

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2013

Säde Harhio

FUSARIUM-SIENEN MÄÄRITTÄMINEN VILJA- AINEISTOSTA Q-PCR MENETELMÄLLÄ



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikka | Biotekniikka

2013 | 54 sivua

Ohjaajat: Kai Rosenberg (FK), Kirsi Peltoniemi (FT)

Säde Harhio

FUSARIUM-SIENEN MÄÄRITTÄMINEN VILJA-AINEISTOSTA Q-PCR MENETELMÄLLÄ

Fusarium on homesienisuku, johon kuuluvia lajeja esiintyy monilla kasvilajeilla, kuten viljoilla. Viljoille *Fusarium*-sienet aiheuttavat erilaisia tauteja ja osa lajeista tuottaa myös mykotoksiineja eli sienimyrkkyjä. Toksiinit ovat ihmisille haitallisia ja niille on tämän takia määritetty EU:ssa korkein sallittu pitoisuus. Yksi yleisimmistä *Fusarium*-sienten tuottamista mykotoksiineista on deoksinivalenoli (DON). *Fusarium*-sienet ovat enenevässä määrin ongelma osittain johtuen niille suotuisista ilmasto-olosuhteista etenkin sateisina kesinä.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli sisäanjaa ja testata menetelmä *Fusarium*-sienen määrittämiseen viljoissa Bio-Radin iCycler laitteella. Työ tehtiin Boreal Kasvinjalostus Oy:lle alustavaksi menetelmäksi olemassaolevien vilja-lajikkeiden *Fusarium*-kestävyyteen liittyvissä tutkimuksissa. Työssä käytettiin aikaisemmissa tutkimuksissa käytettyjä *Fusarium graminearum* ja *Fusarium culmorum* -lajispesifisiä alukkeita ja koettimia. Työssä hyödynnettiin hydrolyysiin perustuvaa TaqMan-koetinta. Tutkittavat jauhönäytteet olivat peräisin MTT:ltä, jossa niiden DON-pitoisuus mitattiin kemiallisesti. Näytteet valikoitiin niiden DON-pitoisuuden perusteella. Jokainen näyte sisälsi DON-toksiinia pitoisuuden ollessa välillä 28 - 2600 µg/kg.

Kokeissa mitattiin onnistuneesti *Fusarium graminearum* -lajin pitoisuuksia kaurassa, ohrassa ja vehnässä. Tarkoituksena oli myös tarkastella *Fusarium*-DNA-pitoisuuden ja DON-toksiinin korrelaatiota. Kokeissa havaittiin positiivinen korrelaatio DON-pitoisuuden ja *Fusarium graminearum*-DNA-pitoisuuden välillä. Menetelmää on mahdollista käyttää alustavissa *Fusarium*-kestävyyteen liittyvissä tutkimuksissa, mutta menetelmän ollessa verrattain hidas ja hintava on tarve tehokkaammalle menetelmälle.

ASIASANAT:

Q-PCR, Deoksinivalenoli, TaqMan, *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

2013 | 54 pages

Instructors: Kai Rosenberg (M.Sc.), Kirsi Peltoniemi (Ph.D.)

Säde Harhio

QUANTIFICATION OF *FUSARIUM* IN GRAIN MATERIAL BY Q-PCR

Fusarium is a large genus of fungi which infect several species of plants including different grains. *Fusarium* may cause several different illnesses in grains and some *Fusarium* species also produce mycotoxins. The toxins are harmful to humans, wherefore the European Union has defined the maximum level of some mycotoxins in grains. One of the most common mycotoxins is deoxynivalenol (DON). *Fusarium* causes more problems now than ever before, partly because the weather conditions are beneficial to their growth and mycotoxin production.

The aim of this thesis was to introduce and test a method of quantitating *Fusarium* in grains by Q-PCR using Bio-Rad's iCycler Q-PCR device. The project was commissioned by Boreal Plant Breeding Ltd. and its purpose was to be able to use the method in analysis of resistance of existing grain breeds against *Fusarium*. The *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* species specific primers used in this thesis were ones used in previously published studies. TaqMan hydrolysis probes were utilised. The grain flour samples used in this thesis were obtained from MTT, where their DON concentration was chemically quantified. The samples were selected by their DON concentration. Every sample contained between 28 and 2600 µg/kg of DON toxin

The concentration of *Fusarium graminearum* was successfully quantified in oat, barley and wheat samples. The correlation between the *Fusarium* DNA and DON concentrations of *Fusarium* was also examined. A positive correlation between the DNA and DON concentrations of *Fusarium* was discovered. It is possible to use this method for analysis of resistance against *Fusarium*, but it is a relatively slow and expensive method, which creates a need for a more efficient one.

KEYWORDS:

Q-PCR, Deoxynivalenol, TaqMan, *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET	8
1 JOHDANTO	9
2 <i>FUSARIUM</i>	11
3 DEOKSINIVALENOLI	13
4 REAALIAIKAINEN KVANTITATIIVINEN PCR	14
4.1 SYBR Green	14
4.2 TaqMan	16
4.3 Bio-Rad iCycler	19
5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	21
5.1 Näytteet	21
5.2 DNA:n eristys ja DNA pitoisuuden mittaaminen	22
5.3 Alukkeet ja koettimet	22
5.4 Aluketestit	23
5.5 Q-PCR, SYBR green testit	24
5.6 Q-PCR, TaqMan-testit	25
5.7 <i>Fusarium</i> -sienten määrittäminen	28
6 TULOKSET JA TARKASTELU	29
6.1 Alukkeiden toimivuus	29
6.2 SYBR green testit	30
6.3 TaqMan testit	35
6.4 <i>Fusarium</i> -sienen määrittäminen	36
7 LOPPUPÄÄTELMÄT	41
LÄHTEET	42
LIITTEET	

LIITTEET

- Liite 1. Taulukko 9. Näytteiden DON-pitoisuudet
Liite 2. Taulukko 10. Näytteiden kokonais-DNA-pitoisuudet
Liite 3. Taulukko 11. *Fusarium graminearum* Q-PCR tulokset
Liite 4. Taulukko 12. *Fusarium culmorum* Q-PCR tulokset

KUVAT

- Kuva 1. Deoksinivalenolin kemiallinen rakenne (EFSA 2004) 13
- Kuva 2. SYBR Greenin toiminta: SYBR Green molekyylit kiinnittyvät vain kaksijuosteiseen DNA:han ja alkavat fluoresoida. (Kuzdraliński 2011) 15
- Kuva 3. TaqManin toiminta. Aluksi koetin (vihreä) kiinnittyy DNA-juosteeseen. Kun Taq-polymeraasientsyymi jatkaa samaan juosteeseen kiinnittyneitä alukkeita tehden DNA:sta kaksijuosteista se samalla irrottaa sekä reportterimolekyylin (lamppu) että vaimentajamolekyylin (Q) koetinmolekyylistä. Reportterimolekyylillä alkaa tällöin fluoresoida. (Bustin ym. 2005, 367 [osa kuvasta]) 18
- Kuva 4. *F. culmorum* -spesifisen koettimen optimoimiseksi tehty lämpötilagradientti TaqMan Q-PCR. 27
- Kuva 5. *F. culmorum* ja *F. graminearum* -lajispesifisten alukkeiden PCR geelielektroforeesiajo. Vasemmalla puoliskolla on neljä kauranäytettä sekä puhtaat *F. culmorum* ja *F. graminearum* näytteet *F. culmorum* -spesifisillä alukkeilla monistettuna. Oikealla puoliskolla on samat neljä kauranäytettä sekä puhtaat *F. culmorum* ja *F. graminearum* näytteet *F. graminearum* -spesifisillä alukkeilla monistettuna. Asteikkona 100 bp ladderit. 30
- Kuva 6. *F. culmorum* -spesifisen SYBR Green Q-PCR menetelmän kynnysykykäyrä. Vasemmalla violetinsävyiset (vaalea 40 ng, tumma 20 ng) käyrät osoittavat puhtaita *F. culmorum* näytteitä, ruskea osoittaa reaktion, jossa näytteen tilalla on vettä, turkoosi osoittaa puhdasta *F. graminearum* -DNA:ta sisältävän näytteen ja loput osoittavat viljoista eristettyjä näytteitä. 31
- Kuva 7. *F. graminearum* -spesifisen SYBR Green Q-PCR menetelmän kynnysykykäyrä. Turkoosi (55 ng), pinkki (5 ng) sekä tummansininen (0,5 ng) käyrä osoittavat puhdasta *F. graminearum* -DNA:ta sisältävät näytteet, lopussa nouseva sininen käyrä osoittaa näytteen sijasta vettä sisältävän reaktion, vihreä osoittaa puhdasta *F. culmorum* -DNA:ta sisältävän näytteen ja loput käyrät osoittavat viljoista eristettyjä näytteitä. 31
- Kuva 8. *F. culmorum* -spesifisillä alukkeilla saatujen tuotteiden sulamiskäyrä SYBR Green Q-PCR menetelmällä. Violetinsävyiset käyrät osoittavat puhtaita *F. culmorum* näytteitä, ruskea osoittaa reaktion, jossa näytteen tilalla on vettä, turkoosi osoittaa puhdasta *F. graminearum* -DNA:ta sisältävän näytteen ja loput osoittavat viljoista eristettyjä näytteitä. 32
- Kuva 9. *F. graminearum* -spesifisillä alukkeilla saatujen tuotteiden sulamiskäyrä SYBR Green Q-PCR menetelmällä. Turkoosi, pinkki sekä tummansininen käyrä osoittavat puhdasta *F. graminearum* -DNA:ta sisältävät näytteet, lopussa nouseva sininen käyrä osoittaa näytteen sijasta vettä sisältävän reaktion, vihreä osoittaa puhdasta *F. culmorum* -DNA:ta sisältävän näytteen ja loput käyrät osoittavat viljoista eristettyjä näytteitä. 32

- Kuva 10. *F.graminearum* -spesifisen Q-PCR menetelmän SYBR green -värjätyn lopputuotteen geelielektroforeesiajo TAE-geelillä. Kyseessä on Q-PCR testien tuloksena tulleet näytteet eli puhdasta *F. graminearum* -DNA:ta sisältävät näytteet (S1, S2, S3), neljä kaurasta eristettyä näytettä sekä puhdasta *F. culmorum* -DNA:ta sisältävä kontrolli sekä vettä sisältävä kontrolli. Geelin molemmilla puoliskoilla on täsmälleen samat näytteet, mutta vasemmalle puoliskolle pipetoitiin 6 µl ja oikealle puoliskolle 3 µl. Asteikkona 100 bp ladderit. 33
- Kuva 11. *F. culmorum* -spesifisen Q-PCR menetelmän SYBR green -värjätyn lopputuotteen geelielektroforeesiajo TAE-geelillä. Kyseessä on Q-PCR testien tuloksena tulleet näytteet eli vettä sisältävä kontrolli, puhdasta *F. culmorum* -DNA:ta sisältävät näytteet (S1, S2), neljä kaurasta eristettyä näytettä sekä puhdasta *F. graminearum* -DNA:ta sisältävä kontrolli. Geelin molemmilla puoliskoilla on täsmälleen samat näytteet, mutta vasemmalle puoliskolle pipetoitiin 6 µl ja oikealle puoliskolle 3 µl. Asteikkona 100 bp ladderit. 34
- Kuva 12. *F. graminearum* -spesifisen koettimen testiajon tulos. Vaalea sininen ja pinkki osoittavat puhdasta *F. graminearum* -DNA:ta sisältävät näytteet, violetti osoittaa vesinäytteen ja turkoosi, tummansininen sekä ruskea osoittavat viljoista eristetyt näytteet. 35
- Kuva 13. *F. culmorum* -spesifisen koettimen TaqMan Q-PCR tulos Taulukon 8. mukaisella ohjelmalla. Punainen osoittaa puhdasta *F. culmorum* -DNA:ta sisältävän näytteen. Muut osoittavat vettä sisältävän näytteen, puhdasta *F. graminearum* -DNA:ta sisältävän näytteen sekä yhden viljasta eristetyn näytteen. 36

KUVIOT

- Kuvio 1. 6-FAM molekyylin eksitaatio- ja emissiospektrit. (Exiqon) 17
- Kuvio 2. TAMRA eksitaatio- ja emissiospektri. (Biosearch Technologies [osa kuvasta]) 17
- Kuvio 3. Kaksijuosteiseen DNA:han kiinnittyneen SYBR Green I tuottama eksitaatio- ja emissiospektrit. (Hoffmeier 2006) 20
- Kuvio 4. DON-arvon korrelaatio *F. graminearum* -pitoisuuteen. 38
- Kuvio 5. DON-arvon korrelaatio *Fusarium culmorum* -pitoisuuteen. 38
- Kuvio 6. DON-arvon korrelaatio *F. culmorumin* ja *F. graminearumin* yhteenlaskettuun pitoisuuteen. 38
- Kuvio 7. *F. graminearum* –lajispesifisellä Q-PCR menetelmällä mitatut *F. graminearum*-lajin DNA-laimennussarjojen kynnysykylien keskiarvot eri ajokerroilla. 39
- Kuvio 8. *F. culmorum* –lajispesifisellä Q-PCR menetelmällä mitatut *F. culmorum*-lajin DNA-laimennussarjojen kynnysykylien keskiarvot eri ajokerroilla. 40

TAULUKOT

Taulukko 1. QPCR alukkeet ja koettimet	23
Taulukko 2. Auke-testeissä käytetty reaktioseos yhtä reaktiota kohti	23
Taulukko 3. SYBR Green Q-PCR monistusten reaktioseos yhtä reaktiota kohtaan.	24
Taulukko 4. Testeissä käytetty Q-PCR monistusten ajo-ohjelma	25
Taulukko 5. TaqMan Q-PCR monistusten reaktioseos yhtä reaktiota kohtaan.	26
Taulukko 6. TaqMan <i>Fusarium graminearum</i> Q-PCR monistusten ajo-ohjelma	26
Taulukko 7. <i>Fusarium culmorum</i> -alukkeen optimointiin käytetty lämpötilagradienttiohjelma.	26
Taulukko 8. TaqMan <i>Fusarium culmorum</i> Q-PCR monistusten ajo-ohjelma	27
Taulukko 9. Näytteiden DON-pitoisuudet (Liite1)	
Taulukko 10. Näytteiden kokonais-DNA-pitoisuudet (Liite 2)	
Taulukko 11. <i>Fusarium graminearum</i> Q-PCR tulokset (Liite 3)	
Taulukko 12. <i>Fusarium culmorum</i> Q-PCR tulokset (Liite 4)	

KÄYTETYT LYHENTEET

PCR	Polymeraasiketjureaktio
Q-PCR	Reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR
Ct	Threshold cycle eli kynnysyksi
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer eli fluoresenssi-resonanssienergian siirto (Analyysi 2004, 9)
MTT	Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus
DON	Deoksinivalenoli, <i>Fusarium</i> -sienten tuottama myrkky
T-2	<i>Fusarium</i> -sienten tuottama myrkky
HT-2	<i>Fusarium</i> -sienten tuottama myrkky

1 JOHDANTO

Fusarium on homesienisuku, johon kuuluvia lajeja kutsutaan usein punahomeiksi niiden punaisen ulkonäön takia. *Fusarium* on yleinen monilla kasvilajeilla, ja aiheuttaa tuhoja etenkin viljapelloilla. Viljoille *Fusarium*-sienet aiheuttavat erilaisia tauteja, mutta osa lajeista tuottaa myös mykotoksiineja eli sienimyrkkyjä. Mykotoksiinit ovat ihmiselle haitallisia ja pitkäaikaisessa altistuksessa johtavat ainakin immuunivasteen heikentymiseen. Akuutissa myrkytyksessä voi esiintyä pahoinvointia, oksentelua ja vatsakipuja. Joillekin *Fusarium*-toksiineille on asetettu EU-lainsäädännössä enimmäispitoisuusrajat. *Fusarium*-toksiineja ovat esimerkiksi diasetoksiskirpenoli, deoksinivalenoli (DON), nivalenoli, zearalenoni sekä T-2 ja HT-2. (Evira 2008, Moradi ym. 2012)

Ympäristössä tapahtuneiden muutosten seurauksena *Fusarium*-tartunnat ovat yhä yleisempiä ja uudet lajit siirtyvät etelästä yhä pohjoisemmaksi. Lämpimät sateiset kesät ovat suotuisampia *Fusarium*-sienten kasvulle toisin kuin lämpimät ja kuivat kesät. Eri lajeilla on kuitenkin hieman erilaisia mieltymyksiä. *Fusarium*-sienten kasvun ja leviämisen myötä syntyy myös kasvinjalostuksessa tarve *Fusarium*-kestäville lajikkeille. *Fusarium*-lajien määrittämiseen on kehitelty Q-PCR menetelmiä, joiden avulla voidaan mitata *Fusarium*-sienten DNA:n määrä jauhetusta viljanjyvästä eristetystä DNA:sta. (Waalwijk ym. 2004; Yli-Mattila ym. 2008, Jalli ym. 2012)

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on testata ja sisäanjaa Q-PCR menetelmä *Fusarium*-sienten kvantitoimiseen Bio-Radin iCycler-Q-PCR-laitteella Boreal Kasvinjalostus Oy:lle. Sisäanjoon liittyy sekä laitteen tarkastus sekä viritys ja kalibrointi että menetelmään liittyvät testaukset. Tarkoituksena on myös tarkastella näytteiden *Fusarium*-DNA-pitoisuuden ja DON-pitoisuuden korrelaatiota, jotta pystytään päättämään voiko menetelmää käyttää viljan DON-pitoisuuden arvioimiseen. Mitattaviksi lajeiksi valikoitui kaksi Suomessa yleisintä DON-toksiinia tuottavaa *Fusarium*-lajia: *Fusarium graminearum* ja *Fusarium culmorum*. Alukkeet ja koettimet näille lajeille valikoitiin tieteellisistä julkaisuista. Koet-

timina käytettiin hydrolyysiin perustuvia TaqMan koettimia. (Waalwijk ym. 2004; Yli-Mattila ym. 2008)

Q-PCR-menetelmällä on tarkoitus alustavasti tarkastella Borealin jo olemassa-olevien lajikkeiden *Fusarium*-kestävyyttä, josta ei tällä hetkellä ole tarkkaa tietoa. Jalostuksen kannalta Q-PCR menetelmä ei ole tarpeeksi nopea, eikä kustannustehokas isoille näytemäärille, jonka vuoksi samaan aikaan kehitetään lähi-infrapunaspektrometriaan perustuvaa menetelmää.

