

## Kvantitatiivinen PCR-pikamääritysmenetelmä viljojen *Fusarium*-homeille

Tapani Yli-Mattila<sup>1</sup>, Sari Paavanen-Huhtala<sup>1</sup>, Tuija Sarlin<sup>2</sup>, Marika Jestoi<sup>3</sup>, Päivi Parikka<sup>4</sup>, Aldo Rizzo<sup>5</sup>, Auli Haikara<sup>2</sup>, Tatjana Gagkaeva<sup>6</sup> ja Sonja Klemsdal<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Turun yliopisto, Biologian laitos, Kasvifysiologia ja molekyylibiologia, 20014 Turku  
[tymat@utu.fi](mailto:tymat@utu.fi)

<sup>2</sup>VTT Bioteknologia, PL 1500, 02044 VTT, [tuija.sarlin@vtt.fi](mailto:tuija.sarlin@vtt.fi), [auli.haikara@kolumbus.fi](mailto:auli.haikara@kolumbus.fi)

<sup>3</sup>EELA, Kemian laitos, 00581 Helsinki, [aldo.rizzo@eela.fi](mailto:aldo.rizzo@eela.fi), [marika.jestoi@eela.fi](mailto:marika.jestoi@eela.fi)

<sup>4</sup>MTT Kasvintuotanto/Kasvinsuojelu, 31600 Jokioinen, [paivi.parikka@mtt.fi](mailto:paivi.parikka@mtt.fi)

<sup>5</sup>Yleisvenäläinen Kasvinsuojeluinstituutti, 196608 Pietari, Venäjä, [gagkaeva02@yahoo.com](mailto:gagkaeva02@yahoo.com)

<sup>6</sup>Norjan Kasvinsuojeluinstituutti, Hoegskoleveien 7, N-1432 Ås, Norja,  
[sonja.klemsdal@PLANTEFORSK.NO](mailto:sonja.klemsdal@PLANTEFORSK.NO)

Mykotoksiinien määriin viljoissa EU:ssa on tulossa uusia enimmäismäärärajoja vuonna 2006. Sallittu enimmäismäärä viljojen deoksinivalenoli (DON)-pitoisuudelle tulee olemaan ohrassa ja vehnässä 1250 ppb, kaurassa 1750 ppb ja lastenruuissa 200 ppb. Niinpä teollisuus tarvitsee uusia luotettavia pikamääritysmenetelmiä suuren mykotoksiini-riskin omaavien viljaerin löytämiseen tutkittavista viljanäytteistä.

Työssä testattiin ensin viittä lajispesifistä lajikeparia SYBR Greeniin perustuvalla kvantitatiivisella PCR:llä vuoden 2002 viljanäytteillä, joiden toksiinimäärät tiedetään. Tulokset olivat kuitenkin vain semikvantitatiivisia eivätkä kovin toistettavia määrien suhteen (hajontaa DNA-määrien suhteen ei-spesifisistä monistustuotteista johtuen), joten emme voineet luotettavasti tutkia eri viljanäytteiden DNA-määrien korrelaatiota toksiinimääriin, vaikka PCR-reaktiota optimoitiin eri tavoilla. Sen sijaan TaqMan-alukkeilla ja -koettimilla pystyttiin toistettavasti määrittämään *Fusarium graminearum*- (TMFg12), *F. poae*- (TM<sub>poae</sub>), *F. sporotrichioides*/*F. langsethiae*- (TMLAN), *F. avenaceum*/*F. arthrosporioides*- (TMAV) ja trikotekeeneita tuottavien *Fusarium*-lajien (TMTRI) DNA:n määrät suomalaisissa viljanäytteissä GeneAmp 5700 ja LightCycler-laitteilla..

Kaikkia TaqMan-alukkeita ja koettimia voidaan käyttää epäilyttävien viljanäytteiden karsimiseen pika-analyysissä esim. viljojen esinäytteiden valinnassa viljelijöiltä ennen yhtiöiden ostopäätöstä. Menetelmä sopii erityisesti kauralla (TMFg12) sekä myös ohralla (TMTRI) ja kevätvehnällä (TMFg12 ja TMTRI) suurilla deoksinivalenoli- (DON) pitoisuuksia sisältävien näytteiden löytämiseen, ohralla (TM<sub>poae</sub>) ja kauralla (TM<sub>poae</sub>) suurilla nivalenoli- (NIV) pitoisuuksia sisältävien viljanäytteiden löytämiseen sekä ohralla (TMAV) suurilla moniliformiini- (MON) ja enniatiini- (ENN) pitoisuuksia sisältävien näytteiden löytämiseen. Lisäksi menetelmästä on hyötyä (TMLAN) etsittäessä suurilla HT-2- ja T2-pitoisuuksia sisältäviä kauranäytteitä.

