УДК 639:616.982.17
DOI: 10.31073/vet_biotech43-05

ЗАХАРОВА О.М., канд. вет. наук, e-mail: olga_zm@gmail.com,
ЯНГОЛЬ Ю.А.*, e-mail: 2019yangol@gmail.com,
ТАРАСОВ О.А., канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: ast97@ukr.net
Інститут ветеринарної медицини НААН

РОЗРОБКА ПЛР ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ МІКРОСКОПІЧНИХ ГРИБІВ РОДУ *FUSARIUM У* ЗЕРНІ КУКУРУДЗИ

У статті представлено дослідження щодо виявлення мікроскопічних грибів роду Fusarium у зерні кукурудзи. Розрахована родоспецифічна пара праймерів (FU_gen_f та FU_gen_r) на основі послідовностей генів TEF різних видів фузаріїв була специфічною виключно до роду Fusarium в тестах як in silico, так із застосуванням виділених ізолятів грибів. У результаті досліджень встановлено, що використання родоспецифічних праймерів дозволяє успішно виявляти всі таргетні види, які є найбільш поширеними контамінантами зерна кукурудзи, при цьому за вивчення 57 невизначених до виду ізолятів, які були віднесені до фузаріїв на основі морфологічних властивостей, лише 55 були ідентифіковані як представники роду Fusarium в ПЛР та два ізоляти віднесено до іншого виду мікроскопічних грибів, близького за морфологічними властивостями.

Досліджені 55 ізолятів були розподілені за видами: F. oxysporum (9%), F. proliferatum (13%), F. sporotrichioides (33%), F. graminearum (25%), F. verticillioides (9%) і F. culmorum (11%). Крім того, ідентичність усіх ізолятів також була підтверджена за допомогою пари праймерів для визначення роду Fusarium.

У подальших дослідженнях будуть розроблені нові підходи для виявлення токсинпродукуючих видів мікроскопічних грибів у зерні та зерновій продукції.

Ключові слова: *Fusarium, фумонізин, токсигенність, зерно кукурудзи, контамінація.*

Вступ. У сучасному глобальному світі забезпечення якості зернової продукції є одним із найважливіших викликів. Ураженість зерна та продуктів рослинництва мікроскопічними токсинпродукуючими грибами різних родів є причиною мікотоксикозів тварин та людини, при цьому хронічні мікотоксикози тварин викликають значне зниження продуктивності [1].

За опублікованими даними, проблематика ураження зерна та кормів грибами-продуцентами мікотоксинів актуальна для України. Необхідність вирішення цієї проблеми полягає також в зниженні ризиків для людей щодо гострих отруєнь токсинами або хронічні токсикози, які перебігають із важкими ураження печінки та нирок [1–2].

* Аспірант

Гриби роду *Fusarium* є одними із найпоширеніших контамінантів зерна кукурудзи та пшениці, багато ізолятів описані як токсинпродукуючі та являють підвищену небезпеку, оскільки продукування токсинів відбувається безпосередньо під час зберігання зерна [3–5].

Кліматичні зміни, які супроводжуються значним потеплінням та змінами у складі мікробіоценозу мікроскопічних грибів та актиноміцетів на певних територіях, сприяють розвитку окремих таксономічних груп, основним з яких щодоо зерна кукурудзи є представники роду *Fusarium* [6–10].

Актуальними методами виявлення мікроскопічних грибів на сьогодні є мікробіологічні, які спрямовані на культивування збудника на поживних середовищах та типування за вивчення морфологічних (мікроскопія) та культуральних (ростових) властивостей [11]. Іншим важливим методом є молекулярно-біологічна діагностика, а саме застосування полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), яка дозволяє виявляти окремі види або роди патогена, в тому числі дозволяє встановити наявність генів токсинопродукування [12–15].

Встановлення видового складу домінантних видів є важливим підходом до попередження контамінації зернової продукції та для оцінки ризиків щодо накопичення мікотоксинів в зерні, оскільки певні види продукують лише певні види мікотоксинів [16–19].

Застосування нових підходів до видової ідентифікації мікроскопічних грибів – контамінантів зернових роду *Fusarium,* є важливим заходом для попередження ураження зерна мікотоксинами в процесі зберігання та є важливим аспектом для збереження здоров’я тварин та людини.

