

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ФИТОПАТОЛОГИИ»  
(ФГБНУ ВНИИФ)

УТВЕРЖДАЮ:



Директор института  
д-р сельскохозяйственных наук  
А. П. Глинушкин

2021 г.

Отчет

**«Определение эффективности применения препарата «Живой Лист»  
для снижения вредоносности патогенов картофеля грибной, оомицетной и  
бактериальной этиологии: *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum  
coccodes*, *Phytophthora infestans* и *Pectobacterium atrosepticum*»**

Зав. отделом  
болезней картофеля и овощных культур,  
кандидат биологических наук

М.А.Кузнецова

2021.02.04

Большие Вяземы

2021

**Цель работы:** Определение целесообразности и эффективности применения препарата «Живой Лист» компании ООО «Поле Вселенной» для снижения вредоносности патогенов картофеля грибной, оомицетной и бактериальной этиологии: *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum coccodes*, *Phytophthora infestans* и *Pectobacterium atrosepticum*.

В отделе болезней картофеля и овощных культур Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии (Московская обл., Б. Вяземы) был испытан препарат «Живой Лист» (действующее вещество – дёготь) компании ООО «Поле Вселенной» в отношении его фунгицидной и бактерицидной активности. Контролем являлась дистиллированная вода.

Исследования фунгицидных и бактерицидных свойств препарата «Живой Лист» проводили *in vitro* в воде и на картофельно-глюкозной среде (КГА) в дозах 1 мл/л, 5 мл/л и 10 мл/л.

### **Опыт №1. Влияние препарата «Живой Лист» на прорастание конидий (выход зооспор) оомицета *Phytophthora infestans***

Как известно, одним из показателей фунгицидной активности препарата является способность его препятствовать прорастанию спор оомицета *Phytophthora infestans*.

Мы изучали влияние препарата «Живой лист» на непрямое прорастание конидий (выход зооспор) в диапазоне: 1 мл/1 л, 5 мл/1, 10 мл/1л.

Суспензию конидий получали путем смыва с 10-дневной культуры *P. infestans* дистиллированной водой, предварительно, охлажденной до +10°C. Далее суспензию смешивали с равным объемом раствора препарата удвоенной концентрации, получая в итоге заданную концентрацию. Смеси оставляли для прорастания конидий на 60 минут при +10°C в холодильнике. В каждом варианте просматривали по 300 конидий (3 повторности по 100 шт.) Определяли процент непрямого прорастания.

Согласно результатам опыта (табл. 1, рис. 1, 2, 3), препарат «Живой лист» оказывал фунгицидное действие на *P.infestans* поскольку снижал прорастание конидий (выход зооспор) в дозах 1 мл/1 л, 5 мл/1 л, 10 мл/1л.

Выход зооспор в контроле (дистиллированной воде) через 1 час составил 25%, через 2 часа 40%, через 3 часа 50 %, через 24 часа – 90%.

В варианте 1, где применяли препарат «Живой лист» в дозе 1 мл/1 л выход зооспор через 2 часа не превышал 2 %; в вариантах 2 и 3, где препарат применяли в дозах 5 мл/1 л и 10 мл/л, выход зооспор ингибировалось полностью через 1,2,3 и 24 часа.

Таким образом, препарат «Живой лист» в значительной мере подавлял прорастаемость конидий *P.infestans*, что позволяет существенно снизить инфекционный фон возбудителя фитофтороза картофеля.

Таблица 1. Оценка влияния препарата «Живой лист» на непрямое прорастание конидий (выход зооспор) *Phytophthora infestans*

№	Испытываемая концентрация, мл/л.	Выход зооспор <i>Phytophthora infestans</i> (пустые конидии, %)			
		1 час	2 часа	3 часа	24 часа
1	1 мл/л	1	2	0	0
2	5 мл/л	0	0	0	0
3	10 мл/л	0	0	0	0
4	Контроль (вода)	25	40	60	90
	НСР <sub>0.95</sub>				