*F. langsethiae*/*F. sporotrichioides* ja *F. poae* samanaikainen tunnistaminen sekoitetuista puhdasviljelmistä ja viljanäytteistä onnistui ABI Prism 7700 -laitteella ja antoi erikseen tehtyjen monistusten kanssa yhtäpitävät tulokset.

MON- ja ENN-pitoisuudet korreloivat myös vuoden 2002 ohranäytteiden yhdistettyjen *F. avenaceum*/*F. arthrosporioides*/*F. tricinatum*-pitoisuuksien kanssa. Myös DON-pitoisuudet korreloivat suuntaa-antavasti yhdistettyjen *F. culmorum*/*F. graminearum*-isolaattipitoisuuksien kanssa.

Työ perustuu Pikafus-Tekes-projektin loppuraporttiin ja siitä valmisteilla oleviin julkaisuihin

Asiasanat: DNA, viljat, mykotoksiinit, punahomeet

## Johdanto

*Fusarium*-homeet ovat maailmanlaajuisesti esiintyviä peltohomeita. Ne ovat oletettavasti tärkeimpiä toksineja tuottavia homeita pohjoisen pallonpuoliskon lauhkeilla vyöhykkeillä (Bottalico ja Perrone, 2002, Yli-Mattila ym., 2004a). *Fusarium*-homeita esiintyy etenkin viljoissa ja maississa, joista kyseisen homesuvun muodostamia lukuisia toksineja yleisesti löytyy. *Fusarium*-homeiden tuottamista mykotoksiineista tunnetuimpia ovat trikotekeenit, kuten deoksinivalenoli (DON), nivalenoli (NIV) sekä T-2 - ja HT-2 -toksiinit. Muita *Fusarium*-toksineja ovat mm. estrogeninen tsearalenoni (ZEN), fumonisiinit, fusariinit ja moniliformiini. *Fusarium*-sienet säilyvät myös maassa ja satojätteissä pitkään, joten niiden määrä vähenee merkittävästi vain monipuolisessa kasvinvuorotuksessa. Punahomeiden taudinkestävyydessä on eroja viljalajien ja -lajikkeiden välillä. Täysin resistenttejä lajikkeita ei kuitenkaan ole. Punahomeet aiheuttavat viljoilla sato- ja laatutappioita, sillä jyvät voivat jäädä kehittymättä, ovat rypyisiä, väriltään punertavia tai harmaita. Tauti heikentää viljan leipoutuvuutta ja itämistä. Lisäksi sienten tuottamat homemyrkyt, mykotoksiinit ovat terveysriski ihmisille ja eläimille.

Viljojen *Fusarium*-homeita ja niiden tuottamia toksineita on tutkittu viime vuosina aktiivisesti Euroopassa ja Yhdysvalloissa. Tällä hetkellä viljojen *Fusarium*-kontaminaatiotason määrittämiseksi on käytettävissä erilaisia kokonaisten jyvien ja jauhettujen jyvien viljelymenetelmiä. Menetelmät ovat työläitä, aikaa vievä ja ei-kuantitatiivisia. Varsinaista *Fusarium*-lajianalyysiä ei yleensä tehdä, vaikka tiedetään, etteivät kaikki *Fusarium*-lajit ole yhtä haitallisia, esim. niiden kyky tuottaa mykotoksiineja vaihtelee. *Fusarium*-lajien tunnistaminen perinteisin menetelmin vaatii erityisosaamista ja on työlästä. Sallittu enimmäismäärä viljojen deoksinivalenoli (DON)-pitoisuudelle tulee olemaan ohrassa ja vehnässä 1250 ppb, kaurassa 1750 ppb ja lastenruuissa 200 ppb (EC draft 2004) 1.7. 2006 lähtien. Myös mallas- ja panimoteollisuus saattaa käyttää tiukempia normeja. Tsearalenonille sallittu enimmäismäärä tulee olemaan 100 ppb ja HT-2/T-2-toksiinien ylärajaksi suunnitellaan 100-500 ppb viljoissa. Mykotoksiinien kemiallinen analyysi kromatografisin menetelmin on varsin kallista ja työlästä, joten käytännössä ei ole mahdollista tutkia kaikkia teollisuuden käyttöön tulevia viljaeria näillä menetelmillä. Niinpä tarvitaan erilaisia pika-analyyskejä, joista käyttöön on elintarviketeollisuudessa jo otettu erilaisia entsyymi-immunomäärityksiä (ELISA) DONin, fumonisiinin ja tsearalenonin määrittämiseen. Fumonisiinia-tuottavia punahomeita ei ole löytynyt suomalaisesta viljasta.

