

**Національна академія наук України
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного
Національна академія аграрних наук України
Інститут сільського господарства Криму
Товариство з обмеженою відповідальністю
науково-виробничий центр «Черкасибіозахист»**

**В.П. ПАТИКА, Т.М. МЕЛЬНИЧУК, М.К. ШЕРСТОБОЄВ,
Л.М. ТАТАРИН, С.Р. ЗУБАЧОВ, А.В. КАЛІНІЧЕНКО
С.П. ХАЛИМОНІК, Ю.М. ШКАТУЛА, Л.В. КИРИЛЕНКО,
Т.Ю. ПАРХОМЕНКО, І.О. КАМЕНЄВА**

БІОТЕХНОЛОГІЯ РИЗОСФЕРИ ОВОЧЕВИХ РОСЛИН

**За редакцією академіка НААН України
В.П. Патики**

КИЇВ – 2015

**National Academy of Sciences of Ukraine
Institute of Microbiology and Virology
National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine
Crimean Institute of Agriculture
Society with limited liability scientific-production center
«Cherkasybiosecurity»**

**V.P. PATYKA, T.N. MELNICHUK, M.K. SHERSTOBOYEV,
L.M. TATARYN, S.R. ZUBACHOV, A.V. KALINICHENKOY S.P.
HALYMONYK, Y.M. SHKATULA, L.V. KYRYLENKO,
T.Y. PARKHOMENKO, I.O. KAMENEVA**

BIOTECHNOLOGY OF VEGETABLE PLANTS RHIZOSPHERE

**Edited by Academician NAAS of Ukraine
V.P. Patyka**

KYIV – 2015

УДК 635.1: 631.147

ББК 42.34

Б - 63

Рецензенти:

Д-р біол. наук, професор, член кор. НАНУ

Г.О. Іутинська

Д-р біол. наук, професор, член кор. НАНУ

С.Я. Коць

Д-р біол. наук, професор

О.В. Надкєрнична

Б - 63

Біотехнологія ризосфери овочевих рослин [монографія]. – Біотехнологія ризосфери овочевих рослин / В.П. Патики, Т.М. Мельничук, М.К. Шєрстобєєв, Л.М. Татарин, С.Р. Зубачєв, А.В. Калінічєнко, С.П. Халімєнік, Ю.М. Шкатула, Л.В. Кірілєнко, Т.Ю. Пархоменко, І.О. Камєнєва; За ред. В.П. Патики. Вінниця «ПП«ТД Едєльвєйс і К» – 2015. – 266 с/

ISBN 978-617-7237-04-3

Монографію присвячєно досліджєнню інтродукції єфективних штамів корисних бактерій у ризосферу і філосферу рослини, оптимізації структури мікробного оточєння рослини та його функціональної активності, що забезпєчує активізацію фізіолого-біохімічних процесів у рослині впродовж усіх етапів її онтогенєзу.

Досліджєно здатність штамів – біоагєнтів мікробних препаратів колонізувати овочєві рослини. Показано їх вплив на ферментативну активність ризосфери та розвиток рослин. Встановлєно позитивний вплив штамів ризобактерій на формування складу епіфітних мікроорганізмів та посівні властивості насіння овочєвих культур як у процесі його зберігання, так і одержаного в поколінні. Штами-продуцєнти рістстимулюючих рєчєвин забезпєчили найвищий вихід ранньої продукції. Виявлєно, що мікробні препарати сприяють зростанню єкономічної єфективності вирощування томатів ранніх. За дії Фосфоєнтерину збільшувався вихід ранньої продукції на 11 % та рівньє рєнтабельності на 47 % щодо контролю.

