УДК 579.64 *DOI 10.18286/1816-4501-2022-4-111-116*

РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ ПОЛИМЕРАЗНО-ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ *ASPERGILLUS FLAVUS*

Феоктистова Наталья Александровна, *кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»*

Мастиленко Андрей Владимирович, *кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»*

Сульдина Екатерина Владимировна, *ассистент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»*

Ломакин Артём Андреевич, *аспирант «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»*

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, дом 1: тел.: 89603621517

e-mail: feokna@yandex.ru

Ключевые слова: *Aspergillus flavus, тест-система, полимеразно-цепная реакция, детекция, идентификация, система праймеров*

В статье представлены результаты исследований по разработке тест-системы методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» для идентификации фитопатогенных грибов Aspergillus flavus. Вышеназванные микроскопические грибы являются контаминантами кукурузы в различных географических зонах. В настоящее время разработана мультиплексная ПЦР-РВ-тест-система «HRM-Zygo-Asp» для выявления и идентификации аспергиллов (только до рода) и коммерческая тест-система для ИФА «Аспергилл-IgG-ИФА-БЕСТ» (ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ)».

Коллективом авторов, использующим программное обеспечение Multiple Sequence Alignment Viewer 1.22.1, UGENA 44.0, NCBI BLAST-primer, Oligoevaluator, для исследований был выбран Aspergillus flavus strain CA14 4,044,380..4,045,732 п.н. Произведен подбор специфических праймеров (f) 5'-3' GGGCCCGCAGCAAGAATAC, обратный праймер (r) 3'-5' ACGAGTTGTCACCTTCCCGAGA, разработан протокол постановки реакции, включающий предварительную денатурацию – 95 ^{0}C - 5 минут (1 цикл); денатурацию - 95 ^{0}C - 5 сек, отжиг - 60 ^{0}C - 15 сек (50 циклов). Для определения чувствительности тест-системы авторами был подобран зонд (CGGTTCGCTTTGGTCATCGT), флуоресцентный краситель - HEX, гаситель - BHQ-2. Определено, что чувствительность тест-системы составляет 1000 клеток. Апробация научной разработки была проведена на 33 полевых штаммах, выделенных из 33 проб кукурузы (зерно, вегетативная масса с признаками заболевания) и референс-штамме (Aspergillus flavus VKM No. F-25). При выборе полевых штаммов, идентифицированных по определителю В.И. Билай и Э.З. Коваль (1988) и ключу Никитинского-Алеева, Установлено, что 25 проб было контаминировано бактериями вида Aspergillus flavus.

Исследования проводятся в соответствии с Тематическим планом научно-исследовательских работ, выполняемых по заданию МСХ РФ в 2022 году.

Введение

Aspergillus flavus является сапрофитным микроскопическим почвенным грибом, который контаминирует сельскохозяйственные полевые культуры до и после сбора урожая, и канцерогенным вторичным метаболитом афлатоксином [1]. Особо восприимчивы к *A. flavus* масличные культуры, такие как кукуруза, арахис и семена хлопка [2-3]. Эти культуры, а также *A. flavus* и другие аспергиллы содержат высокие уровни ненасыщенных жирных кислот, линолевой (18:2) и олеиновой кислоты (18:1), которые являются субстратами для оксигеназ [4]. Колонизация *A. flavus* не обязательно снижает урожайность, но вызывает экономические потери из-за загрязнения семян афлатоксином [5]. *A. flavus* является патогеном животных и человека, вызывающим аспергиллез, вероятность заболеваемости которым увеличивается среди населения с ослабленным иммунитетом [6-7]. У *A. flavus* трудно выделить какой-то один определяющий фактор вирулентности [8]. Скорее, вирулентность этого патогена является многофакторной и тесно связана с онтогенетической связью спорообразования и вторичного метаболизма, приспособляемостью к стрессовым условиям и перехватом защитных молекул, передающих сигналы хозяина [9-10]. Точная идентификация *A. flavus* остается сложной из-за перекрывающихся морфологических и биохимических характеристик.

Это бархатистая плесень от желтого до зеленого или коричневого цвета с золотисто-красно-коричневой обратной стороной [11-12]. Поэтому есть необходимость проведения мониторинговых исследований по детекции вышеназванных микроорганизмов в различных ареалах с учетом географической принадлежности. Исходя из вышеизложенного, цель настоящего исследования – разработка тест-системы идентификации возбудителей заболеваний растений, вызванных фитопатогенными грибами *A. flavus*, на основе полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени».