Viime vuosina molekyylibiologiset tekniikat ovat yleistyneet homeanalytiikassa. Monille haitallisille *Fusarium*-lajeille on kehitetty spesifiset DNA-alkukeet käytettäväksi ei-kuantitatiivisissa PCR (Polymerase Chain Reaction) –sovelluksissa. Lisäksi on kehitetty spesifisiä alukkeita lajinsisäisten ryhmien erotteluun. Tämän projektin tavoitteena oli kehittää kvantitatiivisia, reaaliaikaisia PCR-menetelmiä haitallisten/toksigeenisten *Fusarium*-homeiden määrittämiseksi viljanäytteistä käyttäen hyväksi jo olemassa olevia ryhmä-/lajispesifisiä alukkeita. PCR-testeistä olisi hyötyä erityisesti kasvinjalostuksessa, mallastamoissa sekä lastenruokien raaka-aineen puhtauden testaamisessa. Ennen sadonkorjuuta tehdyt PCR-testit voisivat puolestaan ennakoida tulevan sadon laatua *Fusarium*-toksiinien suhteen.

Tekes-projektiin (Yli-Mattila, 2004) osallistui edustajia Turun yliopistosta, VTT:stä, EELA:sta, MTT:stä, Raisio Yhtymästä, Suomen Rehusta, Suomen Nestle OY:stä, Polttimo Yhtiöistä ja Labmasterista.

## Aineisto ja menetelmät

### *DNA-eristys*

VTT:ssä DNA:n eristys ja puhdistus perustui kaupallisen kitin FastDNA Spin Kit for Soil (Q-BIOgene) käyttöön. Eristysmenetelmää optimoitiin testaamalla erilaisia näytemääriä (0.1 g – 10 g), kokonaisia jyviä tai jauhettuja jyviä, erilaisia käsittelyaikoja (1 - 5 min) sekä erilaisia näytteen hajotusmatriiseja, jotka irrottaisivat ja/tai hajottaisivat homeitiöt ja -hyifyn jyvistä tai

jauhoista. Turun yliopistossa modifioitiin puolestaan Sonja Klemsdalın tutkimusryhmän käyttämää Taylor ym. (2001) kehittämää DNA-eristysmenetelmää, jossa 10 g jyviä ensin liuotettiin TE-puskurissa 5 min, jonka jälkeen niitä vorteksoitiin minuutin ajan, jota seurasi jyvien pintakerroksen homogenisointi Bioreban käsihomogenisaattorilla Bioreban pusseissa, joissa on väliseinäenä muoviverkko. Lopuksi DNA eristettiin saadusta jyvien pintakerroksen sakasta Sigman Plant Genomic DNA Kitin avulla.

#### **Reaaliaikaisissa PCR-reaktioissa käytetyt alukkeet ja olosuhteet**

Projektissa testattiin kahta erilaista reaaliaikaiseen PCR-menetelmään soveltuvaa detektiokemiaa, SYBR Green I - ja hydrolyysikoetinmenetelmää (TaqMan), haitallisten *Fusarium*-homeiden osoittamiseksi ja kvantitoimiseksi viljasta käyttäen LightCycler® -laitetta (Roche Diagnostics GmbH, Saksa) sekä GeneAmp 5700-laitetta (PE Biosystems). Taulukossa 1 on esitetty käytetyt TaqMan-alukkeet.

**Taulukko 1.** Reaaliaikaisissa PCR –reaktioissa käytetyt TaqMan-alukkeet ja koettimet.

Alukepari	Kohde	Detektiokemia	Viite
TMTRI	<i>Tri5</i> –trikotekeeni-synteesigeeni	TaqMan	Klemsdal ym., 2005
TMFg12	<i>F. graminearum</i>	TaqMan	Yli-Mattila ym., 2005a
TMAV	<i>F. avenaceum</i>	TaqMan	Klemsdal ym., 2005
TMLAN	<i>F. langsethiae</i> ja <i>F. sporotrichioides</i>	TaqMan	Klemsdal ym., 2005 (ITS-alueelle)
TMpoe	<i>F. poae</i>	TaqMan	Yli-Mattila ym., 2004b, 2005a (IGS-alueelle)

Optimoinnin jälkeen päädyttiin alukkeille parhaiten soveltuviin reaktio-olosuhteisiin.

#### **Viljanäytteet**

Viljanäytteitä saatiin testattavaksi Kasvintuotannon tarkastuskeskukselta (KTTK), suoraan viljelijöiltä sekä Ravintoraisiosta, Polttimo Yhtiöistä ja Suomen Rehusta satovuosilta 2002-2003. Turun yliopistossa kasvatettiin myös eri punahomelajien kantoja autoklavoidulla riisillä sekä saastutettiin Mahti-vehnää ja Scarlett-ohraa kukinnan aikaan eri punahomelajien itiöillä, jotta saisimme selville, mitä toksiineja eri punahomelajit pystyvät tuottamaan laboratorio-oloissa ja kenttäoloissa.

