

ВИЯВЛЕННЯ ТА КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ МІКОТОКСИНОГЕННИХ ГРИБІВ З ВИКОРИСТАННЯМ МЕТОДУ ПЛР

Т.В. БУСЛИК, В.П. РОСАЛОВСЬКИЙ, Ю.Т. САЛИГА*

Інститут біології тварин НААН, вул. В. Стуса, 38, Львів, 79034, Україна

E-mail: yursalyha@yahoo.com

Одним з основних чинників зниження якості сільськогосподарської продукції є забруднення плісневими грибами, які здатні продукувати мікотоксини, що несуть загрозу здоров'ю як тварин так і людини. У сучасних умовах підвищеної уваги до безпеки кормів питання своєчасного виявлення їх контамінації мікотоксинами та мікотоксинпродукуючими грибами є особливо актуальними. В огляді охарактеризовано сучасний стан проблеми забруднення мікотоксинами та мікотоксигеновими грибами сільськогосподарської продукції в Україні та світі. Описано шляхи впливу на здоров'я тварин найпоширеніших мікотоксинів, а саме – афлатоксинів, фумонізинів, охратоксинів, трихотеценів та зеараленону. Проаналізовано можливість і перспективи застосування полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для якісного та кількісного виявлення мікотоксинпродукуючих грибів та для можливості прогнозування утворення мікотоксинів окремими штамами. Оцінено цільові регіони геному грибів, які можуть бути потенційними маркерами для їх видової ідентифікації та визначення хемотипу грибів. Основну увагу приділено методу ПЛР з електрофоретичною детекцією продуктів ампліфікації та ПЛР з детекцією у режимі реального часу (Real-Time ПЛР) з використанням технологій на основі інтеркалюючого барвника SYBR Green та флуоресцентних олігонуклеотидних зондів TaqMan. Розглянуто ряд ПЛР-тест систем для виявлення мікотоксигеновних цвілевих грибів, з використанням наборів праймерів, які спрямовані на структурні та регуляторні гени, що беруть участь у біосинтезі афлатоксинів (*omt-1*, *nor1*, *ver1*), фумонізинів (*fum1*, *fum13*), трихоценів (*tri1*, *tri3*, *tri5*, *tri6*, *tri12*, *tri13*), зеараленону (*PKS4*, *PKS13*, *ZEB1*, *ZEB2*) та охратоксину (*pks*, *OTAps*). Враховуючи розвиток сучасних молекулярно-генетичних методів обговорено можливість використання молекулярних методів, які включають аналіз ДНК-цільових областей для диференціації видів *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*.

Ключові слова: мікотоксини, контамінація, гени, ПЛР.

Вступ. Одними з основних інгредієнтів кормів, що використовуються у тваринництві та

птахівництві є зернові культури та продукти на основі зернових, які забезпечують повноцінний та збалансований раціон (Navarro D et al, 2019; El-Deek A et al, 2020; Tran H et al, 2020). Незважаючи на зростання використання альтернативних складників у кормах для тварин, пріоритетними зерновими культурами, що застосовуються у світовій комбікормовій промисловості залишаються кукурудза, пшениця, ячмінь, сорго та овес (Awika J et al, 2011; Diarra S, 2018). Світовий попит на ці сільськогосподарські культури з роками збільшується, що зумовлено, зокрема, зростанням глобального попиту на продукти тваринництва. Якість і безпека кормів для тварин стає ще більш вагомим фактором, як для виробників, так і для споживачів продуктів тваринництва.

Відповідно до Директиви ЄС 2002/32, якість та безпека продукції повинні бути оцінені перед їх використанням у кормах, щоб переконатися, що вони не становлять загрози здоров'ю тварин або навколишньому середовищу, не впливають негативно на виробництво продукції тваринного походження (EU Commission, 2015) Серед небажаних речовин у сировині, що можуть містити корми, викладених у цій Директиві, описані мікотоксини, як одні з найнебезпечніших. Мікотоксини є відносно великою та хімічно різноманітною групою токсичних вторинних метаболітів з низькою молекулярною масою, які як правило, синтезуються ниткоподібними грибами, зокрема представниками родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* та *Fusarium* (Dean R et al, 2012; Ostry V et al, 2013; Rahman H et al, 2020; Ting W et al, 2020).

Метою даного огляду було здійснити аналіз сучасних молекулярно-генетичних методів досліджень кормів на наявність у них мікотоксинпродукуючих грибів з використанням ПЛР.

© Т.В. БУСЛИК, В.П. РОСАЛОВСЬКИЙ, Ю.Т. САЛИГА, 2022

Загальна характеристика мікотоксинів та аналітичні методи їх дослідження. На сьогодні вченими описано понад 300 мікотоксинів (Pinotti L et al, 2016). Лише декілька груп мікотоксинів призводять до погіршення якості кормів та зумовлюють їх токсичний вплив на здоров'я тварин, а саме – афлатоксини (AF), фумонізени (FMs), охратоксини (OT), трихотецени (TRC) та зеараленон (ZEN) (Moretti A et al, 2017).

Основними продуцентами афлатоксинів є гриби, що відносяться до роду *Aspergillus Flavi*, зокрема *A. flavus* та *A. parasiticus*. Інші незначні продуценти афлатоксину представлені видами в межах родів *Emericella*, *Rhizopus* та *Penicillium* (Rodriguez A et al, 2012; Sroug A et al, 2017). До групи AF відноситься велика кількість токсинів, проте найпоширенішими є наступні чотири типи: афлатоксин B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1) та G2 (AFG2) (Mahato D et al, 2019; Ting W et al, 2020). Важливо, що афлатоксини дуже стабільні і можуть зберігати свої функції навіть при тривалій термічній обробці, що несе велику загрозу споживачам продуктів тваринного походження (м'ясо, молоко), забруднених афлатоксинами. AFB1 звертає на себе особливу увагу, бо є найпоширенішим афлатоксином та найпотужнішим гепатоканцерогеном, викликає гострі та хронічні захворювання, пов'язані з інтоксикацією тварин, зокрема – шлунково-кишкові дисфункції, анемію, жовтяницю, крововиливи та загальне зниження продуктивних показників, таких як вага, виробництво яєць або молока, погіршення якості туші та підвищення сприйнятливості тварин до стресових факторів навколишнього середовища (Yang C et al., 2020). Крім того AFB1 та AFM1 (гідроксильований метаболіт AFB1) чинять токсичний ефект на нирки, активуючи оксидативний стрес шляхом зміни рівнів експресії проліндегідрогенази, L-проліну та проапоптичних факторів (Вах, Caspase-3), що в свою чергу індукує апоптоз (Li H et al, 2018). У дослідженнях, проведених на білих лабораторних щурах, продемонстровано пригнічувальну дію афлатоксину B1 на активність ензимів глутатіонової антиоксидантної системи (глутатіонпероксидаза, глутатіонтрансфераза, глутатіонредуктаза), при зменшенні вмісту відновленого глутатіону в кліти-

нах печінки, головного мозку і нирок тварин (Houvanovych N, 2016).

Ще однією важливою групою мікотоксинів є фумонізени, які зазвичай класифікуються як токсини фузаріозу, оскільки вони можуть продукуватися декількома видами роду *Fusarium*, основним з яких є *F. verticillioides* та *F. proliferatum*. (Waśkiewicz A et al, 2013; Qiu J et al, 2020). Найчутливішими до дії фумонізинів є коні, свині та кролі, менш чутливими – велика рогата худоба та птиця (Marin S et al, 2013; Murugesan G et al, 2015). У коней споживання корму контамінованого цим мікотоксином викликає лейкоенцефаломаліцію, первинними симптоми якої є млявість, сліпота та зменшення споживання корму, що закінчується судомою та смертю тварини. Найтоксичнішими представниками сімейства FMs є фумонізін B1 (FB1), фумонізін B2 (FB2) (Yu S et al, 2020). Зокрема, у свиней FB1 асоціюється з набряками легень, клінічними проявами яких є зниження споживання корму, задишка, слабкість, ціаноз (Groorpmann J et al, 2012; Yang C et al, 2020). Центральну роль у FB1-індукованій токсичності відіграють порушення у метаболізмі сфінголіпідів та індукція оксидативного стресу, що зумовлює також їх гепатотоксичність (Liu X et al, 2019).

Представники роду *Aspergillus* та *Penicillium* здатні синтезувати охратоксини, зокрема охратоксин А (ОТА) та охратоксин В (ОТВ), Найпоширеніші види-продуценти охратоксинів це: *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *P. verrucosum* та *P. nordicum* (Ostry V et al, 2013, Wang Y et al, 2016). Головним органом-мішенню ОТ є нирки, тобто ОТ проявляє нефротоксичну дію (Marin S et al, 2013). Також високі дози забруднення кормів цим токсином можуть спричинити низку захворювань людини та тварин, зокрема охратоксикоз птиці, свинячу нефропатію, ендемічні нефропатії та пухлини травного тракту у людей тощо (Heussner A et al, 2015).

Трихотецени синтезуються значною мірою видами *Fusarium*, також до продуцентів цього токсину відносяться гриби роду *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium* та *Stachybotrys* (Alshannaq A and Yu J, 2017). Це великий клас грибкових метаболітів з більш ніж 200-ма структурно спорідненими сполуками, які хімічно поділяються на

чотири типи (від А до D) (Mc Cormick S et al, 2011; Kovalsky P et al, 2016). До цієї групи відносяться токсини HT-2 і T-2 (HT-2 і T-2), дезоксиніваленол (DON), його похідні 3-ацетилдезоксиніваленол (3-AcDON), 15-ацетилдезоксиніваленол (15-AcDON), ніваленол (NIV), 3-ацетил NX токсин (3ANX) (Juan C et al, 2013; Varga E et al, 2015; Strippin T et al, 2019).

