Іщенко В. Д., Волощук Н. М., Стерлікова О. М., Гуменюк Л. В., Скляр В. В., Калакайло Л. І.,
Іщенко Я. А., Іщенко Л. М.

УДК 619:615.9: 632.4.01/08

ВНУТРІШНЬОЛАБОРАТОРНА АПРОБАЦІЯ ПРАЙМЕРІВ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОЇ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ГРИБІВ РОДУ *FUSARIUM* LINK

В. Д. ІЩЕНКО, кандидат ветеринарних наук, доцент, докторант кафедри
фармакології та токсикології

Н. М. ВОЛОЩУК, кандидат біологічних наук, старший науковий
співробітник, завідувач науково-дослідного сектору фітосанітарної експертизи
та діагностики УЛЯБП АПК

О. М. СТЕРЛКОВА, кандидат біологічних наук, старший науковий
співробітник науково-дослідного сектору фітосанітарної експертизи та
діагностики УЛЯБП АПК

Л. В. ГУМЕНЮК, науковий співробітник науково-дослідного сектору
фітосанітарної експертизи та діагностики УЛЯБП АПК

В. В. СКЛЯР, аспірант

Л. І. КАЛАКАЙЛО, науковий співробітник відділу молекулярно-біологічних
досліджень УЛЯБП АПК

Я. А. ІЩЕНКО, студентка магістратури

Л. М. ІЩЕНКО, кандидат ветеринарних наук, завідувач відділу молекулярно-
біологічних досліджень УЛЯБП АПК

Національний університет біоресурсів і природокористування України

E-mail: ischenkovd@ukr.net

<https://doi.org/10.31548/dopovidi2019.06.017>

Анотація. Наведено результати внутрішньолабораторної апробації методики молекулярно-генетичної ідентифікації грибів роду *Fusarium* методом ПЛР. Дослідження проводились методом полімеразної ланцюгової реакції з детекцією продуктів ампліфікації в агарозному гелі. Для визначення специфічності методики використовували різні штами грибів роду *Fusarium*, *Alternaria* Nees, *Aspergillus* P. Micheli ex Haller, *Cladosporium* Link, *Drechslera* S. Ito, *Mucor* Fresen., *Rhizopus* Ehrenb., *Trichoderma* Pers.

Екстракцію ДНК проводили гуанідін-тіоціонатним методом із сорбцією на кремнію оксиді описаним R. Вoot із співавторами. Для досліджень використовували праймери, які фланкують ділянку ITS регіону рибосомальної ДНК *Fusarium* spp розміром 431 н.п. Після ампліфікації в термоциклері 2720 (Applied Biosystems) із відповідним температурним режимом її продукти аналізували шляхом розділення в 1,5 % агарозному гелі.

Іщенко В. Д., Волощук Н. М., Стерлікова О. М., Гуменюк Л. В., Скляр В. В., Калакайло Л. І.,
Іщенко Я. А., Іщенко Л. М.

*За дослідження специфічності методики усі види грибів роду *Fusarium* ідентифікувалися як позитивні за допомогою запропонованих праймерів. Перехресних реакцій із мікроміцетами інших видів не відмічали. Чутливість ПЛР-аналізу на основі запропонованих праймерів становить 0,12 нг/мкл. Результати виявлення грибів роду *Fusarium* безпосередньо із зерна кукурудзи та продуктів його переробки свідчать, що більшість посівів кукурудзи на полях уражена мікроміцетами даного роду.*

*Результати внутрішньолaborаторної оцінки праймерів для ідентифікації *Fusarium spp* з дослідженням таких параметрів як специфічність та чутливість свідчать, що апробована методика дає можливість досить швидко і надійно проводити виявлення грибів роду *Fusarium* у зерновій продукції, а також може бути використана для підтвердження сумнівних результатів мікологічного аналізу.*

Ключові слова: молекулярні-генетичні методи досліджень, полімеразна ланцюгова реакція, фузарії