2 FUSARIUM

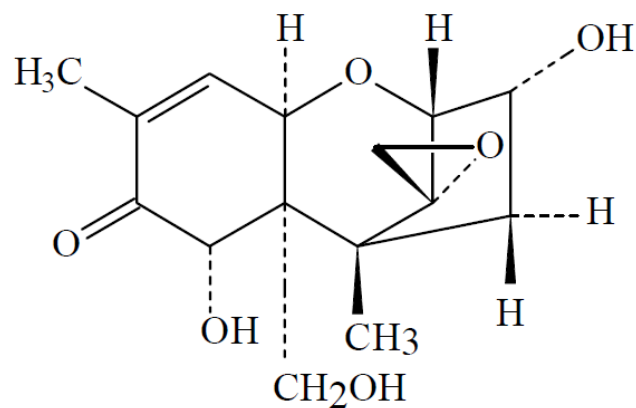
Kasvitaudit vievät vuosittain noin 10 % sadosta ja ne ovat koko ajan lisääntymässä. Muutokset lämpötilassa, kosteudessa ja ilman kaasupitoisuuksissa vaikuttavat suorasti ja epäsuorasti kasvuolosuhteisiin ja siten kasvin rakenteeseen ja sen alttiuteen kasvitaudeille. Samat muutokset vaikuttavat myös taudinaiheuttajien kuten *Fusarium*-lajien kasvuun ja kehitykseen. Taudinaiheuttajat pystyvät yleensä kehittymään isäntälajeja nopeammin, jolloin muutokset olosuhteissa suosivat kasvitauteja isäntäkasvien sijaan. (Jalli ym.)

Fusarium-sienet aiheuttavat kasvitauteja, joihin kuuluvat erilaiset juuristo- ja tyvitaudit, sekä tähkävioitukset. *Fusarium*-lajien tartuntaa suosivat sateinen ja kostea sää tähkänmuodostuksen aikana ja tartuntaa ja toksiininmuodostusta voivat edistää lämpimät kelit. Toksiininmuodostukseen vaikuttaa myös sateen ajankohta enemmän kuin sateen määrä. Myös lakovilja, puutteellinen viljelykierto ja runsas kasvijäte edistävät *Fusarium*-tartuntoja. Osa *Fusarium*-lajeista tuottaa myös merkittäviä määriä mykotoksiineja, joita ovat esimerkiksi diasetoksis- kirpenoli, deoksinivalenoli (DON), nivalenoli, zearalenoni sekä T-2 ja HT-2. Deoksinivalenolille on määritelty EU:ssa korkein sallittu pitoisuus, joka käsittelemättömässä kaurassa on 1750 µg/kg ja muilla käsittelemättömillä viljoilla (paitsi durumvehnä ja maissi) 1250 µg/kg. DON-toksiinille on määritetty EU:n Elintarvikealan tiedekomiteassa myös siedettävät päivittäiset enimmäissaantimäärät, eli määrät, jotka eivät aiheuta haittavaikutuksia ravinnosta saatuna. 25-74 vuotiaille naisille ja miehille suurin suositeltu DON-määrä on 1 µg jokaista painokiloa kohti. Eviran 2008 toteutetun tutkimuksen mukaan 25-74 vuotiaiden naisten DON-toksiinin päivittäinen saanti on 5,4 µg henkilöä kohden ja vastaavasti miehillä 6,3 µg. Viljojen suurkuluttajille vastaavat määrät olivat naisille 12,4 µg ja miehille 15,3 µg. (EFSA 2004; Evira 2008)

Merkittävimpiä DON-toksiinia tuottavia lajeja Suomessa ovat *Fusarium graminearum* ja *Fusarium culmorum*. *Fusarium*-lajien esiintyminen määräytyy vahvasti lämpötilojen mukaan. *F. culmorumin* optimaalinen kasvulämpötila on 21 °C ja *F. graminearumin* 25 °C. Aikaisemmin *F. culmorum* on ollut hallitseva DON-toksiinin tuottaja Suomessa, mutta viime vuosina *F. graminearum* on syrjäyttänyt sitä. (Jalli ym.; Evira 2008; Yli-Mattila ym. 2011) *F. graminearumin* on todettu olevan erittäin aggressiivinen taudinaiheuttaja, jonka määrä on myös kytköksissä taudin asteeseen toisin kuin *F. culmorum*. *F. graminearum*-sienen määrän on myös todettu korreloivan deoksinivalenolin määrän suhteen, mutta *F. culmorumin* määrän ja DON-pitoisuuden välillä ei ole havaittu samanlaista positiivista korrelaatiota. (Moradi ym. 2010)

3 DEOKSINIVALENOLI

Deoksinivalenoli on mykotoksiini, jota tuottavat erityisesti *F. culmorum* ja *F. graminearum*. DON on B-tyyppin trikotekeeni. Trikotekeenit ovat nelirenkaisia seskviterpeenejä. B-tyyppin tunnusmerkki on C-8 sitoutunut karbonyyliryhmä. (Kuva 1.) DON on yleisin trikotekeeni ja sitä esiintyy joka puolella maailmaa. DON-toksiineja esiintyy yleisesti vehnässä, rukiissa, kaurassa, ohrassa, maisissa ja toisinaan riisissä, tritikaalissa ja durrassa. DON kestää korkeita lämpötiloja, kiteytyy värittömäksi neulamaiseksi rakenteeksi ja liukenee veteen ja joihinkin polaarisiin liuottimiin, kuten metanoliin, asetonitriliin ja etyyliasetaattiin. (EFSA 2004; Evira 2008)



Kuva 1. Deoksinivalenolin kemiallinen rakenne (EFSA 2004)

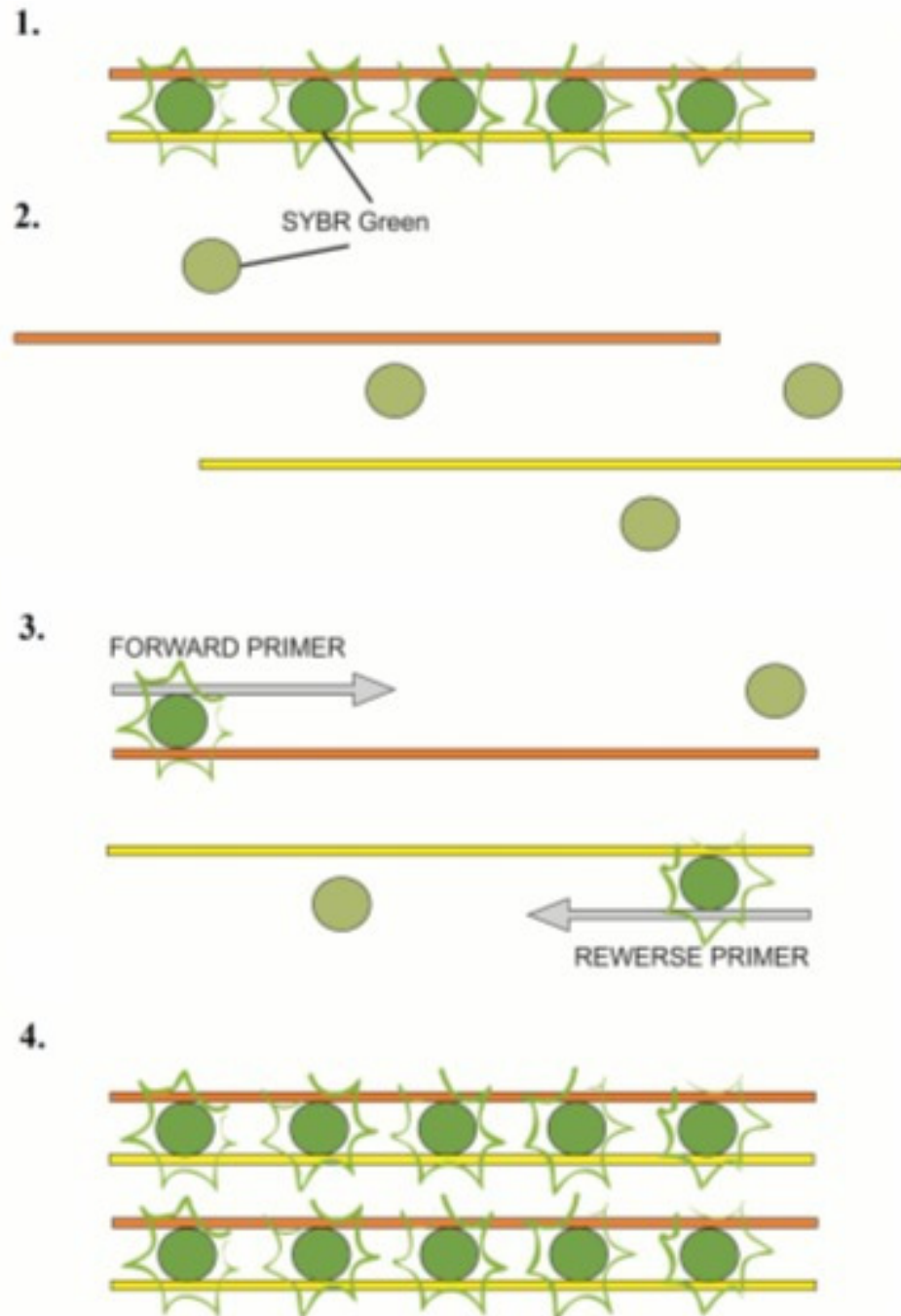
Deoksinivalenolilla on eläinkokeiden perusteella todettu olevan mahdollisia terveydellisiä haittavaikutuksia. Vaikutukset vaihtelevat altistumisen keston mukaan. Suuresta lyhytaikaisesta altistumisesta voi seurata ruokahaluttomuutta, oksentelua, pahoinvointia, huimausta, ripulia, päänsärkyä ja ruuansulatuselimistön häiriöitä, sekä ruuansulatuselimistön solujen vaurioitumista. Pitkäaikaisessa altistuksessa kuitenkin seurauksena on elimistön vastustuskyvyn aleneminen. Koe-eläimillä sekä lyhytkestoinen että pitkäkestoinen altistus heikensivät kasvua. Deoksinivalenoli aiheuttaa suuria määriä ruokamyrkytyksiä Aasian maissa. (WHO 2002; EFSA 2004; Evira 2008)

4 REAALIAIKAINEN KVANTITATIIVINEN PCR

Reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR eli Q-PCR eroaa tavallisesta PCR reaktios-
ta vain siten, että mukana on fluoresenssia tuottavia molekyyliä, joiden fluore-
senssia seurataan reaktion edetessä. Fluoresenssi syntyy kun aine absorboi
lyhyen aallonpituuden omaavaa korkeaaenergistä valoa ja säteilee tämän seura-
uksena pitkän aallonpituuden omaavaa matalaenergistä valoa. (Behlke ym.
2005) Q-PCR laitteeseen siis kuuluu myös kamera, joka detektoi fluoresenssin
määrää näytteessä, sekä ohjelmisto, joka piirtää fluoresenssisignaalin mukaan
kuvaajaa, ja jonka avulla voi tulkita tuloksia. Tavallisesti fluoresenssi kasvaa
suhteessa DNA:n määrän kasvuun, jolloin saadaan kuvaaja, jossa näkyy eks-
ponentiaalisen kasvun vaihe jyrkästi nousevana käyränä. Kun kuvaaja alkaa
nousta jyrkästi ja fluoresenssin määrä nousee yli taustafluoresenssin, on sen
PCR-syklin kohdalla näytteen kynnyssykli. Tämän kynnyssyklin ja standar-
disuoran avulla voidaan laskea näytteen alkuperäinen DNA-pitoisuus. Näyttei-
den kynnyssykleihin vaikuttavat esimerkiksi käytetyt reagenssit ja Q-PCR laite,
joten eri mittausten kynnyssyklejä (Ct) ei voi suoraan verrata toisiinsa. Jokai-
sessa reaktiossa on siis syytä olla oma standardisuora, jotta tulokset ovat kes-
kenään vertailukelpoisia. (Eurogentec)

4.1 SYBR Green

SYBR Green on fluoresoiva reporterimolekyyli, joka kiinnittyy kaksijuosteiseen
DNA:han ja alkaa tällöin fluoresoida. (Kuva 2.) SYBR Green ei siis ole spesifi-
nen, koska se kiinnittyy kaikkeen kaksijuosteiseen DNA:han, joten myös esi-
merkiksi alukedimeerit ja muut epäspesifiset tuotteet näkyvät monistuskäyräs-
sä. Alukedimeerit ovat hallitsevimpia templaattia sisältämättömissä näytteissä,
sekä näytteissä, jotka sisältävät vähän kohde-DNA:ta. (LifeTechnologies Corpo-
ration, 2011)



Kuva 2. SYBR Greenin toiminta: SYBR Green molekyylit kiinnittyvät vain kaksijuosteiseen DNA:han ja alkavat fluoresoida. (Kuzdraliński 2011)

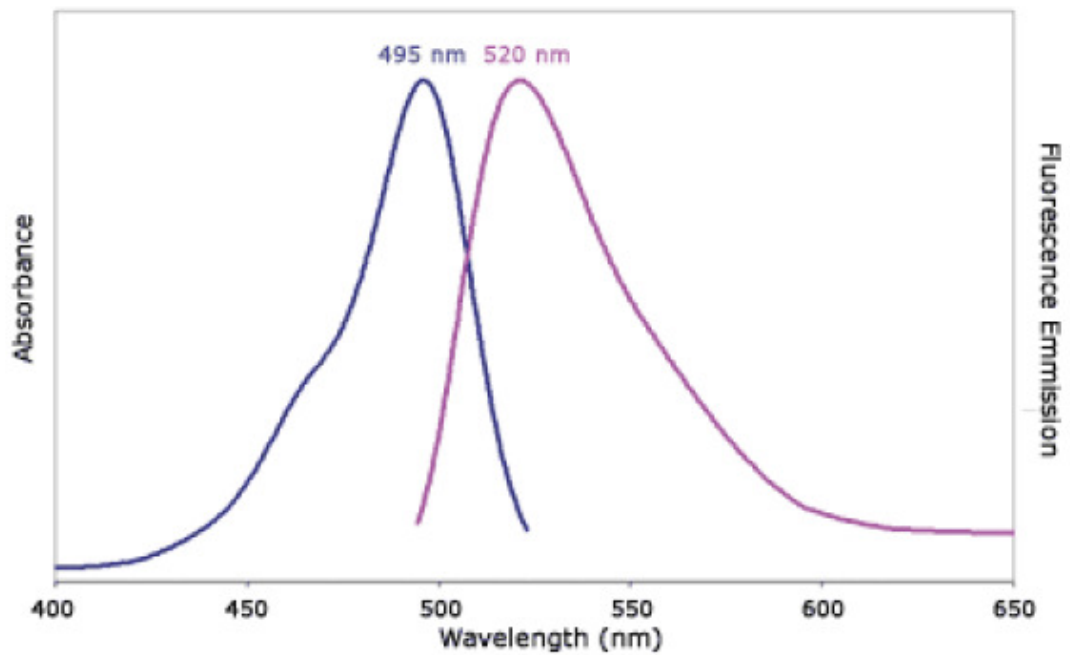
SYBR Greeniä käytettäessä on syytä sisällyttää Q-PCR-ohjelmaan myös sulamiskäyrä, sillä eri tuotteilla on erilainen rakenne ja täten erilainen sulamispiste. Käytännössä sulamiskäyrässä verrataan lämpötilaa fluoresenssisignaaliin. Aluksi kaikki DNA on kaksijuosteisessa muodossa. Sulamiskäyrää tehtäessä

lämpötilaa nostetaan pikkuhiljaa kunnes DNA-juosteet ovat irronneet toisistaan. Kun lämpötila alkaa nousta rakenteen sulamispisteen kohdalle, DNA-juosteet alkavat irrota toisistaan. Sulamispisteen kohdalla puolet DNA-juosteista ovat erkaantuneet ja fluoresenssisignaali muodostaa piikin sulamiskäyrälle. Sulamiskäyrän avulla voidaan siis päätellä lopputuotteen puhtausaste. (Bustin ym. 2005)