Найтоксичнішими представниками типу є токсин T-2 (T2) і токсин HT-2 (HT2), які пригнічують синтез білка та ДНК та послаблюють імунну відповідь у тварин (Groorpmann J et al, 2012). Симптоми інтоксикацій тварин даними токсинами включають зменшення споживання корму, крововиливи, ураження ротової порожнини, зниження продуктивності яєць і молока, аборти та навіть смерть у деяких випадках (Groorpmann J et al, 2012; Marin S et al, 2013).

DON є одним з найменш токсичних трихоченів, однак, оскільки він дуже поширений, вважається досить небезпечним у тваринництві. Даний токсин продукується певними ізолятами *F. graminearum*, *F. pseudograminearum* та *F. culmorum* (Sabburg R et al, 2015; Hellin P et al, 2016). У 2020, за даними організації BIOMIN (<https://www.biomin.net/en/biomin-mycotoxin-survey/>), яка здійснює моніторинг за шістьма основними мікотоксинами в сільськогосподарських культурах, що використовуються у виробництві кормів для худоби, дезоксиніваленол виявився найпоширенішим мікотоксином у всьому світі і був знайдений у 65 % усіх зразків. Висновки науковців ґрунтуються на аналізі 21 709 зразків готових кормів та сировини, які походили із 79 країн. Натомість моніторинг DON в кукурудзі вітчизняного походження впродовж 2014–2017 рр. показав, що відсоток контамінованих зразків у 2014 р. сягав 46 % від загальної кількості перевірених зразків зерна, у 2015 р. – 72 %, у 2016 р. – 12 %, у 2017 р. – 22 %. (Kaminska O et al, 2018). Вважається, що DON сильніше впливає на моногастричних тварин, особливо свиней і може спричинити відмову від корму, блювоту та анорексію (Marin S et al, 2013). Загалом, споживання низького та помірного рівнів цього мікотоксину тваринами призводить до їх підвищеної сприйнятливості до патогенних мікроорганізмів та до зниження продуктивних показників (Munkvold G, 2017).

Зеараленон – мікотоксин, що продукується представниками роду *Fusarium*, зокрема, *F. graminearum*, а також *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti* (González Pezera M et al, 2014). Оскільки ZEN має структурну схожість із людським статевим гормоном, естрадіолом, він здатний зв'язуватися з рецепторами естрогену, викликаючи порушення репродуктивної функції як у людини, так і у племінних тварин. У дослідженнях проведених на свинях показано, що ZEN може активувати сигнальний шлях Wnt/ β -катеніну, регулюючи експресію WNT1 та β -катеніну, сприяючи проліферації та розвитку епітеліальних клітин свинячого ендометрію (Song T et al, 2020).

Оскільки мікотоксини за своєю хімічною структурою належать до різного класу сполук, визначення забруднення цими речовинами є досить складним та трудомістким процесом. Ускладнюються ці дослідження тим, що мікотоксини знаходяться у низьких концентраціях та на різноманітних субстратах. Тим не менше, на сьогодні існує ряд надійних, точних, чутливих методів, направлених на якісну та кількісну оцінку цих вторинних метаболітів у кормах (Pereira C et al, 2019). Виділяють три етапи дослідження кормів на наявність мікотоксинів: відбір проб, підготовка зразків та аналітична процедура. У країнах ЄС, методологія відбору проб у кормах описана у Положенні № 691/2013 про внесення змін до Регламенту № 152/2009. У нашій країні процедура відбору проб зразків зерна чітко регламентується наказом Міністерства аграрної політики та продовольства України «Про затвердження Методів відбору зразків для визначення максимально допустимих рівнів мікотоксинів у харчових продуктах для цілей державного контролю» від 22 травня 2019 р. № 264.

Визначення мікотоксинів ґрунтується на імуноферментних та хроматографічних методах аналізу (Pereira C et al, 2019). В основі методу імуноаналізу лежить здатність специфічних антитіл зв'язуватися з відповідними мікотоксинами, які в даному випадку діють як антигени (Venkataramana M et al, 2014). Тести щодо забруднення кормів мікотоксинами на основі імуноаналізу є здебільшого скринінгові, завдяки їх простоті, дешевизні з відносно високим рівнем чутливості та специфічності, хоча є дані про перехресну реакцію із структурними

аналогами (Anfossi L et al, 2016). Сигнал може залежати від коекстрактивних речовин в результаті неспецифічної взаємодії з матрицею (субстратом) (Shephard G, 2016). Також сьогодні для дослідження кормів на наявність мікотоксинів застосовують і традиційні методи, такі як тонкошарова хроматографія (TLC) та високоефективна рідинна хроматографія (HPLC) (Ramana M et al, 2011; Anfossi L et al, 2016; Sim J et al, 2018). Для кількісного аналізу використовують кілька методів хроматографії: газова хроматографія з мас-детекцією (GC-MS), рідинна хроматографія з мас-детекцією (іонізація способом електростатичного розпилення), рідинна хроматографія з тандемним маспектрометром (LC/MS/MS). (Rodriguez A et al 2012; Sadhasivam S et al, 2017; Maeda K et al, 2020; Righetti L and Dall'Asta C, 2020). Зазначені вище методи потребують, окрім дороговартісного обладнання та висококваліфікованого персоналу, тривалих процесів пробопідготовки екстракції та очищення.

Оскільки продукування мікотоксинів носить яскраво виражений видоспецифічний характер, для оцінки спектру мікотоксинів, накопичених в аналізованій партії зерна, буде корисною інформація про видовий склад присутньої в ній мікобіоти. Потрібно звернути увагу, що в процесі зберігання зерна під впливом різноманітних чинників може розпочатися продукування токсинів. Це спостерігається за умови присутності мікотоксигенних плісневих грибів у сировині та за сприятливих умов середовища для їх росту та продукування ними мікотоксинів, таких як температура та вологість. Отже, важливим для безпеки кормів є виявлення в пробі не тільки безпосередньо токсинів, але і їх продуцентів. На даний час в Україні для таких цілей використовуються мікологічні методи, які ґрунтуються на традиційних мікробіологічних дослідженнях з використанням агаризованого середовища Чапека. (Yaroshenko M et al, 2018, Kutzan O et al, 2020). Видову ідентифікацію ізолятів мікроскопічних грибів здійснюють на основі культурально-морфологічних властивостей, таких як особливості росту культур на різних поживних середовищах, їх розмірів, діаметру, форми країв та центру колоній, їхнього забарвлення тощо (Jangol J; 2018, Kutzan O et al, 2020).

Ступінь контамінації кормів мікроскопічними грибами визначають за кількістю колонієутворювальних одиниць (КУО) у перерахунку на 1 г корму за умов первинного висіву у поживне середовище (агар, сусло та середовище Чапека) (Kutzan O et al, 2020). За даними Yaroshenko M.O. і співавторів, які проводили мікологічний аналіз кормів великої рогатої худоби з різних областей України (Харківської, Сумської, Одеської, Донецької, Київської, Полтавської, Черкаської, Кіровоградської, Івано-Франківської та Тернопільської) у 2018 – I півріччі 2019 рр., недоброякісними було 73,6 %. Натомість у 2014–2015 рр. недоброякісні корми за ступенем забрудненості мікроскопічними грибами становили 51–52 %, в 2016 р. – 79 %, а в 2017 р. – 88 % (Yaroshenko M et al, 2018). Загалом, у кормах призначених для годівлі ВРХ в Україні виявляють токсинотворювальні таксони мікроміцетів таких видів: *A. flavus*, *A. amstelodami*, *A. niger*, *A. sydowi*, *A. fumigatus*, *A. candidus*, *A. oryzae*, *A. ochraceus*, *P. lanosum*, *P. commune*, *P. stoloniferum*, *F. moniliforme*, *F. moniliforme*, var. *lactis*. (Yaroshenko M et al, 2018; Kutzan O et al, 2020). У рамках моніторингу кормів для сільськогосподарських тварин проведеного у 2017 р. у господарствах південного регіону України, встановлено, що 32,4 % проб концентрованого корму та 58,6 % проб грубих кормів для ВРХ, 50,0 % – для свиней, 47,0 % – для качок, 16,7 % – для кролів були контаміновані плісневими грибами та перевищували максимально допустимі рівні (МДР) зазначені в наказі № 131 Міністерства аграрної політики та продовольства України від 19.03.2012 (у редакції наказу Міністерства аграрної політики та продовольства України від 11.10.2017 № 550) «Про перелік максимально допустимих рівнів небажаних речовин у кормах та кормовій сировині для тварин» (Bogach M et al, 2018). Найбільш поширеною плісеневою мікобіотою кормів вітчизняного виробництва були представники роду *Aspergillus Mich*, що складає 53,0 % від загальної кількості виділених ізолятів. Контамінація грибами роду *Penicillium Linc.* – 8,1 %, *Fusarium Linc.* – 6,1 % (Bogach M et al, 2018).