Актуальність. В умовах глобальних кліматичних змін, інтенсифікації і запровадження нових методів ведення виробництва сільськогосподарської продукції, розширення ринків все більшої актуальності набуває проблема контамінації зернової продукції мікроміцетами та продуктами їхньої життєдіяльності – мікотоксинами. Мікотоксини є неминучими контамінантами продуктів харчування і кормів та є загальносвітовою проблемою, а щорічні втрати сільськогосподарської продукції у світі внаслідок забруднення її мікотоксинами становлять 16 млрд. доларів. Особливістю небезпеки мікотоксинів є їхня здатність впливати на організм людини і тварин в ультрамінімальних дозах, які часто є нижчими ніж межі

їхнього виявлення сучасними методами досліджень. Останнім часом для ідентифікації агентів біологічної безпеки все більшої популярності набувають молекулярно-генетичні методи досліджень, зокрема полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) в різних модифікаціях.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. За останні півстоліття мікотоксини визнані одними з найбільш шкідливих агентів біологічної небезпеки для здоров'я людини і тварин. Чисельними дослідженнями вітчизняних і зарубіжних вчених показане значне поширення токсигенних мікроміцетів у навколишньому середовищі та збільшення ареалів їхнього поширення [4, 8]. При цьому забруднення мікотоксинами зернової

Іщенко В. Д., Волощук Н. М., Стерлікова О. М., Гуменюк Л. В., Скляр В. В., Калакайло Л. І.,
Іщенко Я. А., Іщенко Л. М.

продукції має значний економічний і соціальний вплив, оскільки, основна частина населення світу споживає як основне харчування продукти переробки зернових культур [2]. Попри певні успіхи у мікології та мікотоксикології проблема залишається далекою до вирішення і вважається, що з часом відкриватимуться нові види грибів і мікотоксинів, а рівні ураження ними зростатимуть. Так, за останніми даними лише рід *Fusarium* Link, який є основним контамінантом зернової продукції, налічує близько 70 відомих видів і до 300 прогнозованих, більшість з яких ще не мають формальних назв [3]. Деякі дослідники вказують на труднощі видової ідентифікації мікроміцетів за допомогою дослідження їхніх морфологічних структур, вказуючи на перспективність молекулярно-генетичних методів дослідження [7]. Причому у ряді досліджень показано кореляцію між виявленими генами токсинування та виявленими кількісно мікотоксинами [6].

Мета дослідження. Метою роботи було проведення внутрішньолaboratorної апробації методики молекулярно-генетичної ідентифікації грибів роду *Fusarium* методом ПЛР.

Матеріали і методи дослідження. Дослідження

проводились методом полімеразної ланцюгової реакції з детекцією продуктів ампліфікації в агарозному гелі.

Для визначення діагностичної специфічності методики використовували різні штами грибів роду *Fusarium*, *Alternaria* Nees, *Aspergillus* P. Micheli ex Haller, *Cladosporium* Link, *Drechslera* S. Ito, *Mucor* Fresen., *Rhizopus* Ehrenb., *Trichoderma* Pers., які було виділено із насіння зернових культур у науково-дослідному секторі фітосанітарної експертизи та сертифікації насіння Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК.

Екстракцію ДНК проводили із 7-ми денної культури мікроміцетів гуанідін-тіоціонатним методом із сорбцією на кремнію оксиді описаним R. Boom із співавторами [5].

Для досліджень використовували праймери, які фланкують ділянку ITS регіону рибосомальної ДНК (*variable non-coding internal transcribed spacer regions*) *Fusarium* spp розміром 431 н.п. (ITS-F 5 AACTCCCAAACCCCTGTGAACAT A, ITS-R TTTAACGGCGTGGCCGC [1].

Реакцію ампліфікації проводили в реакційній суміші об'ємом 25 мкл, яка включала: 10хПЛР буфер (*Thermo*

Іщенко В. Д., Волощук Н. М., Стерлікова О. М., Гуменюк Л. В., Скляр В. В., Калакайло Л. І.,
Іщенко Я. А., Іщенко Л. М.

Fisher Scientific), 2,5 мМ $MgCl_2$ (*Thermo Fisher Scientific*), 2,0 мМ кожного із дезоксинуклеотидтрифосфатів (*Thermo Fisher Scientific*), 0,2 мкМ прямого і зворотнього праймерів та по 0,1 U Taq-ДНК-полімерази (*Thermo Fisher Scientific*). ДНК вносили в кількості 5,0 мкл (100-150 нг). Ампліфікацію здійснювали в термоциклері 2720 (*Applied Biosystems*) із наступним температурним режимом: 94 °С – 2 хв. – активація полімерази, та 35 циклів (94 °С – 20 с. – денатурація ДНК, 62 °С – 30 с. відпалювання праймерів, 72 °С – 30 с. елонгація ланцюгів ДНК), фінальну елонгацію ДНК проводили на 72 °С протягом 10 хв.

