

***Fusarium*-homeet viljassa**

Homeen tartunta ja toksiinien muodostuminen sekä sadon toksiiniriskin hallinta

Päivi Parikka, Timo Kaukoranta, Sari Rämö, Veli Hietaniemi, Armi Asola, Marika Jestoi, Vertti Virkajärvi, Tuija Sarlin, Ulla Holopainen, Arja Laitila



Fusarium-homeet viljassa

**Homeen tartunta ja toksiinien muodostuminen sekä sadon
toksiiniriskin hallinta**

**Päivi Parikka, Timo Kaukoranta, Sari Rämö, Veli Hietaniemi, Armi Asola, Marika Jestoi,
Vertti Virkajärvi, Tuija Sarlin, Ulla Holopainen, Arja Laitila**

ISBN: 978-952-487-560-8 (Verkkajulkaisu)

ISSN: 1798-6419 (Verkkajulkaisu)

URN: <http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-487-560-8>

<http://www.mtt.fi/mttraportti/pdf/mttraportti153.pdf>

Copyright: MTT

Kirjoittajat: Päivi Parikka, Timo Kaukoranta, Sari Rämö, Veli Hietaniemi, Armi Asola, Marika Jestoi, Vertti Virkajärvi, Tuija Sarlin, Ulla Holopainen, Arja Laitila

Julkaisija ja kustantaja: MTT Jokioinen

Julkaisuvuosi: 2014

Kannen kuva: Päivi Parikka

Fusarium-homeet viljassa

Päivi Parikka¹⁾, Timo Kaukoranta¹⁾, Sari Rämö¹⁾, Veli Hietaniemi¹⁾, Armi Asola²⁾, Marika Jestoi²⁾, Vertti Virkajärvi³⁾, Tuija Sarlin³⁾, Ulla Holopainen³⁾, Arja Laitila³⁾

¹⁾MTT kasvintuotannon tutkimus, MTT Palveluyksikkö

²⁾Evira, Kemian ja toksikologian tutkimusyksikkö

³⁾VTT bio- ja prosessitekniikan yksikkö

Tiivistelmä

SAFECEREAL-projektissa tutkittiin *Fusarium*-homeita, erityisesti nk. A-tyypin trikotekeenituottajina tunnettuja *F. langsethiae* ja *F. sporotrichioides* -lajeja ja niiden toksiinisynteesin käynnistymiseen vaikuttavia tekijöitä kaurassa ja ohrassa kasvukauden aikana. Projektissa tutkittiin myös *Fusarium*-sienten säilymistä kasvijätteessä ja talvehtimista. Lisäksi otettiin käyttöön menetelmiä toksiinipitoisuuksien varhaiseen ennakkointiin ja niiden seuraamiseen ennen sadonkorjuuta sekä turvallisuuslaadun määrittämiseen sadonkorjuun jälkeen.

Tutkimus osoitti, että kesän sääolot vaikuttavat merkittävästi kasvinjätteessä talvehtivien *Fusarium*-lajien määrään ja lajisuhteisiin. *F. culmorum* ja *F. avenaceum* muodostivat pääosan talvehtivista *Fusarium*-sienistä. *F. langsethiae* oli yleinen sekä ohralla että kauralla kasvukauden aikana, mutta lajista tehtiin ainoastaan yksi havainto talven yli säilytetystä kasvijätteestä. Toinen T-2/HT-2 tuottaja *F. sporotrichioides* sen sijaan selvisi erinomaisesti talven yli oljessa ja sängessä. Kasvijätteet, myös lohkon esikasvijätteet, muodostavat merkittävän tartuntalähteen, joka voi infektoida uuden kasvuston.

Mykotoksiinien muodostumista ohrassa tutkittiin kasvukauden aikana transkriptioprofilointi- (TRAC) ja kemiallista monijäämämenetelmää käyttäen. Tutkimuksessa havaittiin, että erilaiset kasvukauden olosuhteet vuosina 2010 ja 2011 näkyivät myös *Fusarium*-sienten kasvussa ja aktiivisuudessa. Lisäksi osoitettiin homeiden erilaiset aktiivisuusprofiilit eri satovuosina. Toksiininmuodostus voi alkaa jo varhaisessa vaiheessa, sillä T-2 ja HT-2-toksiineja havaittiin jo ensimmäisissä kasvukauden aikaisissa näytteissä, jotka otettiin 0-4 päivää tähkälle tulon jälkeen vuosina 2010 ja 2011. Projektissa kehitettiin RNA-eristysmenetelmä kasvukauden aikaisille ohran tähkänäytteille. Uudella transkriptioprofilointimenetelmällä ja suunniteltujen spesifisten *Fusarium*-koettimien avulla pystyttiin ensimmäistä kertaa määrittämään *Fusarium*-sienten toimintaa monimuotoisessa ekosysteemissä. Tutkimuksessa havaittiin myös, että keskimääräiset T-2 ja HT-2 pitoisuudet käsittelemättömissä näytteissä olivat selvästi korkeampia vuonna 2011 kuin 2010, vaikka kesällä 2011 *Fusarium*-homeiden qPCR analyysissä havaittu määrä oli pienempi. *F. langsethiae*-lajin yleisyys (viljelymenetelmällä määritettynä) oli kuitenkin selvästi suurempi 2011 kuin 2010. T-2 ja HT-2 toksiineja hav

aittiin kauralla hieman enemmän kuin ohralla. Viljalajikkeella ei ollut selkeää vaikutusta toksiinituoton herkkyyteen, vaan tulokset vaihtelivat tutkimusvuosien välillä. Tutkittaessa fungisidikäsitteilyn vaikutusta T-2+HT-2 -toksiinien tuottajiin ja toksiininmuodostukseen pelto-olosuhteissa, havaittiin, että peittauksella ei ollut vaikutusta *F. langsethiae* tartuntaan kauralla, eikä kasvukauden aikana tehty torjuntaruiskutus vaikuttanut yksiselitteisesti *Fusarium*-sienten kasvuun tai toksiinien tuottoon. Valmiista puiduista ohra-näytteistä määritettiin jopa suurempia *Fusarium*-DNA kokonaismääriä torjuntakäsittelyn jälkeen verrattuna käsittelemättömään ohraan. *Fusarium*-sienten kvantitointi reaaliaikaisen PCR-menetelmän avulla osoittautui lupaavaksi osoitusmenetelmäksi myös kasvukauden aikaisille näytteille. Sen avulla voitiin kvantitoida *Fusarium*-sienten biomassan määrää monimuotoisessa mikrobiyhteisössä, missä läsnä on myös useita muita sieniryhmiä.