Однією з найвагоміших складових мікологічних досліджень є необхідність точної характеристики ізолятів токсинпродукуючих видів

грибів. Це потрібно не тільки для встановлення їх таксономічного положення, але і для виявлення гетерогенності складу внутрішньовидової популяції за токсигенними власти-

востями для коректного прогнозування їх токсигенного потенціалу. Завдяки розвитку молекулярно-генетичних методів досліджень на основі полімеразної ланцюгової реакції сьо-

Таблиця 1. Праймери, що використовуються для видової ідентифікації токсигенних видів грибів

Рід/вид гриба	Цільовий ген	Назва праймера	Послідовність праймерів та зондів (5'–3')
<i>F. tricinctum</i>	<i>rDNA</i>	Its 1	GCATGCCTGTTTCGAGCGT
		Its 2	CTGTTGCCGCTTCACTCGC
	<i>FOW1</i>	FOW1F	GGTATCCTTGGTGGTGTCTCC
		FOW1R	CTACCCAGTTGGTCATCAGT
<i>F. asiaticum</i>	<i>cyp51A</i>	FaF	CAGCTTCCTCGAAGACCT
		FaR	GGACCGTAAATTTCTTCAGTG
<i>F. graminearum</i> <i>ma F. asiaticum</i>	<i>b-tubulin</i>	FgaF	GCGTTGAGCTTGTITTTTG
		FgaR	GGTTACCCTAATAAACATTGTTAG
<i>F. culmorum</i>	<i>tef-1a</i>	FculC561 fwd	CACCGTCATTGGTATGTTGTCACT
<i>F. cerealis</i>		FculC614 rev	CGGGAGCGTCTGATAGTCG
<i>F. sporotrichioides</i>	<i>tef-1a</i>	FspoA18 fwd	GCAAGTCGACCACTGTGAGTACA
		FspoA85 rev	CTGTCAAAGCATGTCAGTAAAAATGAT
<i>F. langsethiae</i>	<i>tef-1a</i>	FlangA29 fwd	CAAGTCGACCACTGTGAGTACCTCT
		FlangA95 rev	TGTCAAAGCATGTCAGTAAAGATGAC
<i>F. poae</i>	<i>tef-1a</i>	FpoaeA51 fwd	ACCGAATCTCAACTCCGCTTT
		FpoaeA98 rev	GTCTGTCAAGCATGTTAGCACAAAGT
<i>F. equiseti</i>	<i>tef-1a</i>	FequiB569 fwd	CACCGTCATTGGTATGTTGTCACT
		FequiB598 rev	TGTTAGCATGAGAAGGTCATGAGTG
<i>F. proliferatum</i>	<i>tef-1a</i>	Fpro220 fwd	CTTCGATCGCGCGTCCT
		Fpro270 rev	CACGTTTCGAATCGCAAGTG
<i>F. subglutinans</i>	<i>tef-1a</i>	Fsub565 fwd	TCATTGGTATGTTGTGCGCTCATG
		Fsub622A rev	GTGATATGTTAGTACGAATAAAGGGAGAAC
<i>F. verticillioides</i>	<i>tef-1a</i>	Fver356 fwd	CGTTTCTGCCCTCTCCCA
		Fver412 rev	TGCTTGACACGTGACGATGA
<i>F. avenaceum</i>	<i>tef-1a</i>	Fave574 fwd	TATGTTGTCACTGTCTCACACCACC
		Fave627 rev	AGAGGGATGTTAGCATGATGAAG
<i>F. tricinctum</i>	<i>tef-1a</i>	Ftri573 fwd	TTGGTATGTTGTCACTGTCTCACACTAT
		Ftri630 rev	TGACAGAGATGTTAGCATGATGCA
<i>F. culmorum</i>	<i>cox2</i>	COX2_1	TCGTTGACGGTGAGGGTTGT
		COX2_2	GACTCGAACACGTCAACCAACTT
		COX2 probe	FAM-CGGTTATTATTTGAAAAGT-MGB
<i>F. graminearum</i>	<i>cyp51A</i>	FgF	TATCCCTTATGGGTCTTGGT
		FgR	GGACCGTAAACTTCTTCTGCA
	<i>tri5</i>	Tri5 forward	TCTTAACACTAGCGTGCCTTCT
		Tri5 reverse	CATGCCAACGATTGTTTGAGGGGA
	<i>tef-1a</i>	FgramB379 fwd	5'Fam-AACAAGGCTGCCACCACCTTTGCTCAGCCT-Tamra3'
	FgramB411 rev	CCATTCCTGGGCGCT	
<i>P. verrucosum</i>	<i>rRNA</i>	rRNA forward	CCTATTGACAGGTGGTTAGTGACTGG
		rRNA reverse	TAAGGTGCCGGAATACACGCTCAT
		Зонд для rRNA	TAGTTCATTCGGCCCGTGAGTTGT
<i>A. ochraceus</i>	<i>pks</i>	Зонд для rRNA	5'Tet-TCTAGACAGCCCGACGGTGGCCATGGAAGT-Tamra3'
		Pks forward	AGTGATGACTGGAGGGAGGTGAAT
		Pks reverse	ACGAGCATGCGGTATCAATGGTCA
		Зонд для Pks	5'TexasRed-TTGTCCGGCAGGATCAGGTGCCACCATT-Tamra3'

годні стало можливим з високою точністю проводити видову ідентифікацію токсин-продукуючих грибів на рівні ДНК. Впродовж останніх 20 років ведеться інтенсивна дослідницька робота науковцями світу для виявлення

та дослідження генів-маркерів мікотоксин-продукуючих видів грибів з можливістю їхнього подальшого використання для аналізу безпечності сільськогосподарської продукції (O'Donnell K et al, 1998; Chandra N et al, 2011; Scauflaire J et al, 2012; Vegi A and Wolf-Hall CE, 2013).

Використання методів ПЛР для виявлення та ідентифікації токсигенних грибів. Розмноження мікроскопічних грибів та накопичення мікотоксинів у зерні відбувається у польових умовах і під час його транспортування та зберігання. Тому, проведення молекулярно-генетичних досліджень кормів на наявність токсигенних грибів є ефективною профілактикою їх контамінації мікотоксинами та сприяє попередженню мікотоксикозів у сільськогосподарських тварин. Також потрібно звернути увагу, що для кількісної оцінки штамів цвілевих грибів, що продукують мікотоксини, звичайними методами культивування потрібно затратити 3–5 днів, натомість використання з цією метою кількісної ПЛР скорочує час для отримання результатів до 7–9 год (Rodriguez A et al, 2012). До маркерних ділянок ДНК, що використовуються для видової дискримінації мікроскопічних грибів, відносяться як ядерні, так і мітохондріальні локуси ДНК. Для виявлення видів *Fusarium*, наприклад, використовують відмінності у нуклеотидній послідовності внутрішніх транскрибованих спейсерів, що розташовані між генами рибосомальної рРНК (internal transcribed spacer – *ITS1* та *ITS2*), міжгенного спейсера (*IGS*, nuclear ribosomal intergenic spacer), фактору елонгації трансляції (*tef-1a*), генів кальмодуліну та β -тубуліну, гену *sup51A*, що кодує 14а-метилазу (табл. 1) (Kulik T, et al, 2008; Fourie G et al, 2009; Nicolaisen M et al, 2009; Yin Y, 2009; Chandra N et al, 2011; Al-Reedy RM et al, 2012; Stępień L, Waśkiewicz A, 2013).

Використання мітохондріальної ДНК (мтДНК) для молекулярно-генетичних досліджень обумовлене її відносно невеликими розмірами та наявністю як консервативних так і варіабельних ділянок, що сприяє кращій ідентифікації тісно пов'язаних між собою видів (Al-Reedy R et al, 2012) У роботі Fourie G зі співавт. повідомляється, що повторювана область мтДНК може служити молекулярним маркером для розрізнення ліній 70 ізолятів *F.*

Метод	Розмір (п.н.)	Посилання
ПЛР	300	Kulik T, et al, 2008
ПЛР	225	Scauflaire J, et al, 2012
ПЛР	292	Yin Y, et al, 2009
Real-time ПЛР SYBR Green	228	
	72	Nicolaisen M, et al, 2009
	94	
	92	
	72	
	47	
	51	
	57	
	57	
	52	
	58	
Real-time ПЛР TaqMan	77	Bilska K, at al. 2018
ПЛР	352	Yin Y, et al, 2009
Real-time ПЛР TaqMan	193	Vegi A, and Wolf-Hall CE, 2013
Real-time ПЛР SYBR Green	58	Nicolaisen M, et al, 2009
Real-time ПЛР TaqMan	127	Vegi A, and Wolf-Hall C.E, 2013
Real-time ПЛР TaqMan	199	

Oxysporum. Довжина їх послідовностей MtR коливається від 1100 і 1250 п.н. (Fourie G et al, 2009). Існує велика кількість мікотоксигенних видів *Fusarium*, які володіють різною патогенністю, чутливістю до фунгіцидів та їх здатністю синтезувати мікотоксини, тому коректна ідентифікація та кількісна оцінка мають першочергове значення у профілактиці мікотоксикозів. На основі послідовності ДНК гену *EF1α* (*tef-1α*) Nicolaisen M зі співавторами розробили ПЛР тест-систему для ідентифікації та кількісної оцінки 11 видів роду *Fusarium*: *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. langsethiae*, *F. sporotrichioides*, *F. equiseti*, *F. tricinctum*, *F. avenaceum*, *F. verticillioides*, *F. subglutinans* та *F. proliferatum* (Nicolaisen M et al, 2009). Використання гену *EF1α* обумовлене тим, що він добре охарактеризований для багатьох видів *Fusarium* та показує високий рівень поліморфізму. Чутливість методу становить приблизно 0,1 пг ДНК. Yin Y зі співавт. розробили метод ПЛР для кількісного виявлення *F. asiaticum* та *F. graminearum* у насінні пшениці, отриманому з різних місцевостей Китаю, де були використані праймери комплементарні до ділянки в межах першого та другого інтронів гену *tub-тубуліну* (Yin Y et al, 2009). Паралельно в цьому ж дослідженні показано апробацію двох пар високоспецифічних праймерів, за допомогою яких ампліфікується фрагмент гена *сур51А*, для видової ідентифікації *F. asiaticum* та *F. graminearum*.

