

Оригинальная статья / Original article

<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2026-3-120-132>
УДК: 635.649:631.524.86

И.А. Енгальчева*, С.Л. Фролова,
А.В. Каменева, М.Е. Слетова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Федеральный научный центр овощеводства" (ФГБНУ ФНЦО)
143072, Россия, Московская область, Одинцовский городской округ, п. ВНИИССОК, ул. Селекционная, д.14

*Автор для переписки: engirina1980@mail.ru

Финансирование. Исследования выполнены в рамках Государственного задания FGGF-2025-0003 «Разработка эффективных технологий предбридингового скрининга и выделения ген-источников для создания сортов и гибридов овощных и бахчевых культур с групповой устойчивостью к доминирующим фитопатогенам на основе иммунологических и молекулярно-генетических методов».

Вклад авторов: Енгальчева И.А.: методология, концептуализация, проведение исследований, формальный анализ, верификация данных, создание рукописи и её редактирование. Фролова С.Л., Каменева А.В., Слетова М.Е.: проведение исследований, формальный анализ, верификация данных, создание рукописи и её редактирование.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Енгальчева И.А., Фролова С.Л., Каменева А.В., Слетова М.Е. Биологические особенности *Fusarium verticillioides* и оптимизация методов оценки устойчивости перца сладкого к фузариозному увяданию. *Овощи России*. 2026;(3):120-132.
<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2026-3-120-132>

Поступила в редакцию: 12.05.2026

Принята к печати: 01.07.2026

Опубликована: 27.07.2026

Irina A. Engalycheva, Svetlana L. Frolova,
Alina V. Kameneva, Maria E. Sletova

Federal State Budgetary Scientific Institution
Federal Scientific Vegetable Center (FSBSI FSVC)
14, Selectionnaya str., VNISSOK,
Odintsovo district, Moscow region, Russia, 143072

*Corresponding Author: engirina1980@mail.ru

Funding. The research was carried out within the framework of the State Task FGGF-2025-0003 "Development of effective technologies for pre-breeding screening and isolation of gene sources for the creation of varieties and hybrids of vegetable and melon crops with group resistance to dominant phytopathogens based on immunological and molecular genetic methods."

Authors' Contribution. Engalycheva I.A.: methodology, conceptualization, investigation, formal analysis, validation, writing – review & editing. Frolova S.L., Kameneva A.V., Sletova M.E.: investigation, formal analysis, validation, writing – review & editing.

Conflict of interest. The authors declare no conflicts of interest.

For citation: Engalycheva I.A., Frolova S.L., Kameneva A.V., Sletova M.E. Biological characteristics of *Fusarium verticillioides* and optimization of methods for assessing pepper resistance to *Fusarium* wilt. *Vegetable crops of Russia*. 2026;(3):120-132. (In Russ.)
<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2026-3-120-132>

Received: 12.05.2026

Accepted for publication: 01.07.2026

Published: 27.07.2026

Биологические особенности *Fusarium verticillioides* и оптимизация методов оценки устойчивости перца сладкого к фузариозному увяданию

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Повышение эффективности селекционного процесса перца на устойчивость к фузариозному увяданию, вызываемому *Fusarium verticillioides*, требует изучения биологических особенностей патогена и условий реализации патогенеза согласно концепции классического эпифитотического треугольника. Учет этих взаимосвязей важен для разработки воспроизводимых и информативных методов оценки селекционного материала.

Цель. Изучить влияние температурного режима и состава питательных сред на вегетативный рост *F. verticillioides*, а также оптимизировать ключевые элементы протокола искусственной инокуляции для ускоренной оценки устойчивости селекционных линий перца.

Материалы и методы. В работе исследовали три изолята *F. verticillioides* с контрастной агрессивностью. Оценку скорости радиального роста проводили *in vitro* на средах PDA, OA, Czapek и SNA в диапазоне температур 10–40 °C. Патогенность тестировали *in vivo* на сеянцах пяти линий перца при 25, 28 и 30 °C. Дополнительно сравнивали два метода инокуляции: с механическим перемешиванием (орбитальный шейкер, 100 об/мин) и в статических условиях.

Результаты. Внутри популяции *F. verticillioides* выделены контрастные по патогенности классы: высокоагрессивные (ВА, 46%), умеренно агрессивные (УА, 27%) и слабоагрессивные (СА, 27%). Установлена прямая корреляция между скоростью радиального роста (VR) и агрессивностью: ВА-изоляты росли в 1,7–1,9 раза быстрее СА (VR 13,0 против 7,6 мм/сут). Температурный оптимум роста высокоагрессивного изолята *in vitro* (VR 12,8 мм/сут) и патогенеза *in vivo* (I=3,4 балла) совпал и составил 28 °C. Однако при 30 °C, несмотря на сохранение высокого роста *in vitro* (VR 10,3–11,8 мм/сут), патогенез *in vivo* достоверно снизился до 1,9 балла. Двухфакторный ANOVA показал, что на 7-е сутки метод инокуляции (с шейкером) определял 31,6% дисперсии, а к 14-м суткам доминировал генотип (40,6%). Применение орбитального шейкера позволило ускорить патогенез и проявление симптомов, сократив срок достоверной оценки с 14 до 7 суток, что обеспечило возможность ускоренного скрининга.

Заключение. Интеграция знаний о биологических особенностях патогена в методику эксперимента позволила усовершенствовать элементы протокола искусственного заражения. Использование данных элементов позволило существенно сократить сроки скрининга и повысить надежность оценки устойчивости перца к фузариозному увяданию, что важно для ускорения селекционного процесса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:

перец сладкий, *Capsicum annuum*, *Fusarium verticillioides*, фузариозное увядание, филогения, патогенность

Biological characteristics of *Fusarium verticillioides* and optimization of methods for assessing pepper resistance to *Fusarium* wilt.

ABSTRACT

Relevance. Improving the efficiency of the pepper breeding process for resistance to fusarium wilt, caused by *Fusarium verticillioides*, requires studying the biological characteristics of the pathogen and the conditions for pathogenesis development according to the concept of the classical disease triangle. Taking these relationships into account is essential for developing reproducible and informative methods for evaluating breeding material.

Purpose. To study the effect of temperature regime and nutrient medium composition on the vegetative growth of *F. verticillioides*, as well as to optimize key elements of the artificial inoculation protocol for accelerated evaluation of resistance in pepper breeding lines.

Materials and methods. The study examined three *F. verticillioides* isolates with contrasting aggressiveness. The radial growth rate was assessed *in vitro* on PDA, OA, Czapek, and SNA media in the temperature range of 10–40 °C. Pathogenicity was tested *in vivo* on seedlings of five pepper lines at 25, 28, and 30 °C. Additionally, two inoculation methods were compared: with mechanical stirring (orbital shaker, 100 rpm) and under static conditions.

Results. Within the *F. verticillioides* population, contrasting classes of pathogenicity were identified: highly aggressive (HA, 46%), moderately aggressive (MA, 27%), and weakly aggressive (WA, 27%). A direct correlation was established between the radial growth rate (VR) and aggressiveness: HA isolates grew 1.7–1.9 times faster than WA isolates (VR 13.0 vs. 7.6 mm/day). The temperature optimum for the growth of the highly aggressive isolate *in vitro* (VR 12.8 mm/day) and pathogenesis *in vivo* (I=3.4 points) coincided and was 28 °C. However, at 30 °C, despite maintaining high growth *in vitro* (VR 10.3–11.8 mm/day), pathogenesis *in vivo* significantly decreased to 1.9 points. Two-way ANOVA showed that on day 7, the inoculation method (with shaker) accounted for 31.6% of the variance, while by day 14, the genotype dominated (40.6%). The use of an orbital shaker allowed accelerating pathogenesis and symptom manifestation, reducing the period of reliable evaluation from 14 to 7 days, which provided the opportunity for accelerated screening.

Conclusion. Integration of knowledge about the biological characteristics of the pathogen into the experimental methodology allowed improving the elements of the artificial infection protocol. The use of these elements made it possible to significantly reduce screening time and increase the reliability of evaluating pepper resistance to fusarium wilt, which is important for accelerating the breeding process.

KEYWORDS:

Capsicum annuum, *Fusarium verticillioides*, fusarium wilt, pathogenicity, phylogeny.



Введение

Переч сладкий (*Capsicum annuum* L.) относится к числу наиболее значимых овощных культур на территории Российской Федерации. Основные регионы его промышленного возделывания (Северный Кавказ, Южный федеральный округ, Поволжье) характеризуются климатическими условиями, благоприятными не только для роста культуры, но и для развития фитопатогенов. В настоящее время серьезную экономическую угрозу производству перца представляют болезни, вызываемые грибами рода *Fusarium* spp., которые приводят к сосудистым увяданиям, корневым и стеблевым гнилям, а также накапливают токсичные вторичные метаболиты (микотоксины) в тканях растений, что ставит под угрозу безопасность пищевой продукции [1, 2].

Ранее нами было изучено генетическое разнообразие комплекса возбудителей фузариозного увядания на перце в южных регионах России. Использование молекулярно-генетических и морфологических подходов позволило установить, что в структуре патогенного комплекса доминируют виды *F. clavus* (46%) и *F. verticillioides* (20%), обладающие наиболее высокой агрессивностью и широким спектром вирулентности [3]. В связи с высокой вредоносностью и повсеместным распространением, вид *Fusarium verticillioides* представляет особую эпифитотическую опасность и является приоритетным объектом для изучения.