УДК 635.1: 631.147

ББК 42.34

ISBN 978-617-7237-04-3

© В.П. Патики, Т. М. Мельничук, М.К. Шєрстобєєв, Л.М. Татарин, С.Р. Зубачєв, А.В. Калінічєнко, С.П.Халімєнік, Ю.М. Шкатула, Л.В. Кірілєнко, Т.Ю. Пархоменко, І.О. Камєнєва

© Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболєтного НАН України

© Інститут сільського господарства Криму НААН України

Монография посвящена исследованию интродукции эффективных штаммов полезных бактерий в ризосферу и филлосферу растения, оптимизации структуры микробной среды растения и ее функциональной активности, обеспечивающей активизацию физиолого-биохимических процессов растения в течении всех этапов его онтогенеза.

Разработана методика выделения и изучения ассоциативных микроорганизмов к определенному виду овощных растений, позволяющая значительно ускорить селекционный процесс. Выделены штаммы бактерий, ассоциативные к растениям капусты (*Brassica capitata* var. *alba* Lizg.), томатов (*Lycopersicon esculentum* Mill.) и огурцов (*Cucumis sativus* L.), в частности, штамм *Pseudomonas fluorescens* П 10, обладающий способностью к эпифитному и эндофитному существованию при взаимодействии с растениями капусты, что и повышает продуктивность растений до 25 %.

Раскрыты особенности колонизационной способности производственных штаммов к различным видам овощных растений. Обнаружена способность штамма *E. nimipressuralis* 32-3 наиболее активно колонизировать растения томатов, капусты и перца. Численность бактерий была больше в ризосфере томатов (304×10^6 КОЕ) и капусты (55×10^6 КОЕ), чем в филлосфере (44×10^6 КОЕ и 26×10^6 КОЕ), а у перца наоборот – 162×10^6 КОЕ в филлосфере по сравнению с 30×10^6 КОЕ в ризосфере. Наибольшее количество бактерий штамма *P. polymyxa* П отмечено в ризосфере томатов и перца – $9,9 \times 10^6$ КОЕ / на растение, что почти на порядок выше, чем на капусте. Более многочисленным он был в филлосфере капусты, чем в ризосфере, а в филлосфере перца – не обнаружен.

Высокая степень ассоциативности к растениям томатов обнаружена у штамма *Enterobacter nimipressuralis* 32-3, проявившего высокий уровень зависимости большинства признаков: выход ранней продукции зависел от биомассы проростка и корня, как и полная урожайность, имеющая средний уровень зависимости от энергии прорастания семян. Штамм *Paenibacillus polymyxa* П, обладающий низкой степенью ассоциативности, следует применять в сочетании со штаммами с высокой степенью. Этот штамм, благодаря антифунгальным свойствам, является ценным компонентом такого микробного комплекса.

Впервые установлено положительное влияние штаммов ризобактерий на формирование эпифитных микроорганизмов и качество семян овощных культур как в процессе их хранения, так и полученных в поколении. В семенах от инокулированных растений, повышается на 7,4–18,5 % содержание суммы флавоноидных соединений и на 6,2–31,2 % снижается активность каталазы по сравнению с контролем. При инокуляции семян биопрепаратами перед закладкой на хранение отмечено уменьшение содержания флавоноидов на 10,1–19,4 % и повышение активности каталазы на 8,3–16,7 %, что свидетельствует об активизации окислительно-восстановительных процессов.

Интродукция штаммов микроорганизмов на поверхность семенной оболочки, вызывает изменения в составе эпифитных микроорганизмов. Влияние штаммов, не приживающихся на поверхности семян, обусловлено их способностью формировать микробиом на начальном этапе. Показано увеличение разнообразия

типов микроорганизмов поверхности семян томатов как инокулированных перед складкой на хранение, так и полученных в поколении.

Экономическая оценка эффективности применения биопрепаратов в технологии получения ранней овощной продукции свидетельствует о перспективности предложенных приемов для овощеводства. Определено, что инокуляция семян и обработка рассады томатов раннего сорта Шанс микробным препаратом Фосфоентерин способствовала увеличению урожайности ранней продукции на 10,8 %, при этом снижалась себестоимость овощей на 7,6 %, прибыль на 1 га увеличивалась на 12,6 %, а уровень рентабельности — на 47,2 % по сравнению с контролем.