#### **Mykotoksiinianalyysit**

Trikotekeenit määritettiin kaasukromatografisesti massaspektrometri-detektiolla ja tsearaleoni nestekromatografisesti fluoresenssidetektiolla. Beauverisiini, enniatiini ja moniliformiini määritettiin nestekromatografisesti massaspektrometridetektiolla (Jestoi ym., 2005). KTTK:n antamista näytteistä suuri osa mykotoksiineista oli määritetty MTT:ssä ja nämä tulokset saatiin käyttöön CERVEG-tietokannan (<http://www.agronet.fi/cerveg/>) kautta.

#### **Mykologiset analyysit**

*Fusarium*-spesifistä PCNB-alustaa (50 jyvää/näyte), jossa bakteerien kasvu oli estetty streptomysiinisulfaattilla, käytettiin punahomekantojen eristykseen viljanäytteistä vuonna 2003, kun taas 2002 (200 jyvää/näyte) jyvät pantiin ensin kostealle suodatinpaperille ja niistä kasvavat rihmastot siirrettiin PDA-maljoille. Saastuneiden jyvien määrä laskettiin kahden viikon kasvatuksen jälkeen suodatinpaperilla (Yli-Mattila ym., 2005a). Tämän jälkeen punahomeet eristettiin ja tunnistettiin makroskooppisten ja mikroskooppisten tuntomerkkien perusteella MTT:ssä. VTT:ssä jyvien saastumista tutkittiin myös jauhetuista jyvistä, jotka levitettiin petrimaljoille, joista laskettiin kolonioita muodostavat yksiköt (Sarlin ym., 2005a).

## Tulokset ja tulosten tarkastelu:

### *Puhdasviljelmät riisillä ja viljasaastutukset*

Riisikasvatusten mukaan eri punahomelajien toksiiniprofiili on Suomessa samantapainen kuin muuallakin (Jestoi ym., 2004, 2005). *F. graminearum* ja *F. culmorum* ovat tehokkaimpia DON- ja ZEN-tuottajia, kun taas *F. poae* on tehokas NIV- ja Fusarenon-X-tuottaja. Sekä *F. poae* että *F. sporotrichioides* tuottavat beauverisiinia, kun taas *F. sporotrichioides* ja *F. langsethiae* ovat tehokkaimpia HT-2- ja T-2-tuottajia. *F. avenaceum*illa sekä *F. arthrosporioides*- ja *F. tricinctum*-puna-homeilla on aivan erilainen toksiiniprofiili kuin em. trikotekeenisynteisiin kykenevillä puna-homeilla. Nämä kolme lajia tuottavat runsaasti moniliformiina ja enniatiineja. Myös *F. poae* tuottaa runsaasti enniatiineja. Emme löytäneet kirjallisuudessa tunnettuja nivalenolia tuottavia *F. graminearum*- ja *F. culmorum*-kantoja Suomesta, mutta sen sijaan ainoa tutkimamme *F. langsethiae*-kanta tuotti yllättäen runsaasti nivalenolia. Asian varmistaminen vaatii jatkotutkimuksia.

Viljasaastutukset onnistuivat parhaiten *F. culmorum*- ja *F. sporotrichioides*-kannoilla, joilla oli myös selvä vaikutus mykotoksiinipitoisuuksiin. *F. avenaceum*- ja *F. graminearum*-kannoilla syynä heikompaan tulokseen oli pieni itiötuotto saastukseen kasvatetuissa rihmastoissa, kun taas *F. poae*- ja *F. langsethiae*-kantojen itiöillä näytti olevan heikompi kyky infektoida ohraa ja vehnää kuin muilla puna-homeilla.