Продукти ампліфікації аналізували шляхом розділення в 1,5 % агарозному гелі за наявності чи відсутності специфічної смуги відповідного розміру, або порівнюючи отримані смуги із позитивним контролем.

Результати дослідження та їх обговорення. Для видової ідентифікації мікроміцетів найчастіше використовують ділянку рибосомальної ДНК геному мікроміцетів, а саме регіони *ITS 1* і *ITS 2*. На основі пошуку та аналізу праймерів для видової ідентифікації *Fusarium spp* доступних у літературі,

нами було обрано праймери, які описані Bluhm et al та фланкують ділянку *ITS* регіону рибосомальної ДНК розміром 431 н.п. [1].

Відповідно до ISO 17025, впровадження в лабораторну практику будь-якого аналітичного методу передбачає здійснення його оцінки придатності. Для методик на основі ПЛР-аналізу необхідним є підтвердження щонайменше таких показників, як специфічність та чутливість. Оскільки, незважаючи на те, що визначальним для специфічності та чутливості ПЛР є релевантний підбір праймерів, існує багато факторів, які можуть вплинути на достовірність результатів в окремо взятій лабораторії. Такими факторами можуть бути реактиви, які використовуються для приготування ПЛР-суміші, ступінь очистки праймерів, тип обладнання, якість та відповідність розхідного матеріалу, тощо.

Для оцінки запропонованих праймерів нами було досліджено їх специфічність та чутливість.

У табл. 1 наведено результати дослідження діагностичної специфічності для обраних праймерів.

Як видно із представлених у таблиці даних, усі види грибів роду *Fusarium* ідентифікувалися як позитивні за допомогою

Іщенко В. Д., Волощук Н. М., Стерлікова О. М., Гуменюк Л. В., Скляр В. В., Калакайло Л. І.,
Іщенко Я. А., Іщенко Л. М.

запропонованих праймерів. використовувалися в дослідженні, не
Перехресних реакцій із відмічали.
мікроміцетами інших видів, які

Таблиця 1. Види мікроміцетів, що були використані для дослідження специфічності методики

№	Вид	Кількість штамів	Результат
1.	<i>Fusarium culmorum</i>	1	+
2.	<i>Fusarium graminearum</i>	3	+
3.	<i>Fusarium oxysporum</i>	2	+
4.	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	2	+
5.	<i>Fusarium verticillioides</i>	3	+
6.	<i>Alternaria alternata</i>	1	–
7.	<i>Aspergillus niger</i>	1	–
8.	<i>Cladosporium</i> sp.	1	–
9.	<i>Drechslera</i> sp.	1	–
10.	<i>Mucor</i> sp.	1	–
11.	<i>Rhizopus</i> sp.	1	–
12.	<i>Trichoderma</i> sp.	1	–

На рис. 1 показано одну із результаті ампліфікації грибів роду
електрофореграм, отриману у *Fusarium* та інших видів мікроміцетів.

Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ділянки геному мікроміцетів *Its*. 1. *Fusarium oxysporum*; 2. *Fusarium sporotrichioides*; 3. *Fusarium culmorum*; 4. *Fusarium verticillioides* 5. *Fusarium graminearum*; 6. *Alternaria alternata*; 7. *Cladosporium* sp.; 8. *Aspergillus niger*; 9. *Drechslera* sp.; 10. Негативний контроль; 11. Позитивний контроль (*Fusarium oxysporum*). 12. Маркер молекулярної маси.

Іщенко В. Д., Волощук Н. М., Стерлікова О. М., Гуменюк Л. В., Складар В. В., Калакайло Л. І.,
Іщенко Я. А., Іщенко Л. М.

Як видно із рисунка усі гриби роду *Fusarium* мали відповідний ПЛР-продукт розміром 431 н.п., у той час як для інших видів грибів, таких як *Alternaria alternata*, *Cladosporium* sp., *Aspergillus niger*, *Drechslera* sp., та *Mucor* sp. ПЛР-продукт відсутній, що

свідчить про специфічність праймерів.