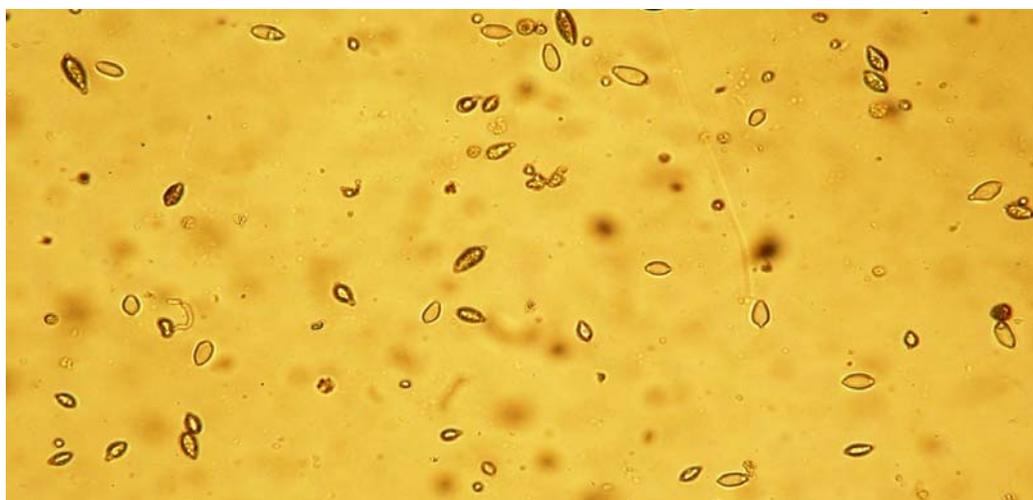




Рисунок 1. Непрямое прорастание конидий (выход зооспор) *P. infestans* в контроле (вода дистиллированная)

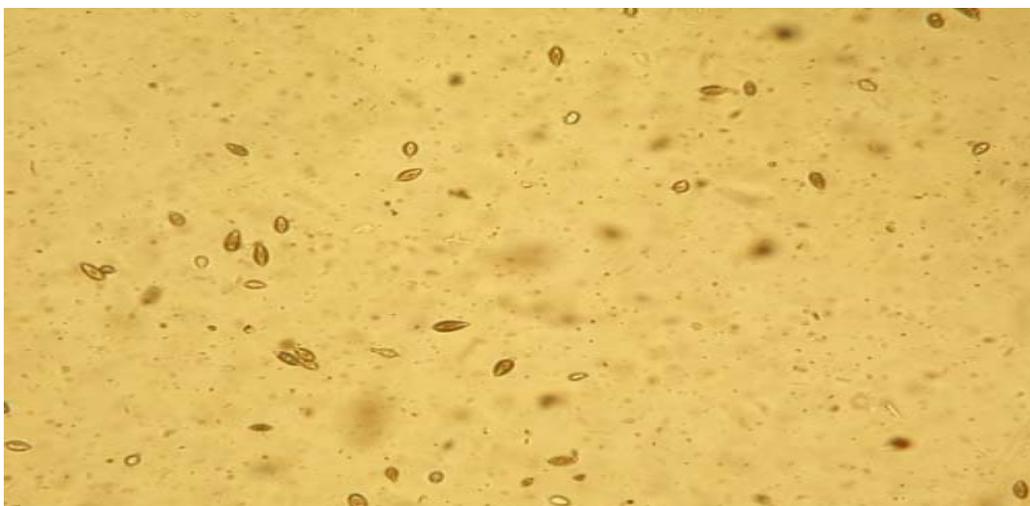


Рисунок 2. Влияние препарата «Живой лист» на непрямоe прорастание конидий *P. infestans* (1 вариант – 1 мл/1 л).