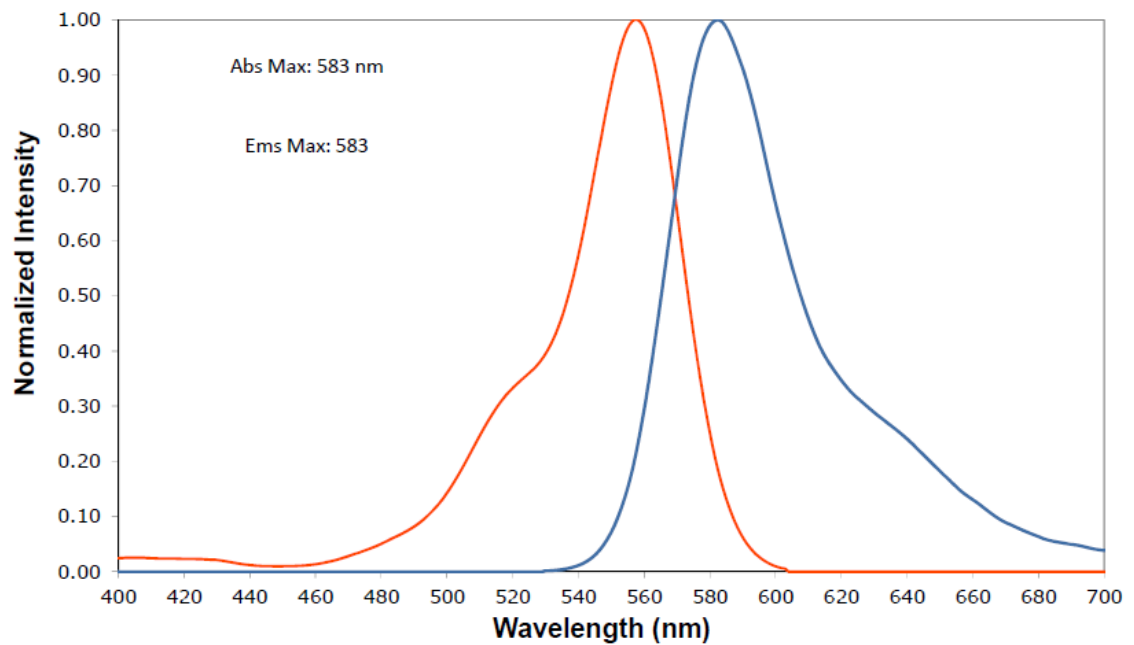
4.2 TaqMan

TaqMan on koetin, jonka toiminta perustuu koetinmolekyylin sitoutumiseen haluttuun DNA:han, mikä puolestaan aiheuttaa fluoresenssin nousun. TaqMan molekyylin on oltava rakenteeltaan sellainen, että se sitoutuu spesifisesti vain halutun kohteen DNA:han. Tämän lisäksi koettimen 5'-pää on merkitty fluoresoivalla molekyylillä (esimerkiksi FAM) ja 3'-pää on merkitty vaimentajamolekyylillä (esimerkiksi TAMRA), jonka ei välttämättä tarvitse olla fluoresoiva. Fluoresoinnin sijaan niin sanotut pimeät vaimentajat voivat esimerkiksi tuottaa lämpöä. (Sigma-Aldrich; Bustin ym. 2005; Behlke ym. 2005)

Reportterimolekyylit ja vaimentajat muodostavat yhdessä niin sanotun FRET-parin (Fluorescence Resonance Energy Transfer), eli fluoresenssiresonanssienergian siirtoparin. Tämä viittaa energian siirtoon lähellä toisiaan olevien molekyylin kesken. Tästä johtuen reportterimolekyylit absorboi valoa, mutta lähellä sijaitseva vaimentajamolekyylit absorboi reportterimolekyylin energian. Tämän seurauksena reportterimolekyylit ei fluoresoi (tai fluoresoi hyvin vähän), ja sen sijaan vaimentajamolekyylit fluoresoi, tai tuottaa lämpöenergiaa riippuen vaimentajasta. Tämän toimimiseksi reportterimolekyylin on kuitenkin tuotettava energiaa aallonpituudella, jolla vaimentaja absorboi. Fluoresoivaa vaimentajaa käytettäessä on myös varmistuttava siitä, että fluoresoivan reportterimolekyylin ja vaimentajamolekyylin fluoresenssit eivät tuota valoa samalla aallonpituudella, minkä seurauksena laite tunnistaisi vaimentajamolekyylin fluoresenssin reporterina. Esimerkki toimivasta parista on FAM reportterimolekyylinä ja TAMRA vaimentajana. (Kuviot 1. ja 2.) (Sigma-Aldrich; Behlke ym. 2005)

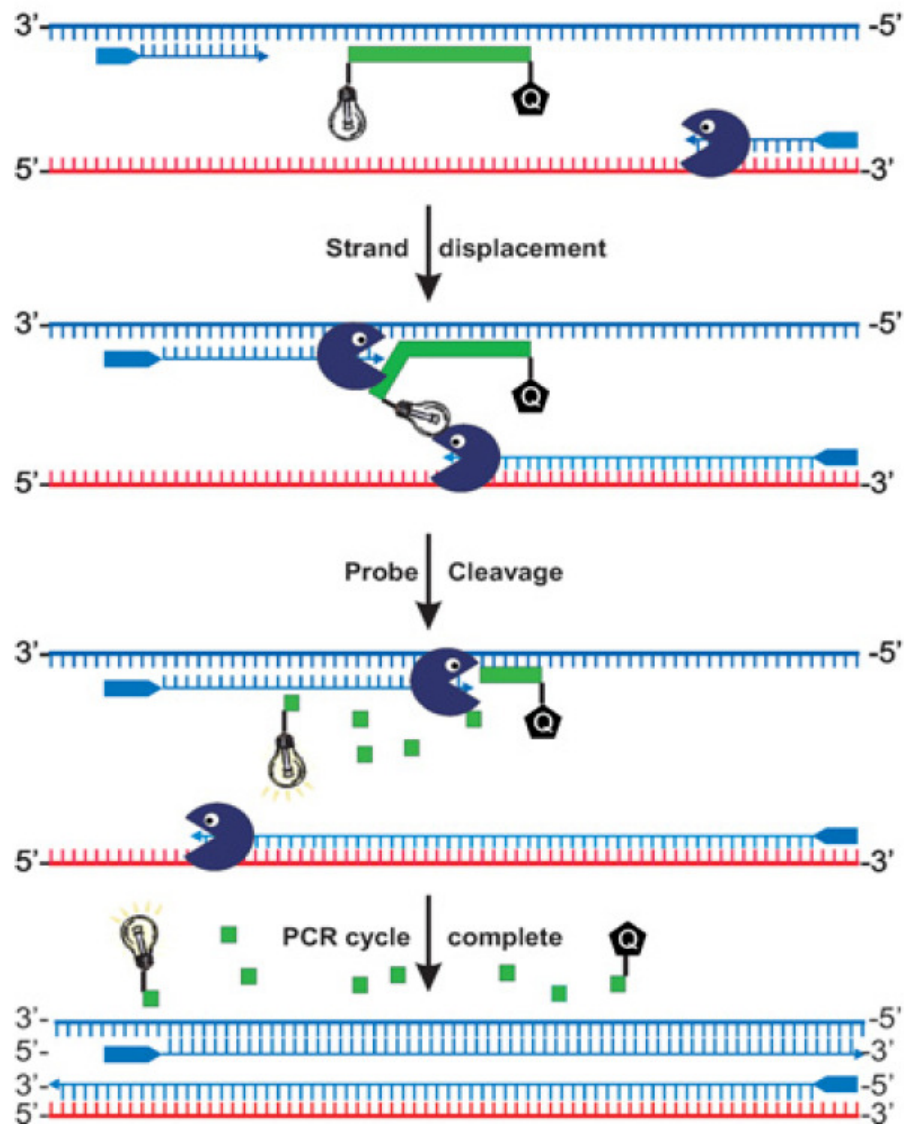


Kuvio 1. 6-FAM molekyylin eksitaatio- ja emissiospektrit. (Exiqon)



Kuvio 2. TAMRA eksitaatio- ja emissiospektri. (Biosearch Technologies [osa kuvasta])

TaqMan molekyyli sitoutuu spesifiseen DNA juosteeseen PCR:n aikana. Aluksi vaimentajamolekyyli vaimentaa reportterimolekyylin fluoresenssin, jolloin taustafloresenssi jää pieneksi. PCR:n edetessä Taq-polymeraasientsyymi ”leikkaa” sekä reportterimolekyylin että vaimentajamolekyylin irti koettimesta, jolloin energiansiirto loppuu. Tällöin reportterimolekyyli alkaa fluoresoida ja laite mittaa fluoresenssin nousun (kuva 3). (Eurogentec; Bustin ym. 2005)



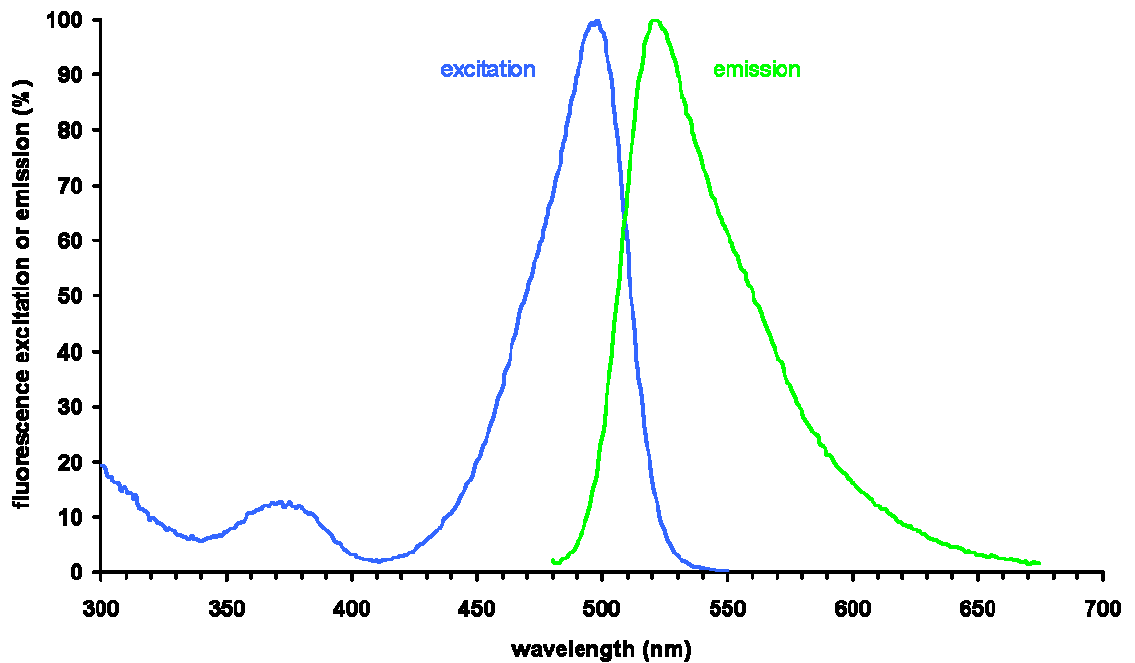
Kuva 3. TaqManin toiminta. Aluksi koetin (vihreä) kiinnittyy DNA-juosteeseen. Kun Taq-polymeraasientsyymi jatkaa samaan juosteeseen kiinnittyneitä alukkeita tehden DNA:sta kaksijuosteista se samalla irrottaa sekä reportterimolekyylin (lamppu) että vaimentajamolekyylin (Q) koetinmolekyylistä. Reportterimolekyyli alkaa tällöin fluoresoida. (Bustin ym. 2005, 367 [osa kuvasta])

Reaktio toimii vain yhteen suuntaan, joten sulamiskäyrän luominen ei ole mahdollista. Sulamiskäyrän luomisen ei pitäisi olla myöskään tarpeellista, sillä vaikka reaktiossa olisikin epäpuhdasta DNA:ta, koettimen pitäisi olla niin spesifinen, ettei se sitoudu muuhun kuin kohde DNA:han, jolloin epäpuhtaudet eivät näy tuloksissa. (Eurogentec; Bustin ym. 2005)

4.3 Bio-Rad iCycler

Työssä käytettävä laite on noin viisi vuotta käyttämättömänä ollut Bio-Rad iCycler -Q-PCR-laite. (Peltoniemi 2012) Laitteessa käytetään 96-kuoppalevyjä ja siihen on määritetty alueet (ns. maskit), joilta se mittaa jokaisesta kuopasta fluoresenssin erikseen. Alueen ulkopuolelle jäävää fluoresenssia ei mitata, vaan se katsotaan taustafluoresenssiksi. Laitteen ohjekirja suosittelee alueiden tarkistamista säännöllisin väliajoin ja kehottaa virittämään ne uudelleen, mikäli laitetta siirretään. (Bio-Rad)

Laitteen käyttämättömyyden seurauksena ei voida myöskään olla varmoja laitteen oikeasta kalibroinnista. Laite on kalibroitava uudelleen aina kun käytetään erilaista 96-kuoppalevyä, kansimateriaalia, eri näytetilavuutta, fluoroforia tai erilaista fluoroforiyhdistelmää. (Bio-Rad)



Kuvio 3. Kaksijuosteiseen DNA:han kiinnittyneen SYBR Green I tuottama eksitaatio- ja emissiospektrit. (Hoffmeier 2006)

Ennen fluoroforien valintaa oli myös tarkistettava mitkä filtrit on olemassa laitteeseen eli millä aallonpituuksilla fluoresoivia fluoroforeja voidaan laitteella mitata. Laitteessa on vain yksi filteripari: eksitaatiofilteri joka virittää alueella 480-500 nm ja emissiofilteri joka suodattaa detektorille aallonpituudet alueella 515-545 nm. (Bio-Rad) Valitut fluoroforit SYBR Green ja 6-FAM toimivat näillä alueilla (Kuvio 1. ja 3.). (Invitrogen; Metabion 2011)

5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Ennen kokeiden aloittamista oli varmistettava laitteen käytettävyys. Aluksi oli tarkistettava oikeiden suodattimien olemassaolo ja niiden oikea sijainti. Laitteen toimintakyvyn varmistamiseksi laitteelle tehtiin ”mask alignment” eli fluoresenssia mittaavien alueiden viritys käyttäen Bio-Radin iCycler iQ Calibrator Dye Solution Set:stä löytyvää External Well Factor -liuosta. Kyseinen toimenpide tehtiin laitteen ohjekirjan mukaan (iCycler iQ Real-Time PCR Detection System Instruction Manual). Laite myös kalibroitiin käyttäen Bio-Radin iCycler iQ Calibrator Dye Solution Set:stä löytyvää FAM kalibrintiliuosta. Laite kalibroitiin 20 µl näyttekoolle, Starlabin 96-kuoppalevyille ja Bio-Radin iCycler Optical Sealing Tape:lle. Myös tämä toimenpide tehtiin täysin ohjekirjan mukaan.

5.1 Näytteet

Työssä käytetyt viljanäytteet olivat suurimmaksi osaksi kauranäytteitä, mutta mukana oli myös muutamia vehnä- ja ohranäytteitä. Näytteet saatiin MTT:n viljojen hometoksiiniseurannasta ja ne oli kerätty eri puolilta Suomea. MTT:n Kasvintuotannon tutkimuksen laboratoriossa niistä oli ensin mitattu DON-pitoisuus akkreditoidulla kaasukromatografi-massaspektrometri-menetelmällä. Testiin otettiin mukaan näytteet, joiden DON-pitoisuus vaihteli 28 - 2600 µg/kg välillä (Liite 1.). MTT:n kasvintuotannon yksiköstä saatiin myös puhtaita *F. graminearum* ja *F. culmorum* DNA:ta, joita käytettiin standardisuorien tekoon ja kontrolleina.

5.2 DNA:n eristys ja DNA pitoisuuden mittaaminen

DNA eristettiin jauhetuista jyvänäytteistä, joka teki eristyksestä tavallista haastavampaa. Eristyksellä on myös suuri vaikutus tuloksiin, sillä jokaisen eristyksen DNA saanto ei ole aina sama. Tässä tapauksessa jokaisesta näytteestä voidaan myös saada erilaisessa suhteessa isäntäkasvin DNA:ta ja *Fusarium*-DNA:ta, sekä tietysti mahdollisia muiden jauhoista löytyvien eliöiden DNA:ta. Jokaisesta näytteestä tehtiin niin ollen kolme rinnakkaista eristystä.

Eristykseen käytettiin Qiagenin DNeasy Plant Mini Kittiiä. Jauhonäytettä punnittiin analyysivaa'alla 20 mg MpBio lysing matrix –putkeen, jonka jälkeen ohjeesta poiketen lisättiin lyysispuskuri ja hajotettiin näyte FastPrep FP120-laitteella 2x30 sekuntia. Tämän jälkeen annettiin näytteiden olla jäällä viisi minuuttia, jonka jälkeen hajotuskäsittely toistettiin. Loput tehtiin ohjeen mukaan. Viimeisessä vaiheessa käytettiin 2x100 µl eluointipuskuria. Sekä jauhönäytteitä että eristysistä säilytettiin -20 °C pakastimessa.

DNA-pitoisuudet määritettiin MTT:n NanoDrop ND-1000 -laitteella. Jokainen eristys mitattiin vähintään kahdesti mittaustuloksen varmistamiseksi.

5.3 Alukkeet ja koettimet

Mitattaviksi *Fusarium*-lajeiksi valikoituivat *Fusarium graminearum* ja *Fusarium culmorum*, niiden DON-toksiinin tuoton perusteella. Alukkeet ja koettimet näille lajeille valittiin kirjallisuudesta (Taulukko 1.). Alukkeiden 5'-pää merkittiin fluoresoivalla 6-FAM reportterimolekyylillä ja 3'-pää merkittiin fluoresoivalla TAMRA vaimentajamolekyylillä. Alukkeet tilattiin Sigma Aldrich:lta.

Taulukko 1. QPCR alukkeet ja koettimet

Laji	Aluke/koetin	Sekvenssi	Lähde
<i>Fusarium graminearum</i>	Forward	CTCCGGATATGTTGCGTCAA	(Yli-Mattila ym. 2008)
	Reverse	CGAAGCATATCCAGATCATCCA	
	Probe	TGAGAATGTCTTGAGGCAATGC- GAACTTT	
<i>Fusarium culmorum</i>	Forward	TCACCCAAGACGGGAATGA	Waalwijk ym. 2004)
	Reverse	GAACGCTGCCCTCAAGCTT	
	Probe	CACTTGGATATATTTCC	

5.4 Aluketestit

Alukkeiden toiminta testattiin aluksi tavallisella PCR:llä ja geielektroforeesilla. Tavoitteena oli nähdä tuottivatko alukkeet odotetunlaisen tuotteen. Reagenssit (Biotools) sekoitettiin aluksi Eppendorf-putkissa, jonka jälkeen seos ja näytteet pipetoitiin PCR-putkiin. Reaktioseos oli taulukon 2. mukainen. PCR ajo toteutettiin ThermoCycler-laitteella (Bio-Rad). Ajo-ohjelma oli taulukon 4. mukainen.

