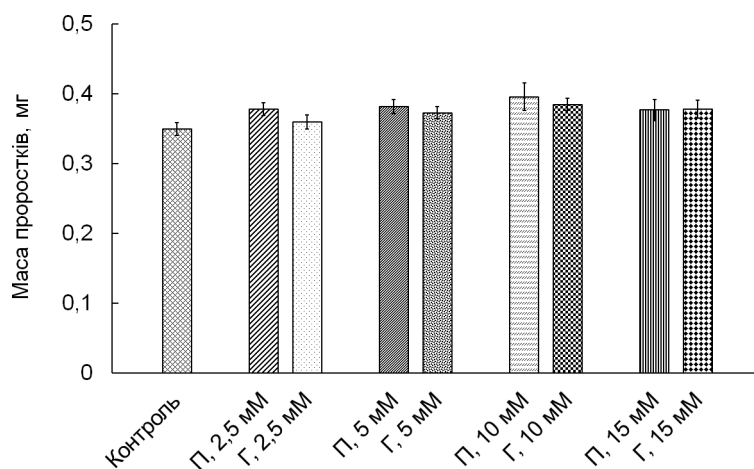


Рис. 1. Маса проростків сої за обробки проліном (П) та гліцином (Г) у різних концентраціях

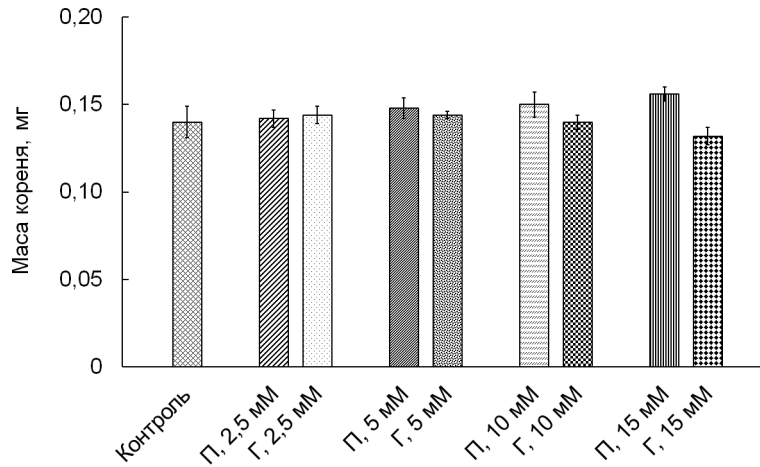


Рис. 2. Маса коренів проростків сої за обробки проліном (П) та гліцином (Г) у різних концентраціях

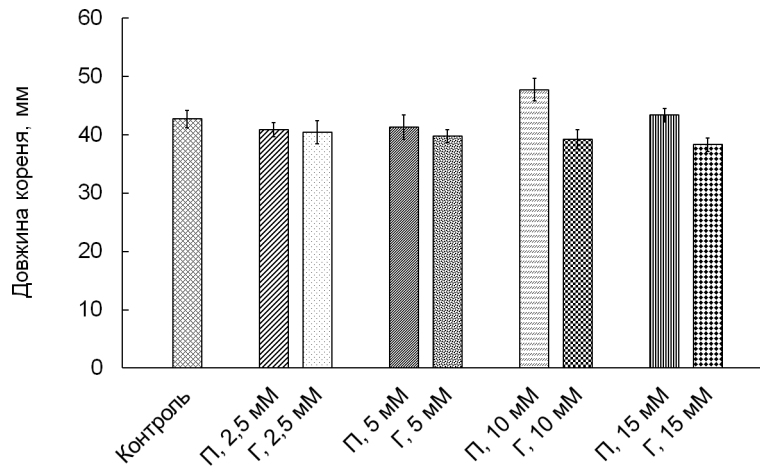


Рис. 3. Довжина коренів проростків сої за обробки проліном (П) та гліцином (Г) у різних концентраціях