Материалы и методы исследований

В работе анализировали 34 штамма микроорганизмов: *A. flavus*, в том числе депонированный штамм (*Aspergillus flavus VKM No. F-25*) во всероссийской коллекции ВКМ и 33 полевых штамма, выделенных из проб кукурузы (зерно, вегетативная масса). При выборе полевых штаммов, выделенных от растений с признаками заболеваний, идентифицированных по определителю В.И. Билай и Э.З. Коваль (1988) и ключу Никитинского-Алеева [13], мы учитывали максимальность охвата природно-географических зон Российской Федерации (пробы были получены из Краснодарского и Ставропольского краев, Ульяновской, Самарской, Воронежской, Ростовской, Белгородской, Курской, Орловской, Калининградской и Московской областей).

Материалы: реакционная смесь Био Мастер HS-Taq ПЦР (2×), ламинарный бокс БМБ-ii-«Ламинар-с» - 12, центрифуга/вортекс для пробирок, центрифуга-встряхиватель медицинская серии СМ-50М, твердотельный термостат TDB-120, амплификатор детектирующий ДТ праймер, прямой праймер (f) 5’-3’ GGGCCCGCAGCAAGAATAC, обратный праймер (r) 3’-5’ ACGAGTTGTCACCTTCCCGAGA, флуоресцентный зонд: HEX CGGTTCGCTTTGGTCATCGT BHQ2, лабораторная посуда.

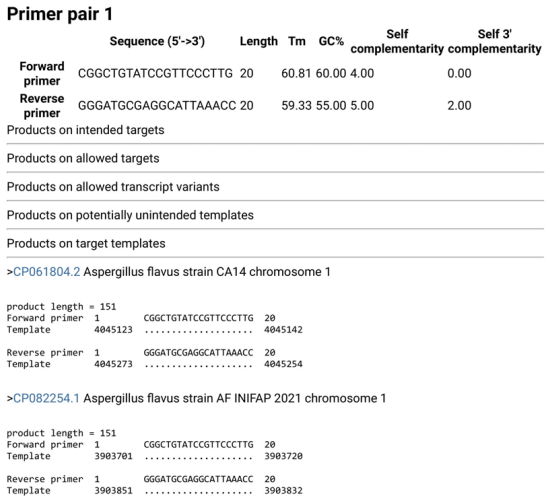
Используя микроскоп, проводили исследования по изучению морфологических свойств полевых штаммов микроскопических грибов, выращиваемых 7-10 суток на среде Сабуро (HiMedia, Индия), модифицированном агаре Чапека-Докса, картофельном и кукурузном агарах при температуре 26 и 37 ^{0}C. Выделение ДНК из моноспоровых культур микроскопических грибов проводили, применяя набора реагентов «ЛИРА+» (Вектор Бест, РФ).

Множественное выравнивание гена *Aspergillus flavus* strain CA14 4,044,380..4,045,732 п.н. проводили в Multiple Sequence Alignment Viewer 1.22.1 и UGENA 44.0. Подбор и дизайн праймеров был осуществлен с помощью ресурса NCBI BLAST-primer (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/), программы UGENA 44.0. Подбор зонда делали в программах UGENA 44.0 и Oligoevaluator ресурс (http://www.oligoevaluator.com/LoginServlet).

Результаты исследований

После изучения генома *A. flavus* для разработки системы молекулярно-генетической идентификации был выбран участок генома *Aspergillus flavus strain* CA14 4,044,380..4,045,732 п.н.

На основании полученной последовательности ДНК указанного выше фрагмента гена нами были подобраны праймеры для проведения ПЦР. Их специфичность была проверена так же при помощи этого сайта (рис. 1).



Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CGGCTGTATCCGTTCCCTTG	20	60.81	60.00	4.00	0.00
Reverse primer	GGGATGCGAGGCATTAAACC	20	59.33	55.00	5.00	2.00

Products on intended targets

Products on allowed targets

Products on allowed transcript variants

Products on potentially unintended templates

Products on target templates

>CP061804.2 Aspergillus flavus strain CA14 chromosome 1

```
product length = 151
Forward primer  1        CGGCTGTATCCGTTCCCTTG  20
Template        4045123  ....................  4045142

Reverse primer  1        GGGATGCGAGGCATTAAACC  20
Template        4045273  ....................  4045254
```

>CP082254.1 Aspergillus flavus strain AF INIFAP 2021 chromosome 1

```
product length = 151
Forward primer  1        CGGCTGTATCCGTTCCCTTG  20
Template        3903701  ....................  3903720

Reverse primer  1        GGGATGCGAGGCATTAAACC  20
Template        3903851  ....................  3903832
```

Рис. 1 - Проверка специфичности подобранных праймеров при помощи NCBI BLAST-primer

Эмпирически авторами был разработан и в дальнейшем оптимизирован алгоритм постановки реакции с применением интеркалирующего красителя SYBR Green. Разработанный протокол включал использование экстрагированной ДНК и следующие параметры постановки реакции:

1) предварительная денатурация – 95 ^{0}C - 5 минут (1 цикл),

2) денатурация – 95 ^{0}C - 5 сек,

3) отжиг - 60 ^{0}C - 15 сек (30 циклов).

Метод оценки результатов постановки реакции с применением порогового уровня (Ct) был изменен на методику прямого сравнения

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср, Fam	Результат
F1	7 pM	14,4	+
G1	К-		-
H1	8 pM	14,8	+
A2	К-		-
B2	9 pM	17,2	+
C2	К-		-
E2	10 pM	18,1	+
F2	К-		-

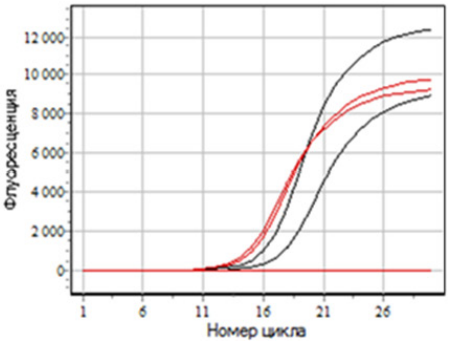


Рис. 2 - Подбор оптимальной концентрации разработанных праймеров в режиме реального времени с использованием интеркалирующиего красителя SYBR Green

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср, Hex	Результат
A3	8 разведение		-
B3	7 разведение		-
C3	6 разведение		-
D3	5 разведение	41,1	+
E3	4 разведение	36,8	+
F3	3 разведение	35,0	+
G3	К+	22,4	+

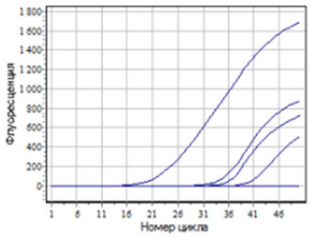


Рис. 3 - Результаты изучения чувствительности разработанного протокола для индикации и идентификации *A. flavus* методом РВ-ПЦР с дедукцией по каналу HEX

графиков накопления флуоресцентного сигнала с учетом первой и второй производной (Ср). Замена позволила исключить в реакции неоднородность расчета коэффициента пропорциональности количества ДНК к уровню сигнала флуоресценции.

Так же был произведен подбор оптимальной концентрации праймеров и изучена их специфичность. Нами были взяты следующие концентрации праймеров: 7 pM, 8 pM, 9 pM, 10 pM каждого на реакцию (рис. 2). Эмпирически было установлено, что увеличение концентрации праймеров не влияет на эффективность реакции, поэтому в наших дальнейших исследованиях были использована концентрация 9 pM каждого праймера на реакцию.

Был произведён подбор зонда для определения чувствительности разработанной тест-системы. Это зонд CGGTTCGCTTTGGTCATCGT, в качестве флуоресцентного красителя был использован HEX, гасителя BHQ-2. После серии экспериментов была подобрана его оптимальная концентрация, которая составила 0,4 pM. Определены показатели цикла для постановки ПЦР-РВ с флуоресцентным красителем:

1) предварительная денатурация – 95 ^{0}C - 5 минут (1 цикл),

2) денатурация - 95 ^{0}C - 5 сек,

3) отжиг - 60 ^{0}C - 15 сек (50 циклов).

В результате изучения чувствительности разработанного протокола для индикации и идентификации *A. flavus* методом РВ-ПЦР с детекцией по каналу HEX, установлено, что она составляет 10^3 клеток (рис. 3).