Метою роботи було розробити вітчизняну тест-систему полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для родової та видової ідентифікації грибів роду *Fusarium* і вивчити видовий склад в зразках зерна з деяких регіонів України.

Матеріали та методи досліджень. Для досліджень використовували 57 ізолятів грибів роду *Fuzarium,* виділених із зразків зерна кукурудзи з північних областей України (Київська, Чернігівська, Житомирська). Зразки отримували для досліджень з господарств, в яких спостерігали ознаки хронічних токсикозів тварин або візуально реєструвалося ураження зерна мікроскопічними грибами.

Видову ідентифікацію виділених ізолятів проводили за морфологічними (мікроскопія) та ферментативними властивостями загальноприйнятими методами. Вивчення морфологічних властивостей проводили із застосуванням стандартних мікологічних методів з використанням середовищ Чапека та Сабуро (HiMedia, Індія).

Виділення ДНК із зразків культури міцелію із використанням набору PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit, A29790 (Invitrogen, США) згідно з інструкцією виробника.

Набори праймерів, що детектують окремі види фузаріїв, використано із опублікованих Wolny-Koładka et al. [20] даних щодо рекомендованих послідовностей, родоспецифічні праймери розраховано авторами статті. Праймери були синтезовані на наше замовлення місцевим постачальником. Список використаних праймерів представлено в таблиці 1.

Таблиця 1

Список праймерів для проведення ПЛР

Назва праймера	Послідовність праймера (5`→3`)	Регіон гену	Специфічність
CLOX1	CTTGTCAGTAACTGGACGTTGGTACT	CAL ген	*F. oxysporum*
CLOX2	CTTGTCAGTAACTGGACGTTGGTACT		
CLPRO1	TGCATCAGACCACTCAAATCCT		*F. proliferatum*
CLPRO2	GCGAGACCGCCACTAGAT		
Fspo-R	CAGCGCACCCCTCAGAGC		*F. sporotrichioides*
Fsp-F	CGCACGTATAGATGGACAAG		
Fgr-F	GTTGATGGGTAAAAGTGTG		*F. graminearum*
Fgr-R	CTCTCATATACCCTCCG		
VER1	CTTCCTGCGATGTTTCTCC		*F. verticillioides*
VER2	AATTGGCCATTGGTATTATATATCTA		
C51F	ATGGTGAACTCGTCGTGGC		*F. culmorum*
C51R	CCCTTCTTACGCCAATCTCG		
FU_gen_f	CGGTTCAAGCATCCGATCTGC	TEF ген	*Fusarium визначення до роду*
FU_gen_r	CCTGACTTGATCTCACGC		

Класичний варіант ПЛР проводили в об’ємі 50 мкл. З метою мінімізації утворення неспецифічних продуктів реакції був використаний метод приготування реакційної суміші з фізичним розділенням компонентів ПЛР. Для приготування «нижньої» реакційної суміші змішували праймери та нуклеотидтрифосфати (2мМ) в одній пробірці з розрахунку по 5,0 мкл кожного компоненту (по 2,5 мкл обох праймерів з кінцевою концентрацією кожного 20–25 пМоль/зразок). Після змішування на вортексі суміш вносили в підготовлені для ПЛР мікропробірки по 10 мкл і нашаровували зверху по 15 мкл розплавленого воску. Після застигання воску в пробірку вносили по 20 мкл «верхньої» суміші та по 2 краплі мінерального масла. До складу «верхньої» ПЛР-суміші в розрахунку на 1 зразок, входило: 10,0 мкл 5-х ПЛР-буферу, 2,5 мкл 50 мМ $MgSO4$, 6,5 мкл $H2O$ та 1,0 мкл Taq-полімерази (5 од/мкл). Під олію у відповідності до маркування пробірок вносили по 20 мкл

ДНК зразку в lowTE буфері в кількості 40 нг. Продукти ПЛР розміром від 300 до 768 нп (видоспецифічні праймери) та 1420 нп (родоспецифічні праймери) виявляли методом електрофорезу ампліконів в 1,4% агарозному гелі з бромідом етідію відповідно до стандартного протоколу в камері виробництва Bio-Rad, США. Як маркер використовували 100 bp DNA Ladder (NEB, США).