Применение микробных препаратов при получении ранней продукции способствовало повышению энергетической эффективности выращивания томатов ранних на 6,1–8,3 % относительно контроля. Это происходит благодаря более высоким темпам прироста энергии урожая, полученного при бактеризации семян и корней рассады.

УДК 635.1: 631.147

ББК 42.34

This monograph is focused on the investigation of the introduction of efficient strains of beneficial bacteria into the plant rhizosphere and phyllosphere, as well as optimization of the microbial environment structure of the plant and its functional activity, which ensures the activation of physiological and biochemical processes in the plant during all stages of its ontogenesis.

The methodical approach was developed for the isolation and investigation of associative microorganisms of specific kinds of vegetable plants, which will allow to significantly accelerate the breeding process. The strains of associative bacteria of the plants of cabbage (*Brassica capitata* var. *alba* Litzg.), tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.) were isolated, in particular a strain of *Pseudomonas fluorescens* P 10 possessing the ability of epiphytic and endophytic existence by interaction with cabbage plants, which increases the productivity of plants by up to 25%.

The colonization capacity features of production bacteria strains of different kinds of vegetable plants were determined. The highest capability of active colonization of tomato, pepper and cabbage plants was demonstrated by *E. nimipressuralis* 32-3 strain. The number of bacteria was higher in the rhizosphere of tomato (304×10^6 CFU) and cabbage (55×10^6 CFU) than in their phyllosphere (44×10^6 CFU and 26×10^6 CFU, respectively). In contrast, phyllosphere of pepper contained 162×10^6 CFU, while the rhizosphere — only 30×10^6 CFU. The greatest number of bacteria of *P. polymyxa* P strain was detected in the rhizosphere of tomato and pepper, $9,9 \times 10^6$ CFU / plant, which is almost an order of magnitude higher than in cabbage. In addition, its number was slightly higher in the phyllosphere cabbage, compared to its rhizosphere, while it was not detected in the phyllosphere of pepper.

The high levels of *Enterobacter nimipressuralis* 32-3 associativity with tomato plants were found. This strain showed a high level of dependence by most characteristics: the yield of early production depended on seedling and root biomass, and so did the total yield, which had an average level of dependence on the energy of seed germination.

Paenibacillus polymyxa P strain, which has a low level of associativity, should be used in conjunction with strains with high level. This strain is a valuable component of the microbial complex due to its antifungal properties.

For the first time a positive effect of rhizobacteria strains on the formation of epiphytic microorganisms was determined as well as on the quality of vegetable seeds during storage and obtained in generation. The total content of flavonoid compounds in the seeds obtained from the inoculated plants increased by 7,4–18,5 %, while the activity of catalase decreased by 6,2–31,2 % compared to the control. Upon inoculation of seeds with biopreparations prior to their storage the marked decrease in flavonoids by 10,1–19,4 % was observed along with increase in the activity of catalase by 8,3–16,7 %, which is an evidence of activation of redox processes.

Introduction of microorganisms strains onto the surface of the seed coat induces changes in the composition of epiphytic microorganisms. The effect of strains that do not survive on the surface of seeds is due to their ability to form the microbiome during initial phase. The increase in diversity of microbial species at the surface of tomato seeds, inoculated prior to storage or produced in a generation, was shown.

Economic evaluation of the effectiveness of biopreparations use in the technology for obtaining early vegetable production shows the promising potential of the proposed techniques for horticulture. It was determined that the inoculation of tomato seeds and treatment of seedlings of an early variety Chance with microbial biopreparation fosfoenterin helped increase the yield of early production by 10,8 %, while reducing the cost of vegetables by 7,6 %, increase in profits – by 12,6 % per 1 ha and the level of profitability by 47,2 % compared to control.

The use of microbial biopreparations in early production helped to improve the energy efficiency of early tomato cultivation by 6,1 – 8,3 % relative to the control. This is due to the higher growth rate of yield energy obtained by bacterization of seeds and seedling roots compared to the energy costs associated with the use of biopreparation.