Несмотря на успешную таксономическую идентификацию, фундаментальные аспекты популяционной биологии *F. verticillioides*, в частности фенотипическая пластичность в ответ на абиотические стрессоры, остаются изученными недостаточно. Известно, что скорость радиального роста мицелия факультативных паразитов зависит от генетической детерминированности, состава питательной среды и температурных условий [4, 5]. Более того, выдвинута и подтверждена для ряда видов гипотеза о том, что высокая скорость линейного роста служит косвенным маркером агрессивности штамма: быстрый выход в экспоненциальную фазу позволяет патогену интенсивнее накапливать биомассу и раньше инициировать синтез фитотоксинов и гидролитических ферментов, что является ключевым фактором успешной колонизации тканей растения-хозяина [6, 7]. Однако влияние температурного градиента и состава сред на кинетику роста именно *F. verticillioides*, выделенного с перца, требует детализации.

Кроме того, эффективность селекции перца на устойчивость к фузариозу сдерживается отсутствием унифицированных и ускоренных протоколов искусственного заражения. Реализация патогенного потенциала гриба подчиняется законам классического эпифитотического треугольника («патоген – растение-хозяин – среда»), где температура выступает мощным модулятором как вирулентности гриба, так и иммунного статуса растения. Оценка устойчивости селекционного материала без учета этих взаимосвязей часто дает недостоверные результаты.

В связи с этим, **целью данного исследования** являлось изучение влияния температурного режима и состава питательных сред на вегетативный рост *F. verticillioides*, оценка патогенности изолятов в условиях *in vivo*, а также оптимизация ключевых элементов протокола искусственной инокуляции для ускоренной оценки устойчивости селекционных линий перца сладкого.

Материалы и методы исследований

В исследования включили три изолята вида *F. verticillioides* с различной агрессивностью в отношении культуры перца сладкого (*Capsicum annuum* L.). Данные изоляты выделены в Республике Крым (Симферопольский район) с пораженных растений перца с симптомами фузариозного увядания (табл. 1).

Идентификацию изолятов проводили по макро- и микроморфологическим характеристикам колоний и с использованием анализа нуклеотидных последовательностей генов *tef-1α* и двух локусов ITS 1.4 и ITS 4.5 [8, 9].

Выделение и культивирование изолятов *F. verticillioides*

Стерилизацию пораженных органов и выделение грибов в чистую культуру проводили в соответствии с общепринятой фитопатологической методикой [10]. Изоляты выращивали на картофельно-декстрозной агаризованной среде (PDA) в течение 16 суток в условиях переменного освещения (16 часов день и 8 часов ночь) при температуре 25 °С. Морфологию колоний, скорость роста грибов, появление пигментации оценивали, фиксируя ежедневно время начала роста. Диаметр колоний измеряли в двух поперечных направлениях для трех параллельных посевов ($n = 3$) до полного обрастания чашки Петри.

Таблица 1. Изоляты *F. verticillioides*, выделенные с растений перца сладкого в условиях Крыма, с симптомами фузариозного увядания
Table 1. *F. verticillioides* isolates obtained from pepper plants in Crimea with symptoms of fusarium wilt

Вид <i>Fusarium</i>	Шифр изолята	Источник*	Год изоляции	Район
<i>F. verticillioides</i>	F-Ст-34-25	Стебель	2025	Симферопольский
	F-Ст-16-1-25	Стебель	2025	Симферопольский
	F-Л-38-25	Лист	2025	Симферопольский

Примечание: * орган растения, из которого выделен изолят

Таблица 2. Последовательности праймеров, использованных для амплификации локусов *tef-1α* и *ITS*
 Table 2. Primer sequences used for amplification of the *tef-1α* and *ITS* loci

Праймер	Последовательность 5'-3'	Размер продукта (bp)	Tm (°C)	Источник
EF-1 EF-2	F:ATGGGTAAGGARGACAAGAC R:GGARGTACCAGTSATCATG	~680	55*	[8]
ITS1 ITS4	F:TCCGTAGGTGAACCTGCGG R:TCCTCCGCTTATTGATATGC	~550	62*	[9]
ITS5 ITS4	F:GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG R:TCCTCCGCTTATTGATATGC	~550	62*	[9]

Для ДНК экстракции, ПЦР амплификации и филогенетического анализа отбирали в пробирки Eppendorf 1,5 мл воздушный мицелий чистой культуры патогенов после культивирования в чашках Петри. Выделение ДНК осуществлялось по методике СТАВ с различной модификацией [11]. Оценка чистоты ДНК осуществлялась на приборе NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA) с измерением концентрации на Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, USA).

На основе опубликованных в открытой печати литературных данных, были выбраны праймеры, представленные в табл. 2. Программа амплификации для всех пар праймеров согласно опубликованной в работе [1].

Для анализа использовали систему Sub-Gell GT с горизонтальной камерой электрофореза и блок питания PowerPac HC (BioRad, США). Выделение продуктов ПЦР из геля проводили на трансиллюминаторе ECX-M (VilberLourmat, Германия). Образцы также были очищены с помощью набора ColGen (Синтол, Россия) и секвенированы в Syntol. Идентификация видов была проведена в GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) и базе данных FUSARIOID-ID – Food, Fibre & Health (<https://www.fusarium.org/>). Эволюционный анализ был проведен в MEGA 12 [12].

Морфолого-культуральные свойства моноспоровых культур *F. verticillioides*

Фенотипические особенности и скорость роста *F. verticillioides* оценивали при культивировании на питательных агаризованных средах: картофельно-декстрозном агаре (PDA), овсяном агаре (OA), средах Czapek и синтетической среде Ниренберга (SNA) с температурным режимом 10, 15, 20, 25, 28, 30, 35 и 40°C в трехкратной повторности. Ежедневно проводили измерение диаметра каждой колонии в двух перпендикулярных направлениях до полного обрастания среды, фиксируя время начала роста (появление мицелия за пределами точки инокуляции). Среднюю скорость роста VR (мм/сут) вычисляли по формуле:

$$VR = \frac{R1 - R0}{t1 - t0},$$

где R1 – радиус колонии в конце роста, мм; R0 – радиус колонии в начале фазы линейного роста, мм; t1-t0 – продолжительность линейной фазы роста, сутки.

Для оценки способности высокоагрессивного изолята *F. verticillioides* адаптироваться к экстремальным

температурам рассчитывали два физиологических индекса термоадаптации: индекс холодоустойчивости (Iхл) и индекс термотолерантности (Iтт). Индекс холодоустойчивости (Iхл) рассчитывали как отношение скорости радиального роста мицелия при пониженных температурах (10 и 15°C) к скорости роста при контрольной температуре 25°C:

$$I_{хл} = \frac{VR_{10 \text{ или } 15^{\circ}C}}{VR_{25^{\circ}C}},$$

где VR10, 15 – скорость линейного роста (мм/сут) при температуре 10 или 15°C; VR25 – скорость линейного роста при 25°C.

Индекс термотолерантности (Iтт) рассчитывали как отношение скорости радиального роста при повышенных температурах (30, 35 и 40 °C) к скорости роста при 25 °C:

$$I_{тт} = \frac{VR_{30.35.40^{\circ}C}}{VR_{25^{\circ}C}},$$

где VR 30,35,40 – скорость линейного роста (мм/сут.) при температуре 30, 35 или 40 °C; VR25 – скорость линейного роста при 25°C.

Значения индексов, равные 1,0, свидетельствуют о сохранении метаболической активности на уровне контрольной; значения <1,0 – о ингибировании роста под действием температурного стресса; значения >1,0 – о компенсаторной активации метаболизма. Температура 20 и 28°C не включалась в расчет индексов, так как по литературным данным они для гриба *F. verticillioides* не являются стрессовыми.

Описание макро- и микроморфологических признаков *F. verticillioides* на изучаемых средах с различным температурным режимом оценивали в течение 30 суток. Микроскопические характеристики моноспоровых культур были исследованы и зафиксированы с помощью микроскопа Zeiss Axio Lab A1 и программного обеспечения ADF Image Capture. Таксономический статус гриба *F. verticillioides* охарактеризован с использованием определителей [8, 10], и научных публикаций.

Для оценки патогенности изолятов *F. verticillioides* использовали двухнедельные сеянцы перца сладкого в фазе двух полностью развернутых настоящих листьев. В исследование включены пять селекционных линий (Л-90/22, Л-94/22, Л-167/22, Л-388/22 и Л-389/22), предоставленные лабораторией селекции и семеновод-

ства паслёновых культур ФГБНУ ФНЦО. Эксперимент заложен в трёхкратной повторности по 10 растений каждой линии в одном повторении.

Непосредственно перед инокуляцией сеянцы извлекали из субстрата, корневую систему тщательно промывали стерильной водой и подрезали на 2 см. Корни погружали в мицелиально-споровую суспензию целевого изолята *F. verticilliioides* (концентрация 10^6 спор/мл) на 30 мин. Для оптимизации протокола искусственного заражения проведено два независимых эксперимента. В первом оценивали эффективность механического воздействия на инокулюм: часть сеянцев инкубировали в суспензии на орбитальном шейкере при 100 об./мин. Во втором дополнительное воздействие не применялось. Растения в контрольных вариантах помещали в стерильную воду.

После обработки сеянцы пересаживали в индивидуальные ячейки кассет (объём 160 мл), заполненные стерильной торфо-перлитной смесью (соотношение 3:1). Растения выращивали в вегетационных боксах при относительной влажности воздуха 85% и фотопериоде 18/6 ч (день/ночь). Для определения оптимального температурного режима инокулированные растения культивировали при трёх температурных режимах: 25, 28 и 30°C. Рандомизацию вариантов эксперимента проводили по методу случайных блоков.