Projektissa kehitettiin DON-toksiinille aikaisemman hankeyhteistyön pohjalta alueellista riskimallia, joka oli koekäytössä 2012-2013. Ennuste toimi varsin hyvin vuoden 2013 olosuhteissa ja sen osoittama riski voitiin todentaa viljan hometoksiiniseurannan näyteaineiston ja viljakaupan aineiston perusteella. Sen sijaan T-2 ja HT-2- toksineja ei voitu ennustaa säätiedon perusteella.

Projektissa tutkittiin T-2 ja HT-2 -pikatestin soveltuvuutta ennen korjuuta tehtäviin määrityksiin. Pikamenetelmien referenssimenetelminä käytettiin LC-MS- ja GC-MS -tekniikkaan perustuvia kemiallisia menetelmiä. Neogen Veratox- T-2 ja HT-2 -testi soveltui valmiin ohra-, kaura- ja vehnäsadon toksiniinimäärityksiin, mutta se ei ollut käyttökelpoinen kasvukauden aikana otetuille, valmistumattomille jyvänteille. Alustavien tutkimusten mukaan NIR-tekniikka vaikuttaa lupaavalta viljan hometoksiinien monitorointiin viljan vastaanotossa ja käsittelyssä, mutta kalibraatioaineistoa oli vielä käytettävissä liian vähän. *Fusarium*-sienten esiintymistä valmiissa ohrasadossa määritettiin monialaiseen kuvantamiseen perustuvan VideometerLab-laitteen avulla (Videometer A/S). Tutkimus osoitti, että sovellus ei ole vielä valmis erottamaan *Fusarium*-saastuneita jyviä vertailunäytteistä. Videometer laitteella saatu *Fusarium*-kontaminaatiotaso ei korreloinut *Fusarium*-DNA- tai viljelytulosten kanssa. Kuvantaminen olisi onnistuessaan nopea työkalu viljan laadun varmistukseen. Videometer- laitteen kehitystyö on edelleen käynnissä.

Tämä tutkimus vahvisti, että viileä ja sateinen kesä on suotuisa *Fusarium*-sienten kasvulle. Sateisen kesän 2012 ohran satonäytteistä määritettiin jopa 10-kertaisia *Fusarium* DNA-pitoisuuksia kesän 2011 näytteisiin verrattuna. Tutkimus toi täysin uutta tietoa mykotoksiinisynteesin käynnistymisestä ja toksiniinisynteesiin liittyvien geenien ilmenemisestä pellolla kasvukauden aikana. Tässä projektissa saatiin ensimmäistä kertaa osoitettua *Fusarium*-sienten aktiivisuuden käynnistymisen kannalta kriittinen ajanjakso, joka on 10-14 päivää tähkälle tulon jälkeen. Tutkimus osoitti myös, että varhain ilmenevä geeni Tri 12 on potentiaalinen biomarkkeri toksiniinisynteesin käynnistymiselle. Se koodaa ionipumppua, jota tarvitaan trikotekeenitoksiinien kuljetukseen ulos solusta. Geenin aktivaatio havaittiin 2010 ja 2011 ensimmäisenä, jo 3-7 päivää tähkälle tulon jälkeen, selkeästi ennen sienien normaaliin kasvuun liittyvän *Fusarium*-elongaatiotekijän ilmenemistä.

T-2 ja HT-2 -toksiineja esiintyi yleisesti kasvukauden aikana vaikka olosuhteet olivat epäsuotuisat *Fusarium*-sienten kasvulle. Lähes kaikista (98%) kesän 2011 kenttäkokeen tähkänäytteistä määritettiin mitattavia HT-2 ja T-2 pitoisuuksia (9-1310 µg/kg). Tutkimus osoitti selkeästi, että T-2 ja HT-2 -toksiinien riskin ennakkointia ei voi käytännössä perustaa pelkkään säätietoon, sillä yhteys laajan alueen sään ja sadossa havaittavien T-2 ja HT-2 -toksiinien välillä on selvästi heikompi kuin deoksinivalenolilla.

Avainsanat:

ohra, kaura, hometoksiinit, trikotekeenit, *Fusarium*-lajit, toksiniinisynteesi, riskimalli, pikatestit, kuvantaminen

Early warning systems and control of toxigenic *Fusarium* fungi in the cereal production chain

Päivi Parikka¹⁾, Timo Kaukoranta¹⁾, Sari Rämö¹⁾, Veli Hietaniemi¹⁾, Armi Asola²⁾, Marika Jestoi²⁾, Vertti Virkajärvi³⁾, Tuija Sarlin³⁾, Ulla Holopainen³⁾, Arja Laitila³⁾

¹⁾MTT kasvintuotannon tutkimus, MTT Palveluyksikkö

²⁾Evira, Kemian ja toksikologian tutkimusyksikkö

³⁾VTT bio- ja prosessiteknikan yksikkö

Abstract

The focus of the SAFECEREAL project was on A-type trichothecene producing *Fusaria*, especially the species *F. langsethiae* and *F. sporotrichioides*, and induction of mycotoxin synthesis on barley and oats during the growing season. Furthermore, this project studied the survival of *Fusarium* fungi in plant residue over winter. In addition, this project aimed to adapt new methods for early prediction and detection of mycotoxins before harvest and for analyses of cereal quality after harvest.

Weather conditions during the growing season had a significant impact on the population dynamics of *Fusarium* fungi surviving in the field. *F. culmorum* and *F. avenaceum* were the main species in crop residue. *F. langsethiae* was common on both oats and barley during the growing season, but was detected only once in overwintered plant residue, while *F. sporotrichioides* survived the winter well in straw and stubble. Plant residues, including residues of pre-crops, are an important source of infection for the new emerging crop. Real-time PCR enabled quantification of the *Fusarium* biomass in the complex microbial communities consisting of a heterogenous group of fungi and bacteria.