Апробация разработанной тест-системы для идентификации бактерий *A. flavus* методом ПЦР-РВ проводилась на тридцати трех полевых штаммах и референс-штамме *Aspergillus flavus VKM No. F-25*, который был использованы в качестве положительного контроля.

В ходе эксперимента нами было подтверждено, что выделенные из проб кукурузы с признаками заболеваний, проявляющихся как загнивание корней и увядание, двадцать пять полевых штаммов, идентифицированные нами *A. flavus* по определителю В.И. Билай и Э.З. Коваль (1988) и ключу Никитинского-Алеева, относятся к данному виду на основании молекулярно-генетических исследований.

Обсуждение

Загрязнение сельскохозяйственных культур афлатоксинами остается серьезной проблемой во всем мире с дополнительными угрозами для здоровья, связанными с увеличением числа случаев аспергиллеза, вызванного *A. flavus*, среди растущего населения с ослабленным иммунитетом. Прогресс в понимании биологии этого микроскопического гриба значительно улучшился с появлением развитых молекулярных инструментов, позволяющих проводить быстрый генетический анализ отдельных генов в геноме.

На текущий момент ведущая роль в идентификации микроскопических грибов закрепле-

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ct, Hex	Результат
A1	K+	25,6	+
B1	Asperillus spp 1	37,9	+
C1	Asperillus spp 3	29,2	+
D1	Asperillus spp 5		-
E1	Asperillus spp 7	27,1	+
F1	Asperillus spp 8		-
G1	Asperillus spp 9		-
H1	Asperillus spp 11		-
A2	Asperillus spp 12		-
B2	Asperillus spp 14	39,2	+
C2	Asperillus spp 15		-
D2	Asperillus spp 16	36,2	+
E2	Asperillus spp 18		-
F2	Asperillus spp 19	25,9	+
G2	Asperillus spp 20	37,3	+
H2	Asperillus spp 24	29,6	+
B3	Asperillus spp 29	29,7	+
C3	Asperillus spp 30	29,1	+
D3	Asperillus spp 33	29,1	+
E3	Asperillus spp 34	28,9	+
F3	Asperillus spp 37	30,5	+
G3	Asperillus spp 39	29,8	+
H3	Asperillus spp 41	28,1	+
A4	Asperillus spp 44	28,1	+
B4	Asperillus spp 50	28,1	+
C4	Asperillus spp 53	31,8	+
D4	Asperillus spp 56	30,6	+
E4	Asperillus spp 60	30,7	+
F4	Asperillus spp 66	31,9	+
G4	Asperillus spp 68	31,8	+
H4	Asperillus spp 74	30,6	+
A5	Asperillus spp 77	31,8	+
B5	Asperillus spp 81	31,7	+
C5	Asperillus spp 83		-
D5	K-		-

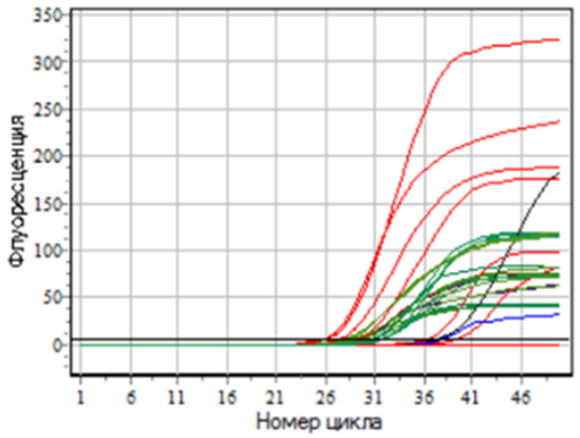


Рис. 4 - Апробация разработанной тест-системы для детекции *A. flavus* методом ПЦР-РВ

на за молекулярными методами, основанными на анализе последовательностей нуклеотидов и ПЦР [14]. С.М. Игнатьева с коллективом соавторов (2019) разработала мультиплексную ПЦР-тест-систему «HRM-Zygo-Asp» в режиме реального времени (РВ) с анализом кривых плавления ПЦР-продуктов высокого разрешения (НЕМ) для выявления и идентификации аспергиллов (только до рода) и мукоромицетов [15]. Известно, что компанией ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ» производится и успешно применяется в медицинской практике коммерческая тест-система для иммуноферментной диагностики аспергиллеза «Аспергилл-IgG-ИФА-БЕСТ» [16].