У наведених двох останніх роботах використаний метод ПЛР з детекцією продуктів ампліфікації в режимі реального часу (Real-Time ПЛР) із використанням SYBR Green. Основним недоліком цього методу є здатність SYBR Green зв'язуватися з будь-якою дволанцюговою ДНК, що з'являється в реакційній суміші, яка може бути як цільовим продуктом ПЛР, так і артефактом (Arya M et al, 2005). Більш високоспецифічним методом, який сьогодні застосовується при кількісному дослідженні мікобіоти є ПЛР з детекцією продуктів ампліфікації в режимі реального часу (Real-Time ПЛР) із використанням зондів TaqMan, що обумовлює зростання специфічності виявлення грибкових збудників. Зростання продуктів ПЛР виявляють шляхом моніторингу збільшення флуоресценції. Vegi A та

Wolf-Hall C розробили мультиплексну ПЛР тест-систему з детекцією продуктів ампліфікації в режимі реального часу (Real-Time ПЛР) із використанням зондів TaqMan для одночасного виявлення та кількісної оцінки мікотоксигенних видів *Fusarium*, *Penicillium* та *Aspergillus* в зернах злаків (Vegi A та Wolf-Hall C, 2013). Як цільові гени у їхній роботі були використані: ген, що задіяний у синтезі трихотецену (*tri5*), ген полікетидсинтази, що бере участь у біосинтезі охратоксину А (*pks*) та ген великої субодиниці рибосомної РНК (28S рРНК) для виявлення *Fusarium spp*, *Aspergillus spp* та *Penicillium spp*, відповідно.

Кількісному визначенню ДНК грибів часто може заважати відносно низький рівень контамінації рослинних зразків та структура клітинної стінки гриба, що ускладнює екстракцію нуклеїнової кислоти. Для вдосконалення чутливості кількісної оцінки грибів молекулярно-генетичні підходи спрямовують на мтДНК. Так, для кількісної оцінки *F. culmorum* Bilska K. зі спів. використала у ПЛР Real-Time як цільовий ген – мітохондріальний ген *cox2*, а саме нуклеотидну послідовність, яка знаходиться в 3 інтроні цього гена (Bilska K et al, 2018). Підбір праймерів здійснювали на основі порівняльного аналізу нуклеотидних послідовностей мітохондріальних геномів 3-х видів: *F. culmorum*, *F. graminearum s.s.* та *F. gerlachii*. Інтрон 3 у гені *cox2* був виявлений лише у *F. culmorum*. Межа кількісного визначення становила 0,05 пг, що в 18 разів нижче, ніж у іншого специфічного аналізу TaqMan для *F. culmorum*, спрямованого на ядерний геном (Waalwijk C et al, 2004).

Питання розробки ПЛР-тестів для ідентифікації мікотоксигенних видів грибів у сільськогосподарських культурах залишається актуальним і на даний час, так у 2020 році опублікована робота Rahman H зі співавторами, у якій описано розробку мультиплексної ПЛР для одночасного виявлення мікотоксигенних грибів, що належать до родів *Aspergillus*, *Fusarium* та *Penicillium*. Автори використали три пари специфічних праймерів, які були розроблені на основі послідовностей внутрішнього транскрибованого спейсера (*ITS*) для родів *Aspergillus* та *Penicillium* та фактора елонгації *1α* (*tef-1α*) для роду *Fusarium* (Rahman H et al, 2020).

Susca A зі спів. відібрали ген кальмодуліну (*CaM*) як найкращий варіант для диференціації видів *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* та *Talaromyces*. (Susca A et al, 2020). Вирівнювання та порівняльний аналіз послідовностей гену *CaM* для видів, включених до цього дослідження, дозволило провести дизайн видоспецифічних пар праймерів для молекулярно-діагностичних аналізів на основі методу ПЛР. Загалом у цій роботі було запропоновано 20 різних пар праймерів, за допомогою яких можна отримати інформацію про наявність 28 різних видів грибів (або видів-груп), що належать до *Fusarium* (14), *Aspergillus* (10), *Penicillium* (2) та *Talaromyces* (2) (табл. 1). Більшість перевірених праймерів, описаних у роботі – видоспецифічні. У деяких випадках використання гену *CaM* не дозволило розрізнити близькоспоріднені види, зокрема, *F. proliferatum/fujikuroi*, *F. graminearum/crookwellense/culmorum*, *F. langsethiae/sporotrichioides* і *F. subglutinans/temperatum* ідентифікувалися у зазначених комбінаціях. Дослідження у цій роботі обмежилися виявленням та ідентифікацією видів мікобіоти кукурудзи.

Використання методу ПЛР для прогнозування токсигеногенного потенціалу плісневих/мікроскопічних грибів. Серед мікотоксинів вагомим впливом на виробництво зернових культур та якість кормів для сільськогосподарських тварин володіють трихотецени. Структурна складність цих хімічних сполук є однією з основних аналітичних проблем для їх виявлення, ідентифікації та кількісного визначення (Dean R et al, 2012).

Рядом вчених для генотипування на основі ПЛР запропоновано застосовувати кластер генів синтезу трихотеценів (*TRI*) як молекулярний маркер для прогнозування хемотипів *Fusarium spp* (Laraba I et al, 2017; Wang C et al, 2017; Villafana R et al, 2019; Ramdass A et al, 2020). Сім генів (*tri3*, *tri4*, *tri5*, *tri7*, *tri8*, *tri11* та *tri13*), що кодують ферменти, які каталізують 10 реакцій в біосинтезі трихотецену, використовують для розробки ПЛР тест систем для ідентифікації продуцентів трихотеценів (Cardoza R et al, 2011; Yörük E and Albayrak G, 2012; Wang C et al, 2017; Krnjaja V et al, 2018; Crippin T et al, 2019).

Класифікацію трихотеценів здійснено за схемою заміщення 12, 13-епокситрихотек-9-ен

і об'єднано у чотири групи (типи А, В, С та D) (McCormick S et al, 2011). У межах трихотеценів типу В виділяють два хемотипи – I та II (Pasquali M et al, 2016). Хемотип I, який відноситься до DON та його ацетильованих похідних, поділяється на хемотип IA для продуцентів 3-ADON та хемотип IB для продуцентів 15-ADON, тоді як хемотип II є характерним для продуцентів NIV та/або 4-ANIV. Гени трихотеценового шляху швидко еволюціонують, змінюючи функції кодованих ферментів, що генерують нові трихотецени (Kelly AC and Ward TJ, 2018). Результати досліджень Maeda K зі співавторами з використанням трансгенних штамів *F. graminearum* дозволяють припустити можливість рекомбінації між існуючими хемотипами, що може призвести до утворення нового штаму, який продукуватиме у рівних кількостях як DON, так і NIV (Maeda K et al, 2020).

Дані про генотип на основі ПЛР-аналізу можуть доповнювати, але не замінити фенотипову інформацію, отриману аналітичними методами досліджень (Ramdass A et al, 2020). Для диференціації різних хемотипів, що обумовлені синтезом різних трихотеценів застосовуються гени *TRI*, а саме *tri3 tri5 tri7* та *tri12* для диференціації генотипів на 3-ADON, 15-ADON або NIV (Chandler E et al, 2003, Quarta A et al, 2006; Nielsen L et al, 2012; Covarelli L et al, 2015; Wang C et al, 2017; Crippin T et al, 2019). Натомість для диференціації генотипів продуцентів DON та NIV використовуються *tri7*, *tri12* та *tri13* (Tralamazza S et al, 2016; Pasquali M et al, 2016; Abedi-Tizaki M, Zafari D, 2017; Wang CL, Cheng YH, 2017) (табл. 2).

У роботах останніх років повідомляється про відкриття нового трихотецену ідентичного 3ADON, який не має кето кисню в положенні C-8 (Varga E et al, 2015; Crippin T et al, 2019). Це 3-ацетил NX токсин (3ANX), також описаний як токсин NX-2, появу нового токсину пов'язують зі змінами у послідовності гену *tri1*. Ген *tri1* у *F. graminearum* кодує оксигеназу P450, відповідальну за приєднання гідроксильних груп у позиціях C-7 та C-8 калонектрину (McCormick S et al, 2011). Тому, для диференціації штамів продуцентів 3ADON та 3ANX використовують ген *tri1* (Liang J et al, 2014, Yue W 2017; Crippin T et al, 2019). Характеристика

Таблиця 2. Праймери, що використовуються для виявлення генів синтезу мікотоксинів