Taulukko 2. Aluke-testeissä käytetty reaktioseos yhtä reaktiota kohti

Komponentit	Tilavuus (µl)
Vesi	11,0
Puskuri (10x)	1,0
MgCl ₂ (50 mM)	1,0
dNTPs (10 mM)	10
Aluke Forward (20 pmol/µl)	0,5
Aluke Reverse (20 pmol/µl)	0,5
Taq	0,2
DNA (30 pmol/µl)	3

Geelielektroforeesi toteutettiin GelRed-värjätyllä 1,5 % TBE geelillä. Geeli ajettiin 70 voltilla yön yli. Näytteinä käytettiin MTT:ltä saatuja puhtaita *F. graminearum* ja *F. culmorum* DNA-näytteitä sekä kahta rinnakkaista eristystä kahdesta DONia sisältävästä kevätvehnästä eristetystä näytteestä.

5.5 Q-PCR, SYBR green testit

SYBR Green testeillä tutkittiin sekä laitteen toimintakykyä että alukkeiden toimintakykyä. Testien tarkoituksena oli ajaa suunniteltu ohjelma läpi ja varmistaa, että laite toimii odotetulla tavalla ja varmistaa, että laitteen detektointi toimii. Haluttiin myös varmistaa, että alukkeet monistavat spesifisesti odotetun kokoisen tuotteen Q-PCR ajon aikana. Testeissä käytettiin sekä *F. graminearum*, että *F. culmorum* spesifisiä alukkeita. Käytetty reaktioseos oli taulukon 3. mukainen. Reaktioseos sekoitettiin aluksi Eppendorf-putkessa, jonka jälkeen seos ja näytteet pipetoitiin 96-kuoppalevyille (Starlab) ja peitettiin optisella teipillä (iCycler Optical Sealing Tape, Bio-Rad). PCR monistus ja fluoresenssin seuraaminen tapahtui Bio-Radin iCycler Q-PCR laitteella. Ajo-ohjelma oli taulukon 4. mukainen.

Taulukko 3. SYBR Green Q-PCR monistusten reaktioseos yhtä reaktiota kohtaan.

Komponentit	Tilavuus (µl)
Vesi	3,0
Aluke, forward (10 pmol/µl)	1,0
Aluke, reverse (10 pmol/µl)	1,0
Bio-Rad IQ SYBR Green Supermix	10
DNA	5

Taulukko 4. Testeissä käytetty Q-PCR monistusten ajo-ohjelma

	Syklit	Lämpötila (°C)	Aika
Alkulämmitys	1	95	10 min
Monistus	45	95	10 s
		60	45 s
		72	1 s
Jäähdytys	1	40	10 s

Testeissä käytettiin MTT:ltä saatujen *F. graminearum* ja *F. culmorum* lajien puhdasta DNA:ta, sekä muutamien näytteiden DNA:ta. Näyte-DNA:t valittiin niiden DON-pitoisuuden mukaan (matala pitoisuus ja korkea pitoisuus). Vertailuna testeissä oli mukana molempien lajien puhdasta DNA:ta, sekä vesinäyte.

Saadut Q-PCR lopputuotteet tutkittiin vielä geelielektroforeesilla. Näytteet ajettiin 1,5 % TAE geelillä, joka värjättiin etidiumbromidilla. Geeliä ajettiin noin kolme tuntia 110 voltilla.

5.6 Q-PCR, TaqMan-testit

TaqMan testeillä pyrittiin havainnoimaan mahdollisia ongelmia koettimien toiminnassa. Reaktioseos (Taulukko 5.) sekoitettiin aluksi Eppendorf-putkessa, jonka jälkeen reaktioseos ja näytteet pipetoitiin 96-kuoppalevylle (Starlab) ja peitettiin optisella teipillä (iCycler Optical Sealing Tape, Bio-Rad). Q-PCR reaktiossa käytettiin taulukon 6. mukaista ajo-ohjelmaa. PCR monistus ja fluoressinsin seuraaminen tapahtui Bio-Radin iCycler Q-PCR laitteella.

Taulukko 5. TaqMan Q-PCR monistusten reaktioseos yhtä reaktiota kohtaan.

Komponentit	Tilavuus (µl)
Vesi	2,8
Aluke, forward (10 pmol/µl)	1,0
Aluke, reverse (10 pmol/µl)	1,0
Koetin, probe (20 pmol/µl)	0,2
Bio-Rad iTaq Universal Probes Mastermix	10
DNA	5

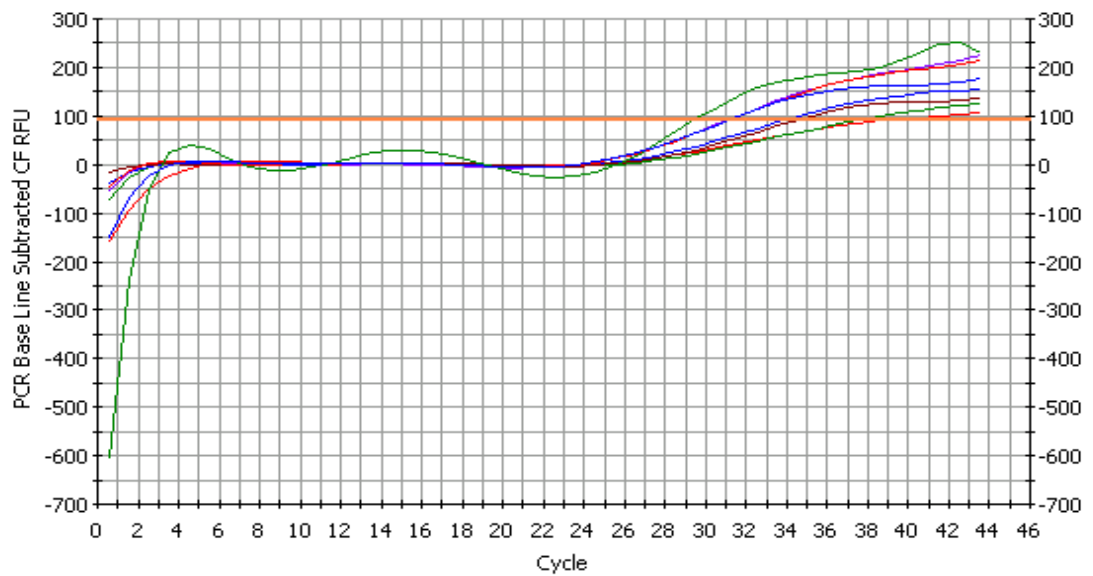
Taulukko 6. TaqMan *Fusarium graminearum* Q-PCR monistusten ajo-ohjelma

	Syklit	Lämpötila (°C)	Aika
Alkulämmitys	1	95	10 min
Monistus	45	95	10 s
		60	45 s
		72	1 s
Jäähdytys	1	40	10 s

Havaittiin, että *Fusarium culmorum* -koetin ei kiinnity templaattiin, joten ohjelmaa jouduttiin optimoimaan tälle koettimelle. Optimointi tehtiin käyttämällä lämpötilagradienttia välillä 55 °C – 45 °C monistuksen toisessa vaiheessa. (Taulukko 7., Kuva 4.)

Taulukko 7. *Fusarium culmorum* -alukkeen optimointiin käytetty lämpötilagradienttiohjelma.

	Syklit	Lämpötila (°C)	Aika
Alkulämmitys	1	95	10 min
Monistus	45	95	10 s
		45–55	30 s
		60	30 s
Jäähdytys	1	40	10 s



Kuva 4. *F. culmorum* -spesifisen koettimen optimoimiseksi tehty lämpötilagradientti TaqMan Q-PCR.

Aluke toimi kaikissa näissä lämpötiloissa, mutta korkein lämpötila, joka tuotti parhaan tuloksen oli 48 °C. Tulos ei kuitenkaan ollut paras mahdollinen, joten ohjelman lämpötiloja muutettiin vielä hieman (Taulukko 8.)

Taulukko 8. TaqMan *Fusarium culmorum* Q-PCR monistusten ajo-ohjelma

	Syklit	Lämpötila	Aika
Alkulämmitys	1	95 °C	10 min
Monistus	45	95 °C	10 s
		48 °C	30 s
		60 °C	30 s
		72 °C	1 s
Jäähdytys	1	40 °C	10 s

5.7 *Fusarium*-sienten määrittäminen

Määrittämissä käytettiin fluoresoivia sekvenssispesifisiä TaqMan koettimia ja *F. graminearumille*, sekä *F. culmorumille* spesifisiä alukkeita (Taulukko 1.). PCR monistus ja fluoresenssin seuraaminen tapahtui Bio-Radin iCycler Q-PCR laitteella. Reaktioseos (Taulukko 5.) sekoitettiin aluksi Eppendorf-putkessa, jonka jälkeen reaktioseos ja näytteet pipetoitiin 96-kuoppalevyille (Starlab) ja peitettiin optisella teipillä (iCycler Optical Sealing Tape, Bio-Rad). Q-PCR reaktiossa käytettiin taulukon 6. mukaista ajo-ohjelmaa *F. graminearumille* spesifisille alukkeille ja koettimille ja taulukon 8. mukaista ajo-ohjelmaa *F. culmorumille* spesifisille alukkeille ja koettimille.

F. graminearum -lajispesifisessä Q-PCR menetelmässä jokaisesta näytteestä tehtiin kolme eristystä ja jokaisesta eristyksestä mitattiin kolme rinnakkaista näytettä. *F. culmorum* -lajispesifisessä Q-PCR menetelmässä jokaisesta eristyksestä mitattiin vain kaksi rinnakkaista näytettä. Näytteitä ei laimennettu mitauksia varten, joten niiden pitoisuudet vaihtelivat (liite 2).

Jokaisessa ajossa oli mukana viiden pisteen standardisuora, jonka avulla laskettiin jokaisen näytteen alkuperäinen *Fusarium*-pitoisuus.

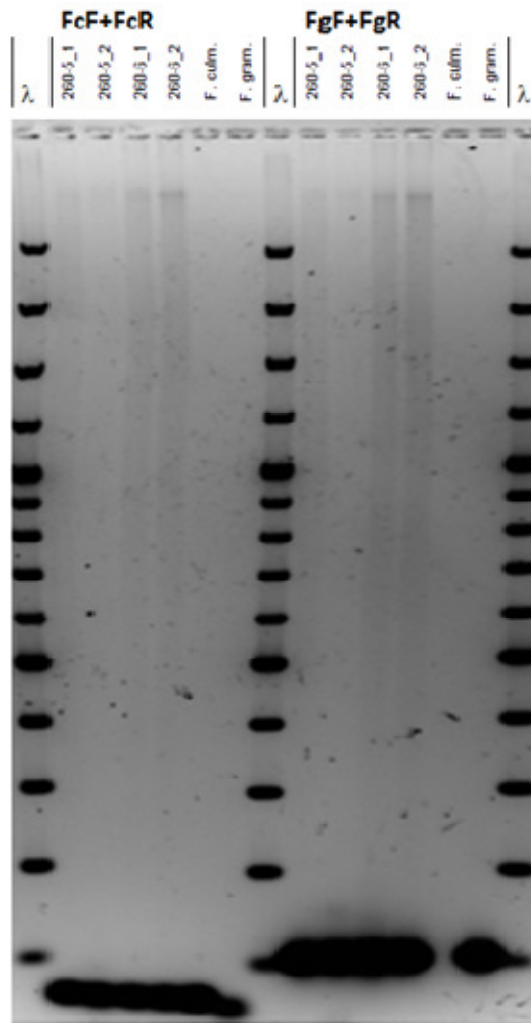
6 TULOKSET JA TARKASTELU

Laitteen tarkastus, viritys ja kalibrointi eivät aiheuttaneet ongelmia ja laite on toimintakykyinen.

DNA eristysten pitoisuusmittauksissa mittaustulokset olivat pääsääntöisesti yhteneviä. Jauhonäytteen heterogeenisyydestä johtuvaa rinnakkaisten eristysten välistä vaihtelua pyrittiin välttämään sekoittamalla jauhonäytteitä ennen varsinaisen eristysnäytteen ottamista. On kuitenkin mahdollista, että mekaanisesta sekoituksesta huolimatta näyte jäi heterogeeniseksi *Fusarium*-sienen suhteen vaikka kokonais-DNA saannot olisivat samaa luokkaa.

6.1 Alukkeiden toimivuus

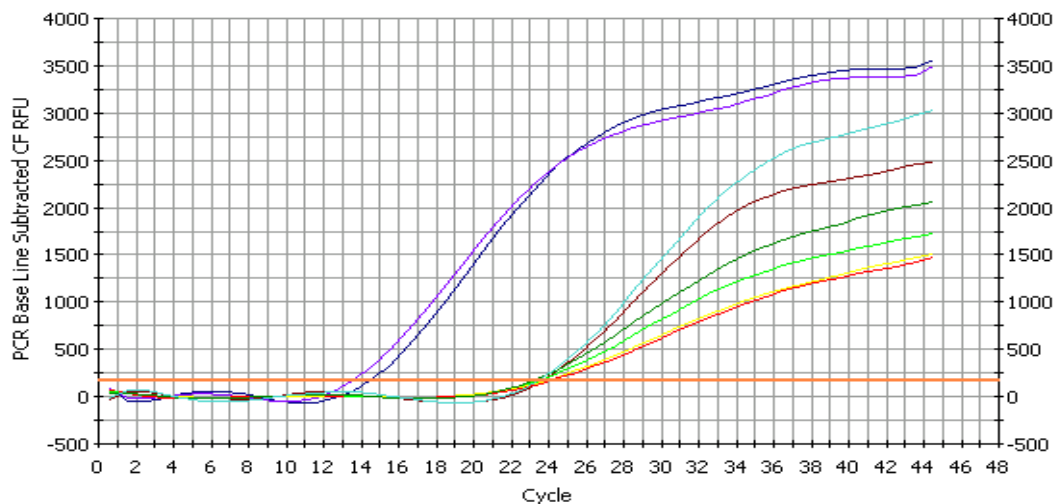
Molemmat alukeparit tuottivat samankokoisen tuotteen sekä näytteillä, että puhtaalla alukeparille tarkoitettulla DNA:lla. Käytettyjen *F. culmorum* -alukkeiden tuottaman tuotteen koon pitäisi olla 60 bp (Moradi ym. 2012) ja *F. graminearum* -alukkeiden laskettu koko 105 bp (Yli-Mattila ym. 2008; NCBI). *F. graminearum*-lajispesifiset alukkeet monistivat vain *F. graminearum*-näytteestä oikeankokoisen tuotteen. Sen sijaan *F. culmorum*-lajispesifiset alukkeet olivat epäspesifisempiä. Ne tuottivat myös *F. graminearum*-lajin DNA:lla tuotteen, mutta kyseinen tuote oli selvästi *F. culmorumille* tyypillistä tuotetta pienempi. (Kuva 5.)



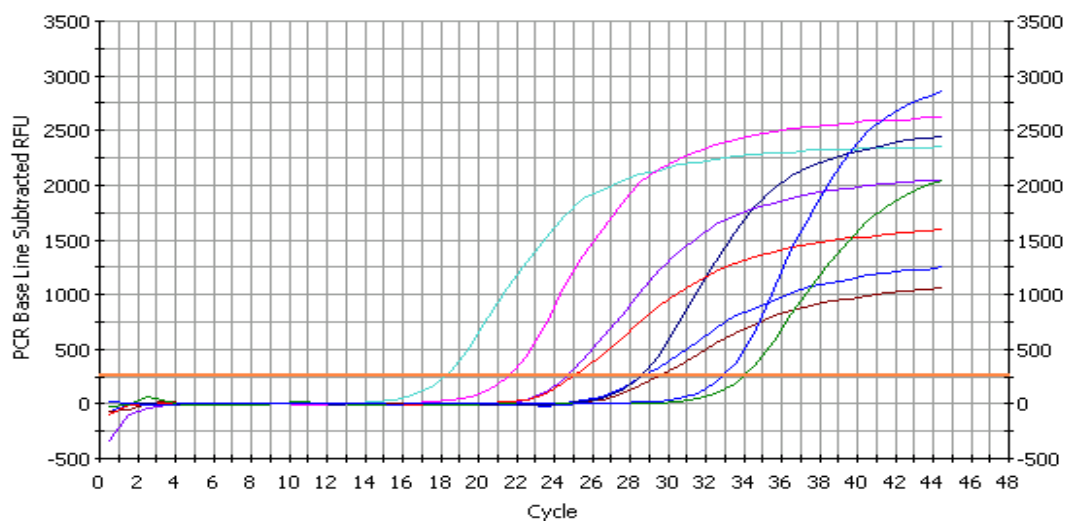
Kuva 5. *F. culmorum* ja *F. graminearum* -lajispesifisten alukkeiden PCR geielektroforeesiajo. Vasemmalla puoliskolla on neljä kauranäytettä sekä puhtaat *F. culmorum* ja *F. graminearum* näytteet *F. culmorum* -spesifisillä alukkeilla monistettuna. Oikealla puoliskolla on samat neljä kauranäytettä sekä puhtaat *F. culmorum* ja *F. graminearum* näytteet *F. graminearum* -spesifisillä alukkeilla monistettuna. Asteikkona 100 bp ladderit.