Наблюдения за развитием проростков и симптомами поражения проводили в динамике на 7, 14 и 21 сутки от даты заражения, учитывая средний индекс поражения (I, балл) и распространённость болезни. Оценку проводили с использованием 4-балльной шкалы в нашей модификации:

- 0 – отсутствие симптомов;
- 1 балл – небольшое потемнение стержневого корня, придаточные корни и вегетативная часть без симптомов;
- 2 балла – потемнение стержневого корня, придаточные корни с видимыми симптомами поражения, рост вегетативной части ограничен;
- 3 балла – стержневой корень полностью коричневый, придаточные слабо развиты, рост стебля на 50 % отстает относительно контроля, сильное увядание;
- 4 балла – стержневой корень темно-коричневый, полностью некротизирован или может совсем не образо-

ваться, придаточные корни отсутствуют, растения полностью некротизированы или в необратимой стадии увядания.

На основании среднего индекса поражения сеянцев в 3-4 балла изоляты *F. verticilliioides* дифференцировали на группы: непатогенные (НП) – отсутствие симптомов, слабоагрессивные (СА) – данный индекс поражения имеют более 25 % инокулированных растений; умеренно агрессивные (УА) – поражено более 50 % инокулированных растений; высокоагрессивные (ВА) – более 75% инокулированных растений.

Статистическая обработка. Анализ экспериментальных данных и статистическая оценка были выполнены в Microsoft Excel 2010 и Statistica 10.0. При изучении микроструктур *F. verticilliioides* для каждого варианта опыта рассчитывали средние значения (М) и стандартное отклонение по результатам всех измерений. Для определения значимости различий в устойчивости линий перца использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с группировкой средних значений в гомогенные группы согласно тесту Дункана ($p \leq 0,05$).

Результаты исследований

1. Молекулярно-генетическая идентификация и изучение патогенных свойств возбудителя фузариозного увядания на перце – вида *F. verticilliioides*

В условиях Республики Крым первые признаки фузариозного увядания проявлялись в фазу бутонизации с листьев верхнего яруса; на более восприимчивых сортах перца в прикорневой зоне наблюдалось побурение стебля. При поперечном разрезе стебля отмечали сильную некротизацию. На некоторых восприимчивых сортах отмечалась сильная некротизация не только проводящей системы растений, но и генеративных органов.

Фитомониторинг видового состава возбудителей фузариозного увядания в 2025 году на перце позволил определить, как и согласно нашим предыдущим данным [1] в структуре патогенного комплекса доминирует вид *F. verticilliioides*. Выделенные изоляты вида *F. verticilliioides* включили в исследование по оценке их патогенности. Установлено, что внутри видовой популяции данного вида были выделены контрастные

Таблица 3. Оценка патогенности и дифференциация различных изолятов *F. verticilliioides* по степени агрессивности при инокуляции сеянцев перца сладкого
Table 3. Assessment of pathogenicity and differentiation of *F. verticilliioides* isolates by the degree of aggressiveness upon inoculation of sweet pepper seedlings

Вид	Изолят	I, балл		ЭД, %		*Доля воспр. образцов, %	Группа СА
		диапазон	среднее	корень	стебель		
Контроль		0,0	0a	0a	0a	0,0	
<i>F.verticillioides</i>	F-Ст-34-25	0-4,0	3,4 c	-43,0 c	-48,0 c	76,0	BA
	F-Ст-16-1-25	0-1,5	1,8 b	-8,0 b	-2,5 b	5,5	YA
	F-Л-38-25	0-0,5	0,4 a	0a	0a	0,0	CA

Примечание: в таблице представлены средние значения индекса поражения по совокупности всех анализируемых растений, зараженных изолятом; I – средний индекс поражения, балл; ЭД – эффект действия на рост и развитие стебля и корня; ВА – высокоагрессивные, УА – умеренно агрессивные, СА – слабоагрессивные изоляты; * – процент пораженных образцов со степенью развития болезни более 50% (для определения агрессивности изолятов); a-c – значения с одинаковой буквой достоверно не имеют существенной разницы с вероятностью 95% согласно тесту Дункана

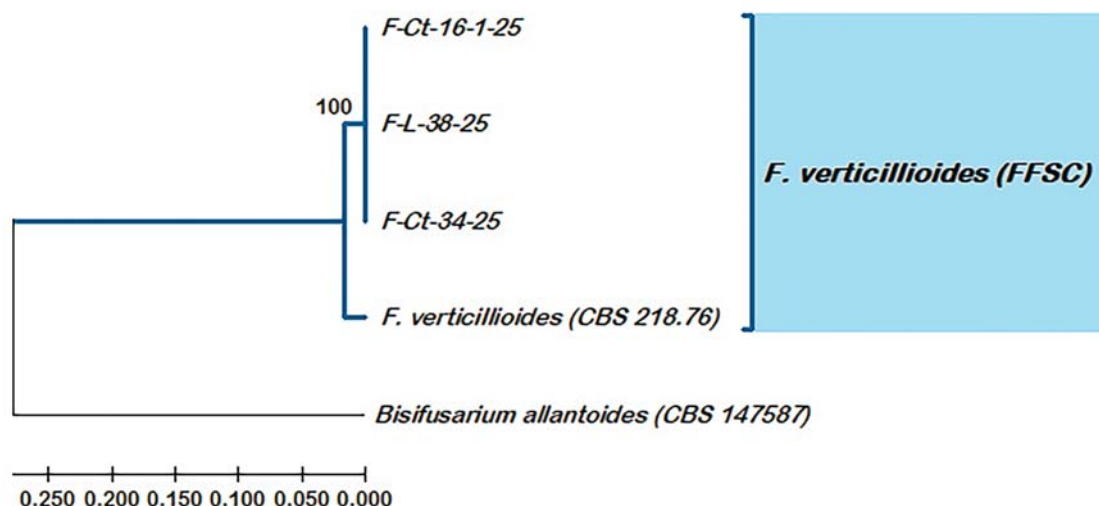


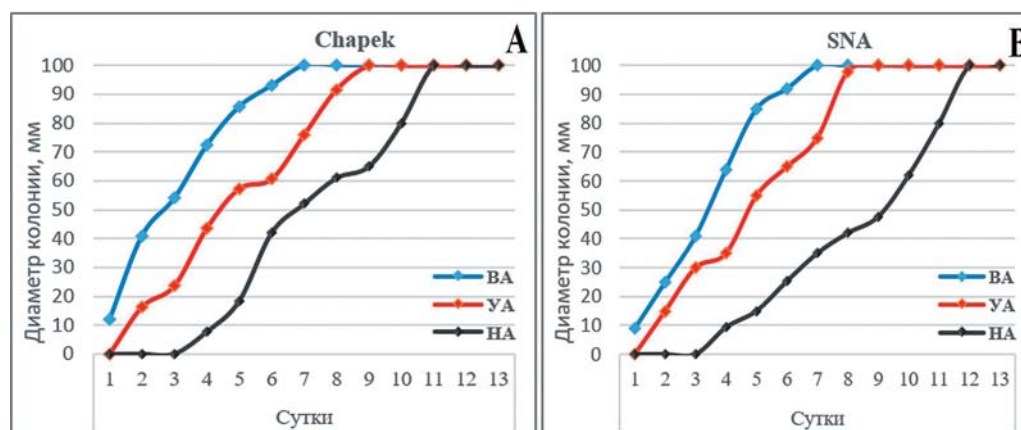
Рис. 1. Филогенетический анализ изолятов *Fusarium*, выполненный на основе полученных нуклеотидных последовательностей гена *tef1*. Дендрограмма построена с помощью программы Mega 12 методом UPGMA, бутстреп 1000. Последовательность локуса *tef1* *Bisufusarium allantoides* выбрана в качестве аутеруппы
 Fig.1. Phylogenetic analysis of *Fusarium* isolates based on the obtained nucleotide sequences of the *tef1* gene. The dendrogram was constructed using MEGA 12 software via the UPGMA method with 1000 bootstrap replicates. The *tef1* locus sequence of *Bisufusarium allantoides* was used as the outgroup

по патогенности классы изолятов. Процентное соотношение классов из групп слабо- (СА) и умеренно агрессивные (УА) было равным и составило по 27%. Наиболее высокий удельный вес пришёлся на группу высокоагрессивных (ВА) изолятов — 46%, что в 1,7 раза превышает суммарную долю СА- и УА-классов. Три изолята *F. verticillioides* из различных групп патогенности: F-Ст-34-25 (ВА), F-Ст-16-1-25 (УА) и F-Л-38-25 (СА) включили для изучения их патогенности и молекулярно-генетической идентификации. Чтобы акцентировать внимание на различиях между контрастными по патогенности изолятами вида *F. verticillioides* внутри видовой популяции, данные по изучаемым линиям и повторностям были усреднены (таблица 3).