Ампліфікацію виділених нуклеїнових кислот проводили за допомогою приладу CFX96 (Bio-Rad, США).

Умови реакції були наступними: початкова денатурація протягом 1 хвилини за 96°С, потім 35 циклів по 10 секунд денатурації за 96°С, відпал протягом 5 секунд за 50°С та елонгація протягом 3 хвилин за 60°С. Програма завершувалася 4-хвилинною фінальною елонгацією за 60°С.

Як позитивний контроль використовували ДНК із культур штамів *F. culmorum, F. graminearum, F. oxysporum, F.proliferatum, F. sporotrichioides, F. verticillioides,* які зберігаються в музеї ІВМ НААН.

Отримані дані аналізували за допомогою програмного пакету «R-studio» (https://www.r-project.org/) методами описової статистики.

Результати досліджень та їх обговорення. Специфічність застосованих родо- та видоспецифічних пар праймерів щодо цільових ділянок геному *Fusarium* була протестована на 6 видах, що представляють такі, що часто зустрічаються в Україні.

Розрахована нами родоспецифічна для *Fusarium* пара праймерів (FU_gen_f та FU_gen_r) на основі послідовностей генів *TEF* різних видів фузаріїв була специфічною виключно до роду *Fusarium* в тестах як *in silico*, так із застосуванням виділених нами ізолятів грибів. У результаті досліджень встановлено, що використання родоспецифічних праймерів дозволяє успішно виявляти всі досліджені таргетні види, які є найбільш поширеними контамінантами зерна кукурудзи, при цьому за вивчення 57 невизначених до виду ізолятів, які були віднесені до фузаріїв на основі морфологічних властивостей, лише 55 були ідентифіковані як представники роду *Fusarium* в ПЛР та два ізоляти віднесено до іншого виду мікроскопічних грибів, близького за морфологічними властивостями.

Результати досліджень представлені в таблиці 2 та на рис. 1.

Згідно з даними таблиці 2, у результаті дослідження окремих видів, передбачених експериментом, встановлено, що набори праймерів CLOX1 та CLOX2; CLPRO1 та CLPRO2; Fspo-R та Fsp-F дозволили визначити всі ізоляти тестованих видів *F. oxysporum, F. proliferatum та F. sporotrichioides* відповідно.

Таблиця 2

Результати дослідження праймерів для виявлення специфічних ділянок геному мікроскопічних грибів роду *Fuzarium*

№	Вид	Всього ізолятів	Ідентифіковано мікроскопією та культуральними властивостями	Ідентифіковано за допомогою ПЛР із набором праймерів						
				CLOX1 CLOX2	CLPRO1 CLPRO2	Fspo-R Fsp-F	Fgr-F Fgr-R	VER1 VER2	C51F C51R	FUgen_f FUgen_r
1	*F. oxysporum*	5	5	5	–	–	–	–	–	5
2	*F. proliferatum*	7	7	–	7	–	–	–	–	7
3	*F. sporotrichioides*	18	18	–	–	18	–	–	–	18
4	*F. graminearum*	14	14	–	–	–	12	-	1	12
5	*F. verticillioides*	5	5	–	–	–	–	5	–	5
6	*F. culmorum*	6	6	–	–	–	1	1	6	6
7	*Fusarium spp.*	57	57	5	7	18	13	6	7	55

Згідно з даними таблиці 2, у результаті дослідження окремих видів, передбачених експериментом, встановлено, що набори праймерів CLOX1 та CLOX2; CLPRO1 та CLPRO2; Fspo-R та Fsp-F дозволили визначити всі ізоляти тестованих видів *F. oxysporum, F. proliferatum та F. sporotrichioides* відповідно.