Чутливість ПЛР-аналізу на основі запропонованих праймерів оцінювали шляхом постановки 10-кратних розведень ДНК, екстрагованої із *Fusarium sporotrichioides* (рис.2).

Рис. 2. Електрофореграма розділення продуктів ампліфікації 10х розведень ДНК, екстрагованої із *Fusarium sporotrichioides*. 1 *Fusarium sporotrichioides* 120 нг/мкл, 2 *Fusarium sporotrichioides* 12 нг/мкл, 3 *Fusarium sporotrichioides* 1,2 нг/мкл, 4 *Fusarium sporotrichioides* 0,12 нг/мкл, 5 *Fusarium sporotrichioides* 0,012 нг/мкл. 6. Позитивний контроль 7. Маркер молекулярної маси ДНК.

Як можна побачити на рис. 2, чутливість ідентифікації *Fusarium spp.* становить 0,12 нг/мкл.

З метою апробації виявлення грибів роду *Fusarium* безпосередньо із зерна кукурудзи та продуктів його переробки було досліджено 13 різних зразків (зерно кукурудзи звичайної і

цукрової, відібране на полях різних областей України в осінній період, протруєне та непротруєне насіння кукурудзи, корми для годівлі ВРХ та лабораторних тварин-гризунів). Результати дослідження наведені на рис 3.

Іщенко В. Д., Волощук Н. М., Стерлікова О. М., Гуменюк Л. В., Скляр В. В., Калакайло Л. І.,
Іщенко Я. А., Іщенко Л. М.

Рис. 3. Електрофореграма розділення продуктів ампліфікації різних зразків зерна кукурудзи та комбікормів щодо ідентифікації *Fusarium spp.*
1. Зерно кукурудзи, відібране з поля у Гайсинському районі Вінницької області; 2-4. Зерно кукурудзи, відібране з полів Уманського (2, 3) та Жашківського (4) районів Черкаської області; 5-6. Зерно кукурудзи, відібране з полів Ставищанського та Білоцерківського районів Київської області; 7. Зерно цукрової кукурудзи, Житомирська обл.; 8. Кормова суміш для годівлі ВРХ із господарства Харківської області; 9. Дерт злакова для годівлі ВРХ із господарства Київської області; 10. Гранульований комбікорм для годівлі гризунів. 11-12. Насіння кукурудзи протруєне. 12. Насіння кукурудзи. 14. *Fusarium sporotrichioides*. 15. *Fusarium oxysporum*. 16. Негативний контроль. 17. Маркер молекулярної маси ДНК.

Аналізуючи отримані дані щодо виявлення *Fusarium spp.* у досліджуваних зразках можна зробити висновок, що більшість посівів кукурудзи на полях уражена мікроміцетами даного роду. Те саме стосується і різних кормів для годівлі продуктивних і лабораторних тварин. Звичайно, виявлення грибів не вказує на обов'язкову наявність мікотоксинів, але їхня присутність може свідчити про можливість утворення мікотоксинів за сприятливих умов. Крім того, рід *Fusarium* включає і нетоксигенні види мікроміцетів, тому доцільним є

використання праймерів, якими можна диференціювати гриби, які здатні синтезувати окремі класи мікотоксинів, наприклад, трихотецен- та фумонізін-продукуючі штами, що буде зроблено в подальшій нашій роботі.

Висновки і перспективи.

Проведено внутрішньолабораторну оцінку праймерів для ідентифікації *Fusarium spp.* Досліджено такі параметри як специфічність та чутливість. Проведено дослідження 13 зразків зерна кукурудзи і продуктів його переробки та встановлено, що 7

Іщенко В. Д., Волошук Н. М., Стерлікова О. М., Гуменюк Л. В., Скляр В. В., Калакайло Л. І.,
Іщенко Я. А., Іщенко Л. М.

із них уражені мікроміцетами роду *Fusarium*.

Апробована методика дає можливість досить швидко і надійно проводити виявлення грибів роду *Fusarium* у зерновій продукції, а також може бути використана для підтвердження сумнівних результатів мікологічного аналізу.