К моменту окончательного учета на 21 сутки выявлена значимая ($P \leq 0,05$) высокая агрессивность изолята F-Ст-34-25 в отношении испытанных линий перца. В ходе эксперимента отмечены высокий индекс поражения (I) при инокуляции данным изолятом (3,4 балла) в отношении подавляющего числа испытанных линий (76,0%) и ингибирование развития корневой системы (ЭД=43,0%), а также развития надземной

части сеянцев (ЭД=48,0%). При инокуляции растений перца изолятом F-Ст-16-1-25 на 5,5% изученных линиях симптомы увядания не превышали 1,5 балла. В ходе эксперимента не было отмечено четких внешних симптомов при инокуляции изолятом F-Л-38-25. Хотя на некоторых на более восприимчивых линиях встречались растения с признаками увядания, но в среднем различия относительно контрольных вариантов были статистически не значимы ($I = 0,4$ балла). Таким образом, результаты таблицы 3 подтверждают наличие внутри популяции *F. verticillioides* контрастных по вирулентности классов. Высокоагрессивные изоляты обладают выраженным фитотоксическим эффектом, подавляющим как корневую, так и надземную биомассу сеянцев, тогда как слабоагрессивные штаммы не вызывают статистически значимых отклонений в развитии растений от незараженных образцов.

Молекулярно-генетическую идентификацию данных трех изолятов проводили путем сравнения полученных нуклеотидных последовательностей с аннотированными последовательностями этих локусов у различных видов рода *Fusarium* из базы данных FUSARIOID-ID –



Примечание: ВА— высокоагрессивный (F-Ст-34-25), УА — умеренно агрессивный (F-Ст-16-1-25), СА — слабоагрессивный (F-Л-38-25)

Рис. 2. Динамика радиального роста изолятов *F. verticillioides* различной степени патогенности в зависимости от состава питательной среды
 Fig. 2. Dynamics of radial growth of *F. verticillioides* isolates with different pathogenicity depending on the composition of the nutrient medium

Food. Результаты анализа приведены на рисунке 1 в виде дендрограммы. У всех изолятов последовательно-сти трех анализируемых локусов кластеризовались с референсными последовательностями этих локусов аналогичных видов. Так, установлено, что изоляты F-Ст-34-25, F-Ст-16-1-25 и F-Л-38-25 относятся к виду *F. verticillioides*.

2. Изучение кинетики роста изолятов

F. verticillioides с различной степенью патогенности на дифференциальных питательных средах

Ранее исследователями выдвинута гипотеза о том, что скорость линейного роста мицелия грибов рода *Fusarium* может служить косвенной оценкой агрессивности штаммов [13]. В связи с этим, нами была изучена скорость линейного прироста (VR, мм/сут) изолятов *F. verticillioides* с различной степенью патогенности при культивировании на дифференциальных питательных средах Czapek и SNA. Анализ динамических характеристик онтогенеза трех изолятов *F. verticillioides* (длительности лаг-фазы и скорости экспоненциального роста) выявил существенные различия в кинетике их роста (рис.2).

Установлено, что высокоагрессивный (BA) изолят F-Ст-34-25 характеризовался фактическим отсутствием лаг-фазы: диаметр колонии на первые сутки уже составлял 9,0 мм на SNA и 12,0 мм на среде Czapek, после чего немедленно наступала фаза активного линейного роста. Умеренно агрессивный (YA) изолят F-Ст-16-1-25 имел скрытый период продолжительностью одни сутки (диаметр 0 мм на 1-е сутки, 15,0 и 16,0 мм на 2-е сутки соответственно). Наиболее выраженная задержка метаболической активации зафиксирована у

слабоагрессивного (CA) изолята F-Л-38-25, лаг-фаза которого составила 3–4 суток (начало роста зафиксировано лишь на 4-е сутки с диаметром 8,0-9,0 мм).

На среде SNA значения VR составили: 13,0 мм/сут. для BA, 10,6 мм/сут. для YA и 7,6 мм/сут. для CA изолятов. Аналогичная тенденция наблюдалась на минеральной среде Czapek: 12,6; 9,3 и 6,8 мм/сут. соответственно. Таким образом, высокоагрессивные штаммы росли в 1,7-1,9 раза быстрее слабоагрессивных, достигая предельного диаметра 90 мм на 6–7-е сутки, тогда как CA-изолятам для этого потребовалось 11-13 суток. Полученные результаты подтверждают выдвинутую гипотезу о том, что для вида *F. verticillioides* минимальная лаг-фаза и максимальная скорость экспоненциального роста могут служить надежными фенотипическими маркерами высокой агрессивности.

3. Изучение влияния температурного режима и состава питательной среды на радиальный рост высокоагрессивного изолята

F. verticillioides в условиях *in vitro*

Известно, что скорость роста мицелия факультативных паразитов из рода *Fusarium* зависит не только от генетически детерминированной агрессивности и состава питательной среды, но и температурных условий культивирования [14, 15]. С целью оценки фенотипической пластичности и выявления экологических лимитов для высокоагрессивного (BA) изолята вида *F. verticillioides* F-Ст-34-25, на следующем этапе исследования проведено изучение радиального роста на четырех дифференциальных питательных средах (PDA, OA, Czapek и SNA) в диапазоне температур от 10 до 40°C (рис. 3, табл. 4).

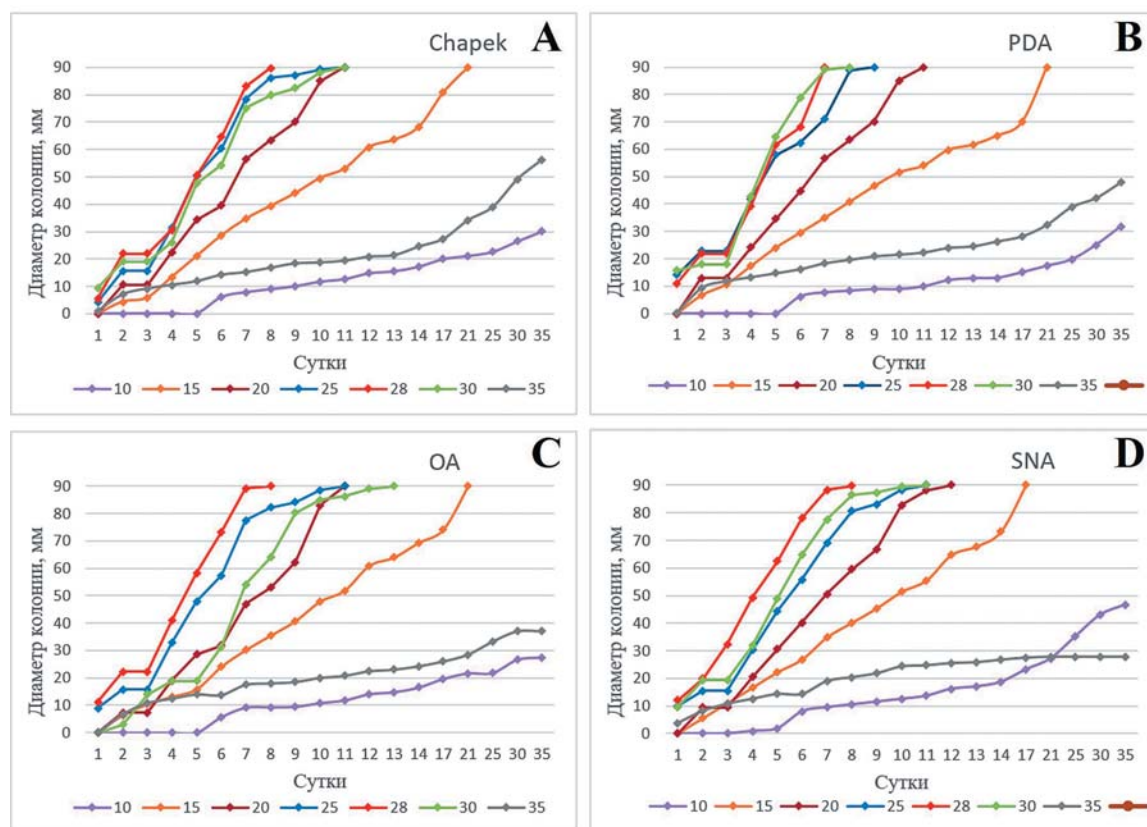


Рис. 3. Влияние температуры и состава питательной среды на радиальный рост высокоагрессивного изолята *F. verticillioides*
Fig. 3. Effect of temperature and nutrient medium composition on the radial growth of a highly aggressive *F. verticillioides* isolate

Таблица 4. Линейная скорость роста и индексы термоадаптации высокоагрессивного изолята *F. verticillioides* на различных питательных средах
Table 4. Linear growth rate and thermo-adaptation indices of a highly aggressive *Fusarium verticillioides* isolate on differential nutrient media

Температура	Показатель	Питательная среда			
		PDA	OA	Чапек	SNA
10	VR, мм/сут	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	I хл	0,01	0,01	0,01	0,01
15	VR, мм/сут	5,80	5,00	5,80	5,80
	I хл	0,44	0,43	0,47	0,59
20	VR, мм/сут	9,50	7,80	9,50	7,80
25	VR, мм/сут	13,30	11,50	12,30	9,80
28	VR, мм/сут	12,80	11,00	12,80	11,00
30	VR, мм/сут	11,00	11,00	11,00	11,00
	I тт	0,83	0,96	0,89	1,12
35	VR, мм/сут	2,70	2,00	2,30	1,80
	I тт	0,20	0,17	0,19	0,18
40	VR, мм/сут	0	0	0	0
	I тт	0	0	0	0

Примечание: VR – скорость линейного роста колонии, мм/сут; I хл – коэффициент холодостойкости; I тт – коэффициент термотолерантности

Установлено, что температурные экстремумы оказывают супрессивное действие на патоген: при 10°C рост мицелия на всех средах практически отсутствовал (диаметр колонии не превышал 1-2 мм к 35 суткам, VR<0,1 мм/сут.), а при 40°C инокулом полностью погибал. Температурный оптимум для ВА-изолята составил 25-30°C. В этих условиях лаг-фаза отсутствовала (рост начинался с 1-х суток), и изолят достигал предельного диаметра (90 мм) уже на 6-7-е сутки. Скорость линейного роста (VR) в экспоненциальную фазу (с 1-х по 7-е сутки) при 28°C была максимальной на средах PDA и Czapek и составила 12,8 мм/сут., на OA и SNA данный показатель был достоверно ниже, что составило 11,0 мм/сут. При 25°C максимальную скорость роста изолят также реализовал на PDA и Чапек (13,3 и 12,3 мм/сут.), тогда как на SNA и OA она снижалась до 9,8 и 11,5 мм/сут.