роорганізмами може розширити можливості позитивного впливу інокуляції, оскільки відомо, що препарати, які містять амінокислоти, забезпечують їхнє включення у метаболізм рослини зі збереженням енергії, необхідної на продукування цих метаболітів, та накопичення азоту. Зазначають, що екзогенне застосування проліну та гліцину індукує стійкість рослин. Пролін відіграє важливу роль у підтриманні метаболізму та росту рослин, сприяє стабілізації клітинних білків і мембран за осмотичного стресу. Він також діє як потенційне джерело азоту і вуглецю. Пролін є важливою частиною структурних білків і ферментів та бере участь у процесах відновлення, активує цикл Кребса і є джерелом енергії. Пролін інтенсифікує здатність насіння до проростання і позитивно впливає на процес фотосинтезу (підвищує кількість хлорофілу) [25].

Гліцин є компонентом так званих структурних білків, які вивільнюються при біотичних стресах. Відіграє головну роль у захисті клі-

тини від наслідків зневоднення (або надлишку солі). Водночас він бере участь у регуляції відкриття та закриття продихів, що має важливе значення для утримання води та газообміну. Гліцин впливає на утворення хелатних комплексів, як прекурсор хлорофілу збільшує ефективність фотосинтезу [18].

Наші дослідження показали, що при застосуванні проліну у концентрації 5 та 10 мМ і гліцину 2,5; 5; 10 мМ спостерігається тенденція до приросту мікробної біомаси, а подальше збільшення концентрацій чинить негативний вплив на ріст бульбочкових бактерій. Встановлено, що використання проліну як додаткового компонента середовища культивування ризобій ефективніше, ніж гліцину. Зі збільшенням концентрації проліну до 10 мМ істотно підвищується титр мікробних клітин *B. japonicum* 6346. У концентрації 10 мМ досліджені амінокислоти найбільше впливали на чисельність життєздатних ризобій.

Виявлено, що амінокислоти пролін і гліцин по-різному впливали на проростання насіння сої Самородок в лабораторних умовах. Зокрема, пролін зі збільшенням концентрації сприяв цьому процесу. З'ясовано, що здебільшого амінокислоти за різних концентрацій, сприяли початковому розвитку проростків сої, або ж підтримували його на рівні контрольних, крім гліцину, який починаючи з концентрації 5 мМ пригнічував ріст коренів.

Отже, пролін та гліцин у разі їх застосування як компонентів середовища культивування ризобій і для обробки насіння сої у більшості випадків найефективніше себе проявили у концентрації 10 мМ. Це дає підґрунтя для подальшого дослідження перспектив використання цих амінокислот з ризобіями у такій концентрації у складі інокулянтів, або для почергового нанесення на посівний матеріал з метою забезпечення ефективного формування і функціонування бобово-ризобіального симбіозу за умов впливу стресових чинників довкілля.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Коць С.Я. Біологічна фіксація азоту: досягнення та перспективи розвитку. *Фізіологія рослин і генетика*. 2021. **53**, № 2. С. 128—159. <https://doi.org/10.15407/frg2021.02.128>
2. Szpunar-Krok E., Bobrecka-Jamro D., Piśula W., Jańczak-Pieniążek M. Effect of Nitrogen Fertilization and Inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* on Nodulation and Yielding of Soybean. *Agronomy*. 2023. **13**, N 5, P. 1341. <https://doi.org/10.3390/agronomy13051341>
3. Rabbani M.G., Salam M.A., Paul S.K., Afsana-Kheya S. Effect of Rhizobium inoculum on the Growth, Yield and Quality of Soybean. *J. Bangladesh Agricul. Univ.* 2023. **21**, N 1. P. 1—11. <https://doi.org/10.5455/JBAU.141905>
4. Воробей Н.А., Пухтаєвич П.П., Коць Т.А., Коць С.Я. Використання бульбочкових бактерій як засобу розширення адаптивних можливостей сої в умовах посухи. *Фізіологія рослин і генетика*. 2022. **54**, № 1. С. 26—39. <https://doi.org/10.15407/frg2022.01.026>
5. Ciampitti I.A., Salvagiotti F. New insights into soybean biological nitrogen fixation. *Agronomy J.* 2018. **110**, N 4. P. 1185—1196. <https://doi.org/10.2134/agronj2017.06.0348>
6. Gamas P., Brault M., Jardinaud M.F., Frugier F. Cytokinins in Symbiotic Nodulation: When, Where, What For? *Trends Plant Sci.* 2017. **22**, N 9, P. 792—802. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.06.012>
7. Павлище А.В. Формування і функціонування симбіозу соя-*Bradyrhizobium japonicum* при використанні фізіологічно активних речовин із фунгіцидною активністю