Transcriptional profiling (TRAC) and the multi-toxin analyses method with liquid chromatography / mass spectrometry were used to study mycotoxin formation on barley during crop development. The study showed that different weather conditions during the growing seasons in 2010 and 2011 resulted in different growth and activity of *Fusarium* species, which could be seen in their activity profiles. Toxin formation began at an early development stage, and T-2 and HT-2 toxins were already detected 0–4 days after ear emergence. In this project, an RNA extraction method was developed for barley ear samples studied during growing season. The new transcriptional profiling method with the designed specific *Fusarium* primers made it possible for the first time to analyse the activity of *Fusarium* species in the cereal ecosystem. The study revealed that the average quantities of T-2 and HT-2 in untreated samples were significantly higher in 2011 than in 2010, although the observed amount of *Fusarium* in qPCR analyses was lower in 2011 than in 2010. However, based on the plating method results *F. langsethiae* was more prevalent in 2011 than in 2010. This study indicated that oats had a slightly higher susceptibility for increased T-2 and HT-2 levels than barley. Different oat or barley cultivars did not have a significant influence on toxin formation. Toxin formation was more determined by the local weather conditions that varied from year to year.

The effect of chemical fungicide treatments on mycotoxin formation was studied in field conditions. The results showed that seed dressing did not suppress *F. langsethiae* infection on oats. Also, fungicide treatment after the ear emergence period did not influence the growth and mycotoxin formation of *Fusarium* fungi. Indeed, total *Fusarium* DNA contents were sometimes higher in fungicide-treated barley than in untreated barley when harvested grains were analysed.

Based on earlier project work, a regional risk model was developed for DON toxin, and the prediction model was used in 2012–2013. In 2013, the risk model gave a relatively good prediction for DON risk which could be proved with the mycotoxin data from the annual mycotoxin survey and data from the cereal trading companies. However, it was not possible to predict the risk of T-2 and HT-2 toxins with weather data.

The rapid test kit was tested for analyses of T-2 and HT-2 in unripe and harvested grain. The reference methods used were based on LC-MS and GC-MS techniques. The kit tested, Neogen Veratox for T-2 and HT-2, was suitable for analyses of ripe barley, oat and wheat grain, but could not be used on unripe grain from growing plants. The preliminary results of NIR techniques in monitoring mycotoxins are promising, but more calibration material is needed to test the method. VideometerLab (Videometer A/S) based on multispectral image analysis was used to determine the amount of *Fusarium* fungi in barley grain. The study showed that the application was not yet ready to distinguish *Fusarium*-contaminated grain from control grains. The *Fusarium* contamination level obtained with imaging did not correlate with *Fusarium*-DNA or plating results. A reliable image analysis is a potential rapid tool for quality control of cereal grain, and the manufacturer is continuing to develop the Videometer equipment.

The SAFECEREAL project confirmed that a cool and rainy summer promoted *Fusarium* growth. In the barley samples from 2012, the levels of *Fusarium* DNA were 10 times higher than in 2011. The present study yielded novel information on the induction of mycotoxin synthesis and the expression of the genes involved in toxin synthesis in field conditions during the growing season. For the first time, we were able to indicate the critical period for the onset of *Fusarium* activity, which was 10–14 days after ear emergence. Furthermore, the study revealed that Tri12 is a potential marker for the induction of mycotoxin synthesis. Tri12 was an early expressing gene, detectable as early as 3–7 days after ear emergence. It encodes the ionic pump needed to transport trichothecenes out of cells. Activation of this gene was detected in 2010 and 2011 prior to the expression of the *Fusarium* elongation factor related to normal fungal growth.

T-2 and HT-2 toxins were prevalent during the growing season in 2010 and 2011 in spite of the conditions unfavourable to growth of *Fusarium* fungi. Almost all (98%) of the ear samples analysed in 2011 contained HT-2 and T-2 (9-1310 µg/kg). The results clearly indicated that prediction of the risk of T-2 and HT-2 toxins cannot be based exclusively on weather data as with predicting DON, since the connection between the weather data for a large area and the toxin contents observed in harvested grain is significantly weaker. Further research efforts should be focused on revealing the biological function of T-2 and HT-2 toxins and the induction mechanisms for toxin synthesis so that it would be possible to design preventive actions in the future.

Keywords:

barley, oats, mycotoxins, trichothecenes, *Fusarium* species, mycotoxin synthesis, risk model, rapid test kits, image analysis

Alkusanat

Viljasatoa ja sen laatua heikentävät punahomeet ovat viime vuosina nousseet kiinnostuksen kohteiksi. Pohjoisessa ilmastossa *Fusarium*-lajit ovat tärkeimpiä hometoksiinien muodostajia, jotka tartuttavat kasvavaa viljaa ja muodostavat toksiineja jo kasvuukauden aikana. Viljelymenetelmien muutos käynnisti keskustelun *Fusarium*-toksiineista ja niitä muodostavien lajien merkityksestä.

Euroopan Yhteisön asettamat enimmäispitoisuudet tärkeimmille *Fusarium*-toksiinille, deoksinivalenolille (DON, raaka-vilja 1250 µg/kg ja prosessoitunut vilja 750 µg/kg) ja zearalenonille (ZEA, raaka-vilja 100 µg/kg ja prosessoitunut vilja 75 µg/kg), elintarvikkeeksi käytettävässä viljassa ja viljatuotteissa vuonna 2006 lisäsivät tarvetta tuntea viljelyyn liittyvien tekijöiden vaikutusta sieniin ja toksiinien muodostumiseen.