Снижение температуры до 20°C приводило к замедлению метаболизма: время достижения 90 мм увеличилось до 11 суток, а VR на PDA и Czapek снижалась до 9,5 мм/сут., на OA — до 7,8 мм/сут. При 15°C экспоненциальная фаза растягивалась: предельный диаметр регистрировался лишь на 17-е сутки, при этом VR на PDA, Czapek и SNA составляла 5,8 мм/сут., а на OA – 5,0 мм/сут. При 35°C наблюдалось выраженное угнетение вегетации, лаг-фаза увеличивалась до 3–4 суток. К 35-м суткам диаметр колоний не превышал 37-48 мм. Скорость линейного роста в этот период была минимальной: на PDA – 2,7 мм/сут., на Czapek – 2,3 мм/сут., на OA – 2,0 мм/сут., а на SNA – всего 1,8 мм/сут.

Если наиболее высокие абсолютные показатели скорости роста во всем диапазоне температур фиксируются на богатых средах (PDA и Czapek), то относительные индексы холодостойкости и термостойкости I_{хл} и I_{тт} демонстрируют обратную зависимость: минимальные

значения индексов при экстремальных температурах характерны для среды PDA (I_{хл}=0,44 при 15°C; I_{хл}=0,20 при 35°C), тогда как на бедной минеральной среде SNA грибок сохраняет значительно большую долю своей метаболической активности (I_{хл}=0,59 при 15°C; I_{тт}=1,12 при 30°C).

Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) позволил оценить вклад температуры и состава питательной среды в скорость радиального роста (VR) высокоагрессивного изолята *F. verticillioides* в основные фазы онтогенеза гриба. В период лаг-фазы температурный режим выступил главным лимитирующим фактором, объяснив 86,17% общей дисперсии признака (F=271,5; p<0,001). Влияние состава среды оказалось статистически значимым, но существенно меньшим ($\eta^2=1,41\%$; F=8,93; p<0,001). Достоверное взаимодействие факторов «температура x среда» ($\eta^2=1,46\%$; F=5,25; p<0,001) свидетельствует о том, что оптимальные температурные точки для старта метаболизма могут незначительно варьировать в зависимости от типа агаризованной среды. При переходе в экспоненциальную фазу доминирование температуры стало практически абсолютным: ее доля влияния возросла до 97,30% (F=4442,19; p<0,001), тогда как вклад питательной среды снизился до 0,71% (F=65,57; p<0,001). Взаимодействие факторов сохранило высокую статистическую значимость (F=22,24; p<0,001), объяснив 1,46% дисперсии.

Анализ макроморфологии колоний высокоагрессивного изолята *F. verticillioides* выявил выраженную температурную зависимость характера роста и пигментообразования. При экстремальных температурах (10, 15 и 35°C) на всех изученных средах (PDA, Czapek, OA и SNA) отмечался слабый рост мицелия и полное отсутствие пигментации, что согласуется с данными о

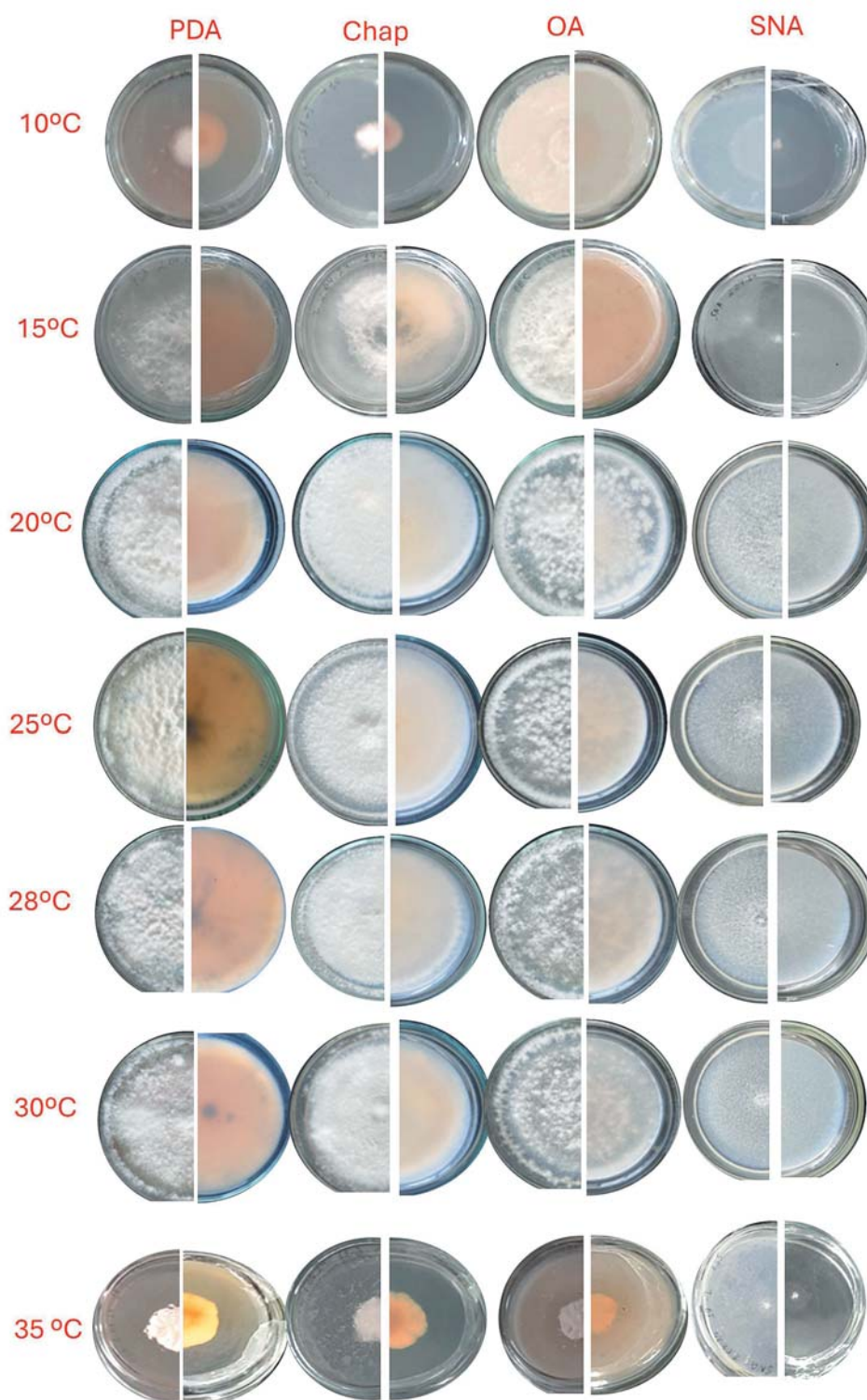


Рис. 4. Макроморфология изолята *F. verticillioides* при культивировании на средах PDA, Czapek OA и SNA при различных температурных режимах (10–35°C) на 10 сутки
Fig. 4. Macromorphology of the *F. verticillioides* isolate cultured on differential nutrient media (PDA, Czapek, OA, and SNA) across a temperature gradient of 10–35 °C on the 10th day of cultivation

супрессивном действии температурных стрессоров на метаболизм гриба.

В диапазоне температур 20–30°C на морфогенез колоний влиял как температурный режим, так и состав среды. На среде PDA при 20°C формировался воздушный пушистый мицелий с появлением розового пигмента к 18-м суткам культивирования, тогда как при 25–30°C пигментация приобретала чернильный оттенок уже к 10-м суткам. На минеральной среде Czapek при 20°C отмечалось формирование более ровного бежевого пигмента к 20–25-м суткам. На среде OA мицелий соби-

рался в плотные конгломераты, а светло-бежевый пигмент появлялся уже на 7-е сутки. На бедной среде SNA воздушный мицелий образовывался слабо, пигментация отсутствовала во всем диапазоне температур.

Таким образом, высокоагрессивный изолят *F. verticillioides* обладает выраженной фенотипической пластичностью, сохраняя способность к активному росту в диапазоне 15–30°C. Наибольшую скорость радиального роста патоген реализует на средах PDA и Czapek при 25–28°C, что коррелирует с его высокой вирулентностью в

условиях южных регионов. Температурный режим является определяющим фактором скорости линейного роста *F. verticillioides*. Питательная среда оказывает статистически достоверное, но количественно незначительное модулирующее влияние, которое нивелируется при максимальной ферментативной активности гриба в экспоненциальную фазу.