Заключение

Авторами была разработана оригинальная тест-система для детекции *A. flavus* методом ПЦР-РВ на основании использования специфичного участка генома, состоящая из прямого праймера (f) 5’-3’ GGGCCCGCAGCAAGAATAC, обратного праймера (r) 3’-5’ ACGAGTTGTCACCTTCCCGAGA, флуоресцентного зонда: HEX CGGTTCGCTTTGGTCATCGT BHQ2, (оптимальная концентрация - 0,4 pM). Протокол постановки реакции включает предварительную денатурацию – 95 ^{0}C - 5 минут (1 цикл), денатурацию - 95 ^{0}C - 5 сек, отжиг - 60 ^{0}C - 15 сек (50 циклов), которая была апробирована на 33 полевых штаммах и 1 референс-штамме с положительным результатом в 25 пробах.

Библиографический список

1. Афлотоксины зерна и способы минимизации рисков их накопления / Н. В. Науменко, И. Ю. Потороко, А. В. Малинин, А. В. Цатуров, О. Д. Назарова // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Пищевые и биотехнологии. - 2019. - № 2. – С. 70-79.

2. Distribution of indigenous strains of atoxigenic and toxigenic *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in maize and peanuts agro-ecological zones of Kenya / D. O. Okun, F. M. Khamis, G. M. Muluvi [et al.] // Agriculture and food security. – 2015. - № 4(14). – P. 66.

3. Dorner, J. W. Effect of inoculum rate of biological control agents on preharvest aflatoxin contamination of peanuts / J. W. Dorner, R. J. Cole, P. D. Blankenship // Biological Control. – 1998. - № 12. – P. 171–176.

4. Aspergillus section Flavi and Aflatoxins: Occurrence, Detection, and Identification in Raw Peanuts and Peanut-Based Products Along the Supply Chain / M. Norlia, S. Jinap, M. A. R. Nor-Khaizura1, S. Radu, N. I. P. Samsudin, F. A. Azri // Frontiers in Microbiology. – 2019. - № 10. – URL: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02602 (дата обращения 12.08.2022).

5. Stakeholders’ knowledge, attitude, and practices (KAP) towards aflatoxins contamination in peanut-based products / N. N. M. Azaman, N. H. Kamarulzaman, M. N. Shamsudin, J. Selamat // Food Control. – 2016. – Vol. 70. – P. 249–256.

6. The influences of ecophysiological factors on growth, aflR gene expression and aflatoxin B1 production by a type strain of *Aspergillus flavus* /

V. Bernáldez, J. J. Córdoba, N. Magan, B. Peromingo, A. Rodríguez // Food Science and Technology. – 2017. - Vol. 83. – P. 283–291.

7. Первичные патогены - возбудители поверхностных микозов / А. А. Баязитова, Ф. Г. Куприянова-Ашина, Е. В. Халдеева, О. Н. Ильинская // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 11-2. – С. 241-248.

8. Cotty, P. J. Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton / P. J. Cotty // Phytopathology. – 1989. – Vol. 79. – P. 808–814.

9. Токсигенные свойства микроскопических грибов / Н. Р. Ефимочкина, И. Б. Седова, С. А. Шевелева, В. А. Тутельян // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2019. - № 45. – С. 6-33.

10. Поиск эффективных средств биологической защиты растений и кормов против микромицета *Aspergillus flavus* / И. И. Идиятов, С. Р. Галлямова, В. В. Бирюля, Л. Р. Валиуллин, К. Х. Папуниди // Ветеринарный врач. - 2017. - № 5. – С. 24-30.

11. Identification of aflatoxins at clinical izolyatov mikromitsetov *Aspergillus flavus* / N. I. Potaturkina-nesterova, A. V. Nesterova, A. S. Nesterov, I. S. Nemova, M. N. Yukhlimova, Yu. V. Zelentsova // Modern problems of science and education. – 2012. – № 4. – P. 10-10.

12. Результаты выявления афлатоксина$_1$ у клинических изолятов *Aspergillus flavus* / А. В. Рыбин, Н. И. Потатуркина-Нестерова, С. А. Нестеров, А. В. Нестерова // Modern high technologies. – 2011. – № 1. – P. 47-48.

13. Билай, В. И. Аспергиллы / В. И. Билай, Э. З. Коваль. – Киев : Наукова думка, 1988. - 204 с.