Цільовий ген	Мікотоксин, у біосинтезі якого задіяний ген/Вид гриба	Назва праймера	Послідовність праймерів та зондів, (5'–3')
<i>esy1</i>	Енніатин/ <i>F. avenaceum</i> / <i>F. tricinctum</i>	Avetric f Avetric r Avetric probe	AGCAGTCGAGTTCGTCAACAGA GGCYTTTCCTGCGAACTTG FAM – CCGTCGAGTCCTCT – MGB
<i>esy1</i>	Енніатин/ <i>F. poae</i>	Poae f Poae r Poae probe	GCGGCCGCTTTTGTCA GCCTTTCCAGCAAGAGATGGT FAM – AAAGCGGTTCGAGTCTG – MGB
<i>aflM</i> (<i>ver-1</i>)	Афлатоксин/ <i>Aspergillus flavus</i>	ver1 ver2	GCC GCA GGC CGC GGA GAA AGT GGG GAT ATA CTC CCG CGA CAC AGC C
<i>nor-1</i>	Афлатоксин/ <i>Aspergillus</i>	NorF- NorR- F-omt R-omt OMTprobe	ACCGCTACGCCGCGCTCTCGGCAC GTTGGCCGCCAGCTTCGACACTCCG GGCCGCCGCTTTGATCTAGG ACCACGACCCGCC [HEX]-CCCACTGGTAGAGGAGATGT-[BHQ1]
<i>omt-1</i>	Афлатоксин/ <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , та <i>Rhizopus</i>		
<i>tri13</i>	DON/ <i>Fusarium graminearum</i> NIV/ <i>Fusarium graminearum</i>	Tri13F Tri13DONR Tri13NIVF Tri13R	CATCATGAGACTTGTCKRAGTTGGG GCTAGATCGATTGTTGCATTGAG CCAAATCCGAAAACCCGCG TTGAAAGCTCCAATGTCGTG
<i>tri3</i>	3-ADON/ <i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. cerealis</i> 15-ADON/ <i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. cerealis</i>	Tri303F Tri303R Tri315F Tri315R	GATGGCCGCAAGTGGA GCCGACTGCCCTATTG CTCGCTGAAGTTGGACGTAA GTCTATGCTCTCAACGGACAAC
<i>tri1</i>	3ADON-3ANX / <i>F. graminearum</i>	3ANX	AATGCTAGCGAAATGATCAA
<i>tri12</i>	3ADON/ <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Fusarium cerealis</i> <i>Fusarium pseudograminearum</i> 15ADON/ <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Fusarium cerealis</i> <i>Fusarium pseudograminearum</i> NIV/ <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Fusarium cerealis</i> <i>Fusarium pseudograminearum</i> NIV/ <i>Fusarium spp</i> 15-ADON/ <i>Fusarium spp</i> 3-ADON/ <i>Fusarium spp</i>	3ADON TRI1-R 3ADONf 3ADONr 15ADONfwd 15ADONrev NIVf NIVr 12NF(F) 12-15 F(F) 12-3 F(F) 12CON(R)	AATGCTCGCGAACTAATCAC TTCCTGCAGGGGCTTGATG AACATGATCGGTGAGGTATCGA CCATGGCGCTGGGAGTT GTTTCGATATTCATTGGAAAGCTAC CAAATAAGTATCGTCTGAAATTGGAAA GCCCATATTCGCGACAATGT GGCGAACTGATGAGTAACAAAACC TCTCCTCGTTGTATCTGG TACAGCGGTTCGCAACTTC CTTTGGCAAGCCCCTGCA CATGAGCATGGTGATGTC CTGAGAAATATCGCTACACTACCGAC CCCACTCAGGTTGATTTTCGTC CGTCTTCGAGAAGATGACAT TGTTCTGCAAGCACTCCGA AAATAATTTACCCGTTCTTCTGGGAACT CTGAAACGGAGGTGTTGAGG GGGATTAACCGCTGTGG TAGGCATGCCCGAAACCGAAA GT GCCCCAACGACAACCGCT GCCATCTCCAAACTCAAGCGTG
<i>PKS13</i>	Зеарелон/ <i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>	ZEA-F ZEA-R	
<i>PKS4</i>	Зеарелон/ <i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. crookwellen</i>	F1 R1	
<i>ZEB1</i>	Зеарелон/ <i>Fusarium spp</i>	Forward Reverse	
<i>ZEB2</i>		Forward Reverse	
<i>OTAnps</i>	Охратоксин А/ <i>Penicillium spp</i> , <i>Aspergillus spp</i>	F1OT R1OT	

Метод	Розмір фрагмента (п.н.)	Посилання
Real-time ПЛР TaqMan	54	Kulik T et al, 2011
Real-time ПЛР TaqMan	56	
ПЛР	537	Criseo G et al, 2001
ПЛР	397	Priyanka S et al, 2014
Real-time ПЛР TaqMan	123	Rodriguez A et al, 2012
SYBR GREEN ПЛР	227	Wang CL et al, 2017
ПЛР	312	
ПЛР	586	Chandler E et al, 2003, Wang CL et al, 2017
ПЛР	864	Chandler E et al, 2003, Wang CL et al, 2017
ПЛР	231	Crippin T et al, 2019
Real-time ПЛР SYBR GREEN	231	
	60	Nielsen LK et al, 2012
	57	
	77	
	840	Covarelli L, 2015
	670	
	410	
	—	Atoui A et al, 2012
Real-time ПЛР SYBR GREEN	193	Meng K et al. 2010
Real-time ПЛР SYBR GREEN	279	Sim JH et al, 2018
	129	
	80	
ПЛР	459	Luque MI et al, 2013

хемотипів видів *Fusarium* є корисним інструментом для визначення токсигенного потенціалу штамів грибів. У публікаціях останніх років показано, що більшість штамів *F. graminearum* та *F. culmorum* синтезує DON, а також його ацетильовані форми (Covarelli L et al, 2015; Laraba I et al, 2017). Хемотип 15-ADON був найпоширенішим серед популяції *F. graminearum*, виділеної з пшениці в Італії (Covarelli L et al, 2015), у провінції Хебей, розташованої на сході Китаю (Ji L et al, 2019), у північному та центральному Тайвані (Wang CL et al, 2017), на півдні Росії (Yli-Mattila T et al, 2009), в Ірані (Abedi-Tizaki M and Zafari D, 2017), в Польщі (Stepien L et al, 2009), в Туреччині (Yörük E et al, 2012; Mert-Türk F and Gencer R, 2013), у Канаді (Crippin T et al, 2019) у різні роки. В інших регіонах світу, виявлено високу частоту хемотипів NIV, зокрема у західній частині Росії (Yli-Mattila T et al, 2009), натомість хемотип 3ADON *F. graminearum* переважає у Фінляндії та Норвегії, (Langseth W et al, 2001). У Кореї хемотипи ніваленолу *F. asiaticum*, що відносяться до видового комплексу *F. graminearum* є більш поширеними, ніж хемотипи дезоксиніваленолу (Shin S et al, 2018; Jang J et al, 2019).

Часто в зерні на півночі Європи виявляють енніатини, що відносяться до групи мікотоксинів з іонофорними властивостями. Потенційними продуцентами енніатинів вважають *F. avenaceum*, *F. roae* та *F. tricinctum*. При моніторингу зразків тритикале зібраних у Польщі виявлено енніатин В (Enn-B), енніатин В1 (Enn-B1), енніатин А-1(Enn-A1) у 100 % зразків та енніатин А (Enn-A) у 70 % зразків (Bryła M et al, 2016). У дослідженні Kulik T запропоновано метод ПЛР з використанням ТаqMan-зондів для кількісного визначення *F. avenaceum* та/або *F. tricinctum* та *F. roae* на основі гена *esunI*, що кодує багатофункціональний фермент енніатин синтетази (Kulik T et al, 2011). Межі виявлення для *F. avenaceum*/*F. tricinctum* становлять 19 пг, а для *F. roae* – 0,3 пг. Авторами відмічено позитивні кореляційні зв'язки між рівнями енніатинів у зернах пшениці та кількістю ДНК *F. avenaceum* та/або *F. tricinctum* (R = 0,61) та *F. roae* (R = 0,42) (Kulik T et al, 2011).

Ще однією групою токсинів, що продукуються переважно грибами роду *Fusarium* є фу-

Цільовий ген	Мікотоксин, у біосинтезі якого задіяний ген/ Вид гриба	Назва праймера	Послідовність праймерів та зондів, (5'–3')
<i>fum1</i>	Фумонізин/ <i>Fusarium spp.</i>	Fum1f Fum1r	ATTATGGGCATCTTACCTGGAT ACGCAAGCTCCTGTGACAGA
<i>fum13</i>		Fum13f Fum13r	AGTCGGGGTCAAGAGCTTGT TGCTGAGCCGACATCATAATC

монізини. До генів, що пов'язані з біосинтезом FMs відносять *fum1* та *fum13*, тому на основі аналізу даних генів розроблено ПЛР тест систему для виявлення фумонізин-продукуючих штамів (Ramana M et al, 2011). *F. verticillioides* визначено, як переважаючий вид, що містить гени *fum1* та *fum13* (Sadhasivam S et al, 2017). Спостерігалася кореляція між результатом LC/MS/MS та HPLC аналізів та результатами специфічної ампліфікації генів-мішеней *fum1* та *fum13* (Ramana M. et al, 2011; Sadhasivam S et al, 2017).

Для дослідження контамінації охратоксин-продукуючими плісневими грибами використовують молекулярно-генетичні методи, розроблені на основі аналізу послідовностей генів біосинтетичного шляху ОТА, зокрема генів нерибосомних пептид синтетаз (NRPS) та полікетидних синтаз (PKS) (Gallo A and Perrone G, 2017).

З метою ідентифікації охратоксин-продукуючих грибів родів *Penicillium* та *Aspergillus* Luque MІ зі співавт обрали ген *nrps* (*OTAnps*), що кодує нерибосомальну пептид-синтетазу (NRPS), яка каталізує лігування між ізокумариною групою, що становить полікетидну групу молекули ОТА та амінокислотою фенілаланін (Luque M et al, 2013). Продемонстровано функціональність даного методу ПЛР у природних заражених зразках. Чутливість методу для чистої культури грибів становила 25 пг цвілі, а на штучно уражених патогенами харчових матрицях межа виявлення зафіксована від 10^2 до 10^4 КУО/г, залежно від випробуваної матриці.

Досліджено генетичний кластер, який задіяний у біосинтезі ZEN, для аналізу на наяв-

ність зеараленон-продукуючих грибів. У більшості робіт пропонується два гени полікетидсинтази (*PKS4* і *PKS13*) (Meng K et al, 2010; Atoui A et al, 2012; Sim J et al, 2018). У роботі Atoui A для ідентифікації зеараленон-продукуючих *F. graminearum* та *F. culmorum* як цільовий ген для кількісної ПЛР використано ген *PKS13*. Зафіксована позитивна кореляція між кількістю ДНК та вмістом зеараленону у ку-курудзі ($R^2 = 0,760$) (Atoui A et al, 2012). Sim JH зі спів. розробили мультиплексну ПЛР на основі нуклеотидної послідовності чотирьох генів, задіяних у біосинтезі ZEN: *PKS4*, *PKS13*, *ZEB1*, *ZEB2* для виявлення зеараленон-продукуючих штамів *Fusarium* (Sim J et al, 2018). Відмічено кореляцію між наявністю чотирьох генів біосинтезу ZEA у *F. equiseti* та *F. graminearum* та продукуванням ZEA, підтвердженого за допомогою HPLC-аналізу (діапазон, 87,3–1439,8 нг/г та 31,9–4732,2 нг/г, відповідно). На відміну від них, для видів *F. oxysporum*, *F. sporotrichioides* та *F. verticillioides*, які не показали жодної ампліфікації чотирьох генів-мішеней, продукція ZEA не була виявлена.