4. Оценка влияния температурного режима на уровень патогенности высокоагрессивного изолята *F. verticillioides* при заражении в условиях *in vivo*

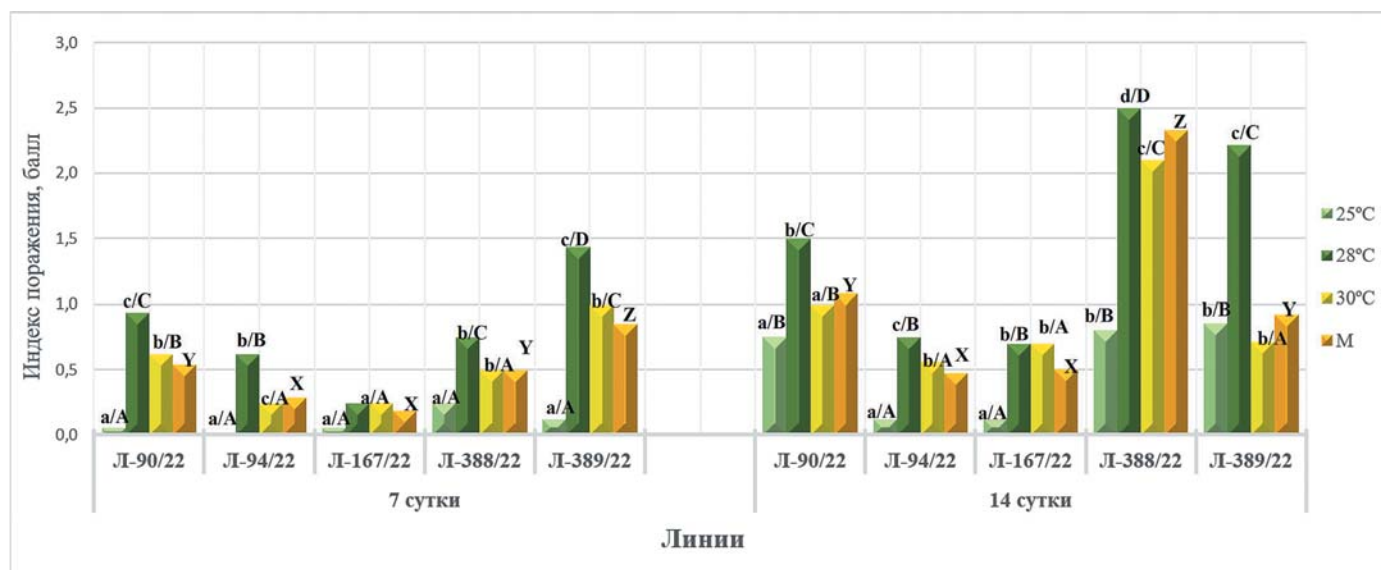
Изучение фитопатогенов исключительно в условиях *in vitro* является необходимым, но недостаточным условием для прогнозирования эпифитотической опасности, так как дает представление лишь об их биологическом потенциале и трофических особенностях. А фактическая реализация патогенного потенциала гриба определяется не только его собственной метаболической активностью, но и физиологическим состоянием растения-хозяина. В связи с тем, что температурный режим выступает модулятором иммунного статуса растения и фактором вирулентности гриба, важным этапом исследования стала оценка условий патогенеза *in vivo* при искусственной инокуляции пяти селекционных линий перца при различных температурных режимах. Поскольку температурный оптимум роста ВА-изолята *in vivo* составил 25-30°C, на следующем этапе мы изучили его патогенный потенциал *in vivo* именно в этом диапазоне температур (25, 28 и 30°C) (рис. 5).

В ходе эксперимента установлено, что температурный режим (25, 28 и 30 °C) является фактором,

определяющим степень проявления фузариозного увядания перца сладкого при искусственной инокуляции высокоагрессивным изолятом *F. verticillioides*. Максимальная патогенная активность изолята в условиях *in vivo* была зафиксирована с температурой 28°C, при котором средний индекс поражения (I) по совокупности пяти селекционных линий достиг 0,8 балла на 7 сутки и 1,5 балла – на 14, что статистически достоверно выше показателей при температурах 25 и 30°C.

При снижении температуры до 25°C наблюдалось статистически значимое снижение агрессивности в динамике: средний индекс поражения составил 0,1 балла к первому учету и 0,9 – ко второму. Несмотря на то, что 25 °C является классическим оптимумом для роста многих микромицетов *in vitro*, в условиях *in vivo* данный режим для вида *F. verticillioides* в нашем исследовании приводил к замедлению колонизации тканей и проявлению менее выраженной симптоматики. Вероятно, это связано с недостаточной скоростью накопления критической концентрации микотоксинов в проводящей системе растения, что позволяло большинству линий сохранять умеренную устойчивость (1,5–1,8 балла). Также выраженное подавление патогенеза наблюдалось и при температуре 30 °C, при которой средний индекс увядания ко второму учету снизился до 1,0 балла, что статистически достоверно ниже, чем при 28 °C. Данное снижение, несмотря на высокую скорость радиального роста изолята *in vitro* при 30°C, может свидетельствовать о включении защитных механизмов у растения-хозяина.

Анализ реакции пяти селекционных линий перца сладкого на инокуляцию высокоагрессивным изолятом *F. verticillioides* при различных температур-



Примечание: учет проводили на 7 и 14 сутки после искусственной инокуляции; М – среднее значение индекса поражения по пяти линиям; ** а-с – разница по вариантам (различные температуры) внутри каждой линии перца сладкого; заглавные буквы А-В – разница между линиями относительно среднего значения температур; заглавные буквы X-Z – разница между линиями относительно среднего значения для всех температур. Значения с одинаковой прописной или заглавной буквой достоверно не имеют существенной разницы с вероятностью 95% согласно тесту Дункана

Рис. 5. Динамика развития фузариозного увядания на селекционных линиях перца, инокулированных высокоагрессивным изолятом *F. verticillioides* при различных температурах
Fig. 5. Dynamics of fusarium wilt development in pepper breeding lines inoculated with a highly aggressive *F. verticillioides* isolate at different temperatures

ных режимах выявил выраженный характер сорто-специфичности. На основании динамики индекса поражения (I) и характера его изменения при повышении температуры, изученные генотипы были разделены на три фенотипические группы по типу реакции. Линии первой группы (Л-94/22 и Л-167/22) характеризуются устойчивостью даже в условиях температурного оптимума для развития патогена (28°C), сохраняя минимальный индекс поражения (I=0,6-0,8 балла на 14-е сутки). Это может свидетельствовать о наличии у них механизмов защиты, которые успешно локализуют инфекцию независимо от температурного стресса. Линии второй группы (Л-90/22 и Л-389/22) характеризуются температурной чувствительностью только к определенной температуре - 28 °C. Индекс поражения ко второму учету составлял 0,8-1,0 балла при 25 °C и 30 °C, статистически значимо возрастая и достигая максимальных значений (I=1,2-1,5 балла) при 28 °C. Линия третьей группы (Л-388/22) является наиболее восприимчивой и демонстрирует явное снижение устойчивости при повышении температуры ко второму учету: от 0,8 балла при 25°C до 2,5 балла при 28°C и 2,1 балла при 30°C. Данный факт может объясняться тем, что температурный стресс подавляет экспрессию специфических генов резистентности, делая растения полностью беззащитными перед фитотоксинами и гидролитическими ферментами гриба. Такая линия может являться моделью для изучения молекулярных механизмов температурно-зависимого иммунитета у перца при заражении возбудителем фузариозного увядания.

Таким образом, при температуре 28°C наблюдается максимальная дифференциация между восприимчивыми и устойчивыми линиями, что делает данный элемент технологии наиболее информативным и оптимальным для оценки устойчивости селекционного материала перца сладкого.

5. Влияние способа инокуляции на развитие симптомов фузариозного увядания у селекционных линий перца при заражении изолятом *F. verticillioides* в условиях *in vivo*

Оптимизация протокола искусственного заражения, позволяющая сократить сроки проведения вегетационного опыта, является необходимым условием для создания методической базы, повышающей эффективность селекции на устойчивость к биотическим стрессам. В связи с этим был проведен сравнительный анализ патогенности изолята *F. verticillioides* на пяти селекционных линиях перца сладкого при использовании двух методов инокуляции: I вариант – инкубация семян в споровой суспензии на орбитальном шейкере (100 об/мин); II вариант – инкубация в споровой суспензии в статических условиях (без механического воздействия) (табл. 5). В ходе эксперимента использование данных методических приемов позволило выявить существенные различия в скорости проявления симптомов и динамике развития фузариозного увядания перца при заражении изолятом *F. verticillioides*.

При инокуляции с качалкой (I вариант) уже на 5-е сутки наблюдения отмечались начальные симптомы увядания у 7,6% растений со средним индексом поражения 0,5 балла. Тогда как во II варианте (без качалки) к этому периоду симптомы полностью отсутствовали (I=0 баллов), что свидетельствует о задержке проникновения патогена в ткани растения. К моменту второго учета (7 сутки) в I варианте распространенность болезни достигла 91,0% при индексе поражения 1,0 балла, тогда как во II варианте эти показатели составили лишь 37,2% и 0,4 балла соответственно. Значительная разница (в 2,4-2,5 раза) может указывать на роль механического воздействия в обеспечении равномерного контакта спор с корневой системой и создании микротравм, облегчающих проникновение гиф гриба в проводящие ткани. На 14-е сутки после инокуляции (окончательный учет) разница между вариантами незначительна, но сохранилась: в I варианте средний индекс поражения достиг 1,9 балла при распространенности заболевания 77,0%, в то время как во II варианте эти значения были статистически достоверно ниже и составили 1,2 балла и 57,0% соответственно. Таким образом, применение качалки позволяет не только ускорить проявление симптомов на 48-72 часа, но и обеспечивает более контрастную дифференциацию между устойчивыми и восприимчивыми генотипами, что имеет решающее значение для эффективного скрининга селекционного материала.