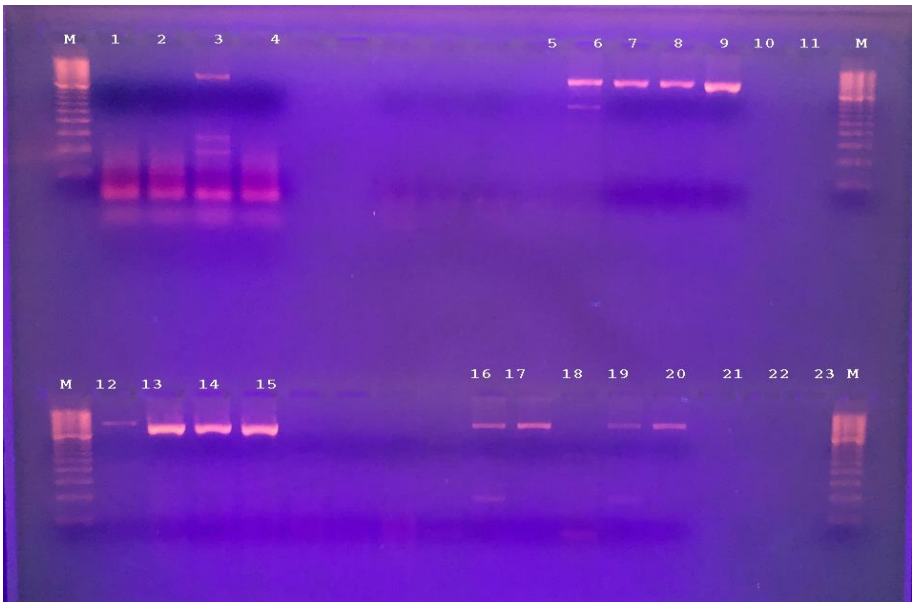

Рис. 1. Електорофореграма продуктів ампліфікації окремих видів мікроскопічних грибів роду *Fuzarium:* М-маркер молекулярної ваги, 1–4 – негативні контролі (*Alternaria spp, Aspergillus spp, Penicillium spp, Trichoderma spp*); праймери Fgr-F Fgr-R 5–9 – *F. graminearum*, 10–11 – суміш ДНК *Fuzarium* інших досліджених видів; праймери CLOX1 CLOX2 12–15 – *F. oxysporum*; праймери FUgen_f та FUgen_r; 16, 17, 19, 20 – виявлено мікроскопічні гриби роду *Fuzarium*; 18–23 – негативний результат.

Згідно з даними таблиці 2, у результаті дослідження окремих видів, передбачених експериментом, встановлено, що набори праймерів CLOX1 та CLOX2; CLPRO1 та CLPRO2; Fspo-R та Fsp-F дозволили визначити всі ізоляти тестованих видів *F. oxysporum, F. proliferatum та F. sporotrichioides* відповідно.

Досліджені 55 ізолятів були розподілені за видами: *F. oxysporum* (9%), *F. proliferatum* (13%), *F. sporotrichioides* (33%), *F. graminearum* (25%), *F. verticillioides* (9%) і *F. culmorum* (11%). Крім того, ідентичність усіх ізолятів також була підтверджена за допомогою пари праймерів для визначення роду *Fusarium* (рис. 2).