6.2 SYBR green testit

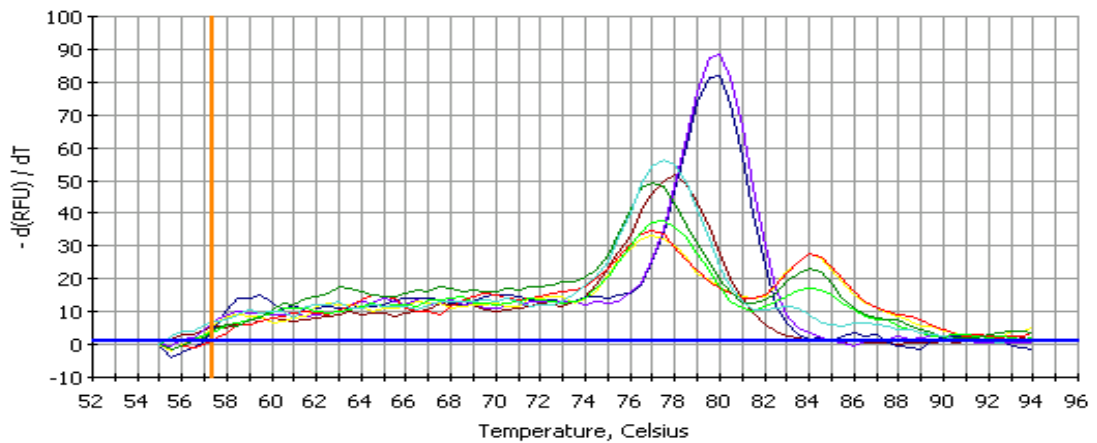
F. graminearum -spesifisillä alukkeilla tulos oli tyydyttävä - niin näytteillä kuin puhtaalla DNA:lla sulamiskäyrä osoitti saman sulamislämpötilan eli puhtaan tuotteen. Myös negatiivisissa kontroleissa näkyi nousua, mutta Ct arvo oli suuri. Sulamiskäyrän perusteella kyseinen tuote kuitenkin erosi hieman *F. graminearumia* sisältävien reaktioiden tuotteista. (Kuvat 6, 7, 8, 9.)



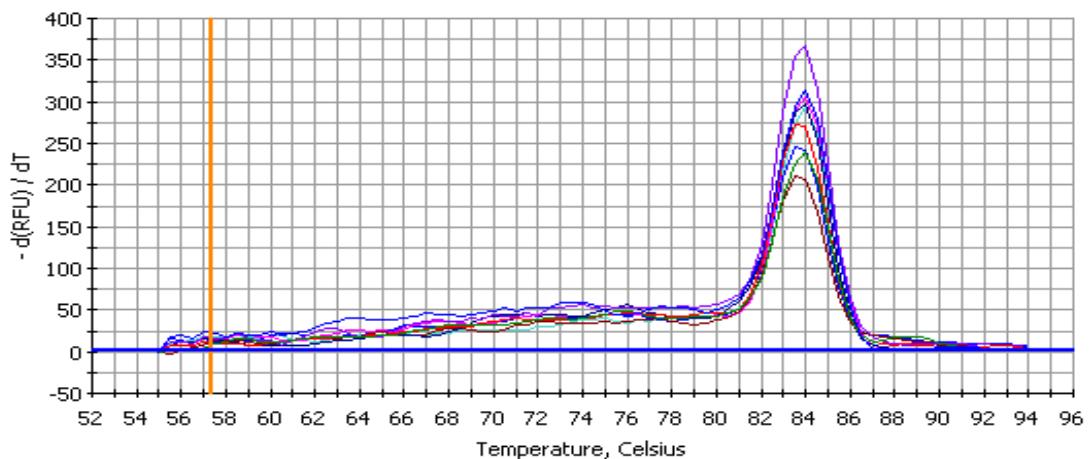
Kuva 6. *F. culmorum* -spesifisen SYBR Green Q-PCR menetelmän kynnysylikäyrä. Vasemmalla violetinsävyiset (vaalea 40 ng, tumma 20 ng) käyrät osoittavat puhtaita *F. culmorum* näytteitä, ruskea osoittaa reaktion, jossa näytteen tilalla on vettä, turkoosi osoittaa puhdasta *F. graminearum* -DNA:ta sisältävän näytteen ja loput osoittavat viljoista eristettyjä näytteitä.



Kuva 7. *F. graminearum* -spesifisen SYBR Green Q-PCR menetelmän kynnysylikäyrä. Turkoosi (55 ng), pinkki (5 ng) sekä tummansininen (0,5 ng) käyrä osoittavat puhdasta *F. graminearum* -DNA:ta sisältävät näytteet, lopussa nouseva sininen käyrä osoittaa näytteen sijasta vettä sisältävän reaktion, vihreä osoittaa puhdasta *F. culmorum* -DNA:ta sisältävän näytteen ja loput käyrät osoittavat viljoista eristettyjä näytteitä.

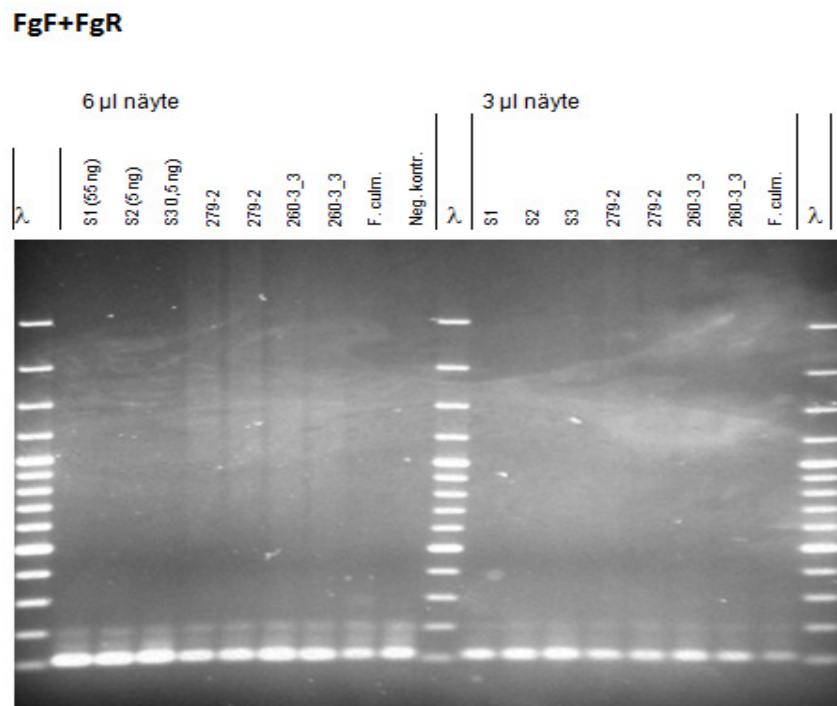


Kuva 8. *F. culmorum* -spesifisillä alukkeilla saatujen tuotteiden sulamiskäyrä SYBR Green Q-PCR menetelmällä. Violetinsävyiset käyrät osoittavat puhtaita *F. culmorum* näytteitä, ruskea osoittaa reaktion, jossa näytteen tilalla on vettä, turkoosi osoittaa puhdasta *F.graminearum* -DNA:ta sisältävän näytteen ja loput osoittavat viljoista eristettyjä näytteitä.



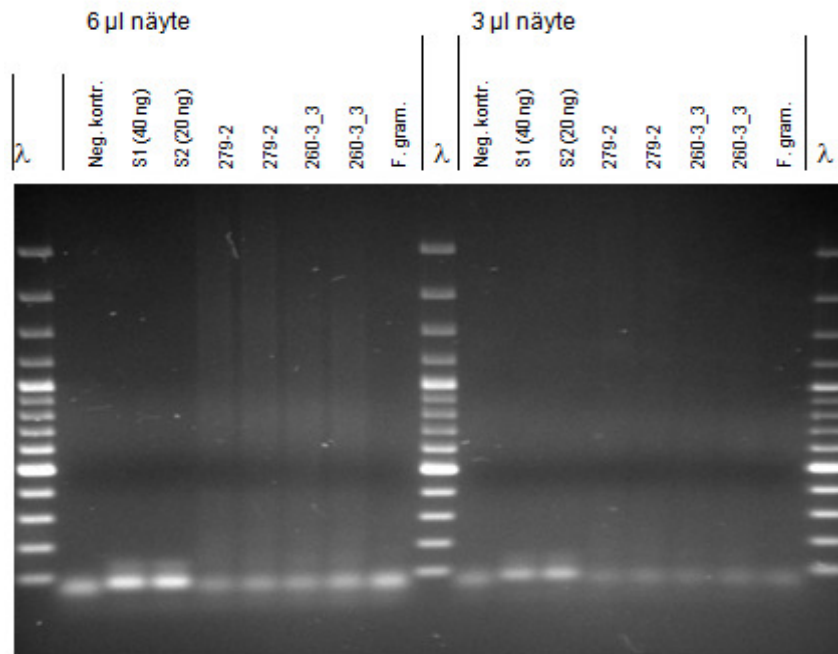
Kuva 9. *F. graminearum* -spesifisillä alukkeilla saatujen tuotteiden sulamiskäyrä SYBR Green Q-PCR menetelmällä. Turkoosi, pinkki sekä tummansininen käyrä osoittavat puhdasta *F. graminearum* -DNA:ta sisältävät näytteet, lopussa nouseva sininen käyrä osoittaa näytteen sijasta vettä sisältävän reaktion, vihreä osoittaa puhdasta *F. culmorum* -DNA:ta sisältävän näytteen ja loput käyrät osoittavat viljoista eristettyjä näytteitä.

Puhdasta *F. culmorum* sisältävien näytteiden kynnyssyklit olivat pienemmät kuin muiden näytteiden kynnyssyklit, joka osoittaa vain huomattavasti standardeja pienemmät pitoisuudet *F. culmorum* DNA:ta. Myös negatiivisten kontrollien fluoresenssi nousi, mutta niiden Ct arvot olivat erittäin suuret. Sulamiskäyrällä puhdasta *F. culmorum* sisältävissä näytteissä esiintyi vain yhtä tuotetta, mutta yllättäen muissa näytteissä esiintyi kahta tuotetta, jotka eivät vastanneet *F. culmorum*in sulamislämpötilaa. Negatiivisilla kontrolleilla esiintyi vain yhtä tai kahta muuta eri sulamislämpötilan tuotetta. (Kuva 9.)



Kuva 10. *F.graminearum* -spesifisen Q-PCR menetelmän SYBR green -värjätyn lopputuotteen geelielektroforeesiajo TAE-geelillä. Kyseessä on Q-PCR testien tuloksena tulleet näytteet eli puhdasta *F. graminearum* -DNA:ta sisältävät näytteet (S1, S2, S3), neljä kaurasta eristettyä näytettä sekä puhdasta *F. culmorum* -DNA:ta sisältävä kontrolli sekä vettä sisältävä kontrolli. Geelin molemmilla puoliskoilla on täsmälleen samat näytteet, mutta vasemmalle puoliskolle pipetoitiin 6 µl ja oikealle puoliskolle 3 µl. Asteikkona 100 bp ladderit.

FcF+FcR

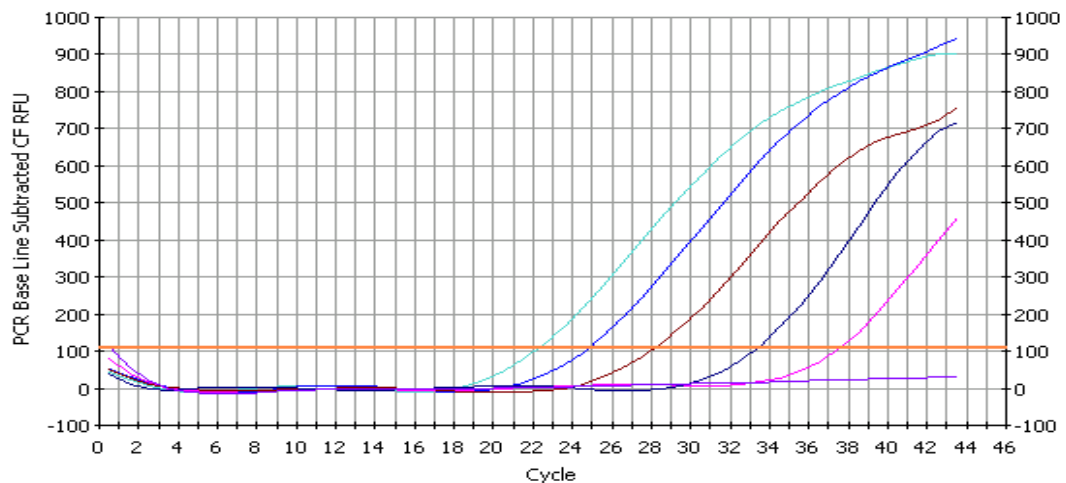


Kuva 11. *F. culmorum* -spesifisen Q-PCR menetelmän SYBR green -värjätyn lopputuotteen geielektroforeesiajo TAE-geelillä. Kyseessä on Q-PCR testien tuloksena tulleet näytteet eli vettä sisältävä kontrolli, puhdasta *F. culmorum* -DNA:ta sisältävät näytteet (S1, S2), neljä kaurasta eristettyä näytettä sekä puhdasta *F. graminearum* -DNA:ta sisältävä kontrolli. Geelin molemmilla puoliskoilla on täsmälleen samat näytteet, mutta vasemmalle puoliskolle pipetoitiin 6 µl ja oikealle puoliskolle 3 µl. Asteikkona 100 bp ladderit.

Molemmilla alukepareilla tehty PCR:t ajettiin myös geielektroforeesilla. Yllättäen *F. graminearum* -spesifiset alukkeet monistivat sekä puhtaasta *F. graminearum* DNA:sta että kaura-näytteistä ja negatiivisesta kontrollista oikeankokoisen tuotteen lisäksi 2 epäspesifistä tuotetta. (Kuva 10.) *F. culmorum* -spesifiset alukkeet monistivat puhdasta *F. culmorum* -DNA:ta sisältävillä näytteillä kaksi erillistä tuotetta kun taas negatiivisilla kontrolleilla ja muilla näytteillä monistui vain yksi selkeä tuote. (Kuva 11.)

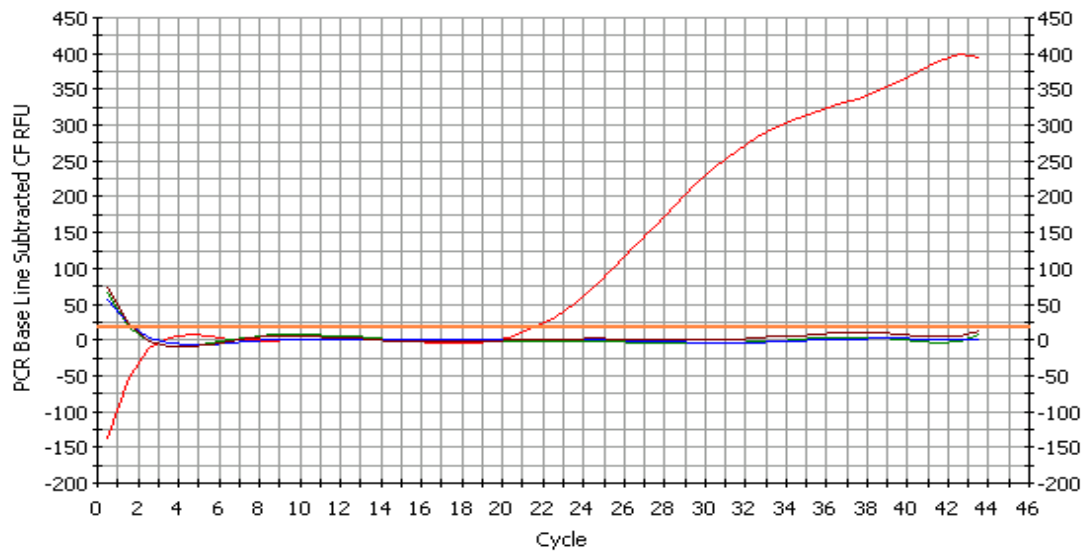
6.3 TaqMan testit

F. graminearum spesifinen koetin toimi odotetusti eli fluoresenssin määrä nousi jyrkästi ja standardien Ct arvot järjestyivät pitoisuuden mukaan (Kuva 12.).



Kuva 12. *F. graminearum* -spesifisen koettimen testiajon tulos. Vaalea sininen ja pinkki osoittavat puhdasta *F. graminearum* -DNA:ta sisältävät näytteet, violetti osoittaa vesinäytteen ja turkoosi, tummansininen sekä ruskea osoittavat viljoista eristetyt näytteet.

Fusarium culmorum -koetimella havaittiin kuitenkin ongelma. Todettiin, että koetin ei kiinnity templaattiin, joten ohjelmaa jouduttiin optimoimaan tälle koettimelle. Lämpötilagradientin avulla saavutettiin koettimelle suotuisin lämpötila, joka oli 48 °C. Tulos ei tälläkään lämpötilamuutoksella ollut kuitenkaan paras mahdollinen, joten ohjelman lämpötiloja muutettiin lisää. Uudella ohjelmalla puhtas *F. culmorum* -standardi tuotti saman kynnyssyklituloksen kuin vastaavat *F. graminearum* -standardit omalla koettimellaan. Fluoresenssi ei kuitenkaan noussut kovin jyrkästi eikä korkealle. (Kuva 13.)



Kuva 13. *F. culmorum* -spesifisen koettimen TaqMan Q-PCR tulos Taulukon 8. mukaisella ohjelmalla. Punainen osoittaa puhdasta *F. culmorum* -DNA:ta sisältävän näytteen. Muut osoittavat vettä sisältävän näytteen, puhdasta *F. graminearum* -DNA:ta sisältävän näytteen sekä yhden viljasta eristetyn näytteen.

