■ ОГЛЯДОВІ СТАТТІ

УДК 575+577.1 : 633.1

СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО ВИЗНАЧЕННЯ ГРИБІВ РОДУ *FUSARIUM*, ЩО УРАЖУЮТЬ ПШЕНИЦЮ

А.В. КАРЕЛОВ [1,2], О.І. БОРЗИХ [1], Н.О. КОЗУБ [1,2], І.О. СОЗІНОВ [1], Л.А. ЯНСЕ [1], О.І. СОЗІНОВА [1,2], Г.М. ТКАЛЕНКО [1], Л.Т. МІЩЕНКО [3], Я.Б. БЛЮМ [2]

[1] Інститут захисту рослин Національної академії аграрних наук України, 03022, вул. Васильківська, 33, Київ
[2] ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України», 04123, вул. Осиповського, 2а, Київ
[3] ННЦ «Інститут біології та медицини», Київський національний університет імені Тараса Шевченка, 01601, вул. Володимирська, 64/13, Київ
E-mail: hromogen-black@ukr.net, natalkozub@gmail.com, blume.yaroslav@nas.gov.ua, lmishchenko@ukr.net

Гриби роду Fusarium є особливо небезпечними фітопатогенами, які, серед інших сільськогосподарських культур, уражують і пшеницю м'яку (Triticum aestivum L.), оскільки, окрім втрат урожаю, можуть призводити до отруєнь людей та худоби. В огляді висвітлено сучасний стан проблеми визначення грибів роду Fusarium, що уражують пшеницю м'яку. Методи мікробіологічного визначення фузаріїв досі входять до лабораторних протоколів та рекомендацій, тому в огляді згадано деякі з найпопулярніших родо- та видоспецифічних середовищ. Однак значно більшу увагу в сучасних публікаціях приділяють визначенню грибів роду Fusarium за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Тому в огляді висвітлено можливі тест-системи для традиційної ПЛР для визначення представників роду загалом або ж таких, які продукують особливо небезпечні метаболіти (ніваленол, дезоксиніваленол, 3-ацетилдезоксиніваленол, 4-ацетилніваленол та енніатин). Наведено пари праймерів для якісного визначення наявності в дослідних зразках тих чи інших видів фузаріїв або їх комбінацій. Для ПЛР у реальному часі, які можна використати для більш точного якісного та кількісного родо- та видоспецифічного визначення збудників фузаріозу, описано деталі протоколів, послідовності праймерів та зондів; для зондів наведено рекомендовані фарбники. Для деяких пар праймерів також вказано додаткову інформацію щодо їх валідації і чутливості тест-систем. Отже методики, наведені в огляді, є достатньо точними та вичерпними, можуть бути використаними у комбінації та окремо для родо- і видоспецифічного якісного або кількісного визначення грибів роду Fusarium.

© А.В. КАРЕЛОВ, О.І. БОРЗИХ, Н.О. КОЗУБ, І.О. СОЗІНОВ, Л.А. ЯНСЕ, О.І. СОЗІНОВА, Г.М. ТКАЛЕНКО, Л.Т. МІЩЕНКО, Я.Б. БЛЮМ, 2021

Ключові слова: *Fusarium, снігова пліснява, фузаріоз колоса, пшениця, молекулярні маркери*

Вступ. Некротрофні фітопатогени харчуються рештками клітин після їх форсованого руйнування (так званої «надчутливої смерті») (Glazebrook, 2005). Часто таке руйнування забезпечується одним або декількома токсинами, які продукують гриби (Miller et al, 1991; Desmond et al, 2008). Так, в Україні некротрофні фітопатогенні гриби, серед інших, представлені грибами роду *Fusarium*, зокрема, збудниками фузаріозу колоса пшениці *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch (анаморф − *F. graminearum*), *F. culmorum* Wm. G. Sm., *F. sporotrichioides*, *F. oxysporum*, *F. avenaceum*, *F. verticillioides (F. moniliforme)*, *F. langsethiae*, *F. poae*, *F. tricinctum*, *F. cerealis* (*F. crookwellense*) та збудниками снігової плісняви *Microdochium* (*Fusarium*) *nivale* (Kovalyshyna et al, 2008; Hrytsev et al, 2018). Вірогідність, ступінь ураження й втрати урожаю пшениці від фузаріїв залежать від погодних умов, фізичних параметрів та часу цвітіння рослин кожного сорту (Snijders & Perkowski, 1990; Ward et al, 2008). У Китаї фузаріоз колоса щорічно уражує, в середньому, 5,4 млн. га посівів (23 % загальної площі під пшеницею) і призводить до втрат до 2 млн. т урожаю у випадку епіфітотій (Ma et al, 2019). У США епіфітотії фузаріозу колоса призводять в середньому до прямих втрат у розмірі 1,3 млрд. дол. і до 4,8 млрд. дол. втрат у вигляді акумулятивного економічного впливу (Johnson et al, 2003), а за розрахунками Sal-

gado et al (2015) 19 % ураження фузаріозом колоса знижує урожайність на 1 т/га. У Лісостеповій зоні України втрати маси зерна з колоса від грибів цього роду можуть сягати 70 % (Kyslukh, Shevchuk, 2006). Крім того, мікотоксини, які продукують гриби роду *Fusarium*, можуть спричиняти отруєння людей та худоби (Miller et al, 1991; Desmond et al, 2008). Тому визначення грибів роду *Fusarium*, які вражають пшеницю, є невід'ємним елементом контролю цих патогенів.

Визначення грибів роду *Fusarium* на селективних середовищах. Згідно з численними рекомендаціями, визначення грибів роду *Fusarium* поділяється на два етапи: встановлення наявності будь-яких грибів цього виду та їх видоспецифічне визначення шляхом аналізу фенотипу або ж додаткового висівання на селективне середовище та видо- або навіть расоспецифічне визначення за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) (Leslie et al, 2006). Для висівання грибів роду *Fusarium* зазвичай використовують агар з додаванням шматків листя гвоздики (Carnation Leaf-piece Agar, CLA), специфічний слабкопоживний агар (Spezieller Nährstoffarmer Agar, SNA) та агар з додаванням картопляної декстрози (Potato Dextrose Agar, PDA) (Anderson & Atkinson, 1974; Fisher et al, 1982; Leslie et al, 2006), у інших джерелах описують також використання мінімального середовища (minimal media, MM) та похідних (Puhall, 1985). Методи фенотипового визначення достатньо швидкі та дешеві, проте кожна публікація чи лабораторний довідник пропонує зміни до складу названих середовищ або ж власні середовища, а також умови вирощування; вважають, що тільки при строгому дотриманні цих рекомендацій морфологію результуючих колоній можна порівнювати із наданими в кожному окремому джерелі, однак, цілком ймовірно, що навіть тоді результат може не відповідати очікуваному (Leslie et al, 2006).

Селективні середовища для грибів роду *Fusarium* є значно зручнішим і точнішим інструментом для видового визначення. Їх використовують для виділення грибів цього роду загалом: найбільш відомим таким середовищем вважають пептонпентахлоронітробензенове (peptone-pentachloronitrobenzene PCNB) (Papavizas, 1967), також існують дослідження, в яких рекомендують використовувати іпродіоновий дихлорановий агар Чапека-Докса (Czapek-Dox Iprodione Dichloran agar, CZID) (Abildgren et al, 1987; Thrane, 1996). Також є середовище Комади, яке пропонують для селективного виділення окремих видів фузаріозу з ґрунту з подальшим розділенням їх за кольором колоній (Komada, 1976). Існують такі середовища і для окремих видів фузаріїв, які уражують пшеницю. Так, для визначення *F. graminearum* як напівселективне середовище запропоновано агар Сегаліна і Рейса (Segalin & Reis agar, SRA-FG) на основі PDA з додаванням іпродіону (0,05 г/л), ністатину (0,025 г/л), тріадіменолу (0,015 г/л), неоміцин сульфату (0,05 г/л) та стрептоміцин сульфату (0,3 г/л) (Segalin & Reis, 2010). Для визначення *F. graminearum* та *F. oxysporum* також можуть бути використані середовища на основі MM або PDA з додаванням токсофлавіну *Burkholderia glumae* в концентрації 80 мг/л (Jung et al, 2013). Для визначення *F. oxysporum* було розроблено низку ефективних селективних середовищ: Fo-G1 та Fo-G2 – для визначення диких типів штамів патогенів у звичайних ґрунтах; Fo-W1 та Fo-W2 – для диких типів у ґрунтах, де також зустрічались мутанти, що не утилізують нітрати, і Fo-N1 та Fo-N2 – для власне таких мутантів (Nishimura, 2007). Щодо збудника снігової плісняви, для нього було запропоноване середовище на основі селективного середовища Комади (Komada, 1976), у яке радять додавати тіофанат-метил у концентрації 10 мкг/л для інгібування росту інших грибів роду *Fusarium* (Hayashi et al, 2014).

Отже, існують середовища, селективні для окремих видів фузаріїв, однак їх не так багато: розробка видоспецифічного середовища є досить трудомістким процесом, саме ж середовище може потребувати багато подекуди екзотичних компонентів, для деяких видів може просто не бути можливим знайти такий компонент середовища, на якому би інші споріднені види фузаріїв теж не формували колоній; тому в роботах щодо визначення грибів роду *Fusarium* значно більше уваги приділяють саме методам на основі ПЛР (Leslie et al, 2006).