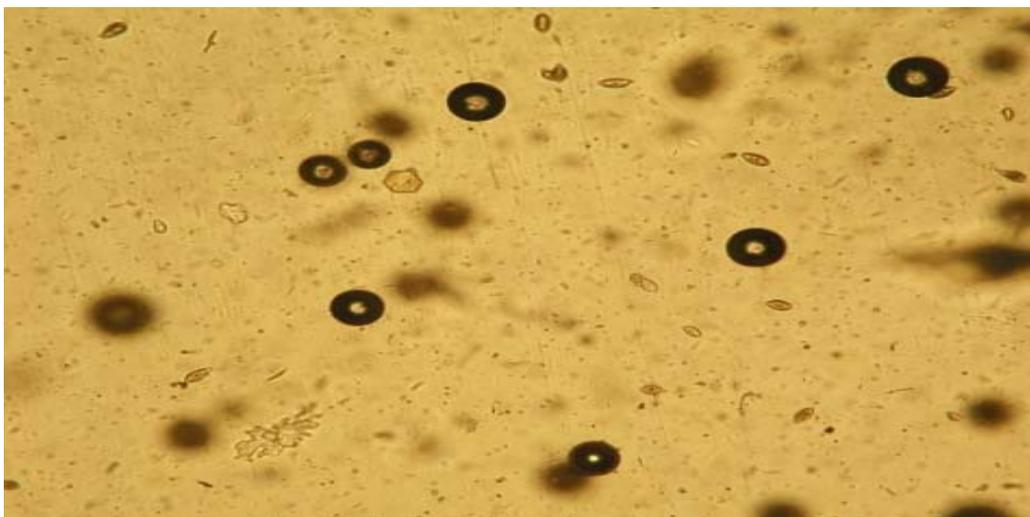


Рисунок 3. Влияние препарата «Живой лист» на непрямоe прорастание конидий *P. infestans* (2 вариант – 5 мл/1 л).

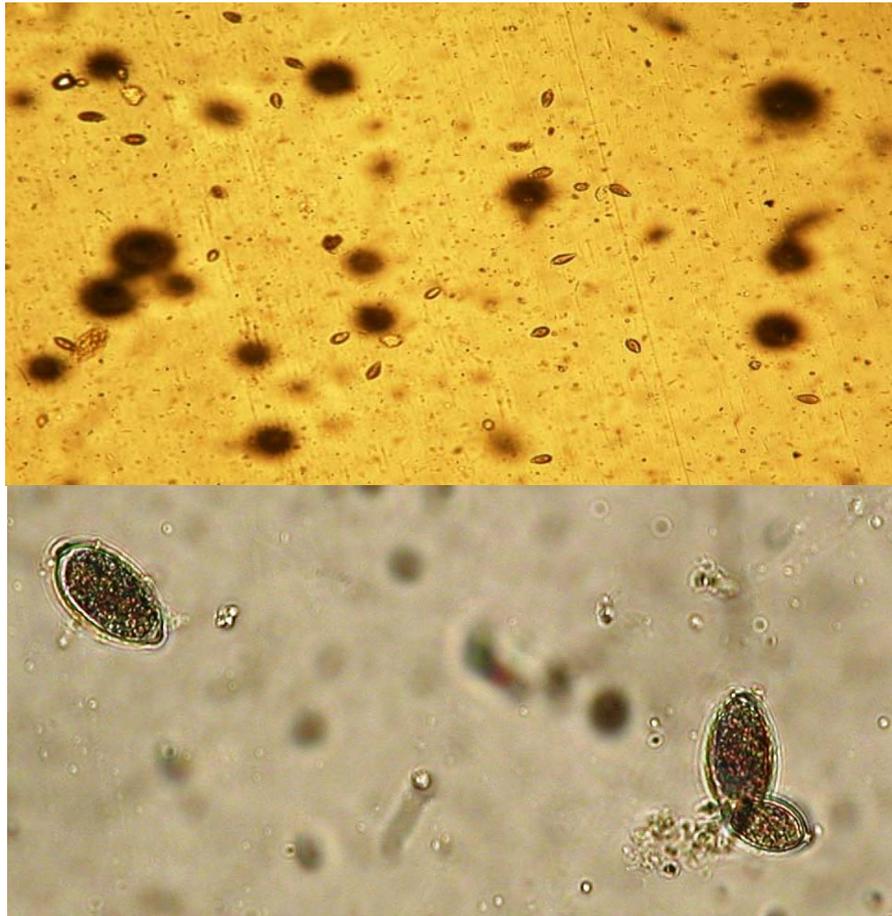


Рисунок 4. Влияние препарата «Живой лист» на непрямое проращивание конидий *P.infestans* (3 вариант – 10 мл/1 л).