6.4 *Fusarium*-sienen määrittäminen

Näyteaineiston lopullisissa *F. graminearum* -lajispesifisissä määrittelyissä ei havaittu ongelmia, mutta eri eristysten välillä oli jonkin verran variaatiota. Eristysmenetelmän toistettavuutta ja eristysten välistä vaihtelua havainnoitiin laskeamalla kynnysyklarvojen variaatiokertoimet. *F. graminearum* -mittauksissa variaatiokertoimien vaihteluväli oli 0,54-4,00 % keskiarvon ollessa 1,72 %. Tulokset liitteessä 3.

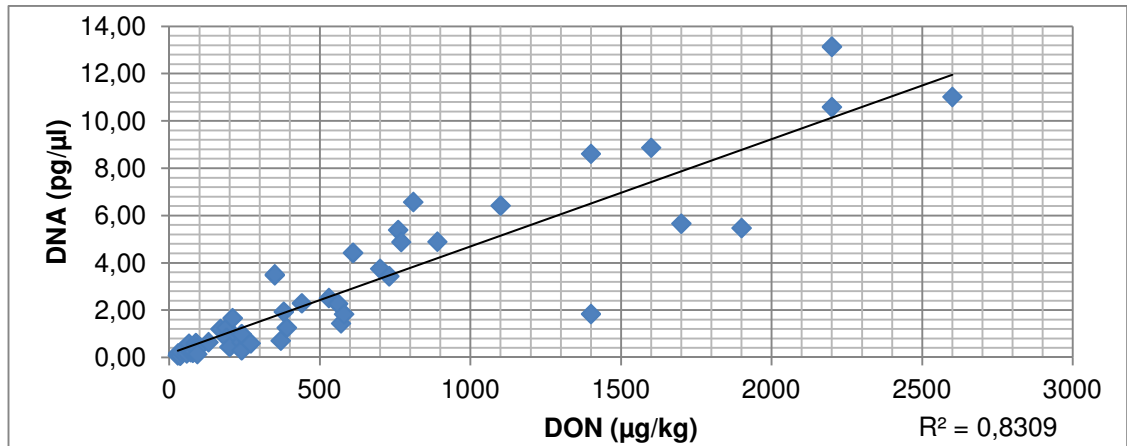
F. culmorum koettimen todettiin edelleen toimivan kyseenalaisesti optimoinnin jälkeenkin. Rinnakkaisten näytteiden, sekä eristysten välillä oli Ct-arvoissa suuria eroja ja useilla näytteillä fluoresenssi ei kasvanut ollenkaan, vaikka rinnakkaisella näytteellä fluoresenssi saattoikin kasvaa. *F. culmorum*in tapauksessa variaatiokertoimien vaihteluväli oli 0,37–17,53 % keskiarvon ollessa 9,22 %. Tulokset löytyvät liitteestä 4. Koettimen huonon toiminnan syy kuitenkin selvisi myöhemmin. Kyseisen koettimen sulamislämpötila on 32,9 °C. PCR reaktio toimii paremmin kuin koettimen 3'-päässä TAMRAn sijasta on mgb (minor groove binder), joka nostaa koetinmolekyylin sulamislämpötilaa (Virkajärvi 2012).

Alhaisissa lämpötiloissa tapahtuu enemmän epäspesifistä sitoutumista, joka ei ole tuloksen kannalta toivottavaa. (Kutyavin ym. 2000)

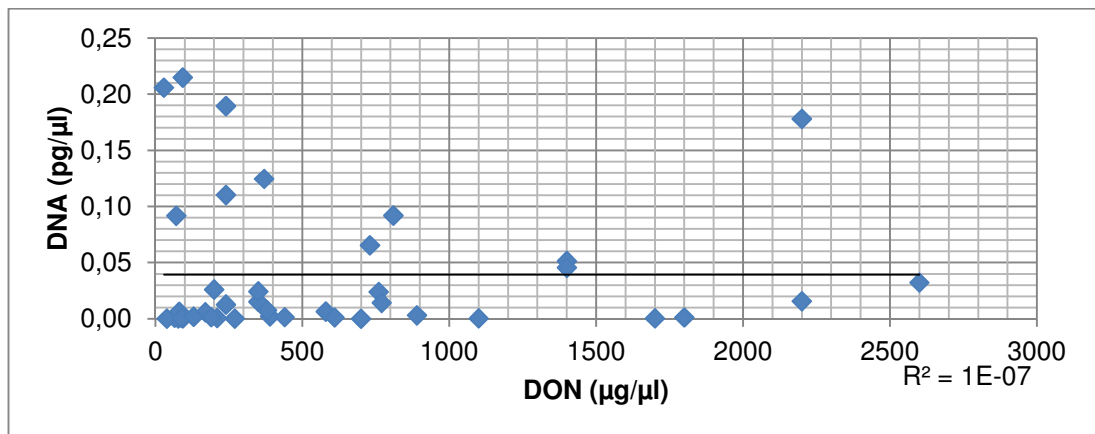
Näytteiden DNA-pitoisuuksien vaihtelun aiheuttamia poikkeamia tuloksissa pyrittiin vähentämään normalisoimalla tulokset jakamalla saadut pitoisuudet näytteen kokonais-DNA-pitoisuudella. Normalisointi tehtiin, jotta tulokset olisivat keskenään vertailukelpoisia.

Näytteiden DNA-pitoisuudet eivät ole erityisen korkeita (Liite 2), jonka seurauksena myös kynnyssyklarivot ovat verrattain korkeita. Kynnyssyklarivoja pystyisi korottamaan suurentamalla eristetyn DNA:n konsentraatiota. Qiagenin DNeasy Plant Mini Kitin ohjeen mukaan tämän pystyisi tekemään pienentämällä eluuti-ossa käytetyn puskurin tilavuudet puoleen.

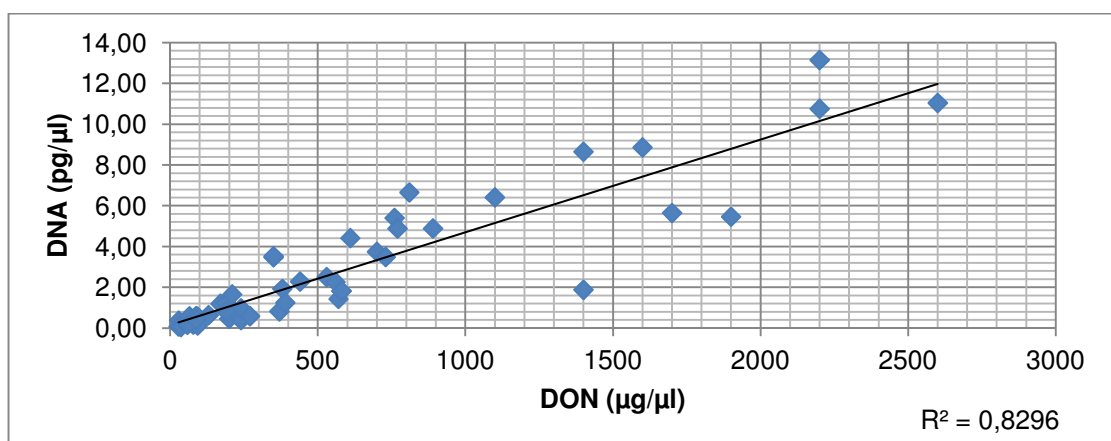
Saaduista tuloksista piirrettiin kuvaaja *Fusarium*-DNA-pitoisuuden ja DON-pitoisuuden suhteen. *F. graminearum* todettiin korreloivan DON-pitoisuuden kanssa melko hyvin korrelaatiokertoimen ollessa 0,8309 (kuvio 4). *F. culmorum* pitoisuus puolestaan ei korreloinut DON-pitoisuuden kanssa ollenkaan korrelaatiokertoimen ollessa 1×10^{-7} (kuvio 5). Tulosta katsottaessa on otettava huomioon tuloksen epäluotettavuus, mutta huono korrelaatio oli kuitenkin odotettavissa (Yli-Mattila ym. 2011). Korrelaatioon vaikuttaa eri lajien samanaikainen esiintyminen samassa kasvissa, joten eri lajeilla saadut tulokset pitäisi laskea myös yhteen ja näistä piirtää korrelaatiokuva DON-arvojen suhteen. Tässä tapauksessa kuvio ei kuitenkaan ole luotettava *F. culmorum* -spesifisen Q-PCR menetelmän toimimattomuuden takia. (kuvio 6).



Kuvio 4. DON-arvon korrelaatio *F. graminearum* -pitoisuuteen.

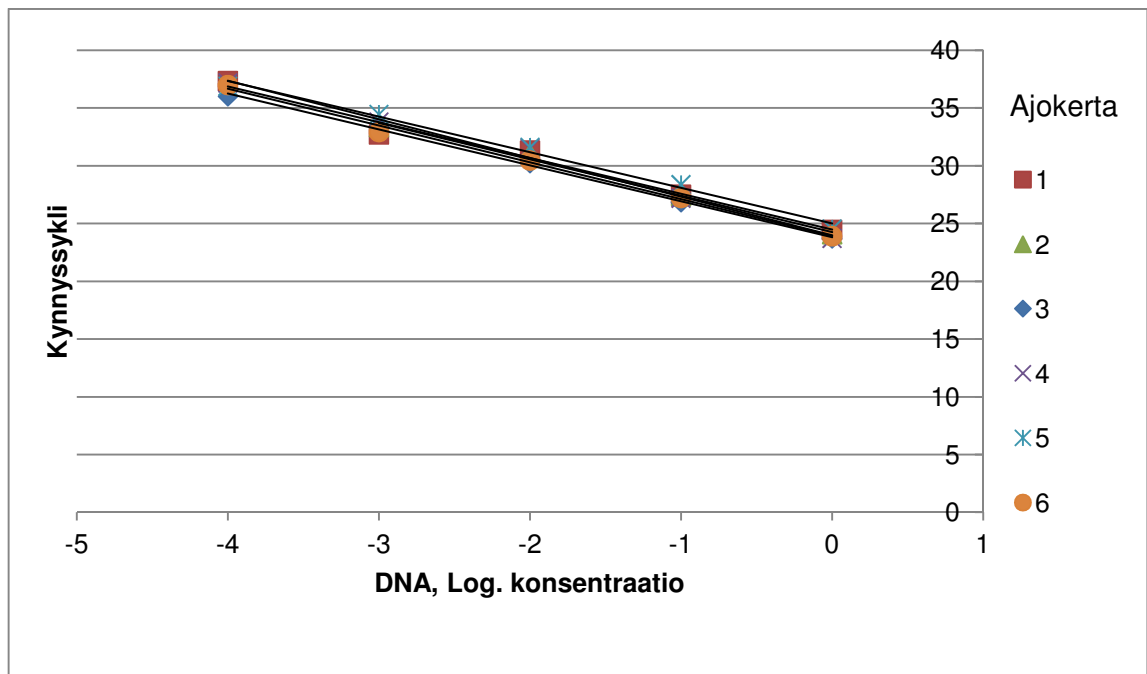


Kuvio 5. DON-arvon korrelaatio *Fusarium culmorum* -pitoisuuteen.

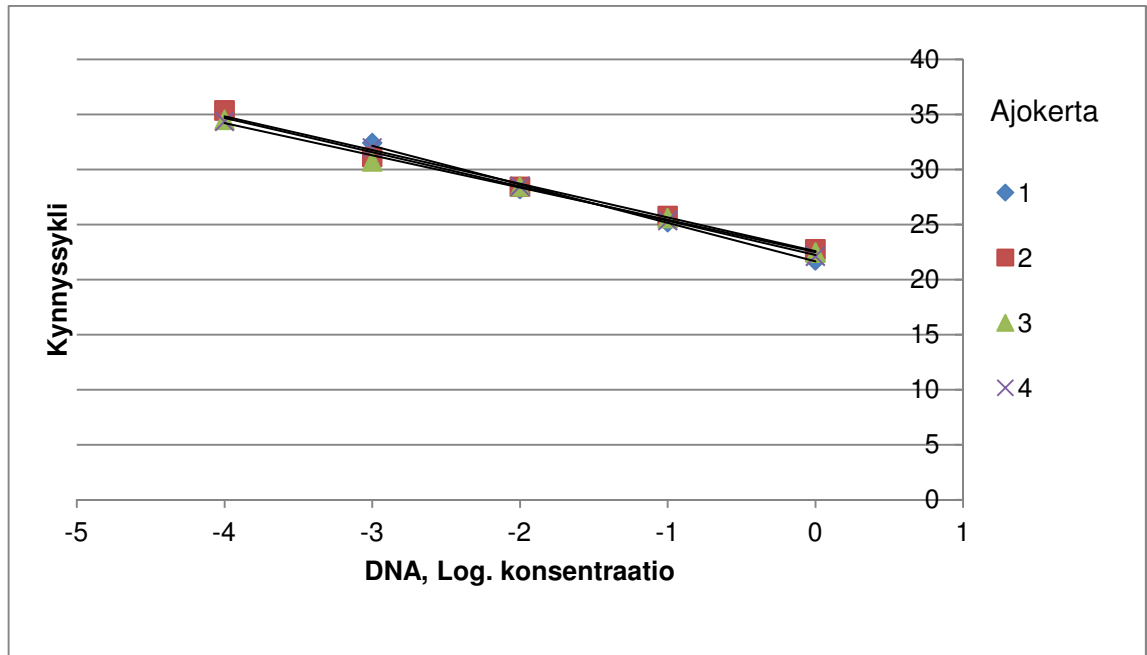


Kuvio 6. DON-arvon korrelaatio *F. culmorum* ja *F. graminearum* yhteenlaskettuun pitoisuuteen.

Kvantitointi tapahtui standardisuorien avulla, joissa käytettiin puhdasta *F. culmorum* ja *F. graminearum* DNA:ta. DNA-liuoksista valmistettiin kaksi rinnakkaisista laimennossarjaa kummastakin. Standardit ajettiin jokaisella mittauskerralla ja näistä piirrettyä standardisuoraa käytettiin näytteiden kvantitoimiseen. Joissakin yksittäisissä tapauksissa pienin standardisuoran pitoisuus ei tuottanut tulosta ennen ohjelman loppua. Tällä ei kuitenkaan ollut suurta vaikutusta itse standardisuoraan, eikä toiseksi pienimmän standardin jälkeen tapahtunut nousua näytteissä näissä tapauksissa. Standardisuorat olivat toistettavia eri ajankohtina tehtyjen määritysten välillä. Standardisuorien korrelaatiokerroin oli välillä 0,981-0,998, keskiarvon ollessa 0,990. (Kuviot 7 ja 8)



Kuvio 7. *F. graminearum* –lajispesifisellä Q-PCR menetelmällä mitatut *F. graminearum*-lajin DNA-laimennussarjojen kynnysyökiön keskiarvot eri ajokertoilla.



Kuvio 8. *F. culmorum* –lajispesifisellä Q-PCR menetelmällä mitatut *F. culmorum*-lajin DNA-laimennussarjojen kynnyssykliden keskiarvot eri ajokertoilla.

Q-PCR reaktioiden tehokkuus ei ollut jokaisessa ajossa parhaimmasta päästä. *F. culmorum* -spesifisissä kokeissa tehokkuus vaihteli välillä 95,6-122,2 %, keskiarvon ollessa 110,1 %. *F. graminearum* -spesifisissä kokeissa tehokkuuden vaihteluväli oli 98,9-110,3 % keskiarvon ollessa 105,6 %. Kvantitointi on sitä tarkempaa mitä lähemmäksi 100 % tehokkuutta päästään. Tehokkuuden tulisi olla välillä 90-110%. (FEM 2009, 92).

7 LOPPUPÄÄTELMÄT

Työn perimmäinen tarkoitus oli sisäänajaa *Fusarium* -sienen kvantitoimiseen käytettävä Q-PCR menetelmä Bio-Radin iCycler -laitteella. Työn aikana pystyttiin onnistuneesti kvantitoimaan *F. graminearum* -lajin pitoisuuksia kaurassa, ohrassa ja vehnässä. *F. culmorum* osalta työ jäi hieman kesken ajallisista syistä, mutta koettimen oikean rakenteen myötä myös tämän kvantitoinnin pitäisi onnistua.

F. graminearum osoitti positiivista korrelaatiota DON-pitoisuuksien suhteen. *F. graminearum* ja DON-pitoisuuksien korrelaatio on osoitettu tutkimuksissa aikaisemminkin (Demeke ym. 2010). *F. culmorum* -tuloksia ei voi pitää kovin luotettavina, eikä korrelaatiota niistä löytynyt DON-pitoisuuksien kanssa. Korrelaation parantamiseksi olisi kuitenkin varmistettava, että käyrältä löytyisi mahdollisimman tasaisesti näytteitä eri DON-pitoisuuksilla. Etenkin suuremmilla pitoisuuksilla ja raja-arvojen kohdalla olisi hyvä olla enemmän näytteitä. *Fusarium* ei aina tuota samalla tavalla toksiineja, vaan tuotantoon vaikuttavat erityisesti sääolosuhteet tiettyinä kasvun aikoina, minkä seurauksena korrelaatio ei ole koskaan täydellinen ja se saattaa vaihdella paljon eri vuosina.

Menetelmää voi käyttää DON-pitoisuuden arvioimiseen kun *F. graminearum* -lajia löytyy mitattavasta viljasta. Arviot eivät kuitenkaan välttämättä ole erityisen tarkkoja ja tarkan DON-pitoisuuden mittaamiseen onkin suositeltavaa käyttää tarkempaa menetelmää. Menetelmää on tarkoitus käyttää olemassaolevien viljalajikkeiden *Fusarium*-kestävyyteen liittyviin alustaviin tutkimuksiin, joihin se soveltuu. Menetelmän ollessa kuitenkin verrattain hidas ja hintava on tarve tehokkaammalle menetelmälle.

LÄHTEET

Analyysi 2003. Monileimalaskimet. 40. vuosikerta, 4/2003, 9.