Родоспецифічні праймери для визначення фузаріїв за допомогою ПЛР. Можна скористатись родоспецифічними праймерами для ви-

значення присутності фузаріїв в матеріалі, щоб не застосовувати більшу кількість реактивів з метою видової ідентифікації (Leslie et al, 2006), деталі для деяких із них наведено в табл. 1. Зазвичай використовують пари праймерів, комплементарні фрагментам ДНК з ділянок, що відповідають за тип розмноження (mating type, MAT) (Leslie et al, 2006; Steenkamp et al, 2000; Kerenyi et al 2004). Так, пари праймерів GFmat1a/b та GFmat1c/d у мультиплексній реакції дають ампліфіковані фрагменти близько 200 та 800 п.н., відповідно; автори рекомендують використовувати саме мультиплекс, оскільки не всі види фузаріїв мають той чи інший таргетний фрагмент ДНК; довжина ампліфікованих фрагментів може дещо відрізнятись від виду до виду (Steenkamp et al, 2000). На основі секвенування відповідних генів також було запропоновано інші пари праймерів fusALPHAfor/fusALPHArev 5, які давали ампліфіковані фрагменти завдовжки 200 п.н., та fusHMGfor/fusHMGrev, з якими очікують отримати фрагменти довжиною 260 п.н. (Kerenyi et al, 2004; Leslie et al, 2006). Іншими авторами пропонуються родоспецифічний маркер для ділянки внутрішнього транскрибованого спейсера (ITS) рДНК з праймерами ItsF/R, що ампліфікують фрагменти завдовжки 431 п.н., а також маркер *TRI6*, фланкований праймерами Tri6f/Tri6r, що ампліфікують фрагменти завдовжки 596 п.н. у випадку видів фузаріїв, які продукують трихотецен (trichothecene), та маркер *FUM5*, фланкований праймерами Fum5f/Fum5r, що ампліфікують фрагменти довжиною

Таблиця 1. **Праймери та деталі ПЛР для ідентифікації гибів роду *Fusarium***

Назва праймера	Послідовність (5′–3′)	Температура відпалу, °С	Таргетний регіон	Довжина продуктів, п.н.	Посилання
GFmat1a	gttcatcaaagggcaagcg	67	MAT	200	Steenkamp et al, 2000
GFmat1b	taagcgccctcttaacgccttc				
GFmat1c	agcgtcattattcgatcaag	67	MAT	800	Steenkamp et al, 2000
GFmat1d	ctacgttgagagctgtacag				
fusALPHAfor	cgccctctkaaygscttcatg	60	MAT box	200	Kerenyi et al, 2004
fusALPHArev	Ggartaracyttagcaatyagggc				
fusHMGfor	cgacctcccaaygcytacat	60	MAT HMG box	260	Kerenyi et al, 2004
fusHMGrev	tgggcggtactggtartcrgg				
ItsF	Aactcccaaacccctgtgaacata	62	rDNA ITS	431	Bluhm et al, 2002
ItsR	tttaacggcgtggccgc				
ITS-Fu1f	acaactcataaccctgtgaacat	68	rDNA ITS	~466	Arif et al, 2012
ITS-Fu1r	cagaagttgggtgttttacgg				
TEF-Fu3f	ggtatcgacaagcgaaccat	58	TEF-1α	~466	Arif et al, 2012
TEF-Fu3r	tagtagcggggagtctcgaa				
tri6f	ctctttgatcgtgttgcgtc	62	TRI6	596	Bluhm et al, 2002
tri6r	cttgtgtatccgcctatagtgatc				
fum5f	gtcgagttgttgaccactgcg	62	FUM5	845	Bluhm et al, 2002
fum5r	cgtatcgtcagcatgatgtagc				
Tri5F	agcgactacaggcttccctc	60	Tri5	545	Nicholson et al, 2004
Tri5R	aaaccatccagttctccatctg				
Tri6Fsp	catgccaaggactttgtccc	56	Tri6	550	Nicholson et al, 2004
T6EndR	gtgtatccgcctatagtgat				
Fus-R	ggcgaaggacggcttac	67	IGS	~200	Jurado et al, 2006
Fps-F	cgcacgtatagatggacaag				
Tct-F	cactgcgtgctgattcactgg	62	IGS	~500	Jurado et al, 2006
Tct-R	gagacaagcatatgactactggcag				

845 п.н., у випадку представників виду фузаріїв, які продукують фумонізин (fumonisin) (Bluhm et al, 2002).

Arif et al (2012) розробили родоспецифічні праймери на основі ITS (ITS-Fu1f/ITS-Fu1r) та на основі гена фактора елонгації транскрипції TEF-1α (TEF-Fu3f/TEF-Fu3r), які продукують амплікони завдовжки приблизно 466 і 420 п.н., відповідно, у випадку присутності гриба роду *Fusarium*. Родоспецифічні праймери, що базуються на послідовності міжгенного спейсера рДНК (IGS), розроблено Jurada et al (2006): у результаті ПЛР при наявності грибів роду *Fusarium* ампліфікуються фрагменти завдовжки приблизно 200 п.н. Більшості видів фузаріїв властиво продукування токсинів групи трихотеценів. Для їх визначення можна використовувати пару праймерів Tri5F/Tri5R або Tri6Fsp/T6EndR; перша пара дає ампліфіковані фрагменти довжиною 545 п.н., друга – фрагменти довжиною 550 п.н. (Nicholson et al, 2004). Праймери для виявлення присутності фузаріїв, які продукують трихотецени, розроблено Jurada et al (2006): Tct-F і Tct-R, які дають амплікон біля 500 п.н.

Для видів фузаріїв, які уражують пшеницю, розроблено низку тест-систем, передбачених для якісного визначення у традиційній ПЛР із використанням видоспецифічних праймерів, а також праймерів, комплементарних фрагментам ДНК, які відповідають за фактори вірулентності, спільні для декількох видів (Demeke et al, 2005; Kuzdraliński et al, 2017a; Villafana et al, 2020). Так, було розроблено і валідовано праймери, комплементарні генам *Tri3*, *Tri5* і *Tri7*, *Tri13*, *Ensyn*, що відповідають за утворення ніваленолу (NIV), дезоксиніваленолу (deoxynivalenol, DON), 3-ацетилдезоксиніваленолу (3-acetyldeoxynivalenol, 3A-DON), 4-ацетилніваленолу (4-acetyl-nivalenol, 4A-NIL), та енніатину (enniatin) згідно з даними за європейськими хемотипами *F. graminearum*, *F. culmorum* та *F. cerealis* (Nicholson et al, 2004; Quarta et al, 2005; 2006) (табл. 2).

Таблиця 2. **Праймери та деталі ПЛР для генів, пов'язаних з біосинтезом окремих біотоксинів**

Назва праймера	Послідовність (5′–3′)	Температура відпалу, °C	Таргетний регіон	Довжина продуктів, п.н.	Хемотип	Посилання
3551H	actttcccaccgagtatttt	53	*Tri5*	525	DON	Quarta et al, 2006
4056H	caaaaactgttgttccactgcc					
Tri7F	tgcgtggcaatatcttcttcta	60	*Tri7*	>380		Nicholson et al, 2004
Tri7DON	gtgctaatattgtgctaatattgtgc					
MinusTri7F	tggatgaatgacttgagttgaca	58		483		
MinusTri7R	aaagccttcattcacagcc					
Tri13F	catcatgagacttgtkcragtttggg	58	*Tri13*	282		
Tri13DON	gctagatcgattgttgcattgag					
Tri3F971	catcatactcgctctgctg	53	*Tri3*	708	15A-DON	Quarta et al, 2005
Tri3R1679	tt(ag)tagtttgcatcatt(ag)tag					
Tri3F1325	gcattggctaacacatga	53	*Tri3*	354	3A-DON	
Tri3R1679	tt(ag)tagtttgcatcatt(ag)tag					
Tri7F340	atcgtgtacaaggtttacg	50	*Tri7*	625	NIV	
Tri7R965	ttcaagtaacgttcgacaat					
Tri7F	tgcgtggcaatatcttcttcta	60		465		Nicholson et al, 2004
Tri7NIV	ggttcaagtaacgttcgacaatag					
Tri13NIVF	ccaaatccgaaaaccgcag	58	*Tri13*			
Tri13R	ttgaaagctccaatgtcgtg					
Ensyn6065F	gctggcaggaccatttcg	58	*Ensyn*	1164	Enniatin	
Ensyn7229R	ggatggaaagtggtggaagac					

При валідації праймерів з використанням мультиплексної ПЛР було встановлено, що для всіх досліджених європейських зразків *F. cerealis* з праймерами 3551H та 4056H утворювались лише амплікони, комплементарні фрагменту гена *Tri7*; для європейських зразків *F. culmorum* властивий або профіль, ідентичний *F. cerealis*, або комбінація *Tri3*-3A-DON/*Tri5* з праймерами Tri3F1325/Tri3R1679 і 3551H/4056H; для всіх зразків *F. graminearum* спостерігали амплікон, що відповідав фрагменту *Tri3*-3A-DON з праймерами 3551H/4056H, разом із фрагментами, ампліфікованими із будь якою однією парою праймерів Tri7F340/Tri7R965, Tri3F1325/Tri3R1679 чи Tri3F1325/Tri3R1679 (Quarta et al, 2006). Повідомляють також про пару праймерів 22F/122R, які фланкують маркерну ділянку, визначену на основі часткового транскрипта генів *Tri5*/*Tri6*, що відповідає за біосинтез DON; вони при температурі відпалу 60 °C дають ампліфіковані фрагменти довжиною 100 п.н. і можуть використовуватись як у ПЛР у реальному часі із додаванням SYBR Green (тоді це – 40 циклів із денатурацією при 95 °C впродовж 20 с і відпалом/елонгацією при 60 °C впродовж 1 хв), так і при традиційній ПЛР (слід зменшити час відпалу до 30–40 с і додати фазу елонгації при 72 °C впродовж 20–30 с) (Terzi et al, 2007). Цю тест-систему було валідовано з DON-продуцентами видів *F. culmorum* та *F. graminearum* (Rossi et al, 2007).