- (дис. канд. біол. наук : 03.00.12) / Інститут фізіології рослин і генетики НАН України. Київ, 2019.
8. Kots S., Kiriziy D., Pavlyshche A., Rybachenko L. Peculiarities of formation and functioning of the soybean—*Bradyrhizobium japonicum* symbiotic apparatus in relation to photosynthetic activity under the influence of seed protectants. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 2022. **11**, N 6. e3128. P. 1—5. <https://doi.org/10.55251/jmbfs.3128>
 9. Kyrychenko O.V., Kots S.Ya., Khrapova A.V., Omelchuk S.V. Biological activity of soybean seed lectin at the spraying of *Glycine max* plants against the background of seed treatment with pesticide containing fipronil, thiophanate-methyl, pyraclostrobin as active substances and rhizobial bacterization. *Regul. Mechan. Biosyst.* 2022. **13**, N 2. P. 12—20. <https://doi.org/10.15421/022215>
 10. Kiriziy D., Kots S., Rybachenko L., Pukhtaievych P. Inoculation of soybean seeds by rhizobia with nanometal carboxylates reduces the negative effect of drought on N₂ and CO₂ assimilation. *Plant Soil Environ.* 2022. **68**. P. 510—515. <https://doi.org/10.17221/287/2022-PSE>
 11. Кириченко О.В. Регуляторна роль глюкозо- та галактозовмісних аміноцукрів у реалізації симбіотичного і продуктивного потенціалу соєво-ризобіального симбіозу в умовах природної посухи. *Фізіологія рослин і генетика*. 2019. **51**, № 3. С. 241—257. <https://doi.org/10.15407/frg2019.03.241>
 12. Lakshmi G., Been R., Soni, K.B., Viji M.M., Jha U.C. Exogenously applied plant growth regulator protects rice from heat-induced damage by modulating plant defense mechanism. *J. Crop Sci. Biotechnol.* 2023. **26**, N 1. P. 63—75. <https://doi.org/10.1007/s12892-022-00162-4>
 13. Li M., Zhang P., Guo Z., Cao W., Gao L., Li Y., Tian C.F., Chen Q., Shen Y., Ren F., Rui Y., White J.C., Lynch, I. Molybdenum nanofertilizer boosts biological nitrogen fixation and yield of soybean through delaying nodule senescence and nutrition enhancement. *ACS nano*. 2023. **17**, N. 15. P. 14761—14774. <https://doi.org/10.1021/acsnano.3c02783>
 14. Canellas L.P., Silva R.M., Barbosa L.J.D.S., Sales F.S., Ribeiro R.C., Mota G.P., Olivares F.L. Co-Inoculation with *Bradyrhizobium* and Humic Substances Combined with *Herbaspirillum seropedicae* Promotes Soybean Vegetative Growth and Nodulation. *Agronomy*. 2023. **13**, N. 10. P. 2660. <https://doi.org/10.3390/agronomy13102660>
 15. Коритко О. До питання про роль амінокислот і їх застосування. *НВ ЛНУ ветеринарної медицини та біотехнологій. Серія: С-х науки*. 2019. **21**, № 91. С. 116—122. <https://doi.org/10.32718/nvlvet-a9121>
 16. Mansour M.M.F., Salama K.H.A. Proline and abiotic stresses: Responses and adaptation. *Plant Ecophysiol. Adapt. Climate Change: Mechanisms and Perspectives II*. 2020. P. 357—397. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2172-0_12
 17. Hu L., Hu T., Zhang X., Pang H. & Fu, J. Exogenous glycine betaine ameliorates the adverse effect of salt stress on perennial ryegrass. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 2012. **137**, N 1. P. 38—46. <https://doi.org/10.21273/JASHS.137.1.38>
 18. Zhu M., Li Q., Zhang Y., Zhang M., Li Z. Glycine betaine increases salt tolerance in maize (*Zea mays* L.) by regulating Na⁺ homeostasis. *Front. Plant Sci.* 2022. **13**. P. 978304 <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.978304>
 19. Ghosh U.K., Islam M.N., Siddiqui M.N., Cao X., Khan M.A.R. Proline, a multifaceted signalling molecule in plant responses to abiotic stress: understanding the physiological mechanisms. *Plant Biol.* 2022. **24**, N 2. P. 227—239. <https://doi.org/10.1111/plb.13363>
 20. Al-Hadithy M.H.S., Al-Mohammed A.N.A. Effect of Bacterial Inoculation and Foliar Application of Arginine and Glutamic Acids on the Growth of Fenugreek Plant (*Trigonella foenum-graecum* L.). In *IOP Conf. Series: Earth and Environ. Sci.* (Kostanay, Kazakhstan, 21—22. Feb. 2023). Kostanay, IOP Publishing. 2023. **1158**, N. 6, P. 062020. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1158/6/062020>
 21. Шкрабалюк А.В., Богатиренко В.А., Оляновська М.О. Дослідження амінокислотного складу люцерни посівної (*Medicago sativa* L.). *Збірник статей «фундаментальні та прикладні дослідження в сучасній хімії та фармації»* (за матеріалами VIII Міжнар. заочної наук.-практ. конф. молодих учених: Ніжин, 23 квітня 2021 р.). Ніжин, 2021. С. 146—150.
 22. Діденко Н.О., Волков Р.А., Панчук І.І. Вплив сольового стресу на вміст проліну та поліфенольних сполук у *Arabidopsis thaliana*. *Наук. вісн. Чернів. ун-ту. Біологія (Біологічні системи)*. 2016. **8**, № 1. С. 35—39.