Behlke, M; Huang, L; Bogh, L; Rose, S; Devor, E., 2005. Fluorescence and fluorescence applications. Integrated DNA Technologies.

Bio-Rad Laboratories, Inc. iCycler iQ Real-Time PCR Detection System Instruction Manual.

Biosearch Technologies. TAMRA Spectral Properties [online, viitattu 5.1.2012]. Saatavilla http://www.biosearchtech.com/assets/bti_TAMRA_abs_em_spectra.pdf.

Bustin, S; Mueller, R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis, 2005, Clinical Science, 365-379.

Demeke, T; Gräfenhan, T; Clear, R; Phan, A; Ratnayaka, I; Chapados, J; Patrick, S; Gaba, D; Lévesque, A; Seifert, K., 2010 Development of a specific TaqMan® real-time PCR assay for quantification of *Fusarium graminearum* clade 7 and comparison of fungal biomass determined by PCR with deoxynivalenol content in wheat and barley. International Journal of Food Microbiology 141, 45–50.

EFSA, 2004, Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Deoxynivalenol (DON) as undesirable substance in animal feed, The EFSA Journal (2004) 73, 1-42, Saatavilla http://www.efsa.europa.eu/EFSA/Scientific_Opinion/contam_op_ej73_DON.pdf.

Eurogentec. qPCR guide [online, viitattu 28.11.2012]. Saatavilla <http://www.eurogentec.com/uploads/qPCR-guide.pdf>.

Evira, 2008. *Fusarium*-toksiinit: saanti viljatuotteista ja viljoista aikuisilla Suomessa. Eviran tutkimuksia 5/2008.

Exiqon. [online, viitattu 4.1.2013]. <http://www.exiqon.com/ls/homeoflna/Chemistry/Fluorescein.pdf>.

FEM, The EPA Forum on Environmental Measurements, 2009. Method Validation U.S. Environmental Protection Agency, Microbiological Methods of Analysis. Appendix C: Guidelines for the Development and Validation of Nucleic Acid Amplification (PCR) Based Microbiological Methods.

Hoffmeier, K., 2006. Fluorescence excitation and emission spectra of SYBR Green I bound to DNA (Kuva).

Invitrogen. SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain. Molecular Probes. [online, viitattu 4.1.2013]. Saatavilla <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp07567.pdf>.

Jalli, M; Hannukkala, A; Laine, P; Parikka, P. Tulevaisuuden kasvinsuojeluongelmat - kasvitautit. MTT Kasvintuotannon tutkimus. [online, viitattu 12.12.2012]. Saatavilla http://www.maaseutu.fi/attachments/newfolder_92/5uovlcKsL/Marja_Jalli.pdf

Kutyavin, IV; Afonina, I; Mills, A; Gorn, VV; Lukhtanov, EA; Belousov, ES; Singer, MJ; Walburger, DK; Lokhov, SG; Gall, A; Dempcy, R; Reed, MW; Meyer, RB; Hedgpeth, J., 2000. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. Nucleic Acids Res. 2000 Jan 15;28(2):655-61.

Kuzdrałiński, A. Real-time PCR. e-Biotechnologia.pl., 2011. [online, viitattu 4.1.2013]. Saatavilla <http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/real-time-pcr>.

LifeTechnologies Corporation., 2011. SYBR Green PCR core reagents. 4304965 Rev. F.

Metabion. 6-FAM azide, 2011. [online, viitattu 4.1.2013]. Saatavilla http://www.metabion.com/downloads/datasheets/click/mi-6Fam_Azide_mi-C1001.pdf.

Moradi, M; Oerke, E-C; Steiner, U; Tesfaye, D; Schellander, K; Dehne, H-W., 2010. Microbiological and SYBR Green real-time PCR detection of major *Fusarium* head blight pathogens on wheat ears. *Mikrobiologija* Sep-Oct; 79(5):655-63.

NCBI [online, viitattu 25.2.2013] Saatavilla <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Peltoniemi, K, 2012. Suullinen tiedonanto, Boreal Kasvinjalostus Oy.

Sigma-Aldrich. Fluorescent Probes for Quantitative Real-Time PCR and other Applications. [online, viitattu 5.1.2013]. Saatavilla http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Brochure/fluorescent_dna_probes.Par.0001.File.tmp/fluorescent_dna_probes.pdf.

Virkajärvi, V. 2012. *Fusarium*-sienten osoittaminen mallasohran tuotannossa. Maisterintutkielma, Helsingin yliopisto, elintarvike- ja ympäristötieteden laitos, mikrobiologia 05/2012.

Waalwijk, C; van der Heide, R; de Vries, I; van der LEE, T; Schoen, C; Costrel-de Corainville, G; Häuser-Hahn, I; Kastlein, P; Köhl, J; Lonnet, P; Demarquet, T; Kema, GHJ., 2004. Quantitative detection of *Fusarium* species in wheat using TaqMan. *European Journal of Plant Pathology* 110:481-494.

WHO, 2002. Evaluation of certain mycotoxins in Food. [online, viitattu 4.1.2013] Saatavilla http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_906.pdf.

Yli-Mattila, T; Paavanen-Huhtala, S; Jestoi, M; Parikka, P; Hietaniemi, V; Gagkaeva, T; Sarlin, T; Haikara, A; Laaksonen, S; Rizzo, A., 2008. Real-time PCR detection and quantification of *Fusarium poae*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae* in cereal grains in Finland and Russia. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 41:4, 243 — 260.

Yli-Mattila, T; Rämö, S; Tanner, R; Loiveke, H; Hietaniemi, V., 2011. *Fusarium* DNA levels as compared to mycotoxin levels in Finnish and Estonian grain samples. *Plant breeding and seed science*. Volume 64.

Taulukko 9. Näytteiden DON-pitoisuudet

Näyte	DON ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Näyte	DON ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
244-13	93	297-19	440
244-15	200	309-1	560
260-1	28	309-2	65
260-2	36	309-3	39
260-3	1400	309-4	88
260-5	350	309-5	2200
260-6	1800	309-6	760
260-13	240	309-7	1700
278-3	570	309-8	580
278-6	190	309-9	890
278-7	350	309-10	240
278-11	730	309-11	370
278-12	1600	309-12	29
297-2	78	309-13	81
297-4	1900	309-14	2600
297-5	1100	309-15	700
297-6	93	309-16	210
297-7	58	309-17	88
297-8	270	309-18	1400
297-9	170	309-19	71
297-10	530	309-20	610
297-14	770	309-21	2200
297-16	190	309-22	130
297-17	810	309-23	390
297-18	380	309-24	240

Taulukko 10. Näytteiden kokonais-DNA-pitoisuudet

Näyte	Pitoisuus Ka (ng/μl)	Näyte	Pitoisuus Ka (ng/μl)	Näyte	Pitoisuus Ka (ng/μl)
297-2-1	69,17	309-1-1	34,09	309-13-1	27,68
297-2-2	47,32	309-1-2	38,05	309-13-2	27,61
297-2-3	39,99	309-1-3	34,78	309-13-3	27,52
297-4-1	59,03	309-2-1	60,29	309-14-1	39,07
297-4-2	41,82	309-2-2	56,79	309-14-2	39,64
297-4-3	36,92	309-2-3	53,71	309-14-3	34,72
297-5-1	39,63	309-3-1	50,42	309-15-1	42,96
297-5-2	28,88	309-3-2	52,22	309-15-2	35,95
297-5-3	34,68	309-3-3	63,53	309-15-3	32,92
297-6-1	54,16	309-4-1	41,62	309-16-1	33,26
297-6-2	48,44	309-4-2	32,96	309-16-2	34,93
297-6-3	39,98	309-4-3	28,77	309-16-3	30,65
297-7-1	45,28	309-5-1	40,25	309-17-1	32,72
297-7-2	37,27	309-5-2	41,03	309-17-2	41,08
297-7-3	38,43	309-5-3	41,01	309-17-3	29,01
297-8-1	44,95	309-6-1	41,31	309-18-1	46,66
297-8-2	39,71	309-6-2	43,70	309-18-2	38,76
297-8-3	35,97	309-6-3	33,45	309-18-3	41,94
297-9-1	41,86	309-7-1	40,87	309-19-1	35,06
297-9-2	29,83	309-7-2	48,55	309-19-2	36,46
297-9-3	35,11	309-7-3	41,29	309-19-3	38,58
297-10-1	45,53	309-8-1	41,21	309-20-1	40,22
297-10-2	41,79	309-8-2	43,26	309-20-2	34,07
297-10-3	37,68	309-8-3	44,08	309-20-3	35,88
278-3-1	55,52	309-9-1	43,66	309-21-1	33,20
278-3-2	43,89	309-9-2	41,92	309-21-2	34,00
278-3-3	23,26	309-9-3	45,82	309-21-3	33,77
260-1-1	35,34	309-10-1	27,61	309-22-1	32,76
260-1-2	39,41	309-10-2	29,97	309-22-2	26,97
260-1-3	35,28	309-10-3	39,78	309-22-3	31,42
260-2-1	40,71	309-11-1	50,66	309-23-1	27,09
260-2-2	35,76	309-11-2	40,74	309-23-2	25,96
260-2-3	34,25	309-11-3	43,68	309-23-3	31,38
260-3-1	55,96	309-12-1	44,66	309-24-1	35,88
260-3-2	44,62	309-12-2	39,88	309-24-2	40,03
260-3-3	26,03	309-12-3	47,51	309-24-3	32,49

(jatkuu)

Taulukko 10. (jatkuu)

Näyte	Pitoisuus Ka (ng/μl)	Näyte	Pitoisuus Ka (ng/μl)
260-5-1	49,35	297-14-1	50,73
260-5-2	41,85	297-14-2	48,92
260-5-3	51,78	297-14-3	43,40
260-6-1	54,42	297-16-1	33,90
260-6-2	37,23	297-16-2	32,92
260-6-3	40,36	297-16-3	30,59
260-13-1	26,65	297-17-1	31,24
260-13-2	21,50	297-17-2	32,96
260-13-3	30,33	297-17-3	25,18
278-6-1	37,69	297-18-1	39,73
278-6-2	48,03	297-18-2	35,12
278-6-3	44,83	297-18-3	32,87
278-7-1	55,25	297-19-1	28,71
278-7-2	40,52	297-19-2	26,37
278-7-3	39,99	297-19-3	31,48
278-11-1	27,33	244-13-1	28,35
278-11-2	30,78	244-13-2	35,38
278-11-3	25,81	244-13-3	34,69
278-12-1	38,65	244-15-1	28,54
278-12-2	32,10	244-15-2	29,43
278-12-3	40,93	244-15-3	27,89

Taulukko 11. *Fusarium graminearum* Q-PCR tulokset

Vilja	Näyte	Ct	DNA (ng/μl)	<i>F. graminearum</i> DNA (ng/μl)	<i>F. graminearum</i> DNA/kok. DNA (pg/μl)	Ka. <i>F. graminearum</i> DNA/kok. DNA (pg/μl)	Std.	Std. %
Kaura	260-1_1	32,99	35,34	0,00	0,05	0,09	0,03	37,1%
Kaura	260-1_2	32,08	39,41	0,00	0,09			
Kaura	260-1_3	31,83	35,28	0,00	0,12			
Kaura	260-2_1	32,56	40,71	0,00	0,06	0,07	0,02	34,0%
Kaura	260-2_2	32,09	35,76	0,00	0,10			
Kaura	260-2_3	33,03	34,25	0,00	0,05			
Kaura	260-3_1	28,88	55,96	0,04	0,69	1,84	1,57	85,1%
Kaura	260-3_2	26,92	44,62	0,16	3,62			
Kaura	260-3_3	29,17	26,03	0,03	1,21			
Kaura	297-2_1	29,83	69,17	0,02	0,27	0,19	0,07	35,8%
Kaura	297-2_2	31,05	47,32	0,01	0,17			
Kaura	297-2_3	31,46	39,99	0,01	0,14			
Kaura	297-4_1	26,46	59,03	0,23	3,87	5,47	1,41	25,8%
Kaura	297-4_2	26,35	41,82	0,25	6,00			
Kaura	297-4_3	26,39	36,92	0,24	6,54			
Kaura	297-5_1	26,84	39,63	0,17	4,36	6,42	2,53	39,4%
Kaura	297-5_2	26,93	28,88	0,16	5,66			
Kaura	297-5_3	26,05	34,68	0,32	9,25			
Kaura	297-6_1	31,59	54,16	0,01	0,09	0,14	0,06	43,8%
Kaura	297-6_2	31,49	48,44	0,01	0,12			
Kaura	297-6_3	30,91	39,98	0,01	0,21			
Kaura	297-7_1	30,42	45,28	0,01	0,27	0,17	0,09	51,8%
Kaura	297-7_2	31,78	37,27	0,00	0,12			
Kaura	297-7_3	31,84	38,43	0,00	0,12			
Kaura	297-8_1	29,57	44,95	0,02	0,51	0,60	0,08	13,1%
Kaura	297-8_2	29,47	39,71	0,02	0,62			
Kaura	297-8_3	29,51	35,97	0,02	0,66			
Kaura	297-9_1	29,04	41,86	0,03	0,78	1,20	0,38	31,6%
Kaura	297-9_2	28,54	29,83	0,05	1,51			
Kaura	297-9_3	28,48	35,11	0,05	1,32			
Kaura	297-10_1	27,29	45,53	0,12	2,55	2,51	0,77	30,7%
Kaura	297-10_2	26,98	41,79	0,14	3,26			
Kaura	297-10_3	28,01	37,68	0,06	1,72			
Kaura	278-3_1	28,97	55,52	0,03	0,58	1,44	1,06	73,6%
Kaura	278-3_2	27,22	43,89	0,12	2,63			
Kaura	278-3_3	29,25	23,26	0,03	1,12			

(jatkuu)

Taulukko 11. jatkuu

Vilja	Näyte	Ct	DNA (ng/μl)	F. graminearum DNA (ng/μl)	F. graminearum DNA/kok. DNA (pg/μl)	Ka. F. graminearum DNA/kok. DNA (pg/μl)	Std.	Std. %
Kaura	309-1_1	27,12	34,09	0,13	3,68	2,27	1,22	53,8%
Kaura	309-1_2	28,04	38,05	0,06	1,69			
Kaura	309-1_3	28,35	34,78	0,05	1,46			
Kaura	309-2_1	29,58	60,29	0,02	0,34	0,58	0,21	36,8%
Kaura	309-2_2	28,77	56,79	0,04	0,66			
Kaura	309-2_3	28,66	53,71	0,04	0,75			
Kaura	309-3_1	30,31	50,42	0,01	0,24	0,24	0,04	15,8%
Kaura	309-3_2	30,54	52,22	0,01	0,20			
Kaura	309-3_3	29,87	63,53	0,02	0,27			
Kaura	309-4_1	30,05	41,62	0,01	0,35	0,42	0,10	24,1%
Kaura	309-4_2	29,79	32,96	0,02	0,54			
Kaura	309-4_3	30,48	28,77	0,01	0,38			
Kaura	309-5_1	25,71	40,25	0,35	8,57	10,59	3,62	34,2%
Kaura	309-5_2	25,73	41,03	0,35	8,42			
Kaura	309-5_3	25,02	41,01	0,61	14,77			
Kaura	309-6_1	25,34	41,31	0,45	10,98	5,39	4,85	89,9%
Kaura	309-6_2	27,20	43,70	0,12	2,68			
Kaura	309-6_3	27,65	33,45	0,08	2,50			
Kaura	309-7_1	25,64	40,87	0,27	6,52	5,66	0,86	15,2%
Kaura	309-7_2	25,79	48,55	0,23	4,81			
Kaura	309-7_3	25,79	41,29	0,23	5,64			
Kaura	309-8_1	27,28	41,21	0,08	1,89	1,83	0,24	13,2%
Kaura	309-8_2	27,49	43,26	0,07	1,57			
Kaura	309-8_3	27,09	44,08	0,09	2,04			
Kaura	309-9_1	25,97	43,66	0,20	4,67	4,89	0,68	14,0%
Kaura	309-9_2	25,77	41,92	0,24	5,66			
Kaura	309-9_3	26,06	45,82	0,20	4,35			
Kaura	309-10_1	30,00	27,61	0,01	0,37	0,30	0,06	19,6%
Kaura	309-10_2	30,60	29,97	0,01	0,26			
Kaura	309-10_3	29,93	39,78	0,01	0,28			
Kaura	309-11_1	28,38	50,66	0,03	0,68	0,71	0,03	4,1%
Kaura	309-11_2	28,59	40,74	0,03	0,72			
Kaura	309-11_3	28,47	43,68	0,03	0,73			
Kaura	309-12_1	30,25	44,66	0,01	0,21	0,18	0,05	26,4%
Kaura	309-12_2	30,30	39,88	0,01	0,21			
Kaura	309-12_3	30,75	47,51	0,01	0,12			
Kaura	309-13_1	30,53	27,68	0,01	0,26	0,24	0,01	5,4%
Kaura	309-13_2	30,60	27,61	0,01	0,24			
Kaura	309-13_3	30,67	27,52	0,01	0,23			

(jatkuu)