Видоспецифічні праймери для визначення фузаріїв за допомогою ПЛР. Першою надійною ПЛР тест-системою для видового визначення *F. graminearum* вважали пару SCAR праймерів Fg16F/R, що давали ампліфіковані фрагменти довжиною 400–500 п.н. (Nicholson et al, 1998; Kuzdraliński et al, 2017a) (табл. 3). Її, зокрема, використовували для видової ідентифікації цього патогена в зразках зерна пшениці різного походження (наприклад, Martinez et al, 2014; Khaledi et al, 2017; Kuzdraliński et al, 2017b; Wang and Cheng, 2017; Krnjaja et al, 2018). Інша пара праймерів, також розроблена в 1998 р., Fg16NF/Fg16NR (табл. 3), не отримала широкого застосування, хоча при тій самій розрахованій температурі відпалу із нею отримували ампліфіковані фрагменти довжиною 280 п.н. (Nicholson et al, 1998). Для обох пар праймерів радять використовувати тач-даун, а саме температуру 66 °C в циклах 1–5, 64 °C в циклах 6–10 і 62 °C в наступних циклах 11–30 (Nicholson et al., 2004). Fg16F/R були використані у ранніх роботах щодо кількісного визначення цього патогена у ПЛР в реальному часі з додаванням SYBR Green (Brandfass & Karlovsky, 2006). Однак у пізніших дослідженнях із парою праймерів Fg16F/R та зразками ДНК фузаріїв інших видів було отримано ампліфіковані фрагменти різних довжин (Covarelli et al, 2011; Castañares et al, 2014; Kuzdraliński et al, 2017a). Надалі на основі IGS ділянки *F. graminearum* було розроблено більш точні праймери Fgr-F/Fgc-R, що давали ампліфіковані фрагменти довжиною приблизно 500 п.н. (табл. 3) (Jurado et al, 2005; Kuzdraliński et al, 2017a).

Для визначення *F. culmorum* також було розроблено SCAR праймери Fc01F/R, з якими очікували отримувати фрагменти довжиною 570 п.н. (табл. 3) (Nicholson et al, 1998; Kuzdraliński et al, 2017a). Для цих праймерів також пропонують проводити реакцію за принципом тач-дауна, аналогічно з *F. graminearum* (Nicholson et al, 2004). Праймери Fc01F/R було валідовано із використанням канадських штамів *F. culmorum* (Demeke et al, 2005). Для грибів цього виду було розроблено також інші тест-системи. Mishra et al (2003) розробили систему на основі ITS регіону; відповідний маркер фланкується праймерами 175F/430R, які давали ампліфіковані фрагменти довжиною 245 п.н. (табл. 3) (Mishra et al, 2003; Kuzdraliński et al, 2017a). На основі IGS регіону було розроблено пару праймерів Fcu-F/Fgc-R, яка давала ампліфіковані фрагменти довжиною приблизно 200 п.н. (табл. 3) (Jurado et al, 2005; Kuzdraliński et al, 2017a). Тест-систему на основі пари праймерів Fc03/Fc02, які давали ампліфіковані фрагменти довжиною 140 п.н., було розроблено для визначення *F. culmorum* в ПЛР у реальному часі, але результати реакції також можна розділяти в агарозному гелі (табл. 3) (Sanoubar et al, 2015).

Одну з перших тест-систем для визначення *F. sporotrichioides* було розроблено шляхом аналізу послідовностей фрагменту ділянки IGS; у результаті отримали пару праймерів CNL12/PulvIGSr (із них тільки PulvIGSr комплементарний ДНК таргетних видів грибів, CNL12 – спільний для багатьох еукаріот), яка давала

Таблиця 3. **Праймери та деталі ПЛР для видоспецифічної ідентифікації гибів роду *Fusarium***

Вид	Пара праймерів	Послідовність (5′–3′)	Температура відпалу, °C	Довжина продуктів, п.н.	Посилання
F. graminearum	Fg16F Fg16R	ctccggatatgttgcgtcaa ggtaggtatccgacatggcaa	62	400–500	Nicholson et al, 1998
F. graminearum	Fg16NF Fg16NR	acagatgacaagattcaggcaca ttctttgacatctgttcaaccca	62	280	Nicholson et al, 1998
F. graminearum	Fgr-F Fgc-R	gttgatgggtaaaagtgtg ctctcatataccctccg	53	500	Jurado et al, 2005
*F. graminearum**	FgramB379 fwd FgramB411 rev	ccattccctgggcgct cctattgacaggtggttagtgactgg			Nicolaisen et al, 2009
F. culmorum	Fc01F Fc01R	atggtgaactcgtcgtggc cccttcttacgccaatctcg	62	570	Nicholson et al, 1998
F. culmorum	175F 430R	ttttagtggaacttctgagtat agtgcagcaggactgcagc	58	245	Mishra et al, 2003
F. culmorum	Fcu-F Fgc-R	gactatcattatgcttgcgagag ctctcatataccctccg	54	200	Jurado et al, 2005
F. culmorum	Fc03 Fc02	ttcttgctagggttgaggatg gaccttgactttgagcttcttg	62	140	Sanoubar et al, 2015
*F. culmorum**	FculC561 fwd FculC614 rev	caccgtcattggtatgttgtcact cgggagcgtctgatagtcg			Nicolaisen et al, 2009
F. sporotrichioides/F. langsethiae	CNL12 PulvIGSr	ctgaacgcctctaagtcag gaaccgtccggcacccatcc	58 55	610/750 400	Konstantinova and Yli-Mattila, 2004
F. sporotrichioides/F. langsethiae	SporoITSf SporoITSr	tcagcccgcgccccgtaa caatttgggactgtgtttgc			Konstantinova and Yli-Mattila, 2004
F. sporotrichioides	FspITS2K P28SL	cttggtgttgggatctgtgtgcaa acaaattacaactcgggcccgaga	68	288	Kulik et al, 2004
F. sporotrichioides	Tox5-1 Tox5-sporo-R2	gctgctcatcactttgctcag tcaacttcgggatgtggagg	56	400	Niessen et al, 2004
F. sporotrichioides	FsporF1 LanspoR1	cgcacaacgcaaactcatc tacaagaagacgtggcgatat	62	332	Wilson et al, 2004
*F. sporotrichioides**	FspoA18 fwd FspoA85 rev	gcaagtcgaccactgtgagtaca ctgtcaaagcatgtcagtaaaaatgat			Nicolaisen et al, 2009
F. avenaceum	FA-ITSF FA-ITSR	ccagaggacccaaactctaa accgcagaagcagagccaat	59	272	Schilling et al, 1996
F. avenaceum/F. tricinictum	Fa-U17f Fa-U17r	caagcattgtcgccactctc gtttggctctaccgggactg	62	345	Turner et al 1998
F. avenaceum	JIAf JIAr	gctaattcttaacttactaggggcc ctgtaataggttatttacatgggcg	58	220	Turner et al 1998
F. avenaceum	FAF1 FAR	aacataccttaatgttgcctcgg atccccaacaccaaacccgag	52	314	Mishra et al 2003
F. avenaceum	Fa-8f Fa-13R	cacgactcgctccctcattcgccagt ggttagtgactgcaagacatag	63	188	Pollard and Okubara 2019
*F. avenaceum**	Fave574 fwd Fave627 rev	tatgttgtcactgtctcacaccacc agagggatgttagcatgatgaag			Nicolaisen et al, 2009
F. poae	Fp82F Fp82R	caagcaaacaggctcttcacc tgttccacctcagtgacaggtt	62	220	Parry and Nicholson, 1996
F. poae	CNL12 PoaeIGSr	ctgaacgcctctaagtcag caagctctcctcggagagtcgaa	58	306	Konstantinova and Yli-Mattila, 2004