### *LightCycler-tulokset eri DNA-eristysmenetelmillä verrattuna mykotoksiinipitoisuuksiin*

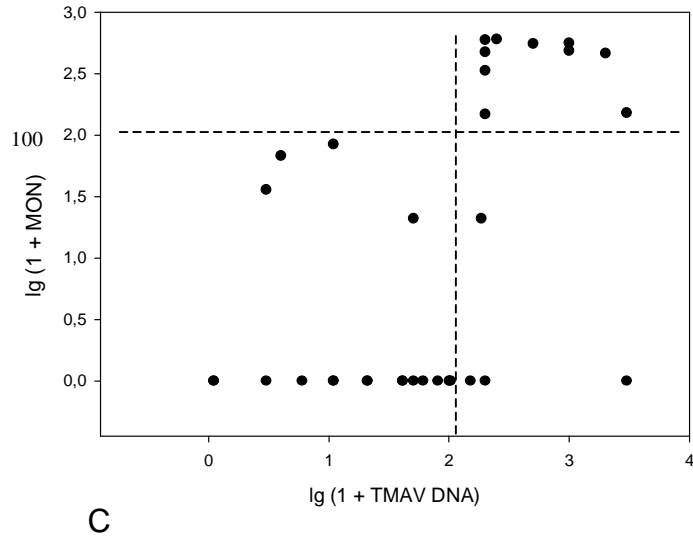
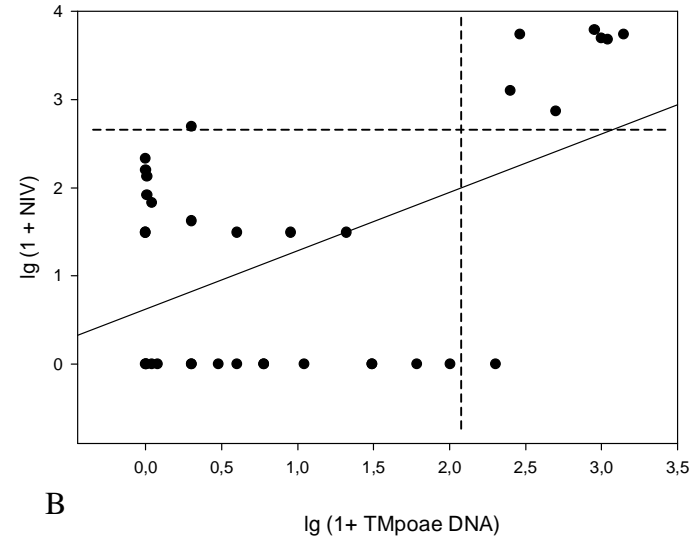
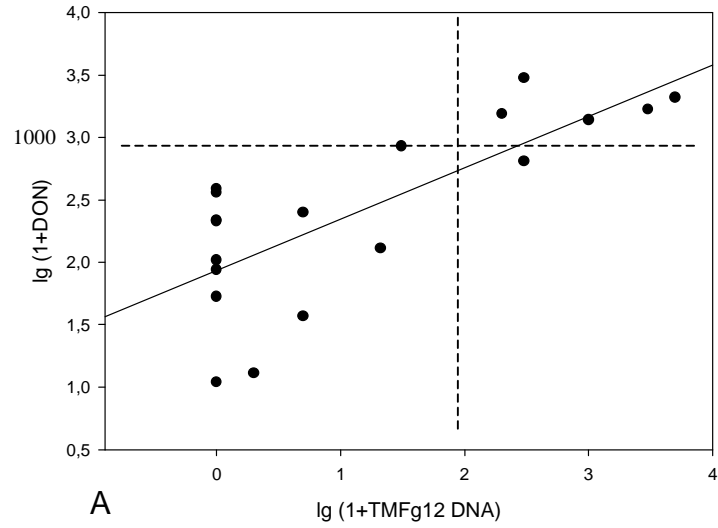
TaqMan-kemiaan perustuvat reaaliaikaiset PCR-sovellukset, jotka oli suunniteltu trikotekeenejä tuottavien *Fusarium*-homeiden (TMTRI), *F. graminearum* -lajin (Fg12) sekä *F. avenaceum* -lajin (TMAV) kvantitointiin viljanäytteistä, todettiin olevan spesifisiä ja toimivan ohramatriisissa. SYBR Green I -kemiaan perustuvat PCR-sovellukset tuottivat alukkeiden itsensä monistumisesta johtuvaa primer dimer -tuotetta sekä epäspesifisiä monistustuotteita, jotka kuitenkin pystyttiin erottamaan oikeista PCR-tuotteista sulamiskäyrien avulla. Nämä epäspesifiset monistustuotteet haittasivat kuitenkin kvantitointia ja hidastivat tulosten tulkintaa. DNA:n eristyskiti FastDNA Spin Kit for Soil (Q-BIOgene) toimi ohranäytteille; se puhdisti ohrajauhoista DNA:n eristyksessä uuttuneet PCR-reaktiota inhiboivat yhdisteet. Suositeltavimmaksi DNA:n eristysmenetelmäksi FastDNA Spin Kit for Soil -kittiin yhdistettynä osoittautui jauhetun viljan käsittely Ribolyser laitteella. Sekä TMTRI-PCR -sovelluksella että Fg12-PCR -sovelluksella määritetyt *Fusarium*-DNA:n määrät korreloivat ohra- ja mallinäytteiden deoksinivalenolipitoisuuden kanssa (Sarlin ym., 2005a). Myös tutkittujen ohranäytteiden TMAV-DNA-määrät korreloivat suuntaa-antavasti enniatiinipitoisuuksien kanssa.