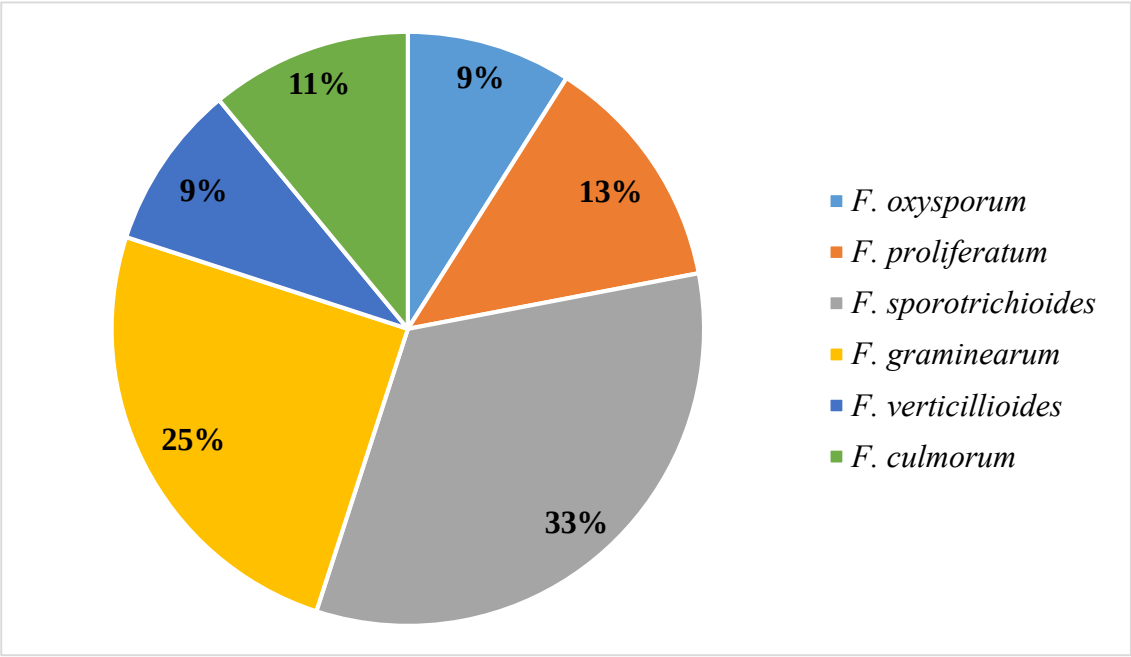

Рис. 2. Розподіл видів *Fusarium* на основі виявлених видів, n=55.

Такий підхід дозволив встановити домінантні серед видів *Fusarium*, асоційованих із контамінацією зерна кукурудзи, отриманого з господарств північного регіону України. Два ізоляти, попередньо віднесених до роду *Fusarium*, не були ідентифіковані на видовому та родовому рівні.

Слід зазначити, що згідно з чинним законодавством кількість міцелярних грибів санітарною оцінкою зерна не регламентується, а регламентуються лише допустимі концентрації мікотоксинів, тому для попередження накопичення мікотоксинів у зерні, важливо дотримуватись температурного режиму зберігання для зменшення ризиків накопичення токсинів в процесі зберігання. Застосування швидкого та точного методу ПЛР дозволить в короткий термін провести моніторингові дослідження щодо наявних видів мікроскопічних грибів роду *Fusarium у* зерні кукурудзи та своєчасно вжити заходів, спрямованих на недопущення накопичення токсинів у процесі зберігання.

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. Розрахована родоспецифічна пара праймерів (FU_gen_f та FU_gen_r) на основі послідовностей генів TEF різних видів фузаріїв була специфічною виключно до роду *Fusarium* в тестах як in silico, так із застосуванням виділених ізолятів грибів.

2. У результаті досліджень встановлено, що використання родоспецифічних праймерів дозволяє успішно виявляти всі таргетні види, які є найбільш поширеними контамінантами зерна кукурудзи. Ідентичність усіх ізолятів також була підтверджена як рід *Fusarium*, а видовий розподіл складався із домінантних видів: *F. oxysporum* (9%), *F. proliferatum* (13%), *F. sporotrichioides* (33%), *F. graminearum* (25%), *F. verticillioides* (9%) та *F. culmorum* (11%).

У подальших дослідженнях будуть розроблені нові підходи для виявлення токсинпродукуючих видів мікроскопічних грибів у зерні та зерновій продукції.

DEVELOPMENT OF A PCR TEST KIT FOR THE IDENTIFICATION OF MICROSCOPIC FUNGI OF THE GENUS FUSARIUM IN CORN GRAIN / Zhakharova O., Yangol Y., Tarasov O.

Introduction. *The mainly used methods for detecting of microscopic fungi are mycological, which are aimed at cultivating the pathogen on nutrient media and typing by studying morphological (microscopy) and fermentative properties. Another important method is molecular biological diagnostics, namely the use of polymerase chain reaction (PCR), which allows to identify individual species or genera of the pathogen, including the presence of toxin-producing genes.*

Establishing the species composition of the predominant species is an important approach to preventing contamination of grain products and to assess the risks of mycotoxin accumulation in grain, since certain species produce only certain types of mycotoxins.

The use of new approaches to the species identification of microscopic fungi – contaminants of grain of the genus Fusarium, is an important measure to prevent grain contamination with mycotoxins during storage and is an important measure to preserve animal and human health.