Продовження табл. 3

Вид	Пара праймерів	Послідовність (5′–3′)	Температура відпалу, °C	Довжина продуктів, п.н.	Посилання
F. poae	Tox5-1 Tox5-poae-R	gctgctcatcactttgctcag tcgtggtgaaacaatgtat	57	400	Niessen et al, 2004
F. poae	Fps-F Fpo-R	cgcacgtatagatggacaag cagcgcacccctcagagc	61	400	Jurado et al, 2005
*F. poae**	FpoaeA51 fwd FpoaeA98 rev	accgaatctcaactccgcttt gtctgtcaagcatgttagcacaagt			Nicolaisen et al, 2009
F. proliferatum	Fp3-F Fp4-R	cggccaccagaggatgtg caacacgaatcgcttcctgac	69	~230	Jurado et al, 2006
F. proliferatum	PRO1 PRO2	ctttccgccaagtttcttc tgtcagtaactcgacgttgttg	56	585	Mulè et al, 2004
*F. proliferatum**	Fpro220 fwd Fpro270 rev	cttcgatcgcgcgtcct cacgtttcgaatcgcaagtg			Nicolaisen et al, 2009
F. verticillioides	VER1 VER2	cttcctgcgatgtttctcc aattggccattggtattatatatcta	56	578	Mulè et al, 2004
F. verticillioides	VERT-1 VERT-2	gtcagaatccatgccagaacg cacccgcagcaatccatcag	64	~800	Patiño et al, 2004
F. verticillioides (лише ті, що продукують фумінозин)	VERTF-1 VERTF-2	gcgggaattcaaaagtggcc gagggcgcgaaacggatcgg	64	~400	Patiño et al, 2004
F. verticillioides	FV-F1 FV-R	gtacaatccccctgttaagg caccctgagtgcccttggtg	64	649	Faria et al, 2012
F. verticillioides	FV-F2 FV-R	actggtggtaacgatgcg caccctgagtgcccttggtg	64	370	Faria et al, 2012
*F. verticillioides**	Fver356 fwd Fver412 rev	cgtttctgccctctccca tgcttgacacgtgacgatga			Nicolaisen et al, 2009
F. tricinctum	tri1 tri2	cgtgtccctctgtacagctttga gtggttacctcccgatactcta	65	215	Kulik, 2008
*F. tricinctum**	Ftri573 fwd Ftri630 rev	ttggtatgttgtcactgtctcacactat tgacagagatgttagcatgatgca			Nicolaisen et al, 2009
F. pseudograminearum	Fp1-1 Fp1-2	cggggtagtttcacatttc(c/t)g gagaatgtgatga(c/g)gacaata	55	523	Aoki and O'Donnell, 1999
F. oxysporum	FOF1 FOR1	acataccacttgttgcctcg cgccaatcaatttgaggaacg	58	340	Mishra et al, 2003
F. equiseti	FEF1 FER1	catacctatacgttgcctcg ttaccagtaacgaggtgtatg	58	389	Mishra et al, 2003
*F. equiseti**	FequiB569 fwd FequiB598 rev	caccgtcattggtatgttgtcatc tgttagcatgagaaggtcatgagtg			Nicolaisen et al, 2009
F. equiseti	Feq-F Feq-R	ggcctgccgatgcgtc cgatactgaaaccgacctc	66	~990	Jurado et al, 2005
F. solani	ITS-Fu2f ITS-Fu2r	ccagaggacccccctaactct ctctccagttgcgaggtgtt	63,5	595	Arif et al, 2012
F. solani	ITS-Fs5f ITS-Fs5r	cgtcccccaaatacagtgg tcctccgcttattgatatgctt	61	485	Arif et al, 2012
F. solani	TEF-Fs4f TEF-Fs4r	atcggccacgtcgactct ggcgtctgttgattgttagc	58	658	Arif et al, 2012
F. solani	FS1 FS2	gcaggtatggctttttggaa gtaaactccgacaggtgcaa	57	175	Casasnovas et al, 2013

Закінчення табл. 3

Вид	Пара праймерів	Послідовність (5′–3′)	Температура відпалу, °C	Довжина продуктів, п.н.	Посилання
F. cerealis	TCRO-A-f CRO-A-r	ctcagtgtccaccgcgttgcgtag ctcagtgtcccaatcaaatagtcc	60	842	Yoder and Christianson, 1998
F. langsethiae	FlangF3 LanspoR1	caaagttcagggcgaaaact tacaagaagacgtggcgatat	62	310	Wilson et al, 2004
*F. langsethiae**	FlangA29 fwd FlangA95 rev	caagtcgaccactgtgagtacctct tgtcaaagcatgtcagtaaagatgac			Nicolaisen et al, 2009
F. subglutinans	61-2 F 61-2 R	ggccactcaagaggcgaaag gtcagaccagagcaatgggc	64	445	Möller et al, 1999
F. subglutinans	SUB1 SUB2	ctgtcgctaacctctttatcca cagtatggacgttggtattatatctaa	56	631	Mulè et al, 2004
F. subglutinans	FS-F1 FS-R	gtacaacccgcctgctaagg taccctgagtacccctatcg	62	649	Faria et al, 2012
F. subglutinans	FS-F2 FS-R	tactggcggcaacgacgct taccctgagtacccctatcg	62	370	Faria et al, 2012
*F. subglutinans**	Fsub565 fwd Fsub622A rev	tcattggtatgttgtcgctcatg gtgatatgttagtacgaataaagggagaac			Nicolaisen et al, 2009
M. nivale var. *majus*	Mnm2F Mnm2R	tgcaacgtgccagaagct aatcggcgctgtctactaaaagc	61	750	Nicholson et al, 1996
M. nivale var. *nivale*	Y13NF Y13NR	accagccgatttgtggttatg ggtcacgaggcagagttcg	61	310	Nicholson and Parry, 1996

Примітка. *Праймери для кількісного визначення за допомогою ПЛР в реальному часі з SYBR Green.

ампліфіковані фрагменти довжиною 610 п.н. із зразками ДНК *F. sporotrichioides* та 750 п.н. – *F. langsethiae* (табл. 3); ця пара праймерів також давала ампліфіковані фрагменти із ДНК рослин, але не інших грибів (Konstantinova and Yli-Mattila, 2004). Інша пара праймерів на основі ITS регіону, розроблених цими ж авторами, SporoITSf/SporoITSr, повинна була давати ампліфіковані фрагменти довжиною 400 п.н. із ДНК *F. sporotrichioides* та *F. langsethiae* (табл. 3), однак із ними автори отримали ще більше неспецифічних фрагментів із ДНК інших видів (Konstantinova and Yli-Mattila, 2004; Kuzdraliński et al, 2017a). Інша тест-система, комплементарна фрагменту ITS2, на основі пари праймерів FspITS2K/P28SL ампліфікувала фрагменти довжиною 288 п.н. (табл. 3) і була достатньо видоспецифічна (Kulik et al, 2004; Kuzdraliński et al, 2017a). У наступній тест-системі на основі гена *Tox5* використовували універсальний праймер Tox5-1, який разом із видоспецифічним праймером Tox5-sporo-R2 давав ампліфіковані фрагменти довжиною 400 п.н. з ДНК, виділеною із більшості зразків *F. sporotrichioides*, які розробники тест-системи взяли для валідації праймерів (табл. 3) (Niessen et al, 2004). На основі ділянки ITS Wilson et al (2004) розробили пари видоспецифічних праймерів для ідентифікації *F. sporotrichioides* (FsporF1/LanspoR1) та *F. langsethiae* (FlangF3/LanspoR1), що мають спільний зворотній праймер (табл. 3).

Першу ПЛР тест-систему для визначення *F. avenaceum* було розроблено на основі ITS ділянки. Вона являла собою пару праймерів FA-ITSF/FA-ITSR, яка давала ампліфіковані продукти довжиною 272 п.н. (табл. 3). Цю пару праймерів було перевірено з використанням ДНК ізолятів грибів із різних регіонів, а також рослинної ДНК, і жодних хибно-позитивних результатів автори не відмітили (Schilling et al, 1996). Наступні тест-системи також були основані на цій ділянці. Так, з парою праймерів Fa-U17f/Fa-U17r при рекомендованому протоколі ПЛР за принципом тач-даун (5 циклів темпе-

ратура відпалу 66 °С, 5 циклів – 64 °С, наступні 30 циклів – 62 °С) отримували ампліфіковані фрагменти довжиною 345 п.н., а з парою праймерів JIAf/JIAr – ампліфіковані фрагменти довжиною 220 п.н. (табл. 3) (Turner et al, 1998). Пара праймерів Fa-U17f/Fa-U17r була, однак, специфічною не лише для *F. avenaceum*, але і для *F. tricinictum* (Turner et al 1998; Kuzdraliński et al, 2017a). Пара праймерів JIAf/JIAr виявилась більш специфічною і її було валідовано у пізніших роботах (Doohan et al, 1998; Demeke et al, 2005). Іншу пару праймерів, FAF1/FAR із очікуваною довжиною ампліфікованих фрагментів 314 п.н. (табл. 3), було розроблено для можливого визначення *F. avenaceum* у ПЛР із міченими праймерами, проте очевидно, що як барвник можна використовувати і бромистий етидій, доданий безпосередньо в агарозний гель (Mishra et al, 2003). Також було розроблено пару праймерів Fa-8f/Fa-13R, які можуть давати ампліфіковані фрагменти довжиною 188 п.н. або ж використовуватись у ПЛР в реальному часі із додаванням SYBR Green (табл. 3) (Pollard and Okubara, 2019).

Для визначення *F. poae* найчастіше використовують пару праймерів Fp82F/R (табл. 3) (Parry and Nicholson, 1996; Kuzdraliński et al, 2017a). Ця пара праймерів давала ампліфіковані фрагменти довжиною 220 п.н. та не продукувала жодних неспецифічних фрагментів із іншими зразками ДНК, використаними її авторами для валідації (Parry & Nicholson, 1996). В інших дослідженнях описано пару праймерів CNL12/PoaeIGSr, яка продукувала ампліфіковані фрагменти довжиною 306 п.н. із зразками ДНК *F. poae* (табл. 3), однак авторами також отримано ампліфіковані фрагменти зі зразками ДНК *F. kyushuense* та *F. langsethiae*, використаними для валідації (Konstantinova & Yli-Mattila, 2004). Так само пара праймерів Tox5-1/Tox5-poae-R продукувала ампліфіковані фрагменти довжиною 400 п.н. з ДНК 45 ізолятів *F. poae* і неспецифічні фрагменти – з одним ізолятом *F. langsethiae* (Niessen et al, 2004; Kuzdraliński et al, 2017a). Jurado et al (2005) розробили тест-систему на основі часткової IGS послідовності, що включала праймери Fps-F/Fpo-R. З ними отримували ампліфіковані фрагменти довжиною 400 п.н. (табл. 3). Пізніше цю тест-систему було додатково валідовано з використанням широкого спектру зразків ДНК різноманітних видів фузаріїв (Jurado et al, 2006).