**Опыт №2. Оценка фунгицидной активности препарата «Живой лист» (*in vitro*)**

Показателем фунгицидной активности препарата служил рост колоний патогена в чашках Петри на картофельно-глюкозной среде (КГА), содержащей испытываемое соединение в концентрациях 1 мл/л, 5 мл/л и 10 мл/л среды. Испытуемое соединение было введено в горячую (70° С) среду КГА до получения необходимой концентрации. В каждом варианте было 3 повторности (чашки Петри). Контролем служили варианты со средой, не содержащей препарат.

В качестве тест-объектов были выбраны *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora infestans*, *Colletotrichum coccodes*. Указанные патогены были предварительно выращены на КГА в течение 10 дней в условиях комнатной температуры (20-22<sup>0</sup> С), при рассеянном освещении. Спустя 10 дней роста культуры, из края сформировавшейся колонии гриба микрошпателем вырезали блок размером 4x4 мм и переносили, с соблюдением условий стерильности, в центр опытных чашек Петри со средой. Инокулированные чашки оставляли в указанных условиях в течение 5 суток (первый учет) и 10 суток (второй учет).

При каждом учете измеряли диаметр образовавшихся колоний в двух взаимно перпендикулярных направлениях.

Таблица 2. Оценка влияния препарата «Живой лист» на рост исследуемых культур (условных патогенов) *in vitro*

№	Испытываемая концентрация В мл/л среды	Диаметр колоний культур на 5 сутки, см			
		<i>Alternaria solani</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Colletotrichum coccodes</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
1	1 мл/л	2	3	2	0
2	5 мл/л	1,5	1,5	1	0
3	10 мл/л	1	0	0,5	0
4	Контроль	4	7	4	3
	НСР <sub>0.95</sub>	1	1	1	0



Рисунок 5. Рост колоний гриба *Rhizoctonia solani* на картофельно - глюкозной среде с содержанием препарата «Живой лист» на 5 сутки после посева; контроль – варианты без добавления препарата; 1- препарат в дозе 1 мл/л; 2- препарат в дозе 5 мл/л; 3 – препарат в дозе 10 мл/л.

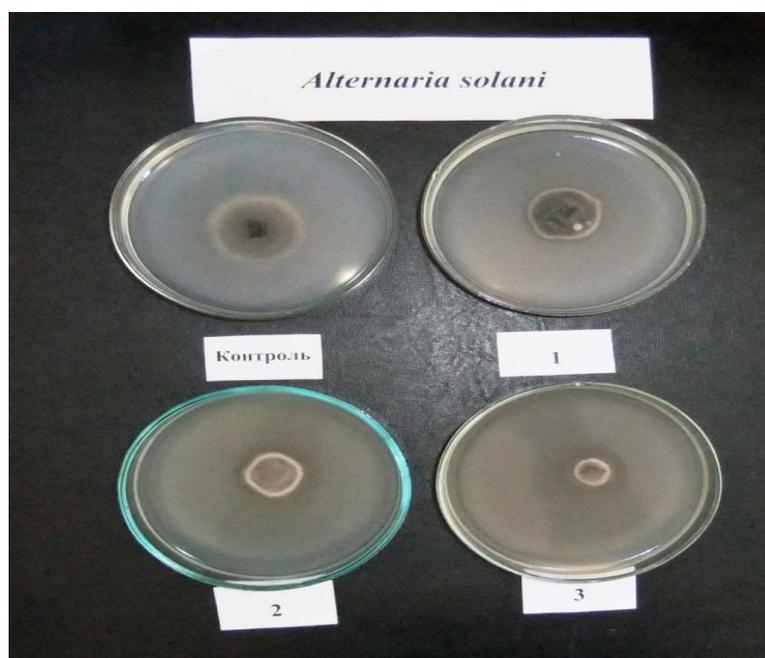


Рисунок 6. Рост колоний гриба *Alternaria solani* на картофельно - глюкозной среде с содержанием препарата «Живой лист» на 5 сутки после посева; контроль – варианты без добавления препарата; 1- препарат в дозе 1 мл/л; 2- препарат в дозе 5 мл/л; 3 – препарат в дозе 10 мл/л.