14. Молекулярно-генетические методы в исследовании таксономии и специфической идентификации токсинпродуцирующих грибов рода *Fusarium*: успехи и проблемы / А. А. Стахеев, Л. В. Самохвалова, Д. Ю. Рязанцев, С. К. Завриев // Сельскохозяйственная биология. - 2016. – Т. 51, № 3. – С. 275-284.

15. Апробация мультиплексной тест-системы «HRM-Zygo-Asp» на клиническом материале больных мукормикозами / С. М. Игнатьева, В. А. Спиридонова, Т. С. Богомолова, Ю. Л. Авдеенко, Ю. В. Борзова, С. Н. Хостелиди, О. В. Шадривова, М. О. Попова, Ю. А. Чудиновских, И. С. Зюзгин, О. С. Успенская, Н. В. Васильева // Проблемы медицинской микологии. - 2019. - Т. 21, № 4. – С. 36-42.

16. Хронический некротизирующий аспергиллез легких как осложнение саркоидоза легких. Описание клинического случая и обзор литературы / И. С. Савостеева, Е. А. Десятик, Р. М. Чернопятова, О. В. Шадривова, Т. С. Одинцова, Т. С. Богомолова, С. М. Игнатьева, Н. В. Васильева, Н. Н. Климко // Проблемы медицинской микологии. – 2013. – Т. 15, № 4. – С. 25-30.

DEVELOPMENT AND TESTING OF POLYMERASE CHAIN REACTION FOR INDICATION AND IDENTIFICATION OF ASPERGILLUS FLAVUS PHYTOPATHOGENIC FUNGI

Feoktistova N. A., Mastilenko A. V., Suldina E. V., Lomakin A. A.
Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Ulyanovsk State Agrarian University
432017, Ulyanovsk, Novyi Venets boulevard, building 1: tel.: 89603621517
e-mail: feokna@yandex.ru

Key words: *Aspergillus flavus, test system, polymerase chain reaction, detection, identification, primer system*

The article presents results of research on development of a test system by means of polymerase chain reaction with real-time detection for identification of Aspergillus flavus phytopathogenic fungi. The above microscopic fungi are contaminants of corn in various geographical areas. At present, a multiplex PCR-RT-test system "HRM-Zygo-Asp" is in operation for detection and identification of aspergillus (only to the genus) and a commercial test system for EIA "Aspergillus-IgG- EIA -BEST" (ZAO "VECTOR- BEST).

The team of authors chose Aspergillus flavus strain CA14 4,044,380..4,045,732 b.p. for research, used Multiple Sequence Alignment Viewer 1.22.1 software, UGENA 44.0, NCBI BLAST-primer, Oligoevaluator. Specific primers were selected (f) 5'-3' GGGCCCGCAGCAAGAATAC, reverse primer - (r) 3'-5' ACGAGTTGTCACCTTCCCGAGA; a reaction protocol was developed, including preliminary denaturation - 95 ^{0}C - 5 minutes (1 cycle); denaturation - 95 ^{0}C - 5 sec, annealing - 60 ^{0}C - 15 sec (50 cycles). To determine the sensitivity of the test system, the authors selected a probe (CGGTTCGCTTTGGTCATCGT), a fluorescent dye - HEX, and a quencher - BHQ-2. It was determined that the sensitivity of the test system is 1000 cells. Approbation of the scientific development was carried out on 33 field strains isolated from 33 corn samples (grain, vegetative mass with signs of disease) and a reference strain (Aspergillus flavus VKM № F-25). When choosing field strains identified by V.I. Bilay and E.Z. Koval (1988) and the key of Nikitinskiy-Aleev, it was established that 25 samples were contaminated with bacteria of Aspergillus flavus species.

Bibliography:

1. Grain aflatoxins and ways to minimize the risks of their accumulation / N.V. Naumenko, I.Yu. Potoroko, A.V. Malinin, A.V. Tsaturov, O.D. Nazarova // Vestnik of the South Ural State University. Series: Food and biotechnologies. - 2019. - № 2. - P. 70-79.

2. Distribution of indigenous strains of atoxigenic and toxigenic Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus in maize and peanuts agro-ecological zones of Kenya / D.O. Okun, F.M. Khamis, G.M. Muluvi et al. // Agriculture and food security. - 2015. - № 4 (14). - P. 66.