Список використаних джерел

1. Bluhm B.H., Flaherty J.E., Cousin M.A., Woloshuk C.P. Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for Assay for the Differential Detection of Trichothecene- and Fumonisin-Producing Species of *Fusarium* in Cornmeal. *Journal of Food Protection*. 2002. Vol. 65. P. 1955–61.

2. Moretti A., Logrieco A.F., Susca A. Mycotoxins: An Underhand Food Problem. *Methods Mol Biol*. 2017. Vol. 1542. P. 3–12. DOI: [10.1007/978-1-4939-6707-0_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0_1)

3. Munkvold G.P. Fusarium Species and Their Associated Mycotoxins. *Methods Mol Biol*. 2017. Vol. 1542. P. 51–106. DOI: [10.1007/978-1-4939-6707-0_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0_4)

4. Rahman H.U., Yue X., Yu Q., Xie H., Zhang W., Zhang Q., Li P. Specific antigen-based and emerging detection technologies of mycotoxins. *J Sci Food Agric*. 2019. Mar. No. 13. doi: 10.1002/jsfa.9686

5. Boom R., Sol C., Salimans M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M., van der Noordaa J. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids *Journal of clinical microbiology*. 1990. Vol. 28. No.3. P. 495–503.

6. Sohrabi N., Taghizadeh M. Molecular identification of aflatoxigenic *Aspergillus* species in feedstuff samples. *Curr Med Mycol*. 2018 Jun. Vol. 4. No 2. P. 1–6. doi: 10.18502/cmm.4.2.66

7. Thomas B., Contet Audonneau N., Machouart M., Debourogne A. Molecular identification of *Fusarium* species complexes:

Молекулярно-генетичні методи дозволяють не лише проводити виявлення грибів роду *Fusarium*, але і визначати їх токсигенні штами за генами токсинування, що буде використано у подальших дослідженнях.

Which gene and which database to choose in clinical practice? *J Mycol Med*. 2019 Apr. Vol. 29. No. 1. P. 56–58. doi: 10.1016/j.mycmed.2019.01.003

8. Янголь Ю.А. Визначення токсичності та токсинування мікроскопічних грибів в кормах. *Ветеринарна біотехнологія*. 2018. Вип. 33. С. 130–135.

References

1. Bluhm B.H., Flaherty J.E., Cousin M.A., Woloshuk C.P. (2002). Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for Assay for the Differential Detection of Trichothecene- and Fumonisin-Producing Species of *Fusarium* in Cornmeal. *Journal of Food Protection*, 65, 1955–61.

2. Moretti A., Logrieco A.F., Susca A. (2017). Mycotoxins: An Underhand Food Problem. *Methods Mol Biol*, 1542, 3–12. DOI: [10.1007/978-1-4939-6707-0_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0_1)

3. Munkvold G.P. (2017). Fusarium Species and Their Associated Mycotoxins. *Methods Mol Biol*, 1542, 51–106. DOI: [10.1007/978-1-4939-6707-0_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0_4)

4. Rahman H.U., Yue X., Yu Q., Xie H., Zhang W., Zhang Q., Li P. (2019). Specific antigen-based and emerging detection technologies of mycotoxins. *J Sci Food Agric*, Mar (13). doi: 10.1002/jsfa.9686

5. Boom R., Sol C., Salimans M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M., van der Noordaa J. (1990). Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids *Journal of clinical microbiology*, 28(3), 495–503.

Іщенко В. Д., Волощук Н. М., Стерлікова О. М., Гуменюк Л. В., Скляр В. В., Калакайло Л. І.,
Іщенко Я. А., Іщенко Л. М.

6. Sohrabi N., Taghizadeh M. (2018). Molecular identification of aflatoxigenic *Aspergillus* species in feedstuff samples. *Curr Med Mycol*, Jun, 4(2), 1–6. doi: 10.18502/cmm.4.2.66

7. Thomas B., Contet Audonneau N., Machouart M., Debourgogne A. (2019). Molecular identification of *Fusarium* species complexes: Which gene and which database to

choose in clinical practice? *J Mycol Med*, Apr, 29(1), 56–58. doi: 10.1016/j.mycmed.2019.01.003

8. Jangol Ju.A. (2018). Vyznachennia toksychnosti ta toksynoutvorennia mikroskopichnykh hrybiv v kormakh [Determination of toxicity and toxin production of microscopic fungi in feed]. *Veterinary biotechnology*, 33, 130–135. [in Ukrainian].