Важно отметить, что ускоренный метод инокуляции в нашем исследовании не нивелировал генетические различия линий, а позволил быстрее и более контрастно их дифференцировать. Линии Л-94/22 и Л-167/22 проявили относительную устойчивость в обоих вариантах опыта (индекс поражения 0-0,8 балла), что свидетельствует о наличии эффективных генетических механизмов резистентности. Использование орбитального шейкера привело к резкому усилению патогенеза у восприимчивых генотипов: индекс поражения линии Л-389/22 возрос с 1,8 до 3,2 балла, а у Л-90/22 – с 1,5 до 2,3 балла. Механическое воздействие вызвало микротравмы корневой системы, создавая дополнительные «ворота для инфекции». Вероятно, это позволило патогену преодолеть первичные структурные барьеры экзодермы и напрямую проникнуть в ксилему, ускоряя колонизацию тканей.

Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) позволил количественно оценить вклад генотипа растения-хозяина и метода инокуляции в вариабельность индекса поражения фузариозным увяданием при заражении *F. verticillioides* в динамике патогенеза. На более ранних стадиях после заражения (7-е сутки) доминирующим фактором выступил метод инокуляции: его доля в общей дисперсии составила 31,61% ($F=69,06$; $p<0,001$). Влияние генотипа также было значимым, но меньшим (27,92%; $F=15,25$; $p<0,001$), а взаимодействие факторов достигло порога достоверности (8,42%; $F=4,60$; $p=0,002$). Это свидетельствует о

Таблица 5. Сравнительная оценка патогенности изолята *F. verticillioides* при различных способах искусственного заражения сеянцев перца сладкого
 Table 5. Comparative assessment of *Fusarium verticillioides* pathogenicity under different methods of artificial infection of pepper seedlings

Линия	Вариант опыта*	1 учет (5 суток)		2 учет (7 суток)		3 учет (14 суток)	
		I, балл**	P, %	I, балл**	P, %	I, балл**	P, %
Контроль		0 а/A/X	0,0	0 а/A/X	0,0	0 а/A/X	0,0
Л-90/22	I	0,8±0,2 ab	15,0	1,2±0,5 c	80,0	2,3±1,5 b	100,0
	II	0a	0,0	0,5 b	75,0	1,5 b	80,0
Среднее по сорту		0A	0,0	0,1±0,01 A	50,0	0,4±0,1 A	17,5
Л-94/22	I	0a	0,0	0,2±0,1 a	100,0	0,8±0,3 b	35,0
	II	0a	0,0	0a	0,0	0a	0,0
Среднее по сорту		0A	0,0	0,1±0,01 A	50,0	0,4±0,1 A	17,5
Л-167/22	I	0a	0,0	0,2±0,1 a	100,0	0,7±0,2 b	50,0
	II	0a	0,0	0a	0,0	0,5 b	30,0
Среднее по сорту		0A	0,0	0,1±0,01 A	50,0	0,6±0,1 A	40,0
Л-388/22	I	0,5±0,1 ab	8,0	1,5±1,1 b	75,0	2,5±1,0 b	100,0
	II	0a	0,0	0,9±1,3 ab	56,0	2,0±1,8 b	100,0
Среднее по сорту		0,3 A	4,0	1,2±1,1 B	65,5	2,3±1,4 B	100,0
Л-389/22	I	1,1±0,3 b	15,0	2,0±1,6 b	100,0	3,2±1,5 b	100,0
	II	0a	0,0	0,5±0,6 a	55,0	1,8±1,7 c	75,0
Среднее по сорту		0,6 B	7,5	1,3±1,2 B	77,5	2,5±1,6 B	87,5
Среднее по варианту I		0,5 Y	7,6	1,0±0,3 Y	91,0	1,9±0,9 Z	77,0
Среднее по варианту II		0 X	0,0	0,4±0,1 X	37,2	1,2±0,7 Y	57,0

Примечание: * – I вариант (с качалкой), II вариант – без качалки; ** а-с – разница по вариантам внутри каждой линии перца сладкого; заглавные буквы A-B – разница между линиями относительно среднего значения двух вариантов; заглавные буквы X-Z – разница между вариантами относительно среднего значения для всех сортов. Значения с одинаковой прописной или заглавной буквой достоверно не имеют существенной разницы с вероятностью 95% согласно тесту Дункана

том, что механическое повреждение корней способствует быстрому проникновению патогена в ксилему, обходя конститутивную устойчивость и вызывая резкий скачок симптомов у восприимчивых линий.

К 14-м суткам структура дисперсии изменилась. Доминирующим фактором стал генотип (40,57%; $F=14,04$; $p < 0,001$), тогда как влияние метода инокуляции снизилось и стало статистически незначимым (2,31%; $F=3,20$; $p=0,078$). Это может быть связано с тем, что к позднему этапу патогенеза грибок преодолевает барьеры даже без механического стресса, и степень увядания определяется исключительно генетическим потенциалом растения. Поэтому метод с шейкером оптимален для ускоренного иммунологического скрининга перца сладкого к возбудителю фузариозного увядания *F. verticillioides*, позволяя окончательный учет проводить уже на уже 7-е сутки.

Таким образом, полученные результаты имеют важное методическое значение: инокуляция с механическим воздействием создает более жесткие условия заражения, позволяющие четко дифференцировать устойчивые и восприимчивые генотипы, тогда как пассивный метод (без шейкера) моделирует естественные условия инфекции и может использоваться для оценки полевой устойчивости.

Обсуждение

Проведенные исследования позволили комплексно охарактеризовать биологические и патогенные свойства возбудителя фузариозного увядания перца сладкого – вида *F. verticillioides*, что имеет важное значение как для селекции на устойчивость, так и разработки эффективных стратегий защиты культуры. Полученные результаты демонстрируют выраженную взаимосвязь между культу-

рально-морфологическими характеристиками, кинетикой роста мицелия *F. verticillioides* и его патогенным потенциалом. Высокоагрессивный изолят *F. verticillioides* демонстрировал минимальную лаг-фазу и максимальную скорость экспоненциального роста, что может объясняться способностью быстрее накапливать биомассу и инициировать синтез фитотоксинов и гидролитических ферментов. Экологическая стратегия гриба, направленная на быстрое захватывание питательного субстрата, делает его высококонкурентным в ризосфере, что подтверждается данными ряда исследователей, отмечавших прямую корреляцию между скоростью радиального роста и степенью патогенности у видов рода *Fusarium* [13, 16, 17]. По их мнению, быстрый выход в активную фазу вегетации позволяет ВА-изолятам интенсивнее накапливать биомассу и раньше начинать синтез физиологически активных веществ и микотоксинов, что является ключевым фактором успешной колонизации тканей растения-хозяина и развития тяжелого патогенеза в агроценозах.

Сопоставление влияния температурного фактора на скорость радиального роста высокоагрессивного изолята *F. verticillioides* в условиях *in vitro* и на развитие фузариозного увядания сеянцев перца *in vivo* выявило как совпадение физиологических оптимумов, так и существенные расхождения, обусловленные защитной реакцией растения-хозяина. В условиях *in vitro* температурный оптимум роста изолята приходится на 28°C (VR=12,8 мм/сут.), хотя и при 30°C гриб сохраняет высокую метаболическую активность (VR=10,3-11,8 мм/сут.). В условиях *in vivo* реализация патогенного потенциала протекает иначе. При 28°C отмечается пик патогенной активности (I=3,4 балла), что полностью коррелирует с максимумом вегетативной активности гриба. Однако при 30°C, несмотря на сохранение высокой скорости радиального роста *in vitro*, индекс увядания *in vivo* достоверно снижался до 1,9 балла. Данное расхождение подчеркивает биологическую значимость абиотических факторов в рамках классического эпифитотического треугольника «патоген – растение-хозяин – среда». Вероятно, подавление инфекции при 30°C обусловлено не угнетением метаболизма гриба, а активацией термозависимых защитных механизмов растения. Согласно данным некоторых исследователей [14, 15], тепловой стресс индуцирует синтез белков теплового шока (HSP) и запускает салицилатный путь, формируя системную приобретенную устойчивость (SAR). Литературные данные относительно оптимальных температурных режимов для *F. verticillioides* противоречивы. Так, Marin и Simbarashe [18, 19, 20], указывают на температурный оптимум на уровне 30 °C при культивировании на различных питательных средах, тогда как Alberts [21] и Le Bars [22] отмечают максимальную скорость роста при 20-25°C. В наших исследованиях можно сделать вывод, что температура выступила модулятором, который при 28°C действует синергично с агрессивностью патогена, а при 30°C нивелирует её за счет мобилизации

иммунитета хозяина, демонстрируя сложное перекрестное взаимодействие между абиотическим и биотическим стрессами.

Важным этапом оптимизации протокола искусственного заражения стало внедрение механического перемешивания (инкубации на орбитальном шейкере) при инокуляции, что изменило кинетику развития патогенеза *F. verticillioides*. Согласно полученным данным, использование шейкера спровоцировало появление первых симптомов уже на 5-е сутки (I=0,5 балла, P=7,6%), тогда как в статических условиях растения оставались полностью здоровыми (I=0, P=0%). К 7-м суткам вариант с шейкером достиг пика распространенности 91,0% (I=1,0 балл), что более чем в 2 раза превышало показатели статического метода (37,2% и 0,4 балла). Данный факт можно объяснить тем, что механическое воздействие вызывает микротравмы корневых волосков, создавая «ворота для инфекции» и позволяя гифам гриба напрямую проникать в ксилему, минуя структурные барьеры экзодермы. Данный прием в селекционном процессе на устойчивость может сократить время оценки устойчивости с 14 до 7 суток, позволяя проводить большее число циклов скрининга за вегетационный сезон.