The goal of the study *was to develop the polymerase chain reaction (PCR) test kit for genus and species identification of Fusarium fungi and to study the species composition of corn grain samples from some regions of Ukraine.*

Materials and methods. *57 isolates of fungi of the genus Fuzarium, isolated from maize grain samples from the northern regions of Ukraine (Kyiv, Chernihiv, Zhytomyr) were used for the study. Samples were obtained for research from farms where signs of chronic animal toxicosis were observed or grain damage by microscopic fungi was visually recorded. The isolation of microscopic fungi and confirmation of the species was carried out with conventional microbiological methods using with the use of Chapek and Sabouraud nutrient media, which were prepared according to the manufacturer's recommendations (HiMedia, India).*

DNA extraction from mycelial culture samples was perormed using PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit, A29790 (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions.

Primer sets detecting individual Fusarium species were used from the data on recommended sequences published by Wolny-Koładka et al. 2015, and genus-specific primers were calculated by the authors. The primers were synthesized for us by local vendor, Ukraine.

The data obtained were analyzed using descriptive statistical methods.

Results of research and discussion. *The Fusarium genus-specific primer pair (FU_gen_f and FU_gen_r), which we calculated based on the TEF gene sequences of different Fusarium species, was specific exclusively for the genus Fusarium in both in silico and in vitro tests using the fungal strains we isolated. As a result of the study, it was found that the use of genus-specific primers allows the successful detection of all the target species studied, which are the most common contaminants of maize grain, while in the study of 57 species-unspecific isolates that were assigned to Fusarium on the basis of morphological properties, only 55 were identified as representatives of the genus Fusarium by PCR and two isolates were stated as non-fusarium species of microscopic fungi similar in morphological properties.*

The identity of all isolates was also confirmed using a pair of primers to determine the genus Fusarium. 55 isolates studied were classified by species: F. oxysporum (9%), F. proliferatum (13%), F. sporotrichioides (33%), F. graminearum (25%), F. verticillioides (9%) and F. culmorum (11%).

This approach allowed us to identify the predominant Fusarium species associated with the contamination of maize grain from farms in the northern region of Ukraine. Two isolates tentatively assigned to the genus Fusarium were not identified at the species and genus level.

Conclusions and prospects for further research.

1. The calculated genus-specific primer pair (FU_gen_f and FU_gen_r) based on the TEF gene sequences of different Fusarium species was specific exclusively for the genus Fusarium in both in silico and in vitro tests using isolated fungal isolates.

2. As a result of the study, it was found that the use of genus-specific primers allows the successful detection of all target species that are the most common contaminants of corn grain. The identity of all isolates was also confirmed as the genus Fusarium, and the species distribution consisted of the predominant species: F. oxysporum (9%), F. proliferatum (13%), F. sporotrichioides (33%), F. graminearum (25%), F. verticillioides (9%) and F. culmorum (11%).

As a next step, new approaches will be developed to detect toxin-producing species of microscopic fungi in grain and grain products.

Keywords: *Fusarium, microscopic fungi, toxigenecity, corn feed, contamination.*

REFERENCES

1. Dvorskaya, U. (2016). Mycotoksini v kormah vliianie na givotnih [Mycotoxins in feed: impact on animals]. *Efectivny kormy ta godivlia – Effective feeds and feeding*, 2, 34-38 [in Russian].

2. Trufanov, O.V. (2011). Monitoring zagriaznennosti mycotoksinamy zerna i kormov v Ukraine v 2005-2010 godah [Monitoring of cereals and feed with mycotoxines contamination in Ukraine in 2005-2010]. *Suchasni problemy toksikologii – Contemporary problems of toxicology*, 1-2, 55-59 [in Ukrainian].

3. Ji, F., He, D., Olaniran, A.O., et al. (2019). Occurrence, toxicity, production and detection of Fusarium mycotoxin: a review. *Food Prod Process and Nutr.*, 1, 6. https://doi.org/10.1186/s43014-019-0007-2.

4. Kępińska-Pacelik, J., & Biel, W. (2021). Alimentary Risk of Mycotoxins for Humans and Animals. *Toxins*, 13(11), 822. https://doi.org/10.3390/toxins13110822.

5. Anfossi, L., Giovannoli, C., & Baggiani, C. (2016). Mycotoxin detection. *Current Opinion in Biotechnology*, 37, 120-126. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.11.005.

6. Nan, M., Xue, H., & Bi, Y. (2022). Contamination, Detection and Control of Mycotoxins in Fruits and Vegetables. *Toxins,* 14(5), 309. https://doi.org/10.3390/toxins14050309.