### *GeneAmp 5700-tulokset verrattuna mykotoksiini- ja kontaminaatiotuloksiin*

Turun yliopistossa testattiin viittä lajispesifistä lajikeparia SYBR Greeniin perustuvalla kvantitatiivisella PCR:llä (DyNAMO SYBR Green qPCR Kit) vuoden 2002 ohra- ja vehnänäytteillä, joiden toksiinimäärät tiedetään. Tulokset olivat kuitenkin vain semikvantitatiivisia eivätkä kovin toistettavia määrien suhteen (hajontaa DNA-määrien suhteen ei-spesifisistä monistustuotteista johtuen), joten emme voineet luotettavasti tutkia eri viljanäytteiden DNA-määrien korrelaatiota toksiinimääriin, vaikka PCR-reaktiota optimoitiin eri tavoilla.

Sen sijaan TaqMan-alukkeilla ja -koettimilla pystyttiin toistettavasti määrittämään *Fusarium graminearum*- (Fg12), *F. poae*- (Tm<sub>poae</sub>), *F. sporotrichioides*/*F. langsethiae*- (TMLAN), *F. avenaceum*/*F. arthrosporioides*- (TMAV) ja trikotekeeneita tuottavien *Fusarium*-lajien (TMTRI) DNA:n määrä sekä viljan pinnasta että jauhetuista jyvistä eristetyistä näytteistä (Yli-Mattila ym., 2005a,b).

Kaikkia TaqMan-alukkeita ja koettimia voidaan käyttää epäilyttävien viljanäytteiden karsimiseen pika-analyyseissä esim. viljojen esinäytteiden valinnassa viljelijöiltä ennen yhtiöiden ostopäätöstä. Menetelmä sopii erityisesti kauralla (Fg12) sekä myös ohrella



Kuva 1. Korrelaatio *F. graminearum*- punahomeen DNA-määrän ( $10^{-6}$  ng ng $^{-1}$  kokonais-DNA) ja DON-pitoisuuden (ppb) välillä kauralla (A,  $R^2 = 0,53$ ,  $P = 0,0004^{***}$ ), *F. poae* DNA-määrän ( $10^{-5}$  ng ng $^{-1}$  kokonais-DNA) ja NIV-pitoisuuden (ppb) välillä ohralla (B,  $R^2 = 0,26$ ,  $P = 0,0014^{**}$ ) ja *F. avenaceum*-punahomeen DNA-määrän ( $10^{-5}$  ng ng $^{-1}$  kokonais-DNA) ja MON-pitoisuuden (ppb) välillä ohralla (C,  $R^2 = 0,23$ ,  $P = 0,0038^{**}$ ). Kuvaan on merkattu kauralla 1000 ppb:n DON-taso ja ohralla 500 ppb:n NIV-taso ja 100 ppb:n MON-taso sekä kuvassa A  $10^{-4}$  ng ng $^{-1}$ :n DNA-taso ja kuvissa B ja C  $10^{-3}$  ng ng $^{-1}$ :n DNA-tasot. Tulokset on esitetty logaritmiarvoina (Yli-Mattila ym., 2005a,b).

(TMTRI) ja kevätevehnällä (Fg12 ja TMTRI) suuria DON-pitoisuuksia sisältävien näytteiden löytämiseen, ohralla (TM<sub>poae</sub>) ja kauralla (TM<sub>poae</sub>) suuria NIV-pitoisuuksia sisältävien viljanäytteiden löytämiseen sekä ohralla (TMAV) suuria MON- ja ENN-pitoisuuksia sisältävien näytteiden löytämiseen. Lisäksi menetelmästä on hyötyä (TMLAN) etsittäessä suuria HT-2- ja T2-pitoisuuksia sisältäviä kauranäytteitä. ABI Prism 7700 -laitteella testattiin kahden alukseen ja koettimen samanaikaista käyttöä. *F. langsethiaen*/*F. sporotrichioideksen* ja *F. poae*n samanaikainen tunnistaminen sekoitetuista puhtasviljelmistä ja viljanäytteistä onnistui ja antoi erikseen tehtyjen monistusten kanssa yhtäpitävät tulokset. Korrelaatiotesteissä tulokset muutettiin logaritmisiksi (kuva 1), koska alkuperäiset tulokset eivät olleet jakautuneet normaalisti.

Kauralla Fg12- ja DON-pitoisuuden korrelaatio oli erittäin merkitsevä (kuva 1A) ja TMTRI-DNA:n ja DON-pitoisuuden välinen korrelaatio jokseenkin merkitsevä ja kumpaakin DNA-laatua voidaan käyttää karsimaan suuren DNA-pitoisuuden omaavat viljanäytteet. Yhdistettyjen *F. culmorum*/*F. graminearum*-isolaattien ja DON-pitoisuuden regressiosuoran kulmakertoimen merkitsevyys on vain suuntaa-antava, mutta myös isolaattien määrän avulla voidaan karsia suurin osa suuria DON-pitoisuuksia sisältävistä viljanäytteistä.