Viljan hometoksiineihin liittyvää tutkimusta on viimeksi kuluneiden kymmenen vuoden aikana tehty useassa kansallisessa hankkeessa Maa- ja metsätalousministeriön Makeran ja muiden rahoittajien tuella. Vuosina 2004–2006 hankkeessa ”Turvallisuusindikaattorien kehittäminen kotimaiselle viljaraaka-aineketjulle” tarkasteltiin kasvitautitorjunnan sekä kynnön ja suorakylvön vaikutuksia ohran ja kauran *Fusarium*-tartuntaan ja toksiinien esiintymiseen. ”Selvitys *Fusarium*-lajeista ja niiden muodostamista mykotoksiineista suomalaisessa viljassa (FinMyco)” vuosina 2005–2007 tuotti tietoa suomalaisen viljan *Fusarium*-lajistosta ja toksiinien, myös ns ”uusien” mykotoksiinien esiintymisestä. ”Haittamikrobien ja niiden tuottamien toksiinien varhainen osoittaminen rehuissa ja viljoissa uudella transkriptioprofilointimenetelmällä (VILJATRAC)”-hankkeessa tutkittiin sienten aktiivisuutta ja toksiinisynteesiä sekä kehitettiin määrittämenetelmiä.

Tämä raportti luo yhteenvedon Makeran tukeman hankkeen ”Toksiineja tuottavien *Fusarium*-homeiden hallinta ja varhaisvaroitusjärjestelmät turvallisen viljatuotannon takaamiseksi (SAFECEREAL)” keskeisistä tuloksista. Makeran lisäksi hanketta rahoittivat MTT, Evira ja VTT. Yrityskumppaneina projektissa oli PlexPress Oy, Panimolaboratorio Oy, Syngenta Crop Protection ja Nestle Nutrition. Projektissa tutkittiin A-tyyppin trikotekeenien muodostumista ja siihen vaikuttavia tekijöitä pelto-oloissa sekä toksiinintuottajien elinkiertoa. MTT vastasi kenttäkokeiden suorituksesta, toksiiniennusteen kehittämisestä, *Fusarium*-lajiston määrittämisestä viljelymenetelmillä sekä toksiiniennusteen rakentamisesta ja pikamäärittämenetelmien tarkastelusta. VTT tutki *Fusarium*-sienten kvantitointia reaaliaikaisen PCR-menetelmällä avulla sekä kehitti transkriptioprofilointimenetelmää (TRAC) *Fusarium*-sienten aktiivisuuden ja trikotekeeni-synteesin käynnistymisen seurantaan. Lisäksi VTT tutki kuvantamismenetelmän käyttökelpoisuutta homeisuuden määrittämiseen valmiista sadosta. Eviran osuutta olivat toksiinianalyysit monijäämämenetelmällä kasvukaudella ja valmiista sadosta. Plexpress Oy suunnitteli TRAC-koettimet ja osallistui aineiston käsittelyyn.

Hankkeen ohjausryhmän jäseniä olivat Liisa Rajakangas (MMM, puheenjohtaja), Mirja Kartio (Evira), Anu Kaukovirta-Norja (VTT), Annika Wilhelmson (VTT/PBL), Päivi Tähtinen (VYR), Sari Peltonen (ProAgria), Karri Kunnas (ETL), Petri Peltola (Senson Oy) ja varajäsenenä Erja Kotaviita (Raisio Oy)

Jokioisilla 7.10.2014

Tutkimusryhmä

Sisällysluettelo

1 Tausta ja tavoitteet.....	9
1.1 Toksiinien muodostuminen ja siihen vaikuttavat tekijät.....	9
1.2 Toksiinien muodostumisen määrittäminen	9
1.3 Toksiiniriskin mallintaminen	9
1.4 Toksiinipitoisuuden määrittäminen viljaketjussa	10
1.5 Tutkimuksen tavoitteet.....	10
2 Tutkimusmenetelmät ja aineisto.....	12
2.1 Fusarium lajien elinkierto ja toksiinintuotannon käynnistyminen	12
2.1.1 Peltokokeet ja näytteenotto Jokioisilla 2010–2012.....	12
2.1.2 <i>Fusarium</i> -homeiden lajikirjo ja kvantitointi	14
2.1.3 <i>Fusarium</i> -aktiivisuuden ja toksiinien tuoton seuraaminen transkriptioprofilointimenetelmällä (TRAC)	15
2.1.4 Mykotoksiinien monimuotoisuuden ja määrän kehitys kemiallisilla monijäämämenetelmillä	16
2.2 Toksiinipitoisuuksien ennakointi ennustemallilla	16
2.3 Sadon mykotoksiinipitoisuuksien arviointi pikamenetelmillä	17
2.3.1 ELISA-kuoppalevytekniikka viljan T-2/HT-2 –toksiinien määrittämisessä.....	17
2.3.2 NIR-menetelmä toksiinimäärittämisessä.....	17
2.3.3 Homeisuuden määrittäminen kuvantamisella	18
3 Tutkimustulokset.....	19
3.1 Sääolot tutkimusvuosina	19
3.2 <i>Fusarium</i> -homeiden lajikirjo ja kvantitointi	20
3.2.1 <i>Fusarium</i> -homeiden lajikirjo viljelymenetelmällä.....	20
3.2.2 <i>Fusarium</i> -sienten määrä ohrassa reaaliaikaisella PCR-menetelmällä määritettynä.....	27
3.2.3 Mykotoksiinien muodostuminen viljaan kasvukaudella	31
3.2.4 Mykotoksiinien monimuotoisuuden ja määrän kehitys kemiallisilla monijäämämenetelmillä	37
3.3 Toksiinipitoisuuksien ennakointi ennustemallilla	46
3.4 Pikamenetelmien käyttökelpoisuus sadon laadunmäärittämisessä.....	48
3.4.1 Pikatestit mykotoksiinien määrittämisessä.....	48
3.4.2 NIR-tekniikka.....	50
3.4.3 <i>Fusarium</i> -sienten osoittaminen monialaiseen kuvantamiseen perustuvalla VideometerLab- laitteella.....	50
3.5 Reaaliaikaisen PCR menetelmän ja transkriptioprofiloinnin soveltuvuus kauranäytteille.....	51
4 Tulosten tarkastelu.....	53
4.1 Kirjallisuusviitteet	55

1 Tausta ja tavoitteet

Fusarium- eli punahomeet ovat merkittävä osa viljan luontaista mikrobiyhteisöä. Sen lisäksi, että punahomeet vähentävät sadon määrää ja ravitsemuksellista laatua, ne voivat myös muodostaa viljaan myrkyllisiä aineenvaihduntatuotteita – mykotoksiineja. Mykotoksiinit saattavat suurina pitoisuuksina aiheuttaa terveydellistä uhkaa kuluttajille sekä tuotantoeläimille. Home- tai toksiinipitoisuuksien nousu vaikuttaa myös merkittävästi viljantuotannon kannattavuuteen heikentämällä raaka-aineen käyttökelpoisuutta. Näistä syistä johtuen toksiineja muodostavien (toksigeenisten) homeiden sekä mykotoksiinien muodostumisen hallinta on ensiarvoisen tärkeää viljaketjun toimijoiden kannalta. Toksigeenisten homeiden lajikirjon ja riskien on ennustettu lisääntyvän ilmaston lämpenemisen myötä myös pohjoisilla viljelyalueilla.