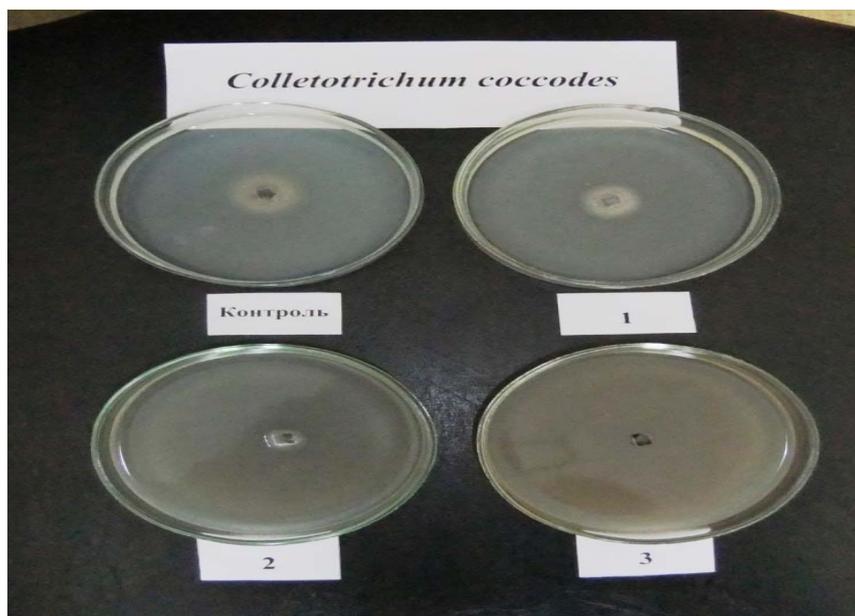


Рисунок 7. Рост колоний гриба *Colletotrichum coccodes* на картофельно - глюкозной среде с содержанием препарата «Живой лист» на 5 сутки после посева; контроль – варианты без добавления препарата; 1- препарат в дозе 1 мл/л; 2- препарат в дозе 5 мл/л; 3 – препарат в дозе 10 мл/л.