Консервативність нуклеотидної послідовності генів біосинтезу мікотоксинів і процес горизонтального переносу генетичного матеріалу – підстава для створення універсальних ДНК-маркерів для детекції мікотоксинів незалежно від видової приналежності організмів. Вченими були розроблені специфічні праймери та зонди до конкретного гену, що задіяний у біосинтезі мікотоксину, незалежно від виду гриба. Зокрема, Rodriguez A зі співавт. на основі послідовності гена О-метилтрансферази стеригматоцистину (*omt-1*) розробили ПЛР-тест систему для виявлення та кількісного визна-

Закінчення табл. 2

Метод	Розмір фрагмента (п.н.)	Посилання
ПЛР	798	Ramana M et al, 2011
ПЛР	988	

чення грибів, що продукують афлатоксин у межах родів *Aspergillus*, *Emericella*, *Penicillium*, *Rhizopus* (Rodriguez A et al, 2012). Чутливість розроблених методів становила 1–2 log КУО/г на реакцію. Ген *omt-1* відноситься до структурних генів генного кластера афлотоксину, до якого також належать ген редуктази норсолоринової кислоти (*nor1*) та дегідрогенази версиколорину А (*ver1*) (Sweeney M et al, 2000; Criseo G et al, 2001; Priyanka S et al, 2014; Sadhasivam S et al, 2017). Продукт гена *omt-1* перетворює стеригматоцистин до О-метилстеригматоцистину (Lee L et al, 2004), або дигідростеригматоцистин до дигідро-О-метилстеригматоцистину (Yu et al, 2004), тобто ген *omt-1* може виступати маркером для диференціації між продуцентами стеригматоцистину та афлатоксину та є корисним для виявлення та кількісної оцінки цвілевих грибів, що синтезують афлатоксин, незалежно від того, чи вони продукують афлатоксин В або G (Rodriguez A et al, 2012). Здатність штамів синтезувати афлатоксин у даному дослідженні була протестована за допомогою високо-ефективної рідинної хроматографії з мас-спектрометрією (HPLC-MS). Також важливим результатом цієї роботи було виявлення кількох видів грибів продуцентів афлатоксинів, які до цього не були описані саме як продуценти, зокрема кількох видів *Penicillium* (*P. aurantiogriseum*, *P. griseofulvum* і *P. commune*), *Aspergillus* (*A. oryzae*, *A. tamarii* та *A. tubingensis*) та *Rhizopus* (*R. oryzae*).

Висновки. Постійний моніторинг сільськогосподарської продукції, яка використовується в годівлі тварин на наявність токсинопродукуючої мікобіоти, повинен лежати в ос-

нові стратегії спрямованої на зменшення рівня та важкості захворюваності тварин пов'язаної з мікотоксикозами. При дослідженні кормів на безпечність важливо не тільки аналізувати наявність токсинів та їх кількість, але і дослідити забрудненість корму мікотоксигенними грибами, що надасть можливість спеціалістам спрогнозувати можливість продукування мікотоксинів та провести коригуючі дії на різних етапах виробництва та застосування корму для тварин. Використання методів ПЛР для кількісної оцінки штамів цвілевих грибів, що продукують мікотоксини значно скорочує час отримання результатів, порівняно з традиційними мікробіологічними методами, що використовуються з цією метою. Розглянуті ПЛР-тест системи для виявлення мікотоксигенних цвілевих грибів з використанням наборів праймерів, які спрямовані на структурні та регуляторні гени, що беруть участь у біосинтезі афлатоксинів (*omt-1*, *nor1*, *ver1*), фумонізинів (*fum1*, *fum13*), трихоценів (*tri1*, *tri3*, *tri5*, *tri6*, *tri12*, *tri13*), зеараленону (*PKS4*, *PKS13*, *ZEB1*, *ZEB2*) та охратоксину (*pks*, *OTAps*) дозволяють отримати результат швидко, з високою чутливістю і специфічністю.

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить жодних досліджень за участю тварин чи людей, проведених будь-яким із авторів.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Це дослідження не отримувало будь-якого конкретного гранту від фінансуючих установ в державному, комерційному або некомерційному секторах.

PCR-BASED DETECTION AND QUANTIFICATION OF MYCOTOXIN-PRODUCING FUNGI

T.V. Buslyk, V.P. Rosalovsky, Y.T. Salyha

Institute of Animal Biology NAAS,
V. Stus Street 38, Lviv 79034, Ukraine

E-mail: yursalyha@yahoo.com

One of the main factors, reducing the quality of agricultural products, can be contamination with molds, capable of producing mycotoxins that pose a threat to both human and animal health. In modern conditions of closer attention to feed safety, the issues of contamination with mycotoxins and mycotoxigenic fungi are especially

relevant. This article describes the current state of problems regarding the contamination of agricultural products, caused by mycotoxins and mycotoxin-producing fungi, both in Ukraine and worldwide. The impacts of the exposure of animals to the most common mycotoxins, namely aflatoxins, fumonisins, ochratoxins, trichothecenes and zearalenone, are described. The prospects of using polymerase chain reaction (PCR) for the purpose of qualitative and quantitative detection of mycotoxin fungi and the ability to predict the production of mycotoxins by individual strains were analyzed. The estimated target regions in the genome of fungi can be potential markers for the identification of fungi species and determination of their chemotype. The focus is on the relatively simple PCR method with electrophoretic detection of amplification products and real-time PCR (RT-PCR) using SYBR Green dye interface technologies and TaqMan fluorescent oligonucleotide probes. We consider several PCR test systems for the detection of mycotoxinogenic molds, using sets of primers with structural and regulatory genes involved in the biosynthesis of aflatoxins (*omt-1*, *nor1*, *ver1*), fumonisins (*fum1*, *fum13*), trichocenes (*tri1*, *tri3*, *tri5*, *tri6*, *tri12*, *tri13*), zearalenone (*PKS4*, *PKS13*, *ZEB1*, *ZEB2*) and ochratoxin (*pks*, *OTAnps*). Considering the development of modern molecular genetic methods, the possibilities of using molecular methods are discussed, which include the analysis of DNA target regions for the differentiation of *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* species.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРА

- Abedi-Tizaki M, Zafari D. (2017) Geographic distribution of phylogenetic species of the *Fusarium graminearum* species complex and their 8-ketotrichothecene chemotypes on wheat spikes in Iran. *Mycotoxin Res.* **33**(3):245–259. doi: 10.1007/s12550-017-0283-0
- Al-Reedy RM, Malireddy R, Dillman CB et al. (2012) Comparative analysis of *Fusarium* mitochondrial genomes reveals a highly variable region that encodes an exceptionally large open reading frame *Fungal. Genet. Biol.* **49**(1):2–14. doi: 10.1016/j.fgb.2011.11.008
- Alshannaq A, Yu J-H. (2017) Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *Int J Environ Res Public Health.* **14**(6):632. doi: 10.3390/ijerph14060632
- Anfossi L, Giovannoli C, Baggiani C. (2016) Mycotoxin detection. *Curr. Opin. Biotechnol.* **37**:120–126. doi: 10.1016/j.copbio.2015.11.005
- Arya M, Shergill IS, Williamson M et al. (2005) Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn.* **5**(2):209–219. doi: 10.1586/14737159.5.2.209
- Atoui A, El Khoury A, Kallassy M et al. (2012) Quantification of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* by real-time PCR system and zearalenone assessment in maize. *Int J Food Microbiol.* **154**(1–2):59–65. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.022
- Awika JM, Piironen V, Bean S. (2011) Major Cereal Grains Production and Use around the World. In *Advances in Cereal Science: Implications to Food Processing and Health Promotion*. Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, USA, pp. 1–13. ISBN 9780841226364
- Bilska K, Kulik T, Ostrowska-Kołodziejczak A et al. (2018) Development of a Highly Sensitive FcMito qPCR Assay for the Quantification of the Toxicogenic Fungal Plant Pathogen *Fusarium culmorum*. *Toxins (Basel)*. **10**(5):211. doi: 10.3390/toxins10050211
- Bogach MV, Selishcheva NV, Roman LG. (2018) Monitoring of moldy mycobiotes in roughage for agricultural animals of the south of Ukraine. *Interdepartmental subject scientific collection Veterinary medicine.* **104**:223–227. (in Ukrainian)
- Bryła M, Waśkiewicz A, Podolska G et al. (2016) Occurrence of 26 Mycotoxins in the Grain of Cereals Cultivated in Poland. *Toxins (Basel)*. **8**(6):160. doi: 10.3390/toxins8060160
- Cardoza R, Malmierca M, Hermosa M et al. (2011) Identification of loci and functional characterization of trichothecene biosynthetic genes in the filamentous fungus *Trichoderma*. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**(14):4867–4877. doi: 10.1128/AEM.00595-11
- Chandler EA, Simpson DR, Thomsett MA et al. (2003) Development of PCR assays to *Tri7* and *Tri13* trichothecene biosynthetic genes, and characterisation of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*. *Physiol Mol Plant Pathol* **62**:355–367. doi: 10.1016/S0885-5765(03)00092-4
- Chandra NS, Wulff EG, Udayashankar AC et al. (2011) Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity. *Appl Microbiol Biotechnol.* **90**:1625–1639. doi: 10.1007/s00253-011-3209-3
- Covarelli L, Beccari G, Prodi A et al. (2015) *Fusarium* species, chemotype characterisation and trichothecene contamination of durum and soft wheat in an area of central Italy. *J Sci Food Agric* **95**(3):540–551. doi: 10.1002/jsfa.6772
- Crippin T, Renaud JB, Sumarah MW et al. (2019) Comparing genotype and chemotype of *Fusarium graminearum* from cereals in Ontario, Canada. *PLoS One.* **14**(5):e0216735. doi: 10.1371/journal.pone.0216735
- Criseo G, Bagnara A, Bisignano G. (2001) Differentiation of aflatoxin-producing and non-producing strains of *Aspergillus favus* group. *Lett. Appl. Micro-*