3. Effect of inoculum rate of biological control agents on preharvest aflatoxin contamination of peanuts / J.W. Dorner, R.J. Cole, P.D. Blankenship // Biological Control. - 1998. - № 12. - P. 171-176.

4. Aspergillus section Flavi and Aflatoxins: Occurrence, Detection, and Identification in Raw Peanuts and Peanut-Based Products Along the Supply Chain /

M. Norlia, S. Jinap, M.A.R. Nor-Khaizura1, S. Radu, N.I. P. Samsudin, F.A. Azri // Frontiers in Microbiology. - 2019. - № 10. - URL: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02602 (accessed 12.08.2022).

5. Stakeholders' knowledge, attitude, and practices (KAP) towards aflatoxins contamination in peanut-based products / N. N. M. Azaman, N. H. Kamarulzaman, M. N. Shamsudin, J. Selamat // Food Control. - 2016. - Vol. 70. - P. 249-256.

6. The influences of ecophysiological factors on growth, aflR gene expression and aflatoxin B1 production by a type strain of Aspergillus flavus / V. Bernáldez, J.J. Córdoba, N. Magan, B. Peromingo, A. Rodríguez // Food Science and Technology – Vol. 83. – P. 283–291.

7. Primary pathogens - causative agents of superficial mycoses / A.A. Bayazitova, F.G. Kupriyanova-Ashina, E.V. Khaldeeva, O.N. Ilyinskaya // International Journal of Applied and Fundamental Research. - 2015. - № 11-2. – P. 241-248.

8. Cotty, P. J. Virulence and cultural characteristics of two Aspergillus flavus strains pathogenic on cotton / P. J. Cotty // Phytopathology. - 1989. - Vol. 79. – P. 808–814.

9. Toxigenic properties of microscopic fungi / N.R. Efimochkina, I.B. Sedova, S.A. Sheveleva, V.A. Tutelyan // Vestnik of Tomsk State University. Biology. - 2019. - № 45. - P. 6-33.

10. Search for effective means of biological protection of plants and feeds against Aspergillus flavus micromycete / I.I. Idiyatov, S.R. Gallyamova, V.V. Biryulya, L.R. Valiullin, K.Kh. Papunidi // Veterinary doctor. - 2017. - № 5. - P. 24-30.

11. Identification of aflatoxins at clinical izolyatov mikromitsetov Aspergillus flavus / N.I. Potaturkina-nesterova, A.V. Nesterova, A.S. Nesterov, I.S. Nemova, M.N. Yukhlimova, Yu. V. Zelentsova // Modern problems of science and education. - 2012. - № 4 - P. 10-10.

12. Results of detection of aflatoxin$_1$ of clinical isolates of Aspergillus flavus / A.V. Rybin, N.I. Potaturkina-Nesterova, S.A. Nesterov, A.V. Nesterova // Modern high technologies. - 2011. - № 1 - P. 47-48.

13. Bilay, V.I. Aspergillus / V.I. Bilay, E.Z. Koval. - Kievv: Naukova Dumka, 1988. - 204 p.

14. Molecular - genetic methods in the study of taxonomy and specific identification of toxin-producing fungi of Fusarium genus: progress and problems / A.A. Stakheev, L.V. Samokhvalova, D.Yu. Ryazantsev, S.K. Zavriev // Agricultural biology. - 2016. - V. 51. - № 3. - P. 275-284.

15. Approbation of the multiplex test system "HRM-Zygo-Asp" on clinical material of patients with mucormycosis / S.M. Ignatieva, V.A. Spiridonova, T.S. Bogomolova, Yu.L. Avdeenko, Yu.V. Borzova, S.N. Khostelidi, O.V. Shadrivova, M.O. Popova, Yu.A. Chudinovskikh, I.S. Zyuzgin, O.S. Uspenskaya, N.V. Vasilieva // Problems of medical mycology. - 2019. Vol. 21. - № 4. - P. 36-42.

16. Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis as a complication of pulmonary sarcoidosis, description of a clinical case and literature review / I.S. Savosteeva, E.A. Desyatik, R.M. Chernopyatova, O.V. Shadrivova, T.S. Odintsova, T.S. Bogomolova, S.M. Ignatieva, N.V. Vasilieva, N.N. Klimko // Problems of Medical Mycology. - 2013. - V. 15. - № 4. - P. 25-30.