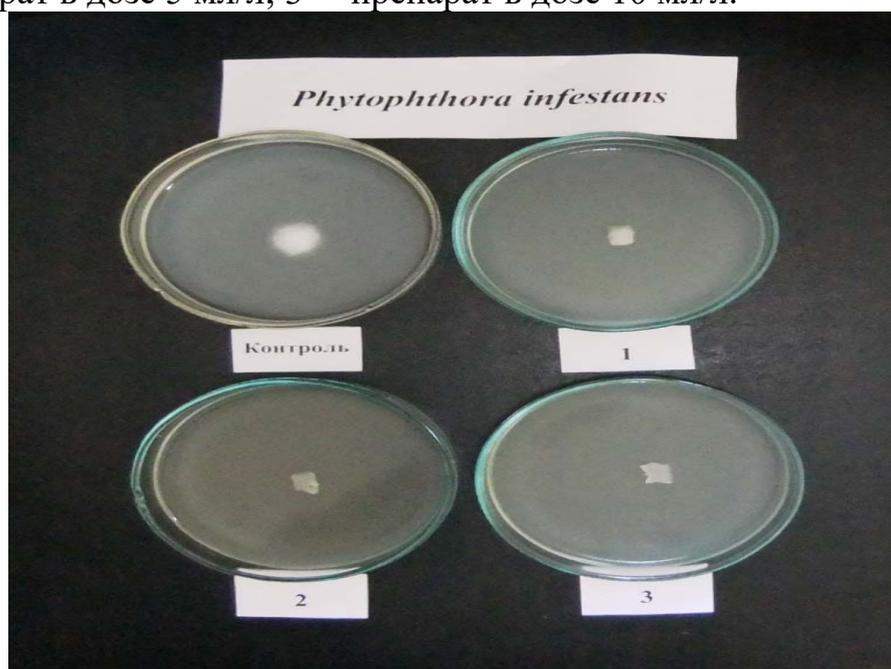


Рисунок 8. Рост колоний оомицета *Phytophthora infestans* на картофельно - глюкозной среде с содержанием препарата «Живой лист» на 5 сутки после посева; контроль – варианты без добавления препарата; 1- препарат в дозе 1 мл/л; 2- препарат в дозе 5 мл/л; 3 – препарат в дозе 10 мл/л.

Таблица 3. Оценка влияния препарата «Живой лист» на рост исследуемых культур (условных патогенов) *in vitro*

№	Испытываемая концентрация В мл/л среды	Диаметр колоний культур на 10 сутки, см			
		<i>Alternaria solani</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Colletotrichum coccodes</i>	<i>Phytophthora infestans</i>

1	1 мл/л	9	9	8	7
2	5 мл/л	9	8	7	0
3	10 мл/л	8	0	3	0
4	Контроль	9	9	9	9
	НСР <sub>0.95</sub>	1	1	2	2

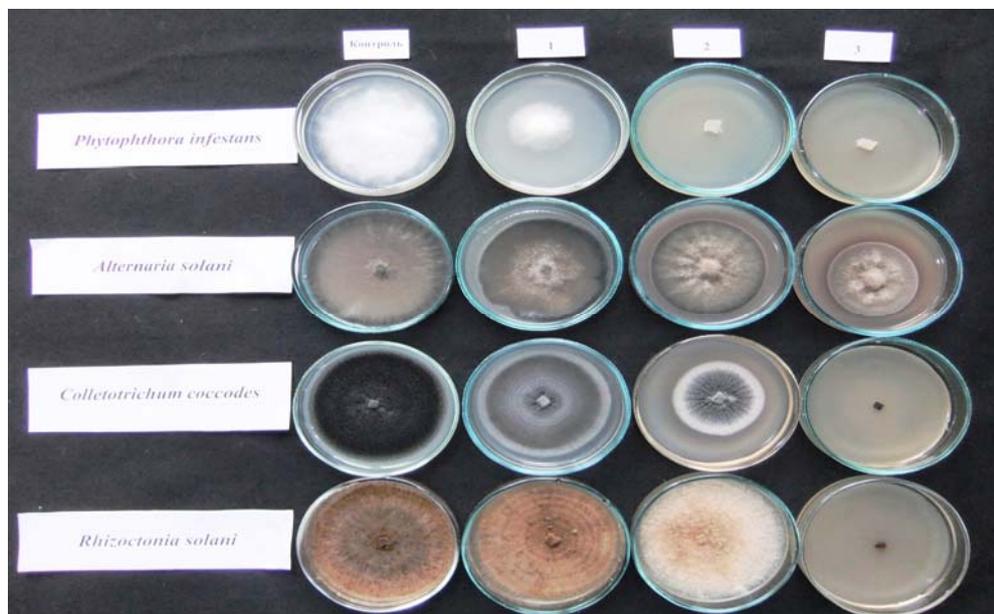


Рисунок 9. Рост колоний грибов на картофельно - глюкозной среде с содержанием препарата «Живой лист» на 10 сутки после посева; контроль – варианты без добавления препарата; 1- препарат в дозе 1 мл/л; 2- препарат в дозе 5 мл/л; 3 – препарат в дозе 10 мл/л.

По результатам первого учета, проведенного на пятые сутки, наблюдалось достоверное сдерживание развития всех тестируемых патогенов картофеля: *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora infestans*, *Colletotrichum coccodes*, по сравнению с контролем.