- biol. 33:291–295. doi: 10.1046/j.1472-765x.2001.00998.x
- Dean R, Van Kan JA, Pretorius ZA et al. (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13:414–430. doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x.
- Diarra SS. (2018) Peel meals as feed ingredients in poultry diets: Chemical composition, dietary recommendations and prospects. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 102(5):1284–1295. doi: 10.1111/jpn.12954
- El-Deek AA, Abdel-Wareth AAA, Osman M et al. (2020) Alternative feed ingredients in the finisher diets for sustainable broiler production. *Sci Rep.* 10(1):17743. doi: 10.1038/s41598-020-74950-9
- EU Commission (2015) The European Parliament and The Council of the European Union Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed. *Off J Eur Union*, L32:1–30
- FAO & WHO. *Animal Feed Impact on Food Safety*; FAO: Rome, Italy, 2007
- Fourie G, Steenkamp ET, Gordon TR et al (2009) Evolutionary relationships among the *Fusarium oxysporum* F. sp. cubense vegetative compatibility groups. *Appl Environ Microbiol* 75(14):4770–4781. doi: 10.1128/AEM.00370-09
- Gallo A, Perrone G. Targeting Ochratoxin Biosynthetic Genes (2017) *Methods Mol Biol* 1542:191–200. doi: 10.1007/978-1-4939-6707-0_12
- González Peyera ML, Sulyok M, Baralla V et al. (2014) Evaluation of zearalenone, α -zearalenol, β -zearalenol, zearalenone 4-sulfate and β -zearalenol 4-glucoside levels during the ensiling process. *World Mycotoxin J.* 7(3):291–295. doi: 10.3920/WMJ2013.1638
- Groopman JD, Kensler TW, Wu F. (2012). *Food Safety: Mycotoxins – Occurrence and Toxic Effects*. In *Encyclopedia of Human Nutrition*. 2–4:337–341. doi: 10.1016/B978-0-12-375083-9.00122-7
- Hellin P, Dedeurwaerder G, Duviol M et al. (2016) Relationship between *Fusarium* spp. diversity and mycotoxin contents of mature grains in southern Belgium. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 33(7):1228–1240. doi: 10.1080/19440049.2016.1185900
- Heussner AH, Bingle LE. (2015) Comparative Ochratoxin Toxicity: A Review of the Available Data. *Toxins (Basel)*. 7(10):4253–4282. doi: 10.3390/toxins7104253.
- Hoyvanovych NK. (2016) Influence of aflatoxin B1 on prooxidant-antioxidant balance in cells of white rats. *The Animal Biology*. 18(3):17–22. doi: 10.15407/animbiol18.03.017. (in Ukrainian)
- Jangol JuA. (2018) Determination of toxicity and toxin production of microscopic fungi in feed. *Bulletin «Veterinary biotechnology»*. 33:130–135. (in Ukrainian)
- Jang JY, Baek SG, Choi JH et al. (2019) Monitoring of *Fusarium* Species and Trichothecene Genotypes Associated with *Fusarium* Head Blight on Wheat in Hebei Province, China. *Plant Pathol J* 35(6):543–552. doi: 10.5423/PPJ.OA.06.2019.0168
- Ji L, Li Q, Wang Y et al. (2019) Monitoring of *Fusarium* Species and Trichothecene Genotypes Associated with *Fusarium* Head Blight on Wheat in Hebei Province, China. *Toxins (Basel)*. 11(5):243. doi: 10.3390/toxins11050243
- Juan C, Ritieni A, Maces J (2013) Occurrence of *Fusarium* mycotoxins in Italian cereal and cereal products from organic farming. *Food Chem* 141(3):1747–1755. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.04.061
- Kaminska O, Marchenko T, Evtuschenko T. (2018) Analysis of the condition and danger of corn grain contamination with deoxynivalenol in 2014–2017. *Bulletin «Veterinary biotechnology»*. 32(2):208–213. (in Ukrainian)
- Kelly AC, Ward T. (2018) Population genomics of *Fusarium graminearum* reveals signatures of divergent evolution within a major cereal pathogen. *PLoS One*. 13(3):e0194616. doi: 10.1371/journal.pone.0194616
- Krnjaja V, Stanković S, Obradović A et al. (2018) Trichothecene Genotypes of *Fusarium graminearum* Populations Isolated from Winter Wheat Crops in Serbia *Toxins (Basel)*. 10(11):460. doi: 10.3390/toxins10110460
- Kovalsky P, Kos G, Nährer K et al. (2016) Co-Occurrence of Regulated, Masked and Emerging Mycotoxins and Secondary Metabolites in Finished Feed and Maize—An Extensive Survey. *Toxins* 8(12):363. doi: 10.3390/toxins8120363
- Kulik T. (2008) Detection of *Fusarium tricinctum* from cereal grain using PCR assay. *J Appl Genet*. 49(3):305–311. doi: 10.1007/BF03195628
- Kulik T, Jestoi M, Okorski A. (2011) Development of TaqMan assays for the quantitative detection of *Fusarium avenaceum*/*Fusarium tricinctum* and *Fusarium poae* esyn1 genotypes from cereal grain. *FEMS microbiology letters*, 314(1):49–56. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02145.x
- Kutzan OI, Orobchenko O, Yaroshenko M et al. (2020) Assessment of the level of contamination of feed with micromycetes and mycotoxins in the cattle industry of Ukraine in recent years. *Bull Agric Sci* 2(803):52–57. doi: 10.31073/agrovisnyk202002-08. (in Ukrainian)
- Laraba I, Bouregghda H, Abdallah N et al. (2017) Population genetic structure and mycotoxin potential

- of the wheat crown rot and head blight pathogen *Fusarium culmorum* in Algeria. *Fungal Genet Biol* 103:34–41. doi: 10.1016/j.fgb.2017.04.001
- Langseth W, Ghebremeskel M, Kosiak B et al. (2001) Production of culmorin compounds and other secondary metabolites by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* strains isolated from Norwegian cereals. *Mycopathologia* 152:23–34. doi: 10.1023/a:1011964306510
- Lee LW, Chiou CH, Klomparens KL et al. (2004) Subcellular localization of aflatoxin biosynthetic enzymes Nor-1, Ver-1, and OmtA in time-dependent fractionated colonies of *Aspergillus parasiticus*. *Archives of Microbiology*. 181:204e214. doi: 10.1007/s00203-003-0643-3
- Liang JM, Xayamongkhon H, Broz K et al. (2014) Temporal Dynamics and Population Genetic Structure of *Fusarium graminearum* in the Upper Midwestern United States. *Fungal Genet Biol* 73:83–92. doi: 10.1016/j.fgb.2014.10.002
- Li H, Xing L, Zhang M et al. (2018) Aflatoxin B1 and Aflatoxin M1 on Kidney through Regulating L-Proline and Downstream Apoptosis. *Biomed Res Int*. 2018:9074861. doi: 10.1155/2018/9074861
- Liu X, Fan L, Yin S et al. (2019) Molecular mechanisms of fumonisin B1-induced toxicities and its applications in the mechanism-based interventions. *Toxicon*. 167:1–5. doi: 10.1016/j.toxicon.2019.06.009
- Luque MI, Cyrdoba JJ, Rodríguez A et al. (2013) Development of a PCR protocol to detect ochratoxin A producing moulds in food products. *Food Control* 29:270–278. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.06.023
- Maeda K, Tanaka Y, Matsuyama M et al. (2020) Substrate specificities of *Fusarium* biosynthetic enzymes explain the genetic basis of a mixed chemotype producing both deoxynivalenol and nivalenol-type trichothecenes. *Int J Food Microbiol* 320:108532. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108532
- Mahato DK, Lee KE, Kamle M et al. (2019) Aflatoxins in food and feed: An overview on prevalence, detection and control strategies. *Front Microbiol* 10:2266. doi: 10.3389/fmicb.2019.02266
- Marin S, Ramos AJ, Cano-Sancho G et al. (2013) Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem Toxicol* 60:218–237. doi: 10.1016/j.fct.2013.07.047
- McCormick SP, Stanley AM, Stover NA et al. (2011) Trichothecenes: From simple to complex mycotoxins. *Toxins*. 3:802–814. doi: 10.3390/toxins3070802
- Meng K, Wang Y, Yang P et al. (2010) Rapid detection and quantification of zearalenone-producing *Fusarium* species by targeting the zearalenone synthase gene PKS4. *Food Control* 21:207–211. doi: 10.1016/j.foodcont.2009.05.014
- Mert-Türk F, Gencer R. (2013) Distribution of the 3-AcDON, 15-AcDON and NIV chemotypes of *Fusarium culmorum* in the North-West of Turkey. *Plant Prot. Sci.* 49:57–64. doi: 10.17221/63/2012-PPS
- Moretti A, Logrieco AF, Susca A. (2017) Mycotoxins: An underhand food problem. *Methods Mol Biol* 1542:3–12. doi: 10.1007/978-1-4939-6707-0_1
- Munkvold GP. (2017) *Fusarium* Species and Their Associated Mycotoxins. *Methods Mol Biol* 1542:51–106. doi: 10.1007/978-1-4939-6707-0_4
- Murugesan GR, Ledoux DR, Naehrer K et al. (2015) Prevalence and effects of mycotoxins on poultry health and performance, and recent development in mycotoxin counteracting strategies. *Poult Sci* 94:1298–1315. doi: 10.3382/ps/pev075
- Navarro DMDL, Abelilla JJ, Stein HH. (2019) Structures and characteristics of carbohydrates in diets fed to pigs. *J Anim Sci Biotechnol* 10:39. doi: 10.1186/s40104-019-0345-6
- Nicolaisen M, Suproniene S, Nielsen LK et al. (2009) Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *J Microbiol Meth* 76(3):234–240. doi: 10.1016/j.mimet.2008.10.016
- Nielsen LK, Jensen JD, Rodríguez A et al. (2012) TRI12 based quantitative real-time PCR assays reveal the distribution of trichothecene genotypes of *F. graminearum* and *F. culmorum* isolates in Danish small grain cereals. *Int J Food Microbiol* 157(3):384–392. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro
- O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E et al. (1998) Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from the nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2044–2049. doi: 10.1073/pnas.95.5.2044
- Ostry V, Malir F, Ruprich J. (2013) Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin. *Toxins (Basel)*. 5(9):1574–1586. doi: 10.3390/toxins5091574
- Pasquali M, Beyer M, Logrieco A et al. (2016) European Database of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* Trichothecene Genotypes *Front Microbiol* 7:406. doi: 10.3389/fmicb.2016.00406
- Pereira CS, Cunha SC, Fernandes JO. (2019) Prevalent Mycotoxins in Animal Feed: Occurrence and Analytical Methods. *Toxins (Basel)* 11(5):290. doi: 10.3390/toxins11050290
- Pinotti L, Ottoboni M, Giromini C et al. (2016) Mycotoxin Contamination in the EU Feed Supply Chain: A Focus on Cereal Byproducts *Toxins* 8(2):45. doi: 10.3390/toxins8020045
- Priyanka SR, Venkataramana M, Kumar GP et al. (2014) Occurrence and molecular detection of toxigenic *Aspergillus* species in food grain samples