23. Tania S.S., Rhaman M.S., Rahaman M.M., Hoque M.A. Effects of seed priming with proline and glycine betaine on germination, seedling growth, and photosynthetic pigments of rice (*Oryza sativa*) under chilling stress. *J. Agricult. Ecol. Res. Int.* 2022. **23**, N 5. P. 15–23. <https://doi.org/10.9734/JAERI/2022/v23i530235>
24. Akinmolaya T.V., Adejumo S.A. Pre-sowing Seed Treatment with Proline, Glycine Betaine, and Soil Amendment with Compost as Strategies for Improving Yield and Drought Tolerance in Cowpea. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 2022. **22**, N 4. P. 4299–4316. <https://doi.org/10.1007/s42729-022-01028-y>
25. Ghafoor R., Akram N.A., Rashid M., Ashraf M., Iqbal M., Lixin Z. Exogenously applied proline induced changes in key anatomical features and physio-biochemical attributes in water stressed oat (*Avena sativa* L.) plants. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 2019. **25**, N 5. P. 1121–1135. <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00683-3>
26. Khan M.N., Ijaz M., Ali Q., Ul-Allah S., Sattar A., Ahmad S. Biological Nitrogen Fixation in Nutrient Management. In: Hasanuzzaman M. (eds). *Agronomic Crops*. 2019. 2. P. 127–147. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9783-8_8