Ohralla TMTRI-DNA:n määrän ja DON-pitoisuuden korrelaatio oli jokseenkin merkitsevä, kun taas Fg12-DNA:n ja *F. culmorum*/*F. graminearum*-isolaattien määrän ja DONin välillä ei havaittu korrelaatiota. Ohralla havaittiin myös merkitsevä korrelaatio TM<sub>poae</sub>-DNA:n ja NIV-pitoisuuden välillä (kuva 1B) ja TM<sub>poae</sub>-DNA:n avulla on mahdollista lähes kaikki suuria NIV-pitoisuuksia sisältävät ohranäytteet. Myös kauralla (16 näytettä) on mahdollista karsia suuri osa suuria NIV-pitoisuuksia sisältävistä näytteistä TM<sub>poae</sub>-DNA:n määrän avulla, mutta korrelaatio ei ollut merkitsevä.

Ohralla voitiin osoittaa merkitsevä korrelaatio TMAV-pitoisuuden ja MON- ja ENN-pitoisuuksien välillä (kuva 1C). TMAV-DNA-pitoisuuden avulla on mahdollista karsia pois suurin osa viljanäytteistä, joiden MON- ja ENN-pitoisuus on korkea. Korkeita MON- ja ENN-pitoisuuksia tavattiin lähinnä vain vuoden 2002 ohranäytteissä. Hyvä korrelaatio havaittiin myös yhdistettyjen *F. avenaceum*/*F. arthrosporioides*/*F. tricinctum*-isolaattien lukumäärän ja MON- ja ENN-pitoisuuden välillä vuonna 2002.

Kevätevehnällä havaittiin jokseenkin merkitsevä korrelaatio niin *F. graminearum*-DNA:n kuin TMTRI-DNA:n määrässä verrattuna DON-pitoisuuteen ja kumpaakin DNA-laatua voidaan käyttää karsimaan suuren DON-pitoisuuden omaavat viljanäytteet. Kauralla havaittiin, että HT-2 ja T-2-toksiinien muodostuminen kaurassa edellyttää TMLAN-DNA:ta ja korrelaatio HT-2- ja T-2-toksiinien pitoisuuksien ja TMLAN-pitoisuuden välillä on jokseenkin merkitsevä korrelaatio. Kun tutkimuksessa yhdistettiin suomalaisten ja norjalaisten kauranäytteiden tulokset, kyseinen korrelaatio oli erittäin merkitsevä (Klemsdal ym., 2005).

## Johtopäätökset

Kehittämällemme diagnostiselle *Fusarium graminearum*-punahomeen kvantitatiiviselle (fluorisoivalla väriaineella merkityt koettimet) PCR-määritysmenetelmälle tehtiin myös alustava liiketoimintapotentiaalin kartoitus TULI-rahoituksella. Kartoituksen mukaan kvantitatiivisen PCR-pohjaisen *F. graminearum*-testin markkinat ovat tällä hetkellä pienet, koska jyvien sisältämän *F. graminearum*-rihmaston määrä ei ennusta DON-määrää riittävän tarkasti, vaikka lähes kaikki näytteet, jotka ylittävät EU:n enimmäismäärät, voidaankin löytää. Menetelmää voidaan kuitenkin tarkentaa määrittämällä myös toiseksi tärkeimmän DON-tuottajan, *F. culmorum*-punahomeen, DNA-määrä jyvissä, kun taas inhibiittorien vaikutus voidaan eliminoida käyttämällä näytteen sisäistä standardia (Waalwijk ym., 2004). Valtaosa asiakasryhmistä odottaa testausmenetelmiltä kvantitatiivista DON-määritystä, mutta myös *Fusarium*-homeiden kvantitatiivista määrittämistä pidetään hyödyllisenä joissakin sovelluksissa. Tällainen alue on esim. maltaan ja oluen valmistus, koska saastunut vilja voi tuottaa haitallisia määriä mykotoksiineja lopputuotteeseen ja toisaalta punahomeiden tuottamien hydrofobiinien (Sarlin ym., 2005b) on todettu aiheuttavan kuohuntaa oluen valmistusprosessissa. Mallasohralla ostopäätös perustuu jo nykyisin viljelijöiden lähettämiin

esinäytteisiin, joiden analyysiin PCR-määritys voitaisiin lisätä. Kvantitatiivisen PCR-menetelmän etuna perinteisiin menetelmiin verrattuna ovat määritysten nopeus ja automatisointimahdollisuudet, kohtuulliset käyttökulut sekä se, että useita eri lajeja voi tutkia samalla kertaa, mutta määrittäislaitteen ostaminen on kallis kertainvestointi. Merkittävien asiakasryhmä ainakin toistaiseksi Euroopassa ja Pohjois-Amerikassa ovat tutkimusryhmät ja palvelulaboratoriot. Lähivuosina uusiksi asiakasryhmiksi voivat nousta mallasteollisuus sekä kasvinjalostusyhtiöt.