Fusarium-lajien tuottamista mykotoksiineista Euroopan yhteisössä on toistaiseksi asetettu korkeimmat sallitut pitoisuustasot raakaviljassa deoksinivalenolille (DON) ja tsearalenonille (ZEN). Valmisteilla on myös enimmäispitoisuuden asettaminen T-2- ja HT-2- toksiinien yhteismäärälle. Kotimaisessa viljassa DON-pitoisuuksissa tavataan vuosittain raja-arvon ylityksiä, samoin HT-2- ja T-2- pitoisuuksia on esitettyjen suositusarvojen tasolla (mm. www.cerveg.fi). Erityisesti kauralla riski sadon turvallisuuslaadun heikkenemisestä HT-2+T-2 -toksiinien vuoksi on muita viljoja suurempi. Tämä on merkittävä erityisesti vientikaupassa, sillä kaura on tärkeä vientivilja. Myös ohralla ja kevätvehnällä HT-2+T-2 -toksiinien (ns. A-tyyppin trikotekeenien) esiintyminen on yleistynyt ja pitoisuustasot ovat nousseet 2000-luvun aikana. Tämän oletetaan johtuvan uuden punahomelajin, *Fusarium langsethiaen*, yleistymisestä ja leviämisestä uusille viljatuotantoalueille. Tämän punahomelajin yleistyminen on osoitettu myös Euroopan-laajuisesti (Edwards ym. 2009). *F. langsethiaen*-lajin lisäksi myös *F. sporotrichioides*, on aktiivinen A-tyyppin trikotekeenien tuottaja (Jestoi ym. 2007). *F. langsethiaen* on yleisin kauralla, mutta lajia tavataan myös ohralla (Parikka ym. 2005).

1.1 Toksiinien muodostuminen ja siihen vaikuttavat tekijät

Mykotoksiinien muodostuminen on erittäin monimutkainen prosessi, jonka yksityiskohtia ei edelleenkään täysin tunneta. Siihen vaikuttaa paitsi itse tuottajahome ja sen geneettiset ominaisuudet, myös erilaiset ympäristöolosuhteet kuten lämpötila, kosteus, kasvumatriisi, muut mikrobit jne. Pelto-olosuhteissa viljoihin muodostuu monimuotoinen mikrobiyhteisö, jonka koostumukseen vaikuttaa mm. viljalajikkeeseen infektiokerkyys, maanmuokkausmenetelmät ja fungisidien käyttö. Eri viljalajikkeiden infektiokerkyyksistä sekä DON- että HT-2+T-2 -tuottajahomeille on toistaiseksi varsin vähän tietoa. Samoin ei ole tarkkaa tietoa, mikä on näiden homeiden elinkierto ja siihen vaikuttavat tekijät. Tämä tieto on tärkeää, jotta näiden homeiden kasvun estämiseen voidaan kehittää tehokkaita keinoja. Samoin tiedetään, että fungisidien käyttö voi vaikuttaa *Fusarium*-tartuntaa vähentävästi, mutta liian alhaiset fungisiditasot voivat toisaalta indusoida toksiinisynteesin käynnistymisen. Norjassa tulokset fungisidien vaikutuksesta T-2/HT-2 -pitoisuuksiin ovat olleet heikkoja (Elen ym. 2008). Englannissa on todettu, että tautitorjunta saattaa jopa lisätä toksiinipitoisuuksia viljassa (D’Mello ym. 2004).

1.2 Toksiinien muodostumisen määrittäminen

Viljoissa ja viljaprosesseissa esiintyvien homeiden osoittaminen sekä niiden haittayhdisteiden tuoton varhainen havaitseminen on keskeisessä asemassa, kun pyritään torjumaan niiden aiheuttamia haittoja. Viime aikoina on kehitetty erilaisia DNA-pohjaisia menetelmiä haittamikrobien osoittamiseen ja identifiointiin. Nämä menetelmät eivät kuitenkaan kerro, milloin ja missä olosuhteissa *Fusarium*-sienten toiminnalliset geenit aktivoituvat ja mm. toksiineja muodostava metabolia käynnistyy. Monet tutkimukset ovat lisäksi osoittaneet, että toksigeenisen homeen läsnäolo ei välttämättä merkitse toksiinisynteesin käynnistymistä ja että samassa ympäristössä voi esiintyä eri mikrobiryhmiä ja siten samanaikaisesti muodostua useita eri toksiineja.

Toksiinien muodostumiseen vaikuttavia tekijöitä voidaan ymmärtää ja ennakoida tutkimalla niiden tuottoa koodaavien geenien ilmentymistä. Geenien ilmentymistä tutkitaan mittaamalla lähetti-ribonukleiini-

happoa eli lähetti-RNA:ta. Mittaamalla lähetti-RNA-tasoa voidaan ennustaa, mitä elävä solu on tekemässä seuraavaksi. VTT:llä kehitetty uusi kvantitatiivinen lähetti-RNA-analytiikkaan perustuva menetelmä (VTT-TRAC) mahdollistaa kymmenien geenien ilmentymisen yhtäaikaisen ja kvantitatiivisen osoittamisen samasta näytteestä (Rautio ym., 2008). Aikaisemmassa MMM-hankkeessa (VILJATRAC) luotiin valmiudet soveltaa tätä menetelmää *Fusarium*-sienten ja niiden toksinisynteesin käynnistymisen nopeaan osoittamiseen viljassa. Hankkeessa suunniteltiin koetinsetit geneille, jotka liittyivät sekä *Fusarium*-sienten normaaliin kasvuun että trikotekeenisynteesiin (Rautio ym., 2007).