Отримано 06.02.2024

REFERENCES

1. Kots, S.Ya. (2021). Biological nitrogen fixation: achievements and prospects. *Fiziol. rast. genet.*, 53, No 2, pp. 128-159 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.15407/frg2021.02.128>
2. Szpunar-Krok, E., Bobrecka-Jamro, D., Piłkuła, W. & Jańczak-Pieniążek, M. (2023). Effect of Nitrogen Fertilization and Inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* on Nodulation and Yielding of Soybean. *Agronomy*, 13, No. 5, pp. 1341. <https://doi.org/10.3390/agronomy13051341>
3. Rabbani, M.G., Salam, M.A., Paul, S.K. & Afsana-Kheya, S. (2023). Effect of *Rhizobium* inoculum on the Growth, Yield and Quality of Soybean. *J. Bangladesh Agricult. Univ.*, 21, No. 1, pp. 1-11. <https://doi.org/10.5455/JBAU.141905>
4. Vorobey, N.A., Pukhtaievych, P.P., Kots, T.A. & Kots S.Ya. (2022). The use of the nodule bacteria as a remedy for expanding adaptive possibilities of soybean under drought conditions. *Fiziol. rast. genet.*, 54, No. 1, pp. 26-39 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.15407/frg2022.01.026>
5. Ciampitti, I.A. & Salvaggiotti, F. (2018). New insights into soybean biological nitrogen fixation. *Agronomy J.*, 110, No. 4, pp. 1185-1196. <https://doi.org/10.2134/agronj2017.06.0348>
6. Gamas, P., Brault, M., Jardinaud, M.F. & Frugier, F. (2017). Cytokinins in Symbiotic Nodulation: When, Where, What For? *Trends Plant Sci.*, 22, No. 9, pp. 792-802. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.06.012>
7. Pavlyshche, A.V. (2019). Formation and functioning of soybean—*Bradyrhizobium japonicum* symbiosis under using physiologically active substances with fungicidal activity (Unpublished candidate thesis. 03.00.12) Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine [in Ukrainian].
8. Kots, S., Kiriziy, D., Pavlyshche, A. & Rybachenko, L. (2022). Peculiarities of formation and functioning of the soybean—*Bradyrhizobium japonicum* symbiotic apparatus in relation to photosynthetic activity under the influence of seed protectants. *J. Microbiology, Biotechnol. Food Sci.*, 11, No. 6. E3128, pp. 1-5. <https://doi.org/10.55251/jmbfs.3128>
9. Kyrychenko, O.V., Kots, S.Ya., Khrapova, A.V. & Omelchuk, S.V. (2022). Biological activity of soybean seed lectin at the spraying of *Glycine max* plants against the background of seed treatment with pesticide containing fipronil, thiophanate-methyl, pyraclostrobin as active substances and rhizobial bacterization. *Regul. Mechan. Biosyst.*, 13, No. 2, pp. 12-20. <https://doi.org/10.15421/022215>
10. Kiriziy, D., Kots, S., Rybachenko, L. & Pukhtaievych, P. (2022). Inoculation of soybean seeds by rhizobia with nanometal carboxylates reduces the negative effect of drought on N₂ and CO₂ assimilation. *Plant Soil Environ.*, 68, pp. 510-515. <https://doi.org/10.17221/287/2022-PSE>
11. Kyrychenko, O.V. (2019). Regulatory role of glucose- and galactose-containing aminosaccharides in the realization of the symbiotic and productive potential of soybean-