Taulukko 11. jatkuu

Vilja	Näyte	Ct	DNA (ng/μl)	F. graminea- rum DNA (ng/μl)	F. graminearum DNA/kok. DNA (pg/μl)	Ka. F. graminea- rum DNA/kok. DNA (pg/μl)	Std.	Std. %
Kaura	309-14_1	24,77	39,07	0,50	12,71	11,02	1,52	13,8%
Kaura	309-14_2	25,00	39,64	0,42	10,60			
Kaura	309-14_3	25,31	34,72	0,34	9,75			
Kaura	309-15_1	26,99	42,96	0,10	2,24	3,75	2,60	69,2%
Kaura	309-15_2	25,73	35,95	0,24	6,75			
Kaura	309-15_3	27,33	32,92	0,07	2,27			
Kaura	309-16_1	27,86	33,26	0,07	2,12	1,66	0,40	24,1%
Kaura	309-16_2	28,42	34,93	0,05	1,39			
Kaura	309-16_3	28,50	30,65	0,05	1,48			
Kaura	309-17_1	30,03	32,72	0,02	0,53	0,60	0,26	43,2%
Kaura	309-17_2	30,22	41,08	0,02	0,39			
Kaura	309-17_3	29,34	29,01	0,03	0,89			
Kaura	309-18_1	24,84	46,66	0,56	12,05	8,61	3,26	37,9%
Kaura	309-18_2	25,69	38,76	0,32	8,24			
Kaura	309-18_3	26,19	41,94	0,23	5,56			
Kaura	309-19_1	30,44	35,06	0,01	0,37	0,23	0,12	53,9%
Kaura	309-19_2	31,44	36,46	0,01	0,17			
Kaura	309-19_3	31,70	38,58	0,01	0,14			
Kaura	309-20_1	26,91	40,22	0,14	3,37	4,42	1,18	26,7%
Kaura	309-20_2	26,40	34,07	0,19	5,70			
Kaura	309-20_3	26,74	35,88	0,15	4,19			
Kaura	309-21_1	24,51	33,20	0,71	21,36	13,14	7,29	55,5%
Kaura	309-21_2	25,99	34,00	0,25	7,47			
Kaura	309-21_3	25,52	33,77	0,36	10,59			
Kaura	309-22_1	29,03	32,76	0,03	0,97	0,64	0,29	45,4%
Kaura	309-22_2	30,17	26,97	0,01	0,55			
Kaura	309-22_3	30,47	31,42	0,01	0,41			
Kaura	309-23_1	28,67	27,09	0,04	1,51	1,26	0,24	19,3%
Kaura	309-23_2	29,29	25,96	0,03	1,03			
Kaura	309-23_3	28,74	31,38	0,04	1,22			
Kaura	309-24_1	29,06	35,88	0,03	0,87	0,99	0,28	28,8%
Kaura	309-24_2	29,04	40,03	0,03	0,78			
Kaura	309-24_3	28,58	32,49	0,04	1,31			
Kevätvehnä	260-5_1	27,39	49,35	0,17	3,40	3,47	1,34	38,6%
Kevätvehnä	260-5_2	27,13	41,85	0,20	4,84			
Kevätvehnä	260-5_3	28,05	51,78	0,11	2,17			
Kevätvehnä	260-6_1	24,30	54,42	1,61	29,65	26,33	3,02	11,5%
Kevätvehnä	260-6_2	25,21	37,23	0,88	23,73			
Kevätvehnä	260-6_3	24,97	40,36	1,03	25,61			

(jatkuu)

Taulukko 11. jatkuu

Vilja	Näyte	Ct	DNA (ng/μl)	F. graminea- rum DNA (ng/μl)	F. graminearum DNA/kok. DNA (pg/μl)	Ka. F. graminea- rum DNA/kok. DNA (pg/μl)	Std.	Std. %
Kevätvehnä	278-6_1	28,60	37,69	0,07	1,84	1,25	0,53	42,1%
Kevätvehnä	278-6_2	29,36	48,03	0,04	0,82			
Kevätvehnä	278-6_3	29,08	44,83	0,05	1,09			
Kevätvehnä	278-7_1	27,87	55,25	0,12	2,17	3,51	1,37	39,0%
Kevätvehnä	278-7_2	27,65	40,52	0,14	3,46			
Kevätvehnä	278-7_3	27,17	39,99	0,20	4,91			
Kevätvehnä	297-14_1	25,60	50,73	0,30	6,01	4,88	1,03	21,2%
Kevätvehnä	297-14_2	26,20	48,92	0,19	3,97			
Kevätvehnä	297-14_3	26,14	43,40	0,20	4,66			
Rehuohra	297-16_1	29,21	33,90	0,02	0,66	0,83	0,19	23,3%
Rehuohra	297-16_2	28,98	32,92	0,03	0,79			
Rehuohra	297-16_3	28,71	30,59	0,03	1,04			
Rehuohra	297-17_1	25,75	31,24	0,27	8,63	6,57	1,82	27,7%
Rehuohra	297-17_2	26,39	32,96	0,17	5,17			
Rehuohra	297-17_3	26,59	25,18	0,15	5,92			
Rehuohra	297-18_1	27,88	39,73	0,06	1,45	1,93	0,42	21,7%
Rehuohra	297-18_2	27,50	35,12	0,08	2,17			
Rehuohra	297-18_3	27,59	32,87	0,07	2,18			
Rehuohra	297-19_1	27,41	28,71	0,08	2,86	2,29	0,58	25,5%
Rehuohra	297-19_2	28,24	26,37	0,04	1,69			
Rehuohra	297-19_3	27,56	31,48	0,07	2,33			
Rehuohra	244-13_1	31,49	28,35	0,01	0,32	0,36	0,11	31,6%
Rehuohra	244-13_2	30,52	35,38	0,02	0,49			
Rehuohra	244-13_3	31,35	34,69	0,01	0,27			
Rehuohra	244-15_1	30,81	28,54	0,01	0,48	0,44	0,08	18,0%
Rehuohra	244-15_2	30,74	29,43	0,01	0,49			
Rehuohra	244-15_3	31,28	27,89	0,01	0,35			
Rehuohra	260-13_1	30,72	26,65	0,01	0,55	0,64	0,08	12,8%
Rehuohra	260-13_2	30,74	21,50	0,01	0,67			
Rehuohra	260-13_3	30,22	30,33	0,02	0,70			
Rehuohra	278-11_1	28,24	27,33	0,09	3,29	3,43	0,13	3,7%
Rehuohra	278-11_2	27,98	30,78	0,11	3,54			
Rehuohra	278-11_3	28,29	25,81	0,09	3,46			
Rehuohra	278-12_1	26,44	38,65	0,34	8,68	8,87	1,70	19,2%
Rehuohra	278-12_2	26,44	32,10	0,34	10,66			
Rehuohra	278-12_3	26,60	40,93	0,30	7,27			
					Keskiarvo	3,29	1,00	32,15%
					Maksimi	0,07	0,01	3,70%
					Minimi	26,33	7,29	89,90%

Taulukko 12. *Fusarium culmorum* Q-PCR tulokset

Vilja	Näyte	Ct	DNA (ng/μl)	<i>F. culmorum</i> DNA (ng/μl)	<i>F. culmorum</i> DNA/kok. DNA (pg/μl)	Ka. <i>F. graminearum</i> DNA/kok. DNA (pg/μl)	Std.	Std. %
Kaura	260-1_1		35,34		0,00	0,00		
Kaura	260-1_2		39,41		0,00			
Kaura	260-1_3		35,28		0,00			
Kaura	260-2_1		40,71		0,00	0,00		
Kaura	260-2_2		35,76		0,00			
Kaura	260-2_3		34,25		0,00			
Kaura	260-3_1	31,97	55,96	0,00	0,01	0,04	0,06	149,01%
Kaura	260-3_2		44,62		0,00			
Kaura	260-3_3	29,97	26,03	0,00	0,11			
Kaura	297-2_1		69,17		0,00	0,00	0,00	173,21%
Kaura	297-2_2	36,81	47,32	0,00	0,00			
Kaura	297-2_3		39,99		0,00			
Kaura	297-4_1		59,03		0,00	0,00		
Kaura	297-4_2		41,82		0,00			
Kaura	297-4_3		36,92		0,00			
Kaura	297-5_1	36,52	39,63	0,00	0,00	0,00	0,00	157,81%
Kaura	297-5_2	40,68	28,88		0,00			
Kaura	297-5_3		34,68	0,00	0,00			
Kaura	297-6_1	37,35	54,16	0,00	0,00	0,00	0,00	173,21%
Kaura	297-6_2		48,44		0,00			
Kaura	297-6_3		39,98		0,00			
Kaura	297-7_1		45,28		0,00	0,00		
Kaura	297-7_2		37,27		0,00			
Kaura	297-7_3		38,43		0,00			
Kaura	297-8_1	38,60	44,95	0,00	0,00	0,00	0,00	173,21%
Kaura	297-8_2		39,71		0,00			
Kaura	297-8_3		35,97		0,00			
Kaura	297-9_1	33,33	41,86	0,00	0,01	0,00	0,00	173,21%
Kaura	297-9_2		29,83		0,00			
Kaura	297-9_3		35,11		0,00			
Kaura	297-10_1		45,53		0,00	0,00		
Kaura	297-10_2		41,79		0,00			
Kaura	297-10_3		37,68		0,00			
Kaura	278-3_1		55,52		0,00	0,00		
Kaura	278-3_2		43,89		0,00			
Kaura	278-3_3		23,26		0,00			

(jatkuu)

Taulukko 12. jatkuu

Vilja	Näyte	Ct	DNA (ng/μl)	F. culmorum DNA (ng/μl)	F. culmorum DNA/kok. DNA (pg/μl)	Ka. F. graminea- rum DNA/kok. DNA (pg/μl)	Std.	Std. %
Kaura	309-1_1		34,09		0,00	0,00		
Kaura	309-1_2		38,05		0,00			
Kaura	309-1_3		34,78		0,00			
Kaura	309-2_1	36,01	60,29	0,00	0,00	0,00	0,00	173,21%
Kaura	309-2_2		56,79		0,00			
Kaura	309-2_3		53,71		0,00			
Kaura	309-3_1		50,42		0,00	0,00	0,00	173,21%
Kaura	309-3_2	39,47	52,22	0,00	0,00			
Kaura	309-3_3		63,53		0,00			
Kaura	309-4_1		41,62		0,00	0,00		
Kaura	309-4_2		32,96		0,00			
Kaura	309-4_3		28,77		0,00			
Kaura	309-5_1	28,61	40,25	0,01	0,33	0,12	0,18	153,19%
Kaura	309-5_2		41,03		0,00			
Kaura	309-5_3	31,82	41,01	0,00	0,03			
Kaura	309-6_1	35,78	41,31	0,00	0,00	0,03	0,05	169,32%
Kaura	309-6_2	40,70	43,70	0,00	0,00			
Kaura	309-6_3	30,52	33,45	0,00	0,09			
Kaura	309-7_1		40,87		0,00	0,00	0,00	173,21%
Kaura	309-7_2	39,24	48,55	0,00	0,00			
Kaura	309-7_3		41,29		0,00			
Kaura	309-8_1	42,54	41,21	0,00	0,00	0,01	0,01	173,09%
Kaura	309-8_2		43,26		0,00			
Kaura	309-8_3	32,25	44,08	0,00	0,02			
Kaura	309-9_1	37,44	43,66	0,00	0,00	0,00	0,00	157,72%
Kaura	309-9_2	33,88	41,92	0,00	0,01			
Kaura	309-9_3		45,82		0,00			
Kaura	309-10_1	36,48	27,61	0,00	0,00	0,11	0,20	172,22%
Kaura	309-10_2	40,00	29,97	0,00	0,00			
Kaura	309-10_3	28,58	39,78	0,01	0,34			
Kaura	309-11_1	27,40	50,66	0,01	0,65	0,25	0,35	142,08%
Kaura	309-11_2	42,37	40,74	0,00	0,00			
Kaura	309-11_3	30,16	43,68	0,00	0,09			
Kaura	309-12_1	30,97	44,66	0,00	0,05	0,02	0,03	167,25%
Kaura	309-12_2	37,07	39,88	0,00	0,00			
Kaura	309-12_3	36,66	47,51	0,02	0,00			
Kaura	309-13_1	36,76	27,68	0,00	0,00	0,00	0,01	153,25%
Kaura	309-13_2	33,52	27,61	0,00	0,01			
Kaura	309-13_3		27,52		0,00			

(jatkuu)

Taulukko 12. jatkuu

Vilja	Näyte	Ct	DNA (ng/μl)	F. culmorum DNA (ng/μl)	F. culmorum DNA/kok. DNA (pg/μl)	Ka. F. graminea- rum DNA/kok. DNA (pg/μl)	Std.	Std. %
Kaura	309-14_1	30,14	39,07	0,00	0,11	0,04	0,06	141,81%
Kaura	309-14_2	35,50	39,64	0,00	0,00			
Kaura	309-14_3	33,04	34,72	0,00	0,01			
Kaura	309-15_1		42,96		0,00	0,00	0,00	86,83%
Kaura	309-15_2	42,01	35,95	0,00	0,00			
Kaura	309-15_3	42,23	32,92	0,00	0,00			
Kaura	309-16_1		33,26		0,00	0,00		
Kaura	309-16_2		34,93		0,00			
Kaura	309-16_3		30,65		0,00			
Kaura	309-17_1	37,79	32,72	0,00	0,00	0,00	0,00	83,21%
Kaura	309-17_2	34,87	41,08	0,00	0,00			
Kaura	309-17_3	34,67	29,01	0,00	0,00			
Kaura	309-18_1	36,91	46,66	0,00	0,00	0,05	0,08	172,78%
Kaura	309-18_2		38,76		0,00			
Kaura	309-18_3	29,02	41,94	0,01	0,14			
Kaura	309-19_1	35,30	35,06	0,00	0,00	0,02	0,03	167,75%
Kaura	309-19_2		36,46		0,00			
Kaura	309-19_3	30,38	38,58	0,00	0,05			
Kaura	309-20_1		40,22		0,00	0,00	0,00	173,21%
Kaura	309-20_2		34,07		0,00			
Kaura	309-20_3	35,19	35,88	0,00	0,00			
Kaura	309-21_1	32,02	33,20	0,00	0,02	0,01	0,01	173,21%
Kaura	309-21_2		34,00		0,00			
Kaura	309-21_3		33,77		0,00			
Kaura	309-22_1	34,24	32,76	0,00	0,00	0,00	0,00	94,81%
Kaura	309-22_2		26,97		0,00			
Kaura	309-22_3	34,95	31,42	0,00	0,00			
Kaura	309-23_1	36,93	27,09	0,00	0,00	0,00	0,00	150,49%
Kaura	309-23_2		25,96		0,00			
Kaura	309-23_3	33,83	31,38	0,00	0,00			
Kaura	309-24_1		35,88		0,00	0,24	0,21	87,52%
Kaura	309-24_2	27,98	40,03	0,01	0,32			
Kaura	309-24_3	28,03	32,49	0,01	0,38			
Kevätvehnä	260-5_1		49,35		0,00	0,01	0,02	173,12%
Kevätvehnä	260-5_2	40,89	41,85	0,00	0,00			
Kevätvehnä	260-5_3	30,62	51,78	0,00	0,03			
Kevätvehnä	260-6_1	41,47	54,42	0,00	0,00	0,00	0,00	166,45%
Kevätvehnä	260-6_2		37,23		0,00			
Kevätvehnä	260-6_3	36,53	40,36	0,00	0,00			

(jatkuu)

Taulukko 12. jatkuu

Vilja	Näyte	Ct	DNA (ng/μl)	F. culmorum DNA (ng/μl)	F. culmorum DNA/kok. DNA (pg/μl)	Ka. F. grami- nearum DNA/kok. DNA (pg/μl)	Std.	Std. %
Kevätvehnä	278-6_1		37,69		0,00	0,00	0,00	173,21%
Kevätvehnä	278-6_2		48,03		0,00			
Kevätvehnä	278-6_3	37,44	44,83	0,00	0,00			
Kevätvehnä	278-7_1	32,86	55,25	0,00	0,02	0,01	0,01	173,21%
Kevätvehnä	278-7_2		40,52		0,00			
Kevätvehnä	278-7_3		39,99		0,00			
Kevätvehnä	297-14_1		50,73		0,00	0,00	0,01	173,21%
Kevätvehnä	297-14_2	33,85	48,92	0,00	0,01			
Kevätvehnä	297-14_3		43,40		0,00			
Rehuohra	297-16_1		33,90		0,00	0,00		
Rehuohra	297-16_2		32,92		0,00			
Rehuohra	297-16_3		30,59		0,00			
Rehuohra	297-17_1		31,24		0,00	0,03	0,04	139,21%
Rehuohra	297-17_2	34,78	32,96	0,00	0,01			
Rehuohra	297-17_3	32,43	25,18	0,00	0,07			
Rehuohra	297-18_1		39,73		0,00	0,00	0,00	173,21%
Rehuohra	297-18_2		35,12		0,00			
Rehuohra	297-18_3	35,37	32,87	0,00	0,01			
Rehuohra	297-19_1		28,71		0,00	0,00	0,00	173,21%
Rehuohra	297-19_2		26,37		0,00			
Rehuohra	297-19_3	37,92	31,48	0,00	0,00			
Rehuohra	244-13_1	32,24	28,35	0,00	0,02	0,34	0,58	167,39%
Rehuohra	244-13_2	26,72	35,38	0,04	1,01			
Rehuohra	244-13_3	32,83	34,69	0,00	0,01			
Rehuohra	244-15_1	35,24	28,54	0,00	0,00	0,02	0,03	166,35%
Rehuohra	244-15_2		29,43		0,00			
Rehuohra	244-15_3	30,77	27,89	0,00	0,05			
Rehuohra	260-13_1	37,87	26,65	0,00	0,00	0,01	0,01	145,05%
Rehuohra	260-13_2	35,11	21,50	0,00	0,01			
Rehuohra	260-13_3		30,33		0,00			
Rehuohra	278-11_1	36,97	27,33	0,00	0,00	0,01	0,02	160,89%
Rehuohra	278-11_2	31,16	30,78	0,00	0,04			
Rehuohra	278-11_3	36,44	25,81	0,00	0,00			
Rehuohra	278-12_1		38,65		0,00	0,00		
Rehuohra	278-12_2		32,10		0,00			
Rehuohra	278-12_3		40,93		0,00			
					Keskiarvo	0,03	0,05	157,01%
					Maksimi	0,34	0,58	173,21%
					Minimi	0,00	0,00	83,21%