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ АПРОБАЦИЯ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГРИБОВ РОДА *FUSARIUM* LINK

В. Д. Ищенко, Н. М. Волощук, О. М. Стерликова, Л. В. Гуменюк,
В. В. Скляр, Л. И. Калакайло, Я. А. Ищенко, Л. М. Ищенко

Аннотация. Приведены результаты внутрилабораторный апробации методики молекулярно-генетической идентификации грибов рода *Fusarium* методом ПЦР. Исследования проводились методом полимеразной цепной реакции с детекцией продуктов амплификации в агарозном геле. Для определения специфичности методики использовали различные штаммы грибов рода *Fusarium*, *Alternaria* Nees, *Aspergillus* P. Micheli ex Haller, *Cladosporium* Link, *Drechslera* S. Ito, *Mucor* Fresen., *Rhizopus* Ehrenb., *Trichoderma* Pers.

Экстракцию ДНК проводили гуанидин-тиоционатным методом с сорбцией на кремния оксиде описанным R. Воот с соавторами. Для исследований использовали праймеры, которые фланкирующих участок ITS региона рибосомальной ДНК *Fusarium* spp размером 431 н.п. После амплификации в термоциклере 2720 (Applied Biosystems) с соответствующим температурным режимом ее продукты анализировали путем разделения в 1,5% агарозном геле.

При исследовании специфичности методики все виды грибов рода *Fusarium* идентифицировались как положительные с помощью предложенных праймеров. Перекрестных реакций с микромицетами других видов не отмечали. Чувствительность ПЦР-анализа на основе предложенных праймеров составляет 0,12 нг/мкл. Результаты выявления грибов рода *Fusarium* непосредственно из зерна кукурузы и продуктов его переработки свидетельствуют, что большинство посевов кукурузы на полях поражена микромицетами данного рода.

Результаты внутрилабораторный оценки праймеров для идентификации *Fusarium* spp с определением таких параметров как специфичность и чувствительность свидетельствуют, что апробированная методика даёт возможность достаточно быстро и надежно проводить выявление грибов рода *Fusarium* в зерновой продукции, а также может быть использована для подтверждения сомнительных результатов микологического анализа.

Ключевые слова: молекулярно-генетические методы исследований, полимеразная цепная реакция, фузариоз

INTERLABORATORY APROBATION OF PRIMERS FOR MOLECULAR GENETIC IDENTIFICATION OF *FUSARIUM* LINK FUNGUS

V. D. Ishchenko, N. M. Voloshchuk, O. M. Sterlikova, L. V. Humenyuk,
V. V. Sklyar, L. I. Kalakaylo, Y. A. Ishchenko, L. M. Ishchenko

Abstract. *There are given results of innerlaboratory approbation of methodology of molecular genetic identification of Fusarium fungus by using PCR method. The researches were carried out by using polymerase chain reaction method with detection of amplification products in agarose gel. For determination specificity of the methodology there were used different strains of fungus: Fusarium, Alternaria Nees, Aspergillus P. Micheli ex Haller, Cladosporium Link, Drechslera S. Ito, Mucor Fresen., Rhizopus Ehrenb., Trichoderma Pers.*

The extraction of DNA was carried out by using guanidine-thiocyanate method with sorption on silicon oxide which was described by R. Boom with co-authors. For researches there were used primers that flank part of ITC region of ribosomal DNA Fusarium spp, 431 n.p. After amplification in thermocycler 2720 (Applied Biosystems) with appropriate temperature mode its products were analyzed by separation in 1,5 % agarose gel.

During the research of specificity of the methodology all the species of Fusarium fungus were identified as positive by using given primers. Cross-reactions with micromycetes of other species were not observed. Sensitivity of PCR-analysis using given primers is 0,12 ng/mcl. The results of detection of Fusarium fungus directly from corn grains and its recycling products show that most corn plants on fields are infected by micromycetes of given genus.

The results of innerlaboratory evaluation of primers for Fusarium spp identification with researching such parameters as specificity and sensitivity show that tested methodology gives ability to detect Fusarium fungus in grain products quite fast and reliably and also it can be used for confirmation of dubious results of mycological analysis.

Keywords: *molecular genetic research methods, polymerase chain reaction, fusarium*