Затверджено до друку вченою радою Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України протокол № 6 від 23 червня 2015 року та вченою радою Інституту сільського господарства Криму Національної академії аграрних наук України протокол №9 від 25 грудня 2014 р.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	11
ВСТУП	12
РОЗДІЛ 1. АСОЦІАТИВНІ МІКРООРГАНІЗМИ ТА ВЗАЄМОДІЯ ЇХ З РОСЛИНАМИ	15
1.1. Мікробні асоціативні системи рослин та шляхи їх активізації	15
1.2. Механізми взаємодії ініційованих рослинно-мікробних асоціацій	24
1.3. Методичні підходи щодо виділення та вивчення взаємодії асоціативних мікроорганізмів до рослини	41
1.4. Мікробіологічні фактори підвищення продуктивності агроценозів	45
РОЗДІЛ 2. СЕЛЕКЦІЯ ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ, АСОЦІАТИВНИХ ДО ОВОЧЕВИХ РОСЛИН	55
2.1. Розроблення методу селекційного добору штамів мікроорганізмів, асоціативних до овочевих рослин	55
2.2. Морфологічні, культуральні, біохімічні та фізіологічні властивості виділених штамів та їх ідентифікація	66
2.3. Падіння поновиділених штамів на овочеві рослини	70
РОЗДІЛ 3. ОСОБЛИВОСТІ ВЗАЄМОДІЇ ШТАМІВ АСОЦІАТИВНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ І ОВОЧЕВИХ РОСЛИН	78
3.1. Хемотаксис мікробних штамів до ексудатів різних видів овочевих рослин	79
3.2. Продуктування штамми жирних кислот як чинник взаємодії між організмами	83
3.3. Колонізація ризо- та філосфери овочевих рослин штамми ризобактерій	89
РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ МІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ НА ФОРМУВАННЯ РОСЛИН ТОМАТІВ В ОНТОГЕНЕЗІ	96
4.1. Період проростків томатів за інокуляції	96
4.2. Ювенільний період бактеризованих рослин	97
4.3. Період дефінітивної інокульованої рослини томатів	101
4.4. Якість плодів та насіннева продуктивність томатів за інокуляції	104
РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ МІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ НА МІКРОБНІ УГРУПОВАННЯ ҐРУНТУ РИЗОСФЕРИ ОВОЧЕВИХ РОСЛИН	113
5.1. Мікробіота ґрунту ризосфери овочевих рослин за інтродукції штамів поліфункціональної дії	123
5.2. Вплив штамів агрономічно корисних мікроорганізмів на ферментативну активність та фітотоксичність ґрунту ризосфери овочевих рослин	126

РОЗДІЛ 6. ЗМІНИ ЧИСЕЛЬНОСТІ ЕПІФІТНОЇ МІКРОБІОТИ ІНОКУЛЬОВАНОГО НАСІННЯ В ПРОЦЕСІ ЗБЕРІГАННЯ.....	132
6.1. Вплив інокуляції на зміни чисельності епіфітної мікробіоти насіння в процесі зберігання	133
6.2. Якість бактеризованого насіння томатів за різних термінів зберігання.....	145
6.3. Розвиток рослин томатів за умови використання бактеризованого насіння різних строків зберігання.....	153
6.4. Динаміка чисельності епіфітів насіння овочевих рослин у процесі зберігання за впливу інокуляції.....	164
РОЗДІЛ 7. ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ ЕФЕКТИВНОЇ ІНОКУЛЯЦІЇ НАСІННЯ.....	171
7.1. Визначення оптимального інокуляційного навантаження за бактеризації насіння овочевих культур	171
7.2. Дращування як шлях інтродукції штамів агрономічно корисних мікроорганізмів у ризосферу овочевих рослин	178
РОЗДІЛ 8. ОЦІНЮВАННЯ БІОПРЕПАРАТІВ ЯК ЕКОНОМІЧНИХ І БІОЕНЕРГЕТИЧНИХ ЗАСОБІВ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ РАННЬОЇ ОВОЧЕВОЇ ПРОДУКЦІЇ	187
8.1. Економічне оцінювання застосування мікробних препаратів на овочевих культурах.....	188
8.2. Біоенергетичне оцінювання одержання ранньої овочевої продукції за використання мікробних препаратів	195
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	198
ДОДАТКИ.....	234