## **Kirjallisuus:**

- Bottalico, A. and Perrone, G.** 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 108: 611-624.
- Commission of the European Communities** 2004. Draft SANCO/00006/2004-rev6-updated, Brussels, Belgium.
- Jestoi, M., Paavanen-Huhtala, S., Uhlig, S., Rizzo, A. and Yli-Mattila, T.** 2004. Mycotoxins and cytotoxicity of Finnish *Fusarium* strains grown on rice cultures. In: Canty SM, Boring T, Wardwell J and Ward RW (Eds.), *Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Symposium on Fusarium Head Blight; incorporating the 8<sup>th</sup> European Fusarium seminar*; 2004, 11-15; Orlando, FL, USA. Michigan State University, East Lansing, MI. pp. 405-409
- Jestoi, M., Paavanen-Huhtala, S., Parikka, P. & Yli-Mattila, T.** 2005. In vitro and in vivo mycotoxin production of *Fusarium* species isolated from Finnish grains. *Agricultural and Food Research* (submitted).
- Klemsdal, S.S., Elen, O., Paavanen-Huhtala, S., Sarlin, T., Jestoi, M., Rizzo, A., Parikka, P., Hofgaard, I.S. & Yli-Mattila, T.** 2005. Quantitative real-time detection of trichothecene producing *Fusarium* spp. and *Fusarium avenaceum* in cereal samples. *European Journal of Plant Pathology* (submitted).
- Sarlin, T., Yli-Mattila, T., Jestoi, M., Rizzo, A., Paavanen-Huhtala, S. & Haikara, A.** 2005a. Real-time PCR for quantification of toxigenic *Fusarium* species in barley and malt. *European Journal of Plant Pathology* (submitted)
- Sarlin, T., Nakari-Setälä, T., Linder, M., Penttilä M. & Haikara A.** 2005b. Fungal hydrophobins as predictors of the gushing activity of malt. *Journal of the Institute of Brewing* 111: 105-111.
- Taylor, E.J.A., Stevens, E.A., Bates, J.A., Morreale, D., Lee, D., Kenyon, D.M. & Thomas, J.E.** 2001. Rapid-cycle PCR detection of *Pyrenophora graminea* from barley seed. *Plant Pathology* 50: 347-355
- Waalwijk, C., van der Heide, R., de Vries, I., van der Lee, T., Schoen, C., Costrel-de Corainville, G., Häuser-Hahn, I., Kastelein, P., Köhl, J., Lonnet, P., Demarquet, T. & Kema, G.H.J.** 2004. Quantitative detection of *Fusarium* species in wheat using TaqMan. *European Journal of Plant Pathology* 110: 481-494.
- Yli-Mattila, T.** 2004. Kvantitatiivinen PCR-pikamääritysmenetelmä viljojen *Fusarium*-homeille. – Pikafus-Tekes-projektiin loppuraportti (No. 40168/03).
- Yli-Mattila, T., Paavanen-Huhtala, S., Parikka, P., Hietaniemi, V., Jestoi, M. & Rizzo, A.** 2004a. Toxigenic fungi and mycotoxins in Finnish cereals. In: Logrieco A and Visconti A (eds) *An overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe*. (pp. 83-100) Kluwer Academic Publishers, The Netherlands
- Yli-Mattila, T., Paavanen-Huhtala, S., Parikka, P., Hietaniemi, V., Jestoi, M. & Rizzo, A.** 2004b. Real-time PCR detection and quantification of *Fusarium poae* as compared to mycotoxin production in grains in Finland. In: Canty SM, Boring T, Wardwell J and Ward RW (Eds.), *Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Symposium on Fusarium Head Blight; incorporating the 8<sup>th</sup> European Fusarium seminar*; 2004, 11-15; Orlando, FL, USA (pp. 422-425). Michigan State University, East Lansing, MI.
- Yli-Mattila, T., Paavanen-Huhtala, S., Parikka, P., Hietaniemi, V., Jestoi, M., Gagkaeva, T., Sarlin, T., Haikara, A., Laaksonen, S. & Rizzo, A.** 2005a. Real-time PCR detection and quantification of *Fusarium poae*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae* as compared to mycotoxin production in grains in Finland and Russia *European Journal of Plant Pathology* (submitted).
- Yli-Mattila, T., Paavanen-Huhtala, S., Parikka, P., Jestoi, M., Klemsdal, S. & Rizzo, A.** 2005b. Genetic variation, metabolites and mycotoxins of *Fusarium avenaceum* and related species. *Mycotoxin Research* (submitted)