Для визначення *F. tricinctum* було запропоновано тест-систему на основі часткової послідовності IGS, що включала праймери tri1/tri2. З цими праймерами автори отримували ампліфіковані фрагменти довжиною 215 п.н. для всіх зразків ДНК таргетного фітопатогена, використаних у дослідженні, та не спостерігали жодних неспецифічних фрагментів (табл. 3) (Kulik, 2008).

Для ідентифікації *F. oxysporum* Mishra et al (2003) розробили видоспецифічні праймери FEF1/ FER1 на основі послідовності ITS ядерної рДНК, які дають амплікон розміром 340 п.н. Аналогічно, ці ж автори запропонували праймери для ідентифікації *F. equiseti*: FEF1/FER1, з видоспецифічним ампліконом 389 п.н. Для *F. equiseti* також розроблено праймери Feq-F/Feq-R на основі послідовності IGS (табл. 3) (Jurado et al, 2005).

Для *F. cerealis* (*F. crookwellense*) ще в 1998 р. Yoder and Christianson (1998) розробили видоспецифічні праймери CRO-A на основі аналізу RAPD спектрів, які у штамів цього виду давали амплікон 842 п.н. (табл. 3). Зокрема, ці праймери було апробовано Demeke et al (2005).

Для різних підвидів *M. nivale* використовують окремі тест-системи. Так, для визначення *M. nivale* var. *majus* було запропоновано тест-систему на основі праймерів Mnm2F/R, з якими отримували ампліфіковані фрагменти довжиною 750 п.н. (Nicholson et al, 1996). Для визначення *M. nivale* var. *nivale* запропоновано тест-систему на основі праймерів Y13NF/R з очікуваними ампліфікованими фрагментами довжиною 310 п.н. (табл. 3) (Nicholson and Parry, 1996).

F. pseudograminearum – збудник фузаріозної прикореневої гнилі пшениці раніше розглядався як *F. graminearum* 1 групи (Aoki and O'Donnell 1999; Kazan and Gardiner, 2018). Праймери для ідентифікації *F. pseudograminearum* розроблено Aoki and O'Donnell (1999) (табл. 3). З використанням цих праймерів було показано, що *F. pseudograminearum* стає переважаючим збудником прикореневої гнилі пшениці в західній Австралії (Khudhair et al, 2019) та східному Китаї (Deng et al, 2020).

Для визначення *F. proliferatum,* який продукує фумінозини, було розроблено праймери Fp3-F/Fp4-R, що дають продукти ампліфікації розміром приблизно 200 п.н. (табл. 3) (Jurado et al, 2006). Ці ж праймери було використано і для кількісного визначення цього патогена за допомогою ПЛР в реальному часі з SYBR Green I (Amato et al, 2015). Для *F. proliferatum* та *F. verticillioides* видоспецифічні праймери було розроблено також на основі послідовності гена, що кодує кальмодулін: специфічні для *F. proliferatum* праймери PRO1/PRO2 дають амплікони завдовжки 585 п.н, а специфічні для *F. verticillioides* праймери VER1/VER2 − амплікони 578 п.н. (табл. 3) (Mulè et al, 2004). На основі послідовності 28S рДНК (IGS) Patiño et al (2004) розробили праймери для ідентифікації грибів виду *F. verticillioides* (VERT-1/VERT-2, що дають амплікон біля 800 п.н.) або лише ізолятів цього виду, що продукують фумінозини (праймери VERTF-1/VERTF-2, які дають фрагмент біля 400 п.н.) (табл. 3). Для ідентифікації *F. verticillioides* Jurado et al (2006) запропонували поєднати вищезгаданий праймер VERT-2 (Patiño et al, 2004) з родоспецифічним праймером Fps-F (табл. 1), що давало амплікон біля 700 п.н. Для *F. verticillioides* Faria et al (2012) розробили видоспецифічні праймери на основі послідовності галактоозооксидази gaoA: FV-F1/FV-R, що дає ПЛР-продукт завдовжки 649 п.н., та FV-F2/FV-R з маркерним фрагментом 370 п.н. (табл. 3).

На основі аналізу RAPD фрагментів Möller al (1999) першими розробили видоспецифічні праймери для *F. subglutinans* (61-2 F/R), які давали специфічний ПЛР-продукт завдовжки 445 п.н. при температурі відпалу 64 °С (табл. 3). Однак при температурі відпалу 62 °С і нижче ці праймери також ампліфікували слабоінтенсивні продукти у *F. nygamai* and *F. oxysporum*, проте іншого розміру. Послідовність гена кальмодуліну було використано для розробки видоспецифічних праймерів SUB1/SUB2 і для *F. subglutinans*, які дають ПЛР-продукт завдовжки 631 п.н. (табл. 3) (Mulè et al, 2004). Видоспецифічні праймери для *F. subglutinans* FS-F1/FS-R та FS-F2/FS-R на основі послідовності гена галактоозооксидази gaoA з маркерними продуктами завдовжки 649 і 370 п.н., відповідно, запропоновано Faria et al (2012) (табл. 3).

Послідовності рДНК (ITS) та гена фактора елонгації трансляції EF1α було використано Arif et al (2012) для дизайну специфічних праймерів для визначення *F. solani*: ITS-Fu2f/ITS-Fu2r, ITS-Fs5f/ITS-Fs5r та TEF-Fs4f/TEF-Fs4, які дають продукти ампліфікації завдовжки 595, 485 та 658 п.н., відповідно (табл. 3). Для ідентифікації *F. solani* також застосовуються праймери FS1/FS2, розроблені Casasnovas et al (2013) на основі продуктів AFLP (amplified fragment length polymorphism) аналізу (дають маркерний амплікон завдовжки 175 п.н., див. табл. 3). Хоча ці праймери початково було розроблено для ідентифікації збудника кореневої гнилі арахісу, вони також застосовувались для ідентифікації *F. solani* на матеріалі пшениці (Sadhasivam et al, 2017).

На основі послідовностей фактора елонгації трансляції EF1α Nicolaisen et al (2009) розробили видоспецифічні праймери для кількісного визначення *F. graminearum, F. culmorum, F. poae, F. langsethiae, F. sporotrichioides, F. equiseti, F. tricinctum, F. avenaceum, F. verticillioides, F. subglutinans* and *F. proliferatum* методом ПЛР в реальному часі з використанням барвника SYBR Green. Ці праймери активно застосовуються для визначення якісного і кількісного видового складу комплексу фузаріїв у зразках зерна або ж кількісного визначення окремого виду в багатьох дослідженнях (наприклад, Birr et al, 2020; Góral et al, 2018).

Для різних видів грибів роду *Fusarium* пропонують також тест-системи для ПЛР у реальному часі з використанням міченого зонда (табл. 4). Зокрема, перші тест-системи для визначення видів *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *M. nivale* var. *majus*, *F. poae* з використанням TaqMan зонда були основані на послідовностях, використаних до того для тест-систем на основі традиційної ПЛР (Nicholson et al, 1996, 1998; Waalwijk et al, 2003). При їх розробці застосували так званий метод підбору праймерів за принципом лігандів на основі мінорних пазових зв'язувань (Minor Groove Binder або MGB ligands) (Waalwijk et al, 2004). Як негативний внутрішній контроль радили використовувати пару праймерів і зонд, комплементарний фрагменту ДНК вірусу скручування листя картоплі (праймери PLRV-F та PLRV-R та зонд PLRV) (табл. 4); кожна реакційна суміш містила по

Таблиця 4. **Тест-системи для визначення різних видів грибів роду *Fusarium* у реальному часі з використанням міченого зонда**