TABLE OF CONTENTS

LIST OF SYMBOLS, UNITS, ABBREVIATIONS AND TERMS.....	11
INTRODUCTION.....	12
CHAPTER 1. MICROBIAL ASSOCIATIVE SYSTEMS OF PLANTS AND WAYS OF THEIR ACTIVATION	15
1.1. Microbial associative systems of plants and ways of their activation.....	15
1.2. Mechanisms of interaction of initiated plant-microbial associations	24
1.3. Methodological approaches for selection and studying of associated to plants microorganisms	41
1.4. Microbiological factors for increase in agrocenoses productivity.....	45
CHAPTER 2. SELECTION OF STRAINS OF MICROORGANISMS ASSOCIATIVE TO VEGETABLE PLANTS.....	55
2.1. Development of method for selection of microorganism strains associative with vegetable plants	55
2.2. The morphological, cultural, biochemical and physiological properties of isolated strains and their identification	66
2.3. Impact of new isolated strains on vegetable plants	70
CHAPTER 3. FEATURES OF INTERACTION BETWEEN STRAINS OF ASSOCIATIVE MICROORGANISMS AND VEGETABLES PLANTS	78
3.1. Chemotaxis of strains-bioagents contained in biopreparations to exudates of different kinds of vegetable plants	69
3.2. Production of fatty acids by strains as a factor of interaction between organisms.....	83
3.3. Colonization of rhizosphere and filosphere of plants by rhizobacteria strains	89
CHAPTER 4. INFLUENCE OF BIOAGENTS IN MICROBIAL BIOPREPARATIONS ON TOMATOES PLANTS FORMATION IN ONTOGENESIS	96
4.1. Period of tomato seedlings upon inoculation	96
4.2. Juvenile period of bacterized plants	97
4.3. Period of definitive inoculated tomato plant	101
4.4. The quality of the fruit and seed productivity of tomato plant	104
CHAPTER 5. INFLUENCE OF STRAINS-BIOAGENTS IN MICROBIAL BIOPREPARATIONS ON MICROBIAL POPULATIONS IN THE SOIL OF VEGETABLE PLANTS RHIZOSPHERE	113
5.1. Microbiota of soil of vegetable plants rhizosphere upon introduction of strains with multifunctional activity	123
5.2. Impact of agronomically useful microorganism strains on enzymatic activity and phytotoxicity of soil of vegetable plants rhizosphere.....	126

CHAPTER 6. CHANGES IN THE NUMBER OF EPIPHYTIC MICROBIOTA OF INOCULATED SEEDS DURING STORAGE	132
6.1. Influence of inoculation on changes in richness of epiphytic microbiota of seeds during storage	133
6.2. Sowing quality of bacterized seeds of tomato upon different storage time	145
6.3. The development of tomato plants upon use of bacterized seeds of different storage time	153
6.4. Dynamics of epiphytes richness in seeds of vegetable plants during storage upon inoculation effects	164
CHAPTER 7. OPTIMIZATION OF CONDITIONS FOR EFFECTIVE SEED INOCULATION	171
7.1. Determination of the optimal inoculation burden for bacterization of seeds of vegetable plants	171
7.2. Seed pelleting as a way to introduce the strains of agronomically beneficial microorganisms into rhizosphere of vegetable plants	178
CHAPTER 8. EVALUATION OF BIOPREPARATIONS AS ECONOMIC AND BIOENERGY APPROACHES FOR OBTAINING EARLY VEGETABLE PRODUCTS	187
8.1. Economic evaluation of the use of microbial biopreparations for vegetable crops	188
8.2. Bioenergy assessment of obtaining early vegetable production upon use of microbial biopreparations	195
REFERENCES	198
APPLICATIONS	234