Evirassa on kehitetty ns. multimenetelmä usean mykotoksiinin yhtäaikaiseen määrittämiseen viljasta ja rehuista nestekromatografi-tandemmassaspektrometrisesti (LC-MS/MS) (Kokkonen ja Jestoi, 2009). Analyysitekniikka mahdollistaa useiden, kemiallisilta ominaisuuksiltaan erilaisten yhdisteiden samanaikaisen määrittämisen. Analyysin tehostuttua myös kustannukset ovat aikaisempaan verrattuna pienemmät. Kehitetyllä menetelmällä voidaan määrittää yhteensä yli 30 erilaista mykotoksiinia. Näiden uusien multimenetelmien avulla voidaan samanaikaisesti ennakoita useiden eri haittayhdisteiden tuottoa pellolla ja koko viljan jalostusprosessissa sekä suunnitella ja luoda valmiuksia mahdollisimman täsmällisiin keinoihin haittamikrobien estoon ja torjuntaan. Lisäksi saadaan tietoa mm. siitä, miksi toksigeeniset *Fusarium*-lajit ovat lisääntymässä sekä milloin ja missä olosuhteissa infektio ja toksinintuotanto tapahtuvat.

1.3 Toksiiniriskin mallintaminen

Sää on tärkein *Fusarium*-homeiden tartuntaan ja toksinimuodostukseen vaikuttava tekijä. Sääolot vaikuttavat voimakkaasti korjattavan sadon turvallisuuslaatuun. Säähän perustuvia toksiiniriskin ennustemalleja on kehitetty useissa maissa mm Hollannissa (Franz ym. 2009) ja Kanadassa (Schaafsma ja Hooker 2007) ja niitä on käytössä Yhdysvaltojen ja Kanadan lisäksi Keski-Euroopassa (Hooker ym. 2002, Musa ym. 2007, Schaafsma ja Hooker 2007). Mallien käyttökelpoisuus ei kuitenkaan ole kovin hyvä suomalaisissa oloissa, koska meillä on erilainen *Fusarium*-lajisto verrattuna sekä Keski- ja Etelä-Eurooppaan että Pohjois-Amerikkaan. Norjassa kehitetty toksiiniriskin suuruutta ennakoiva malli on maantieteellisesti lähin meille soveltuva malli (Brodal ym. 2008). Kohonneen toksiiniriskin aikainen toteaminen hyödyttää sekä viljelijää että viljan käyttäjää pyrittäessä optimoimaan raaka-aineen käyttöä. Koko ketjun huomioon ottavaa riskinarviointia on tarkasteltu Hollannissa vehnällä perustuen valittuihin riski-indikaattoreihin, kuten säähän ja viljelytekniikkaan (Van der Fels-Klerx ym. 2007). Siirtyminen suorakylvöön ja entistä yksipuolisempaan viljanviljelyyn yhdistettynä ilmaston lämpenemiseen muuttaa toksigeenisten homeiden ekologiaa ja toksiinitalannetta myös Suomessa.

1.4 Toksiinipitoisuuden määrittäminen viljaketjussa

Viljan turvallisuuden ja kauppakelpoisuuden määrittäminen mahdollisimman varhaisessa vaiheessa auttaa säästämään kustannuksissa, kun heikkolaatuista viljaa voidaan ohjata pois rehu- tai ravintokäytöstä jo ennen markkinointia. Mykotoksiinien määrittäminen pikamenetelmillä on tutkittu valmiista sadosta (Rämö ym. 2008). Kuitenkaan menetelmien soveltuvuudesta valmistumattoman sadon DON-analytiikkaan ei ole kokemuksia. Toksiinit muodostuvat kehittyviin jyviin, joten niiden määrittäminen ennen korjuuta antaa ennakkotietoa tulevasta laadusta. Viljan kauppakelpoisuuden määrittäminen mahdollisimman varhaisessa vaiheessa säästää kustannuksia, kun heikkolaatuinen vilja pystytään ohjaamaan pois rehu- ja elintarvikekäytöstä. MTT:n aikaisemmissa tutkimuksissa on testattu eri viljoille soveltuvia mykotoksiinien pikamäärittämenetelmiä. Mukana tutkimuksissa on ollut sivuvirtaus- eli liuskatestejä, ELISA –kuoppalevytestejä ja lähi-infrapunatekniikkaan (NIR) perustuva pikamäärittäminen. Pikatestien referenssimenetelminä on käytetty nestekromatografi (HPLC)- ja kaasukromatografi -massaspektrometri (GC-MS) -tekniikkaan perustuvia kemiallisia menetelmiä.

Pikatestien käyttö on yleistynyt viljan vastaanotossa viime vuosina ja tulosten luotettavuus on herättänyt keskustelua. Epävarmuutta tuloksiin ovat aiheuttaneet eri viljamatriisit ja pikatestien ristireaktiot, esimerkiksi ELISA -kuoppalevytestien deoksinivalenolimäärityksissä (DON) ristireaktioita aiheuttavat 3-asetyyliideoksinivalenoli (3-AcDON) ja 15-asetyyliideoksinivalenoli (15-AcDON). Tämän takia tutkittavasta näytteestä voidaan saada vääriä positiivisia tuloksia. Lisäksi pikatestien soveltuvuutta viljan vastaanottoon tai lähes valmiin sadon hometoksiinipitoisuuksien määrittämiseen on arvioitu. Liuskatestit ovat kenttäolosuhteisiin soveltuvia, mutta ne vaativat käyttökoulutusta, kuten liuskemiaa ja liuskojen

tulkintaa. Alustavien tulosten pohjalta soveltuvin menetelmä kenttäolosuhteisiin, tila- ja yrityskohtaiseen viljaraaka-aineen laadunmäärittelyyn on NIR/NIT -tekniikka.