- rhizobium symbiosis under field drought conditions. *Fiziol. rast. genet.*, 51, No. 3, pp. 241-257 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.15407/frg2019.03.241>
12. Lakshmi, G., Been, R., Soni, K.B., Viji, M.M. & Jha, U.C. (2023). Exogenously applied plant growth regulator protects rice from heat-induced damage by modulating plant defense mechanism. *J. Crop Sci. Biotechnol.*, 26, No. 1, pp. 63-75. <https://doi.org/10.1007/s12892-022-00162-4>
13. Li, M., Zhang, P., Guo, Z., Cao, W., Gao, L., Li, Y., Tian, C.F., Chen, Q., Shen, Y., Ren, F., Rui, Y., White, J.C. & Lynch, I. (2023). Molybdenum nanofertilizer boosts biological nitrogen fixation and yield of soybean through delaying nodule senescence and nutrition enhancement. *ACS nano*, 17, No. 15, pp. 14761-14774. <https://doi.org/10.1021/acsnano.3c02783>
14. Canellas, L.P., Silva, R.M., Barbosa, L.J.D.S., Sales, F.S., Ribeiro, R.C., Mota, G.P. & Olivares, F.L. (2023). Co-Inoculation with Bradyrhizobium and Humic Substances Combined with Herbaspirillum seropedicae. Promotes Soybean Vegetative Growth and Nodulation. *Agronomy*, 13, No. 10, pp. 2660. <https://doi.org/10.3390/agronomy13102660>
15. Korytko, O. (2019). To the question of amino acids and whey consumption. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Agricult. Sci.*, 21, No. 91, pp. 116-122 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.32718/nvlvet-a9121>
16. Mansour, M.M.F. & Salama, K.H.A. (2020). Proline and abiotic stresses: Responses and adaptation. *Plant Ecophysiol. Adapt. Climate Change: Mechanisms and Perspectives II*. pp. 357-397. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2172-0_12
17. Hu, L., Hu, T., Zhang, X., Pang, H. & Fu, J. (2012). Exogenous glycine betaine ameliorates the adverse effect of salt stress on perennial ryegrass. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 137, No. 1, pp. 38-46. <https://doi.org/10.21273/JASHS.137.1.38>
18. Zhu, M., Li, Q., Zhang, Y., Zhang, M. & Li, Z. (2022). Glycine betaine increases salt tolerance in maize (*Zea mays* L.) by regulating Na⁺ homeostasis. *Front. Plant Sci.*, 13, p. 978304 <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.978304>
19. Ghosh, U.K., Islam, M.N., Siddiqui, M.N., Cao, X. & Khan, M.A.R. (2022). Proline, a multifaceted signalling molecule in plant responses to abiotic stress: understanding the physiological mechanisms. *Plant Biol.*, 24, No. 2, pp. 227-239. <https://doi.org/10.1111/plb.13363>
20. Al-Hadithy, M.H.S. & Al-Mohammedy, A.N.A. (2023, April). Effect of Bacterial Inoculation and Foliar Application of Arginine and Glutamic Acids on the Growth of Fenugreek Plant (*Trigonella foenum-graecum* L.). In *IOP Conf. Series: Earth and Environ. Sc.* (Vol. 1158, No. 6, pp. 062020). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1158/6/062020>
21. Shkrabaliuk, A.V., Bohatyrenko, V.A. & Olianovska, M.O. (2021). Study of the amino acid composition of seed alfalfa (*Medicago sativa* L.). Collection of articles «Fundamental and applied research in modern chemistry and pharmacy» (on the materials of the 8 th Int. Correspon. Scientific-Practical Conf. Young Scientists: Nizhyn, April 23, 2021), pp. 146-150 [in Ukrainian].
22. Didenko, N.O., Volkov, R.A. & Panchuk, I.I. (2016). Effects of saline stress on proline and polyphenolic compounds content in *Arabidopsis thaliana* *Nauk. visn. Cherniv. univ.. Biolohiia (Biolohichni systemy)*, 8, No. 1, pp. 35-39 [in Ukrainian].
23. Tania, S.S., Rhaman, M.S., Rahaman, M.M. & Hoque, M.A. (2022). Effects of seed priming with proline and glycine betaine on germination, seedling growth, and photosynthetic pigments of rice (*Oryza sativa*) under chilling stress. *J. Agricul. Ecol. Res. Int.*, 23, No. 5, pp. 15-23. <https://doi.org/10.21746/aps.2022.11.6.3>
24. Akinmolayan, T.V. & Adejumo, S.A. (2022). Pre-sowing Seed Treatment with Proline, Glycine Betaine, and Soil Amendment with Compost as Strategies for Improving Yield and Drought Tolerance in Cowpea. *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, 22, No. 4, pp. 4299-4316. <https://doi.org/10.1007/s42729-022-01028-y>
25. Ghafoor, R., Akram, N.A., Rashid, M., Ashraf, M., Iqbal, M. & Lixin, Z. (2019). Exogenously applied proline induced changes in key anatomical features and physio-biochemical attributes in water stressed oat (*Avena sativa* L.) plants. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 25, No. 5, pp. 1121-1135. <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00683-3>