7. Locatelli, S., Scarpino, V., Lanzanova, C., Romano, E., & Reyneri, A. (2022). Multi-Mycotoxin Long-Term Monitoring Survey on North-Italian Maize over an 11-Year Period (2011-2021): The Co-Occurrence of Regulated, Masked and Emerging Mycotoxins and Fungal Metabolites. *Toxins,* 14(8), 520. https://doi.org/10.3390/toxins14080520.

8. Yu, J., & Pedroso, I.R. (2023). Mycotoxins in Cereal-Based Products and Their Impacts on the Health of Humans, Livestock Animals and Pets. *Toxins,* 15(8), 480. https://doi.org/10.3390/toxins15080480.

9. Penagos-Tabares, F., Khiaosa-Ard, R., Schmidt, M., Pacífico, C., Faas, J., Jenkins, T., Nagl, V., Sulyok, M., Labuda, R., & Zebeli, Q. (2022). Fungal species and mycotoxins in mouldy spots of grass and maize silages in Austria. *Mycotoxin research,* 38(2), 117-136. https://doi.org/10.1007/s12550-022-00453-3.

10. Zhang, D., Zhao, L., Chen, Y., Gao, H., Hua, Y., Yuan, X., & Yang, H. (2022). Mycotoxins in Maize Silage from China in 2019. *Toxins,* 14(4), 241. https://doi.org/10.3390/toxins140402419.

11. Chauhan, R., Singh, J., Sachdev, T., Basu, T., & Malhotra, B. D. (2016). Recent advances in mycotoxins detection. *Biosensors & Bioelectronics,* 81, 532-545. https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.03.004.

12. Awuchi, C.G., Ondari, E.N., Nwozo, S., Odongo, G.A., Eseoghene, I.J., Twinomuhwezi, H., Ogbonna, C.U., Upadhyay, A.K., Adeleye, A.O., & Okpala, C.O.R. (2022). Mycotoxins' Toxicological Mechanisms Involving Humans, Livestock and Their Associated Health Concerns: A Review. *Toxins (Basel),* 14(3), 167. doi: 10.3390/toxins14030167.

13. Arif, M., Chawla, S., Zaidi, M.W., Rayar, J.K., Variar, M., Singh, U.S. (2012). Development of specific primers for genus Fusarium and F. solani using rDNA sub-unit and transcription elongation factor (TEF-1α) gene. *African Journal of Biotechnology,* 11, 444-447. https://doi.org/10.5897/AJB10.489.

14. Bayraktar, H., and Dolar, F.S. (2011). Molecular identification and genetic diversity of Fusarium species associated with onion fields in Turkey. *Journal of Phytopathology*, 159, 28-34.

15. Geiser, D.M., Aoki, T., Bacon, C.W., Baker, S.E., Bhattacharyya, M.K., Brandt, M.E., Brown, D.W. et al (2013). One fungus, one name: defining the genus Fusarium in a scientifically robust way that preserves longstanding use. *Phytopathology,* 103(5), 400-408.

16. Aoki, T., O'Donnell, K., & Geiser, D.M. (2014). Systematics of key phytopathogenic Fusarium species: current status and future challenges. *J Gen Plant Pathol.,* 80(3), 189-201.

17. Woloshuk, C.P., & Shim, W.B. (2013). Aflatoxins, fumonisins, and trichothecenes: a convergence of knowledge. *FEMS Microbiol Rev.,* 37(1), 94-109.

18. Schatzmayr, G., & Streit, E. (2013). Global occurrence of mycotoxins in the food and feed chain: facts and figures. *World Mycotoxin J.,* 6(3), 213-222.

19. Lattanzio, V.M.T., von Holst, C., Visconti, A. (2013). Experimental design for in-house validation of a screening immunoassay kit. The case of a multiplex dipstick for Fusarium mycotoxins in cereals. *Anal Bioanal Chem.,* 405(24), 7773-7782.

20. Wolny-Koładka, K., Lenart-Boroń, A., & Boroń, P. (2015). Species composition and molecular assessment of the toxigenic potential in the population of Fusarium spp. isolated from ears of winter wheat in southern Poland. *Journal of Applied Botany and Food Quality,* 88, 139-144. https://doi.org/10.5073/JABFQ.2015.088.020.