Вид	Пара праймерів і зонд	Послідовність (5′–3′)	Посилання
F. avenaceum	avenaceum_MGB-F	ccatcgccgtggctttc	Waalwijk et al, 2004
	avenaceum_MGB-R	caagcccacagacacgttgt	
	avenaceum_MGB-probe	acgcaattgactattgc	
F. avenaceum	EF1-FA_F2	catcttgctaactcttgacagaccg	Elbelt et al, 2018
	EF1-FA_R3	gggtaatgaatgcgtttcgaa	
	Ef1-FA	agcgagtcgtgggaatcgatggg	
F. culmorum	culmorum_MGB-F	tcacccaagacgggaatga	Waalwijk et al, 2004
	culmorum_MGB-R	tggctaaacagcacgaatgc	
	culmorum_MGB-probe	cacttggatatatttcc	
F. culmorum	EF1-FC_F2	cgaatcgccctcacacg	Elbelt et al, 2018
	EF1-FC-R2	gtgatggtgcgcgcctag	
	culmo2-EF1-R2	atgagccccaccagaaaaattacgacaa	
F. graminearum	graminearum_MGB-F	ggcgcttctcgtgaacaca	Waalwijk et al, 2004
	graminearum_MGB-R	tggctaaacagcacgaatgc	
	graminearum_MGB-probe	agatatgtctcttcaagtct	
F. graminearum	EF1-FCFG_F	tcgatacgcgcctgttacc	Elbelt et al, 2018
	EF1-FG_R	atgagcgcccagggaatg	
	grami2-EF1_rev	agccccaccgggaaaaaaattacgaca	
F. graminearum	FGtubf/	gtctcgacagcaatggtgtt	Reischer, et al, 2004
	FGtubr	gcttgtgtttttcgtggcagt	
	FGtubTM	acaacggaacggcacctctgagctccagc	
F. graminearum	TMFg12f	ctccggatatgttgcgtcaa	Yli-Mattila et al 2008
	TMFg12r	cgaagcatatccagatcatcca	
	TMFg12p	tgagaatgtcttgaggcaatgcgaacttt	
F. poae	poae_1-F	aaatcggcgtatagggttgagata	Waalwijk et al, 2004
	poae_1-R	gctcacacagagtaaccgaaacct	
	poae_1-probe	caaaatcacccaaccgacccttc	
F. poae	EF1-FP2_F	ctcgagcgattgcatttcttt	Elbelt et al, 2018
	EF1_FP2_R	ggcttcctattgacaggtggtt	
	EF1-FP	cgcgaatcgtcacgtgtcaatcagtt	
F. poae	TMpoaef	gctgagggtaagccgtcctt	Yli-Mattila et al 2008
	TMpoaer	tctgtcccccctaccaagct	
	TMpoae-probe	atttccccaacttcgactctccgagga	
F. sporotrichioides	EF1-FS_F3	tcgatacgcgcctgttacc	Elbelt et al, 2018
	EF1-FS_R2	tcgatacgcgcctgttacc	
	EF1-FS	tcgatacgcgcctgttacc	
F. langsethiae	EF1-FL-F3	gccgtgtcgtaatttttttgtg	Elbelt et al, 2018
	EF1-FL-R3	aaatggctatgtgggaaggaag	
	EF1_FL	gggctcataccccgccactcga	
M. nivale var. *majus*	nivale_2-F	cgccaaggactcctccagtag	Waalwijk et al, 2004
	nivale_2-R	gccgacgaatggatattaagaact	
	nivale_2-probe	tcccgccttcacggtggaaagc	

Продовження табл. 4

Вид	Пара праймерів і зонд	Послідовність (5′–3′)	Посилання
M. nivale	Mniv_Btub_F	tctacttcaacgaggtatgtcaccat	Elbelt et al, 2018
	Mniv_Btub_R	cctaagttatgtgggtggtcagttag	
	Mniv_Btub	ttcgggcttcacacattcggcc	
F. langsethiae/F. sporotrichioides	TMLANf	gagcgtcatttcaaccctcaa	Halstensen et al, 2006
	TMLANr	gaccgccaatcaatttggg	
	TMLANp	agcttggtgttgggatctgtccttaccg	
F. avenaceum/F. arthrosporoides	TMAVf	agatcggacaatggtgcattataa	Halstensen et al, 2006
	TMAVr	ggccctactatttactcttgcttttg	
	TMAVp	ctcctgagaggtcccagagatgaacata acttc	
Всі види роду *Fusarium*, що продукують трихотецени	TMTrif	cagcagmtrctcaaggtagaccc	Halstensen et al, 2006
	TMTrir	aactgtayacraccatgccaac	
	TMTrip	agcgactacaggcttccctccaaacaat	

83 нМ кожного зонда й 333 нМ – кожного з праймерів (Waalwijk et al, 2004). До зондів, специфічних для ДНК представників роду *Fusarium*, був «пришитий» фарбник FAM (6-карбокси-флуорисцин, емісія при 518 нм) на 5′-кінці; до зонду PLRV, який використовували як внутрішній стандарт, був «пришитий» VIC; до всіх зондів на 3′ кінці був «пришитий» фарбник TAMRA (6-карбокси-тетраметил-родамін із довжиною хвиль емісії 582 нм).

Окремо для *F. graminearum* було розроблено специфічну тест-систему на основі послідовності гена тубуліну з використанням TaqMan зонда, зокрема пари праймерів FGtubf/FGtubr та зонда FgtubTM, міченого FAM із 5′ кінця і TAMRA із 3′ кінця (табл. 4) (Reischer, et al, 2004; Sanoubar et al, 2015). Інша тест-система для визначення *F. graminearum* базувалась на ПЛР із праймерами Fg11f та Fg11r, які ампліфікували фрагмент IGS регіону довжиною 382 п.н. (табл. 4) (послідовність у GeneBank AY937106), відповідно до Yli-Mattila et al (2004). Авторами запропоновано пару праймерів TMFg12f/TMFg12r та зонд TMFg12p (табл. 4). Зонд також мітили FAM барвником із 5′-кінця і TAMRA – із 3′-кінця; протокол ПЛР в цьому випадку також збігався із запропонованим Waalwijk et al (2004) (Yli-Mattila et al, 2008). Для *F. poae* було розроблено високоспецифічну тест-систему на основі праймерів TMpoaef/TMpoaer та зонда TMpoaep (табл. 4), комплементарних фрагменту IGS; зонд мітили з 5′ кінця TET (тетрахлоро-6-карбоксифлуорисцин) і на 3′ кінці – 3′ Екліпсом Темним як квенчером; протокол ПЛР анало-гічний до запропонованого Waalwijk et al (2004); автори стверджували, що ця тест-система була найчутливішою на час розробки з-поміж аналогів не лише для *F. poae*, але і для інших видів грибів роду *Fusarium*, зокрема, у порівнянні з тест-системами, опублікованими Waalwijk et al (2004) (Yli-Mattila et al, 2008).

На основі послідовності гена EF1α грибів роду *Fusarium*, зібраних у різних локаціях Франції, було розроблено низку тест-систем, наведених у табл. 4; у випадку тест-системи для визначення *M. nivale* авторами було обрано ген β-тубуліну (Elbelt et al, 2018). Всі зонди у запропонованих тест-системах мітили фарбниками FAM і TAMRA з 5′- і 3′-кінців, відповідно (Elbelt et al, 2018).

Для випадків, коли видова приналежність представників роду *Fusarium* не є принциповою, можна використати тест-системи на основі послідовностей гена *Tri5*, який відповідає за біосинтез трихотеценів, або ж послідовностей, які є спільними для декількох видів (Halstensen et al, 2006) (табл. 4). Зонди у наведених тест-системах пропонують мітити барвником FAM (TMLANp, TMAVp) або VIC (TMTrip) із 5′ кінця і TAMRA – з 3′; всі праймери пропонують додавати до фінальної

концентрації 300 нМ, зонд – 100 нМ; протокол ПЛР ідентичний такому для тест-систем, запропонованих Waalwijk et al (2004) (Halstensen et al, 2006).

Ще одним сучасним підходом до визначення видової приналежності грибів роду *Fusarium* є секвенування ампліфікованих фрагментів ДНК та їх порівняння з послідовностями з бази даних ДНК (наприклад, Shikur Gebremariam et al, 2018; Minati and Mohammed-Ameen, 2019).

Отже, як бачимо, досить багато уваги приділяється визначенню грибів роду *Fusarium*. І хоча переважна більшість актуальних на сьогодні досліджень присвячена саме ПЛР аналізу, не втрачають важливість і роботи щодо мікробіологічного визначення цих патогенів (наприклад, Abass et al, 2021). Не всі ПЛР методики, наведені у цьому огляді, є досконалими – частина з тест-систем, які розроблялись як видоспецифічні, такими не виявились. Однак, навіть їх можна використати для досліджень, у яких важливим є не визначення того чи іншого виду фузаріїв, а будь-якої їх комбінації. Так само можна використати і тест-системи, орієнтовані на продуцентів певних мікотоксинів, безвідносно їх видової приналежності.

CURRENT APPROACHES TO IDENTIFICATION OF *FUSARIUM* FUNGI INFECTING WHEAT

A.V. Karelov, O.I. Borzykh, N.O. Kozub, I.O. Sozinov, L.A. Yanse, O.I. Sozinova, H.M. Tkalenko, L.T. Mishchenko, Ya.B. Blume

Institute of Plant Protection of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine,
03022, 33 Vasykivska St., Kyiv
Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, 04123, 2a Osypovskogo St., Kyiv
Education and Scientific Center 'Institute of Biology and Medicine' of Taras Shevchenko National University of Kyiv, 01601,
64/13 Volodymyrska St., Kyiv

E-mail: hromogen-black@ukr.net, natalkozub@gmail.com, blume.yaroslav@nas.gov.ua, lmishchenko@ukr.net

Fungi of the genus *Fusarium* are especially dangerous phytopathogens affecting common wheat (*Triticum aestivum* L.) among other crops, as they may cause not only crop losses but poisoning of humans and livestock. The review highlights current approaches to identify fungi of the genus *Fusarium* infecting common wheat. Microbiological techniques for identification of *Fusarium* species are still among laboratory protocols and recommendations, therefore some of the most popular genus- and species-specific media are mentioned in the review. However, in the modern literature, much more attention is paid to identification of *Fusarium* fungi with the use of the polymerase chain reaction (PCR). Therefore conventional PCR assays for identification of representatives of the genus *Fusarium* in general or only species producing especially dangerous metabolites (nivalenol, deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, 4-acetyl-nivalenol, enniatin) are highlighted in the review. The primer pairs to identify the presence of certain *Fusarium* species or their combinations in samples are described. For real-time PCR assays, which may be used for more precise quantitative and qualitative genus- and species-specific identification of *Fusarium* fungi, protocol details, primer and probe sequences are described, as well as recommended dyes are mentioned for the probes. For some primer pairs, additional details regarding their validation and the assay sensitivity are mentioned. Thus, the techniques described in the review are precise and comprehensive enough and may be used in combinations and separately for genus- and species-specific quantitative or qualitative identification of the fungi of the genus *Fusarium*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