- from India. *J Sci Food Agric* 94:537–543. doi: 10.1002/jsfa.6289
- Qiu J, Lu Y, He D et al. (2020) *Fusarium fujikuroi* Species Complex Associated With Rice, Maize, and Soybean From Jiangsu Province, China: Phylogenetic, Pathogenic, and Toxigenic Analysis. *J, Shi J. Plant Dis* 104(8):2193–2201. doi: 10.1094/PDIS-09-19-1909-RE
- 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
- Rahman HU, Yue X, Ren X et al. (2020) Multiplex PCR assay to detect *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* species simultaneously. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 37(11):1939–1950. doi: 10.1080/19440049.2020.1810860
- Ramana MV, Balakrishna K, Murali HC et al (2011) Multiplex PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in rice and finger millet collected from southern India. *J. Sci. Food Agric* 91:1666–1673
- Ramdass AC, Villafana RT, Rampersad SN (2020) TRI Genotyping and Chemotyping: A Balance of Power Toxins (Basel). 12(2):64. doi: 10.3390/toxins12020064
- Righetti L, Dall'Asta C. (2020) A Workflow for the Identification of Mycotoxin Metabolites Using Liquid Chromatography-Ion Mobility-Mass Spectrometry. *Methods Mol Biol* 2084:133–144. doi: 10.1007/978-1-0716-0030-6_8
- Rodríguez A, Rodríguez M, Luque MI et al. (2012) Real-time PCR assays for detection and quantification of aflatoxin-producing molds in foods. *Food Microbiol* 31(1):89–99. doi: 10.1016/j.fm.2012.02.009
- Sabburg R, Obanor F, Aitken E et al (2015) Changing fitness of a necrotrophic plant pathogen under increasing temperature. *Glob Chang Biol* 21(8):3126–3137. doi: 10.1111/gcb.12927
- Sadhasivam S, Britzi M, Zakin V et al. (2017) Rapid Detection and Identification of Mycotoxigenic Fungi and Mycotoxins in Stored Wheat Grain. *Toxins (Basel)*. 9(10):302. doi: 10.3390/toxins9100302
- Scauflaire J, Godet M, Gourgue M et al. (2012) A multiplex real-time PCR method using hybridization probes for the detection and the quantification of *Fusarium proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. temperatum*, and *F. verticillioides*. *Fungal Biol* 116:1073–1080. doi: 10.1016/j.funbio.2012.07.011
- Shephard GS. (2016) Current status of mycotoxin analysis: A critical review. *J AOAC Int* 99(4):842–848. doi: 10.5740/jaoacint.16-0111
- Shin S, Son JH, Park JC et al. (2018) Comparative Pathogenicity of *Fusarium graminearum* Isolates from Wheat Kernels in Korea *Plant Pathol J* 34(5):347–355. doi: 10.5423/PPJ.OA.01.2018.0013
- Sim JH, Tian F, Jung SY et al. (2018) Multiplex polymerase chain reaction assays for the detection of the zearalenone chemotype of *Fusarium* species in white and brown rice. *Int J Food Microbiol* 269:120–127. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.003
- Song T, Yang W, Huang L et al. (2020) Zearalenone exposure affects the Wnt/beta-catenin signaling pathway and related genes of porcine endometrial epithelial cells in vitro. *Asian-Australas J Anim Sci* doi: 10.5713/ajas.20.0292
- Srour AY, Fakhoury AM, Brown RL. (2017) Targeting Aflatoxin Biosynthetic Genes. *Methods Mol Biol* 1542:159–171. doi: 10.1007/978-1-4939-6707-0_10
- Stępień L, Waskiewicz A. (2013) Sequence Divergence of the Enniatin Synthase Gene in Relation to Production of Beauvericin and Enniatins in *Fusarium* Species. *Toxins* 5:537–555. doi: 10.3390/toxins5030537
- Susca A, Villani A, Moretti A et al. (2020) Identification of toxigenic fungal species associated with maize ear rot: Calmodulin as single informative gene. *Int J Food Microbiol* 319:108491. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108491
- Sweeney MJ, Pamies P, Dobson ADW. (2000) The use of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for monitoring aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* 439. *Inter J Food Microbiol* 56:97e103. doi: 10.1016/s0168-1605(00)00277-4
- Ting WTE, Chang CH, Szonyi B et al. (2020) Growth and Aflatoxin B1, B2, G1, and G2 Production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* on Ground Flax Seeds (*Linum usitatissimum*). *J Food Prot.* 83(6):975–983. doi: 10.4315/JFP-19-539
- Tralamazza SM, Braghini R, Corrka B. (2016) Trichothecene Genotypes of the *Fusarium graminearum* Species Complex Isolated from Brazilian Wheat Grains by Conventional and Quantitative PCR. *Front Microbiol* 7:246. doi: 10.3389/fmicb.2016.00246
- Tran H, Schlageter-Tello A, Caprez A et al. (2020) Development of feed composition tables using a statistical screening procedure. *J Dairy Sci* 103(4):3786–3803. doi: 10.3168/jds.2019-16702
- Varga E, Wiesenberger G, Hametner C et al. (2015) New Tricks of an Old Enemy: Isolates of *Fusarium graminearum* Produce a Type A Trichothecene Mycotoxin. *Environ Microbiol* 17(8):2588–2600. doi: 10.1111/1462-2920.12718
- Vegi A, Wolf-Hall CE. (2013) Multiplex real-time PCR method for detection and quantification of mycotoxigenic fungi belonging to three different genera. *J Food Sci* 78:M70–M76. doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.03008.x

- Venkataramana M, Chandranayaka S, Prakash HS et al. (2014) Mycotoxins Relevant to Biowarfare and Their Detection. *Toxinology. Toxins*. 11:1–22. doi: 10.1007/978-94-007-6645-7_32-1
- Villafana RT, Ramdass AC, Rampersad SN. (2019) Selection of *Fusarium trichothecene* toxin genes for molecular detection depends on TRI gene cluster organization and gene function. *Toxins* 11:36. doi: 10.3390/toxins11010036
- 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(1):4. doi: 10.1186/s40529-016-0156-4
- Waskiewicz A, Stępień L, Wilman K et al. (2013) Diversity of pea-associated *F. proliferatum* and *F. verticillioides* populations revealed by FUM1 sequence analysis and fumonisin biosynthesis. *Toxins (Basel)* 5(3):488–503. doi: 10.3390/toxins5030488
- Yang C, Song G, Lim W. (2020) Effects of mycotoxin-contaminated feed on farm animals. *J Hazard Mater*. 389:122087. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.122087
- Yaroshenko MO, Kutsan AT, Orobchenko AL. (2018) Monitoring of feeds for dairy cows of the daily stage on the availability of mold micromycetes in the farms of the north-eastern region of Ukraine. *Bulletin «Veterinary biotechnology»*. 32(2):602–610. (in Ukrainian)
- Yin Y, Liu X, Ma Z. (2009) Simultaneous detection of *Fusarium asiaticum* and *Fusarium graminearum* in wheat seeds using a real-time PCR method. *Let Appl microbiology* 48(6):680–686. doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02595.x
- Yli-Mattila T, Gagkaeva T, Ward TJ et al. (2009) A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East. *Mycologia* 101(6):841–852. doi: 10.3852/08-217
- Yörük E, Albayrak G. (2012) Chemotyping of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates from Turkey by PCR assay. *Mycopathologia* 173:53–61. doi: 10.1007/s11046-011-9462-2
- Yue W. Characterization of Genetic Variation in Secondary Metabolites in *Fusarium*. Ph.D. Dissertation. Kansas State University; 2017
- Yu S, Jia B, Liu N et al. (2020) Evaluation of the Individual and Combined Toxicity of Fumonisin Mycotoxins in Human Gastric Epithelial Cells. *Int J Mol Sci* 21(16):5917. doi: 10.3390/ijms21165917

Надійшла в редакцію 29.04.21
Після доопрацювання 28.05.21
Прийнята до друку 18.01.22