По результатам второго учета, проведенного через десять суток, достоверное сдерживание развития патогенов наблюдалось при применении препарата в дозе 10 мл/л для всех тестируемых патогенов: *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora infestans*, *Colletotrichum coccodes*, по сравнению с контролем. Препарат в дозе 1 мл/л сдерживал развитие патогенов на первых этапах, однако в дальнейшем не оказывал существенного влияния на рост и развитие грибов: *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani* и *Colletotrichum coccodes*, (табл.3, рис. 9).

Таким образом, по результатам испытаний было установлено, что препарат «Живой лист» обладает определенной фунгицидной активностью против *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora infestans*, *Colletotrichum coccodes*, однако, необходимо проведение дальнейших исследований с указанным препаратом для оценки эффективности на другие целевые объекты.

**Опыт №3. Оценка бактерицидного действия препарата «Живой лист» на бактерию *Pectobacterium atrosepticum* (возбудителя черной ножки картофеля) (*in vitro*)**

Опыт по оценке бактерицидного действия препарата «Живой лист» проводили по методике, применяемой для тестирования медицинских антибиотиков (Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам; Методические указания. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004, 91 с.).

Одну бактериологическую петлю суточной культуры *Pectobacterium atrosepticum* суспендировали в 1 мл дистиллированной воды. Для получения базовой бактериальной суспензии в концентрации  $10^8$  КОЕ/мл использовали спектрофотометр (режим «cell culture», длина волны 600 нм). Рабочие растворы испытуемого препарата «Живой лист» готовили в следующих концентрациях: 1 мл/л; 5 мл/л; 10 мл/л.

Для определения эффективности воздействия препарата в течение короткого времени в пробирки вносили 990 мкл раствора препарата в дистиллированной воде. Для получения конечной концентрации бактерии около  $10^6$  КОЕ/мл в пробирки вносили по 10 мкл бактериальной суспензии с концентрацией  $10^8$  КОЕ/мл. Инкубировали в течение часа. После окончания инкубирования для контроля жизнеспособности по 50 мкл суспензии высевали на среду КГА (картофельно-глюкозный агар) с помощью шпателя Дригальского, культивировали при температуре 20-25°C до 5 суток, ежедневно просматривая. Показателем бактерицидной активности против бактерий был показатель КОЕ (колониеобразующих единиц). Чем меньше выросло колоний

(КОЕ) на поверхности среды тем больше была эффективность препарата (обратно пропорциональная зависимость).

Таблица 4. Оценка влияния препарата «Живой лист» на рост бактериальной культуры *Pectobacterium atrosepticum*

№	Испытываемая концентрация В мл/л среды	<i>Pectobacterium atrosepticum</i> (КОЕ)			
		1 <i>повторность</i>	2 <i>повторность</i>	3 <i>повторность</i>	<i>среднее</i>
1	1 мл/л	16	18	21	18
2	5 мл/л	2	4	3	3
3	10 мл/л	0*	0*	0*	0*
4	Контроль	59	62	54	58
	НСР <sub>0.95</sub>				6

\* - полное подавление роста колоний

Согласно результатам опыта (табл. 4, рис.10), препарат «Живой лист» оказывал бактерицидное действие на *Pectobacterium atrosepticum*, поскольку снижал КОЕ (колониеобразующие единицы) бактерии во всех трех испытываемых концентрациях. Вместе с тем, самая высокая эффективность препарата была получена в варианте 3, где применяли «Живой лист» в дозе 10 мл/л.

Таким образом, препарат «Живой лист» в значительной мере снижал рост колоний бактерии *Pectobacterium atrosepticum*, что позволяет его рекомендовать в качестве дезинфицирующего средства, обладающего высоким бактерицидным



свойством.

Рисунок 10. Рост колоний бактерии *Pectobacterium atrosepticum* на картофельно - глюкозной среде с содержанием препарата «Живой лист»; контроль – варианты без добавления препарата; 1- препарат в дозе 1 мл/л; 2- препарат в дозе 5 мл/л; 3 – препарат в дозе 10 мл/л.