26. Khan, M.N., Ijaz, M., Ali, Q., Ul-Allah, S., Sattar, A. & Ahmad, S. (2019). Biological Nitrogen Fixation in Nutrient Management. In: Hasanuzzaman M. (ed.) *Agronomic Crops*. Springer, Singapore, 2, pp. 127-147. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9783-8_8

Received 06.02.2024

THE EFFECT OF DIFFERENT PROLINE AND GLYCINE CONCENTRATIONS ON THE GROWTH ACTIVITY OF NODULE BACTERIA *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* IN VITRO AND THE GERMINATION OF SOYBEAN SEEDS

S.Ya. Kots, A.V. Khrapova, K.P. Kukol

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylykivska, St., Kyiv, 03022, Ukraine
e-mail: khrapova.anastasiia@gmail.com

The use of amino acids as components of various preparations in the pre-sowing treatment of plants is increasingly attracting attention both in the agricultural field and among the scientists-biologists and plant physiologists. Amino acids are one of the most active participants in metabolism, which can stimulate seed germination, regulate the intensity of photosynthesis, promote development and growth, increase yield, and activate plant protective mechanisms under the influence of stress factors. Studies aimed at the possibility of their exogenous influence on soybean plants, to ensure the stable development of the organism, the formation and functioning of soybean-rhizobial symbiosis are relevant. Therefore, the aim of the work was to select such concentrations of amino acids (proline and glycine), which as components of the nodule bacteria culture medium would contribute to increasing their growth activity in vitro, and reveal the most effect on the development of soybean seedlings. It was shown that the introduction of high concentrations of the amino acids proline and glycine (15 mM) into the rhizobia culture medium has a negative effect on the indices of the bacterial suspension optical density and the titer of viable cells of *Bradyrhizobium japonicum* 634b. When using proline as an additional component in the nutrient medium with an increase in its concentration to 10 mM, the most significant increase in the titer of microbial cells was noted, compared to the control variant. Analyzing the effect of soybean treatment with amino acid solutions on the dynamics of seed germination, it was found that proline already from the 4th day with an increase in its concentration contributed to the intensification of this process. It was found that in most cases, amino acids, at different concentrations, contributed to the initial development of soybean seedlings, or provided it at the control level, except for glycine, which, from a concentration of 5 mM, inhibited root growth. Our results indicate that proline and glycine, when added at the concentration of 10 mM to the rhizobia culture medium provide the maximum increase in the titer of microbial cells of *B. japonicum* 634b. At the same time, treatment of soybean seeds with proline and glycine solutions promotes the initial development of seedlings. Thus, the obtained data promote further study of the use of these amino acids for the treatment of seed material *Glycine max* (L.) Merr. compatible with inoculants or by involving them in the composition of microbial preparations, in order to ensure the effective formation and functioning of soybean-rhizobial symbiosis under the influence of stress factors.

Key words: *Glycine max* (L.) Merr., *Bradyrhizobium japonicum* 634b, amino acids, proline, glycine.

ORCID

С.Я. КОЦЬ — S.Ya. Kots <https://orcid.org/0000-0002-3477-793X>

А.В. ХРАПОВА — A.V. Khrapova <https://orcid.org/0000-0001-7613-3131>

К.П. КУКОЛ — K.P. Kukol <https://orcid.org/0000-0002-2889-9957>