Abass MH, Madhi QH, Matrood AAA. (2021) Identity and prevalence of wheat damping-off fungal pathogens in different fields of Basrah and Maysan provinces. Bull Natl Res Cent 45:51. doi: 10.1186/s42269-021-00506-0

Amato B, Pfohl K, Tonti S et al. (2015) *Fusarium proliferatum* and fumonisin B1 co-occur with *Fusarium* species causing Fusarium Head Blight in durum wheat in Italy. JABFQ 88:288–233. doi:10.5073/JABFQ.2015.088.033

Anderson MG, Atkinson RG. (1974) Comparison of media for the isolation of *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* from sawdust used for growing tomatoes. Can J Plant Sci 54(2):373–374. doi:10.4141/cjps74-057

Aoki T, O'Donnell K. (1999) Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* recognized as the Group 1 population of *F. graminearum*. Mycologia 91(4):597–609. doi:10.1080/00275514.1999.12061058

Arif M, Chawla S, Zaidi NW et al. (2012) Development of specific primers for genus *Fusarium* and *F. solani* using rDNA sub-unit and transcription elongation

factor (TEF-1α) gene. Afr J Biotechnol 11(2):444–447. doi: 10.5897/AJB10.489

Birr T, Hasler M, Verreet JA et al. (2020) Composition and predominance of *Fusarium* species causing Fusarium head blight in winter wheat grain depending on cultivar susceptibility and meteorological factors. Microorganisms 8(4):617. doi: 10.3390/microorganisms8040617

Bluhm BH, Flaherty JE, Cousin MA et al. (2002) Multiplex polymerase chain reaction assay for the differential detection of trichothecene- and fumonisin-producing species of *Fusarium* in cornmeal. J Food Prot 65(12):1955–1961. doi:10.4315/0362-028X-65.12.1955

Brandfass C, Karlovsky P. (2006) Simultaneous detection of *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* in plant material by duplex PCR with melting curve analysis. BMC Microbiol 6: 4. doi:10.1186/1471-2180-6-4

Casasnovas F, Fantini EN, Palazzini JM et al. (2013) Development of amplified fragment length polymorphism (AFLP)-derived specific primer for the detection of *Fusarium solani* aetiological agent of peanut brown root rot. J Appl Microbiol 114(6):1782–92. doi: 10.1111/jam.12183

Castañares E, Albuquerque DR, Dinolfo MI et al. (2014) Trichothecene genotypes and production profiles of *Fusarium graminearum* isolates obtained from barley cultivated in Argentina. Int J Food Microbiol 179: 57–63. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.024

Covarelli L, Beccari G, Salvi S. (2011) Infection by mycotoxigenic fungal species and mycotoxin contamination of maize grain in Umbria, central Italy. Food Chem Toxicol 49:2365–2369. doi: 10.1016/j.fct.2011.06.047

Demeke T, Clear RM, Patrick SK et al. (2005) Species-specific PCR-based assays for the detection of *Fusarium* species and a comparison with the whole seed agar plate method and trichothecene analysis. Int J Food Microbiol 103(3):271–84. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.026

Deng YY, Li W, Zhang P et al. (2020) *Fusarium pseudograminearum* as an emerging pathogen of crown rot of wheat in eastern China. Plant Pathol 69:240–248. doi: 10.1111/ppa.13122

Desmond OJ, Manners JM, Stephens AE et al. (2008) The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production; programmed cell death and defence responses in wheat. Mol Plant Pathol 9(4):435–445. doi: 10.1111/j.1364-3703.2008.00475.x

Doohan FM, Parry DW, Jenkinson P et al. (1998) The use of species-specific PCR-based assays to analyze *Fusarium* ear blight of wheat. Plant Pathol 47:197–205. doi: 10.1046/j.1365-3059.1998.00218.x

Elbelt S, Siou D, Gelisse S et al. (2018) Optimized real-time qPCR assays for detecting and quantifying the *Fusarium* and *Microdochium* species responsible for wheat head blight, as defined by MIQE guidelines. bioRxiv 272534. doi: 10.1101/272534

Faria CB, Abe CA, da Silva CN et al. (2012) New PCR assays for the identification of *Fusarium verticillioides*, *Fusarium subglutinans*, and other species of the *Gibberella fujikuroi* complex. Int J Mol Sci 13(1):115–132. doi: 10.3390/ijms13010115

Fisher NL, Burgess LW, Toussoun TA et al. (1982) Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. Phytopathology 72(1): 151–15. doi: 10.1094/Phyto-72-151

Glazebrook J. (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annu Rev Phytopathol 43:205–227. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923

Góral T, Wiśniewska H, Ochodzki P et al. (2018) Relationship between Fusarium head blight, kernel damage, concentration of *Fusarium* biomass, and *Fusarium* toxins in grain of winter wheat inoculated with *Fusarium culmorum*. Toxins 11(1):2. doi: 10.3390/toxins11010002

Halstensen AS, Nordby KC, Eduard W et al. (2006) Real-time PCR detection of toxigenic *Fusarium* in airborne and settled grain dust and associations with trichothecene mycotoxins. J Environ Monit 8(12):1235–41. doi: 10.1039/b609840a

Hayashi Y, Kozawa T, Aiuchi D et al. (2014) A selective medium to isolate airborne spores of *Microdochium nivale*, causing winter wheat scab. Eur J Plant Pathol 138:247–256. doi: 10.1007/s10658-013-0324-2

Johnson DD, Flaskerud GK, Taylor RD et al. (2003) Fusarium head blight of wheat and barley In Leonard KJ, Bushnell WR (ed) Quantifying economic impacts of Fusarium head blight in wheat. APS Press, St. Paul, USA, p 461–483

Jung B, Lee S, Ha J et al. (2013) Development of a selective medium for the fungal pathogen *Fusarium graminearum* using toxoflavin produced by the bacterial pathogen *Burkholderia glumae*. Plant Pathol J 29(4):446–450. doi: 10.5423/PPJ.NT.07.2013.0068

Jurado M, Vázquez C, Patico B et al. (2005) PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*. Syst Appl Microbiol 28:562–568

Jurado M, Vázquez C, Marín S et al. (2006) PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in maize. Syst Appl Microbiol 29(8):681–689. doi: 10.1016/j.syapm.2006.01.014

Kazan K, Gardiner DM. (2018) Fusarium crown rot caused by *Fusarium pseudograminearum* in cereal

crops: recent progress and future prospects. Mol Plant Pathol 19(7):1547–1562. doi: 10.1111/mpp.12639

Kerenyi Z, Moretti A, Waalwijk C et al. (2004) Mating type sequences in asexually reproducing *Fusarium* species. Appl Environ Microbiol 70:4419–4423. doi: 10.1128/AEM.70.8.4419-4423.2004

Khaledi N, Taheri P, Falahati RM. (2017) Identification, virulence factors characterization, pathogenicity and aggressiveness analysis of *Fusarium* spp., causing wheat head blight in Iran. Eur J Plant Pathol 147:897–918. doi: 10.1007/s10658-016-1059-7

Komada H. (1976) A new selective medium for isolating *Fusarium* from natural soil. Proc Am Phytopathol Soc 3: 221.

Konstantinova P, Yli-Mattila T. (2004) IGS-RFLP analysis and development of molecular markers for identification of *Fusarium poae*, *Fusarium langsethiae*, *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium kyushuense*. Int J Food Microbiol 95:321–331. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.010.

Krnjaja V, Stanković S, Obradović A et al. (2018). Trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* populations ssolated from winter wheat crops in Serbia. Toxins 10(11):460. doi: 10.3390/toxins10110460

Kulik T. (2008) Detection of *Fusarium tricinctum* from cereal grain using PCR assay. J Appl Genet 49:305–311. doi: 10.1007/BF03195628

Kulik T, Fordoński G, Pszczyłkowska A et al. (2004) Development of PCR assay based on ITS2 rDNA polymorphism for the detection and differentiation of *Fusarium sporotrichioides*. FEMS Microbiol Lett 239:181–186. doi: 10.1016/j.femsle.2004.08.037

Kuzdraliński A, Kot A, Szczerba H et al. (2017a) A review of conventional PCR assays for the detection of selected phytopathogens of wheat. J Mol Microbiol Biotechnol 27:175–189. doi: 10.1159/000477544

Kuzdraliński A, Nowak M, Szczerba H et al. (2017b) The composition of *Fusarium* species in wheat husks and grains in south-eastern Poland. J Integr Agric 16(7):1530–1536. doi: 10.1016/S2095-3119(16)61552-6

Leslie JF, Summerel BA, Bullock S. (2006) The *Fusarium* laboratory manual Wiley, p. 388. ISBN 0813819199, 9780813819198

Ma H, Zhang X, Yao J et al. (2019) Breeding for the resistance to *Fusarium* head blight of wheat in China. Front Agr Sci Eng 6(3):251–264. doi: 10.15302/J-FASE-2019262

Martinez M, Castañares E, Dinolfo MI et al. (2014) Presencia de *Fusarium graminearum* en muestras de trigo destinado al consumo humano. Rev Argent Microbiol 46(1):41–44. doi: 10.1016/S0325-7541(14)70046-X

Miller JD, Greenhalgh R, Wang Y et al. (1991) Trichothecene chemotypes of three *Fusarium* species. Mycologia 83:121–130. doi: 10.2307/3759927

Minati MH, Mohammed-Ameen MK. (2019) Novel report on six *Fusarium* species associated with head blight and crown rot of wheat in Basra province, Iraq. Bull Natl Res Cent 43:139. doi: 10.1186/s42269-019-0173-z