NIR/NIT -tekniikkaan perustuvat menetelmät ovat elintarvike- ja rehuteollisuudessa sekä viljatutkimuksessa yleisesti käytettyjä menetelmiä. Viljojen koostumusmäärittelyssä kuten kosteus- valkuais- ja kuitupitoisuuksissa NIR/NIT -teknologia on suvereeni pikamenetelmä. Sen etuja ovat määrittysten nopeus ja monen eri yhdisteen samanaikainen mittaus. Lisäksi näytteen esikäsittelyssä ei tarvita kemikaaleja, mittaus on nopea ja teknologia soveltuu prosessiolosuhteisiin. Infrapunaspektroskopia otettiin ensimmäiseksi käyttöön viljan analysoinnissa jo noin 30 vuotta sitten. Pikamenetelmiin perustuva viljan hometoksiinipitoisuuksien mittaaminen sopisi erittäin hyvin viljan kuivaus- tai vastaanottovaiheessa tapahtuvan tiedonkeruun osaksi. Kuivaus- tai vastaanotto-prosessin aikana tapahtuva hometoksiinipitoisuuksien mittaaminen antaisi mahdollisuuden ohjata viljaeriä käyttötärpeen mukaan sekä varmistaa viljaerän laadukkuus esimerkiksi sertifiointitodistuksella.

1.5 Tutkimuksen tavoitteet

SAFECEREAL-projektin tavoitteena oli selvittää *Fusarium*-homeiden, erityisesti A-tyypin trikotekeenituottajien *F. langsethiae* ja *F. sporotrichioides* -lajien toksiiinisynteesin käynnistymiseen vaikuttavia tekijöitä kaurassa ja ohrassa kasvukauden aikana. Lisäksi tavoitteena oli ottaa käyttöön menetelmiä toksiiinipitoisuuksien varhaiseen ennakoointiin ja niiden seuraamiseen ennen sadonkorjuuta sekä turvallisuuslaadun määrittämiseen sadonkorjuun jälkeen.

Tutkimuksessa selvitettiin seuraavia *Fusarium*-lajeihin, toksiiineihin ja niiden määrittelyyn ja hallintaan liittyviä kysymyksiä:

1. *Fusarium* lajien elinkierto ja toksiiinintuotannon käynnistyminen
2. Toksiiinipitoisuuksien ennakointi ennustemallilla ja 3. Viljan laadun määrittely tiloilla ja viljan vastaanotossa.

Hankkeen tavoitteena oli selvittää erityisesti T-2+HT-2 -toksiiinintuottajien (*F. langsethiae* ja *F. sporotrichioides*) elinkiertoa pellolla sekä niiden kehitystä kasveissa ja analysoida mykotoksiinien muodostumista ohrassa kasvukauden aikana transkriptioprofilointi- (TRAC) ja kemiallista monijäämämenetelmää käyttäen. Tavoitteena oli etsiä sopivia biomarkkereita, jotka ennakoisivat haittayhdisteiden synteesin käynnistymistä eri kasvuvaiheissa ja joiden avulla voitaisiin ennakoida valmiin sadon toksiiinipitoisuutta. Fungisidikäsittelyn vaikutusta T-2+HT-2 -toksiiinien tuottajiin ja toksiiinimuodostukseen tutkittiin peltoolosuhteissa.

Tavoitteena oli luoda hometoksiinien riski- ja ennakointimalli hyödyntäen aikaisempaa mallinnustutkimusta ja kerättyä sää- ja toksiiinitietoa. Lisäksi tavoitteena oli saada aikaan sähköisesti käytettävä palvelu, jota sekä viljelijät että viljan käyttäjät voivat hyödyntää.

Tavoitteena oli myös selvittää eri pikamenetelmien käyttökelpoisuus, tarkkuus ja luotettavuus toksiiinimäärittelyyn tarkastelemalla MTT:n ja Eviran alustavien tutkimusten perusteella potentiaalisempien liuskatestien, ELISA-testien sekä lähi-infrapunatekniikkaan (NIR ja NIT) perustuvien menetelmien antamia tuloksia kemiallisilla menetelmillä saatuihin tuloksiin. Lisäksi tavoitteena oli tarkastella kuvantamisen käyttömahdollisuuksia jyvien homeisuuden määrittämisessä.

2 Tutkimusmenetelmät ja aineisto

2.1 Fusarium lajien elinkierto ja toksinintuotannon käynnistyminen

2.1.1 Peltokokeet ja näytteenotto Jokioisilla 2010–2012

Fusarium-tartunnan kehitystä seurattiin 2010–2011 Jokioisille perustetuissa kenttäkokeissa, jossa oli mukana ohra- ja kauralajikeita, jotka valittiin niiden aikaisemmin havaitun *Fusarium*-tartunta-alttiuden mukaan. Ohralajikkeet olivat Saana, Scarlett, Barke ja NFC Tipple. Kauralajikkeet olivat Belinda, Roope, Julius ja Viviana. Koejärjestelynä oli osa-osaruutumalli, jossa pääruutuina olivat tartuttamaton vilja sekä *F. sporotrichioides*-sienellä tähkälle tulon aikaan tartutettu kasvusto. Osaruutuina olivat kasvusto ilman torjuntaa, tähkälle tulon aikaan kasvitautivalmisteella käsitellyt sekä peitatulla siemenellä perustetut kasvustot. Osa-osaruutuina olivat kaura- ja ohralajikkeet. Torjuntakäsittelyyn käytettiin Delaro SC 325-valmistetta (trifloksistrobiini+protiokonatsoli) 0,7l/ha ja siemenen peittäus tehtiin Celest Formula M-valmisteella (fludioksoniili).

Kenttäkokeet kylvettiin muokattuun kasvualustaan ruutukylvökoneella (Wintersteiger). Ruutukoko kentällä oli 7,5 m² ja kerranteita 4. Koealueella mitattiin lämpötilaa maan pinnalla koko viljan kasvun ajan loggereilla (Tinytag Plus 2). Tartutusta varten *F. sporotrichioides*-sientä kasvatettiin perunadekstroosi (PDA) alustalla kahden viikon ajan. Rihmasto ja itiöt kaavittiin maljoilta ja sekoitettiin tislattuun veteen tehosekoittimella. Saatu homebiomassa laimennettiin ja sekoitettiin tartutusta varten puhtaaseen veteen. Itiömäärä lopullisessa tartukeliuoksessa oli noin 2 x 10⁶ /ml. Levitys ruuduille tehtiin kasvinsuojeluruis-kulla, jolloin käytetty suspensiomäärä oli 0,09L/m². Ruutusadot puitiin koeruutupuimurilla ja kuivattiin säkkikuivurissa sekä lajiteltiin (2 mm seula) (Taulukko 1).