Таким образом, изучение температурной пластичности южного изолята в широком диапазоне температур имеет принципиальное значение для оценки его адаптационного потенциала и прогнозирования эпифитотической опасности в условиях нестабильного климата южных регионов. А на основе изучения биологических особенностей и патогенного потенциала *F. verticillioides* были научно обоснованы и усовершенствованы ключевые элементы технологии искусственного заражения, что позволяет существенно повысить эффективность и сократить сроки скрининга селекционного материала перца сладкого на устойчивость.

Заключение

В проведенном нами исследовании внутри популяции *F. verticillioides* выделены контрастные классы патогенности, причем высокоагрессивные изоляты росли в 1,7–1,9 раза быстрее слабоагрессивных, что подтверждает прямую корреляцию скорости вегетации и вирулентности. Установлено полное совпадение температурного оптимума роста *in vitro* и патогенеза *in vivo* (28 °C), тогда как при 30 °C развитие болезни достоверно снизилось за счет активации термозависимых защитных механизмов растения. Двухфакторный дисперсионный анализ показал, что на ранних сроках (7-е сутки) метод инокуляции определял 31,6% дисперсии, форсируя раннее проникновение патогена, а к 14-м суткам доминировал генотип (40,6%). Внедрение орбитального шейкера сократило срок достоверной оценки устойчивости с 14 до 7 суток, обеспечив ускоренный селекционный скрининг. Выявленная сортоспецифичность разделила линии на три кластера, что подчеркивает необходимость учета генотип-средового взаимодействия при создании стабильных доноров устойчивости для селекции в условиях изменяющегося климата.

• Литература / References

- Engalycheva I.A., Kozar E.G., Frolova S.L., Vetrova S.A., Tikhonova T.O., Dzhos E.A., Engalychev M.R., Chizhik V.K., Martynov V.V., et al. *Fusarium* Species Causing Pepper Wilt in Russia: Molecular Identification and Pathogenicity. *Microorganisms*. 2024;(12):343. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12020343>
- Aoki T., O'Donnell K., Geiser D.M. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *J Gen Plant Pathol*. 2014;(80):189-201. <https://doi.org/10.1007/s10327-014-0509-3>
- Ma L.J., Geiser D.M., Proctor R.H., et al. *Fusarium pathogenomics*. Annual review of microbiology. 2013;(67):399-416. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155650>
- O'Donnell K., Ward T.J., Robert V.A.R.G. et al. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions. *Phytoparasitica*. 2015;(43):583-595. <https://doi.org/10.1007/s12600-015-0484-z>
- Du M., Ren X., Sun Q., Wang Y., Zhang R. Characterization of *Fusarium* spp. causing potato dry rot in China and susceptibility evaluation of Chinese potato germplasm to the pathogen. *Potato Res*. 2012;(55):175-184. <https://doi.org/10.1007/s11540-012-9217-6>
- Gagkaeva T.G., Gavrilova O.G., Orina A.O. First detection of *Fusarium globosum* in small grain cereals on Ural and Siberian territory. *Plant Protection News*. 2019;(1):10-18. (In Russ.) [https://doi.org/10.31993/2308-6459-2019-1\(99\)-10-18](https://doi.org/10.31993/2308-6459-2019-1(99)-10-18) <https://elibrary.ru/pcrbvh>
- McDonald B.A., Linde C. Pathogen Population Genetics, Evolutionary Potential, and Durable Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol*. 2002;(40):349-379. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120501.101443>
- O'Donnell K., Rooney A.P., Proctor R.H., Brown D.W., McCormick S.P., Ward T.J., Frandsen R.J.N., Lysøe E., Rehner S.A., Aoki T., Robert V.A.R.G., Crous P.W., Groenewald J.Z., Kang S., Geiser D.M. Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal Genetics and Biology*. 2013;(52):20-31. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.12.004>
- Wang M.M., Chen Q., Diao Y.Z., Duan W.J., Cai L. *Fusarium incarnatum-equiseti* complex from China. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*. 2019;(43): 70-89. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2019.43.03>
- Summerell B.A., Leslie J.F. Fifty Years of *Fusarium*: How Could Nine Species Have Ever Been Enough? *Fungal Divers*. 2011;(50):135-144. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0132-y>
- Gawel N., Jarret R. A Modified CTAB DNA Extraction Procedure for Musa and Ipomoea. Plant molecular biology reporter. 1991;(9):262-266. <https://doi.org/10.1007/BF02672076>
- Kumar S., Stecher G., Suleski M., Sanderford M., Sharma S., Tamura K. MEGA12: Molecular Evolutionary Genetic Analysis Version 12 for Adaptive and Green Computing. *Mol Biol Evol*. 2024;(41):263. <https://doi.org/10.1093/molbev/msae263>
- Shashko Yu.K. Mycelium growth rate of *fusarium* fungi as an indicator of phytopathogen aggressiveness. *Vestnik of Mari State University. Chapter: AGriculture. economics*. 2020;6(1):66-74. (In Russ.) <https://doi.org/10.30914/2411-9687-2020-6-1-66-73> <https://elibrary.ru/hhvurb>
- Clarke S.M., Mur L.A.J., Wood J.L., Scott I.M. Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2004;42(10):949-955. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02054.x>
- Larkindale J., Halliday J.J., Halliday K.J., Huang B. Salicylic acid is a major modulator of cross-tolerance. *The Plant Journal*. 2005;43(2):175-186. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2016.04.023>
- Szczeczura W., Staniaszek M., Habdas H. *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* – the cause of *Fusarium crown* and root rot in tomato cultivation. *J. of Plant Protection Research*. 2013;53(2):172-176. <https://doi.org/10.2478/jppr-2013-0026>
- Lupashku G.A., Mihnea N.I., Gavzer S.I. Influence of the combined action of *Fusarium* spp. fungi and temperature on some tomatoes growth traits. *Vegetable crops of Russia*. 2020;(5):97-102. (In Russ.) <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2020-5-97-102> <https://elibrary.ru/joguqi>
- Marin S., Homedes V., Sanchis V., Ramos A.J., Magan N. Impact of *Fusarium moniliforme* and *F. proliferatum* colonisation of maize on calorific losses and fumonisin production under different environmental conditions. *J. Stored Prod. Res*. 1999;35(1):15-26. [https://doi.org/10.1016/S0022-474X\(98\)00026-5](https://doi.org/10.1016/S0022-474X(98)00026-5)
- Marin S., Magan N., Serra J., Ramos A.J., Canela R., Sanchis V. Fumonisin B1 production and growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* on maize, wheat, and barley grain. *J. Food Sci*. 1999;(64):921-924. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1999.tb15941.x>
- Samapundo S., Devlieghere F., De Meulenaer B., Debevere J. Effect of Water Activity and Temperature on Growth and the Relationship between Fumonisin Production and the Radial Growth of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on Corn. *Journal of Food Protection*. 2005;68(5):1054-1059. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.5.1054>
- Alberts J.F., Gelderblom W.C.A., Thiel P.G., Marasas W.F.O., Van Schalkwyk D.J., Vohrend Y. Effects of temperature and incubation period on the production of fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol*. 1990;56(6):1729-1733. <https://doi.org/10.1128/AEM.56.6.1729-1733.1990>
- Le Bars J., Le Bars P., Dupuy J., Boudra H., Casini R. Biotic and abiotic factors in fumonisin B1 production and stability. *J. AOAC Int*. 1994;77:517-521. <https://doi.org/10.1093/jaoac/77.2.517>

Об авторах:

Ирина Александровна Енгальчева – кандидат с.-х. наук, ведущий научный сотрудник, зав. лаб. молекулярно-иммунологических исследований <https://orcid.org/0000-0003-4843-111X>, SPIN-код: 2084-2830, автор для переписки, engirina1980@mail.ru

Светлана Леонидовна Фролова – младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-иммунологических исследований, <https://orcid.org/0000-0002-2680-9938>, SPIN-код: 6089-4491, svetlanaleonidovna95@gmail.com

Алина Валерьевна Каменева – младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-иммунологических исследований, <https://orcid.org/0000-0002-0194-0817>, SPIN-код: 9164-9083, plant.protector@yandex.ru

Мария Евгеньевна Слетова – кандидат с.-х. наук, научный сотрудник лаборатории молекулярно-иммунологических исследований, <https://orcid.org/0000-0003-4117-2565>, SPIN-код: 6272-6594, gvina@yandex.ru

About the Authors:

Irina A. Engalycheva – Cand. Sci. (Agriculture), Leading Researcher of the Laboratory Molecular Immunological Research, <https://orcid.org/0000-0003-4843-111x>, SPIN-code: 2084-2830, Corresponding Author, engirina1980@mail.ru

Svetlana L. Frolova – Junior Researcher of the Laboratory of Molecular Immunological Research, <https://orcid.org/0000-0002-2680-9938>, SPIN-code: 6089-4491, svetlanaleonidovna95@gmail.com

Alina V. Kameneva – Junior Researcher of the Laboratory Molecular Immunological Research, <https://orcid.org/0000-0002-0194-0817>, SPIN-code: 9164-9083, plant.protector@yandex.ru

Maria E. Sletova – Cand. Sci. (Agriculture), Senior Researcher of the Laboratory Molecular Immunological Research, <https://orcid.org/0000-0003-4117-2565>, SPIN-code: 9164-9083, gvina@yandex.ru