Mishra PK, Fox RT, Culham A. (2003) Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic *Fusaria*. FEMS Microbiol Lett 218(2):329–32. doi: 10.1111/j.1574-6968.2003.tb11537.x

Möller EM, Chełkowski J, Geiger HH. (1999) Species-specific PCR assays for the fungal pathogens *Fusarium moniliforme* and *Fusarium subglutinans* and their application to diagnose maize ear rot disease. J Phytopathol 147:497–508. doi: 10.1046/j.1439-0434.1999.00380.x

Mulè G, Susca A, Stea G et al. (2004) A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. Eur J Plant Pathol 110: 495–502. doi:10.1023/B:EJPP.0000032389.84048.71

Nicholson P, Parry DW (1996) Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. Plant Pathol 45:872–883. doi:10.1111/j.1365-3059.1996.tb02898.x

Nicholson P, Lees AK, Maurin N et al. (1996) Development of a PCR assay to identify and quantify *Microdochium nivale* var. *nivale* and *Microdochium nivale* var. *majus* in wheat. Physiol Mol Plant Path 48:257–71. doi: 10.1006/pmpp.1996.0022

Nicholson P, Simpson DR, Weston G et al. (1998) Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. Physiol Mol Plant Pathol 53:17–37. doi: 10.1006/pmpp.1998.0170

Nicholson P, Simpson D, Wilson AH et al. (2004) Detection and differentiation of trichothecene and enniatin-producing *Fusarium* species on small-grain cereals. Eur J Plant Pathol 110:503–514. doi: 10.1023/B:EJPP.0000032390.65641.a7

Nicolaisen M, Suproniene S, Nielsen LK et al. (2009) Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. J Microbiol Methods 76(3):234–240. doi: 10.1016/j.mimet.2008.10.016

Niessen L, Schmidt H, Vogel RF. (2004) The use of tri5 gene-sequences for PCR detection and taxonomy of trichothecene-producing species in the *Fusarium* section *Sporotrichiella*. Int J Food Microbiol 95:305-319. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.009

Nishimura N. (2007) Selective media for *Fusarium oxysporum*. J Gen Plant Pathol 73:342–348. doi: 10.1007/s10327-007-0031-y

Papavizas GC. (1967) Evaluation of various media and

antimicrobial agents for isolation of *Fusarium* from soil. Phytopathology 57:848–852

Patiño B, Mirete S, González-Jaén MT et al. (2004) PCR detection assay of fumonisin-producing *Fusarium verticillioides* strains. J Food Prot 67(6):1278–1283. doi: 10.4315/0362-028x-67.6.1278

Pollard AT, Okubara PA. (2019) Real-time PCR quantification of *Fusarium avenaceum* in soil and seeds. J Microbiol Methods 157:21–30. doi: 10.1016/j.mimet.2018.12.009

Puhall J. (1985) Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. Can J Bot 63:179–183

Quarta A, Mita G, Haidukowski M et al. (2005) Assessment of trichothecene chemotypes of *Fusarium culmorum* occurring in Europe. Food Additives and Contaminants, 22(4):309–315. doi: 10.1080/02652030500058361

Quarta A, Mita G, Haidukowski M et al. (2006) Multiplex PCR assay for the identification of nivalenol, 3- and 15-acetyl-deoxynivalenol chemotypes in *Fusarium*. FEMS Microbiol Lett 259(1):7–13. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00235.x

Ramdass AC, Villafana RT, Rampersad SN. (2020) TRI genotyping and chemotyping: A balance of power. Toxins 12:64. doi: 10.3390/toxins12020064

Reischer GH, Lemmens M, Farnleitner A et al. (2004) Quantification of *Fusarium graminearum* in infected wheat by species specific real-time PCR applying a TaqMan Probe. J Microbiol Methods 59(1):141–146. doi: 10.1016/j.mimet.2004.06.003

Rossi V, Terzi V, Moggi F et al. (2007) Assessment of *Fusarium* infection in wheat heads using a quantitative PCR assay. Food Addit Contam 24(10):1121–1130. doi: 10.1080/02652030701551818

Sadhasivam S, Britzi M, Zakin V et al. (2017) Rapid detection and identification of mycotoxigenic fungi and mycotoxins in stored wheat grain. Toxins 9(10):302. doi: 10.3390/toxins9100302

Salgado JD, Madden LV, Paul PA. (2015) Quantifying the effects of Fusarium head blight on grain yield and test weight in soft red winter wheat. Phytopathology 105(3):295–306. doi: 10.1094/PHYTO-08-14-0215-R.

Sanoubar R, Bauer A, Seigner L. (2015) Detection, identification and quantification of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* in wheat kernels by PCR techniques. J Plant Pathol Microbiol 6:287. doi: 10.4172/2157-7471.1000287

Schilling AG, Möller EM, Geiger HH. (1996) Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum and F. avenaceum*. Mol Plant Pathol 86:515–522

Segalin M, Reis EM. (2010) Semi-selective medium for *Fusarium graminearum* detection in seed samples. Summa Phytopathologica 36(4):338–341. doi: 10.1590/S0100-54052010000400010

Shikur Gebremariam E, Sharma-Poudyal D, Paulitz TC et al. (2018) Identity and pathogenicity of *Fusarium* species associated with crown rot on wheat (*Triticum* spp.) in Turkey. Eur J Plant Pathol 150:387–399. doi: 10.1007/s10658-017-1285-7

Snijders CHA, Perkowski J. (1990) Effects of head blight caused by *Fusarium culmorum* on toxin content and weight of wheat kernels. Phytopathology 79:455–469

Steenkamp ET, Wingfield BD, Coutinho TA et al. (2000) PCR-based identification of MAT-1 and MAT-2 in the *Gibberella fujikuroi* species complex. Appl Environ Microbiol 66:4378–4382. doi: 10.1128/aem.66.10.4378-4382.2000

Terzi V, Morcia C, Faccioli P et al. (2007) *Fusarium* DNA traceability along the bread production chain. Int J Food Sci Technol 42:1390–1396. doi: 10.1111/j.1365-2621.2006.01344.x

Thrane U. (1996) Comparison of three selective me-dia for detecting *Fusarium* species in foods: a collaborative study. Int J Food Microbiol 29(2–3):149–156. doi: 10.1016/0168-1605(95)00040-2

Turner AS, Lees AK, Rezanoor HN et al. (1998) Refinement of PCR-detection of *Fusarium avenaceum* and evidence from DNA marker studies for phonetic relatedness to *Fusarium tricinctum*. Plant Pathol 47: 278–288. doi: 10.1046/j.1365-3059.1998.00250.x

Waalwijk C, Kastelein P, de Vries PhM et al. (2003) Major changes in *Fusarium* spp. in wheat in the Netherlands. Eur J Plant Pathol 109:743–754. doi: 10.1023/A:1026086510156

Waalwijk C, van der Heide R, de Vries I et al. (2004) Quantitative detection of *Fusarium* species in wheat using TaqMan. Eur J Plant Pathol 110:481–494. doi: 10.1023/B:EJPP.0000032387.52385.13

Wang CL, Cheng YH. (2017) Identification and trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* species complex from wheat in Taiwan. Bot Stud 58:4. doi: 10.1186/s40529-016-0156-4

Ward TJ, Clear RM, Rooney AP et al. (2008) An adaptive evolutionary shift in *Fusarium* head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America. Fungal Genet Biol 45(4):473–484. doi: 10.1016/j.fgb.2007.10.003

Wilson A, Simpson D, Chandler E et al. (2004) Development of PCR assays for the detection and differentiation of *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae*. FEMS Microbiol Lett 233(1):69–76. doi: 10.1016/j.femsle.2004.01.040

Yoder WT, Christianson LM. (1998) Species-specific primers resolve members of *Fusarium* section *Fusarium*. Taxonomic status of the edible «Quorn»

fungus reevaluated. Fungal Genet Biol 23(1):68–80. doi: 10.1006/fgbi.1997.1027

Yli-Mattila T, Mach R, Alekhina IA et al. (2004) Phylogenetic relationship of *Fusarium langsethiae* to *Fusarium poae* and *F. sporotrichioides* as inferred by IGS, ITS, β-tubulin sequence and UP-PCR hybridization analysis. Int J Food Microbiol 95:267–285. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.006

Yli-Mattila T, Paavanen-Huhtala S, Jestoi M et al (2008) Real-time PCR detection and quantification of *Fusarium poae*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae* in cereal grains in Finland and Russia. Arch Phytopathol Pflanzenschutz 41(4):243–260. doi: 10.1080/03235400600680659

Hrytsev OA, Zozulya OL, Vorobiova NG et al. (2018) Monitoring of species composition of fungi of the genus *Fusarium* in seed materials of winter wheat on Ukrainian territory. Microbiology & Biotechnology 2:81–89. doi: dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2018.2(42).134443 (in Ukrainian)

Kyslukh TM, Shevchuk OV. (2006) Harmfulness of the main pathogens of Fusarium head blight of winter wheat in the Forest-Steppe zone of Ukraine. Bulletin of Agricultural Science 1:16–18 (in Ukrainian).

Kovalyshyna HM, Murashko LA, Kovalyshyn AB. (2008) Spike diseases of winter wheat from the Forest-Steppe of Ukraine. Bulletin of Ukrainian Society of Geneticists and Breeders 6(2):223–239. (in Ukrainian)

Надійшла в редакцію 10.05.21
Після доопрацювання 10.06.21
Прийнята до друку 18.09.21