Vuonna 2011 kylvettiin lisäksi täysin erillinen alue ilman käsittelyjä kolmena kerranteena VTT:n näytteenottoa varten, jotta keinotartunnan leviämismahdollisuus tartuttamattomiin näytteisiin voitiin eliminoida.

Kesän 2012 kenttä oli supistettu edellisistä vuosista, kauralajikkeista oli mukana vain Belinda ja Viviana, ohralajikkeista NFC Tipple ja Scarlett. Käsittelyinä olivat siemenen peittäus, tautitorjunta tähkälle tullessa sekä peittäus+ tautitorjunta. Tautitorjuntaan käytettiin Delaro 325 SC (0,7 L/ha) ja peittaukseen Celest Formula M. *Fusarium sporotrichioides*- tartutusta ei tehty kentällä, lukuun ottamatta Tipple-lajiketta. Silmä tartutettiin neljä ruutua, joista samoin kuin käsittelemättömistä ruuduista otettiin tähkänäytteet VTT:n qPCR analyysejä varten samoina päivinä kuin MTT:n sienimäärityksiin (Taulukko 1). Kentältä tutkittiin myös orasnäytteitä kesäkuun alussa.

Kentältä otettiin näytteitä *Fusarium*-määrityksiin viljelymenetelmällä tähkälle tulosta alkaen kahden viikon välein. Jokaiselta ruudulta kerättiin 20 tähkää/röyhyä/näytekertä. Lisäksi kentältä kerättiin jokaiselta ruudulta olki- ja sänkinäytteet *Fusarium*-määrityksiin puinnin jälkeen. Ruutujen olkea säilytettiin myös muokkaamattoman maan pinnalla talven ajan ja säilynyt *Fusarium*-tartunta määritettiin keväällä. Vuosina 2011 ja 2012 tarkastettiin käytetyn kylvösiemenen *Fusarium*-tartunta ja kentältä tutkittiin orasnäytteitä kesäkuussa peittauksen tehon selvittämiseksi.

Taulukko1. Kenttäkokeen kylvö- ja puintiajat sekä tartutus-, torjunta ja näytteenotto *Fusarium*-viljelymäärityksiin kehityvästä sadosta eri vuosina

Vuosi	Kylvö	Puinti	Tartutus	Torjunta		Näytteenottopäivät	
				kaura	ohra	kaura	ohra
2010	2.6.	15.7.	17.7.	20.7.,3.8.	20.7.,3.8.	2.9.	2.9., 14.9.
				17.8.,31.8.	17.8.,31.8.		
2011	9.5.	4.7.	5.7.	7.7., 21.7.	7.7., 21.7.	5.9.	16.8.
				4.8., 18.8.	4.8.		
2012	9.5.	9.7.	10.7.	11.7., 25.7.	11.7., 25.7.	13.9.	13.9.
				8.8.	8.8.		

Kenttäkokeista 2010 ja 2011 seurattiin *Fusarium*-sienten kasvua reaaliaikaisen PCR-menetelmän avulla sekä *Fusarium*-sienten aktiivisuutta ja trikotekeenisynteesin käynnistymistä hyödyntäen transkriptioprofiilointimenetelmää (TRAC). Taulukkoon 2. on koottu näytteet ja aikapisteet. TRAC-tutkimuksiin jauhetut tähkänäytteet jaettiin kahteen erään, joista puolet käytettiin RNA-erityksiin ja puolet DNA-eristykseen.



Kuvat 1. Kenttäkokeen kylvö ruutukylvökoneella ja *F. sporotrichioides*-tartutus kasvinsuojeluruiskulla 2010.

Kesän 2010 mykotoksiinäytteet kerättiin erikseen 16.7., 19.7., 27.7. 3.8. ja 24.8. ja kuivattiin. Kesän 2011 kokeissa mykotoksiinit analysoitiin samoista TRAC-analyysiin kerätyistä kenttänäytteistä, jolloin tulosten vertaaminen oli mahdollista. Vuonna 2012 tähkänäytteet pakastettiin qPCR ja toksinianalyysjää varten.

Taulukko 2. Näytteiden otto vuosina 2010–2012 transkriptioprofilointia ja *Fusarium*-sieniryhmän kvantitointia varten.

	2010	2011	2012
Lajikkeet: ohra	NFC Tipple, Scarlett, Saana	NFC Tipple, Scarlett, Saana	NFC Tipple
kaura	Belinda, Julius, Viviana	-	-
Kylvöajankohta	2.6.	9.5.	9.5.
Käsittelyt: Torjunta tähkälle tuloon aikaan	ei / kyllä 17.7.	ei / kyllä 5.7.	ei / kyllä 10.7.
Tartutus (<i>F. sporotrichioides</i>)	ei / kyllä (15.7.)	ei / kyllä (4.7.)	ei / kyllä 9.7.
Aikapisteet	<u>5</u> kpl tähkälle tulo (= 0 d) sekä 3, <u>10</u> , <u>14</u> ja <u>38</u> d infektiosta	<u>7</u> kpl tähkälle tulo (=0 d) sekä <u>7</u> , <u>10</u> , <u>14</u> , 21, 28 ja <u>35</u> d infektiosta	<u>3</u> kpl <u>11.7.</u> , <u>25.7.</u> , <u>8.8.</u> , <u>2.</u> , <u>16</u> ja <u>30</u>
Näytteitä kasvukaudelta	360 kpl (180 ohra- ja 180 kauranäytettä)	252 kpl (ohra)	24 kpl (ohra)
Puintiajankohta	2.9. (Tipple 14.9)	16.8	13.9.
Puidut valmiin sadon näytteet	72 kpl 2.9.	36 kpl (16.8.)	8 kpl 13.9.

2.1.2 *Fusarium*-homeiden lajikirjo ja kvantitointi

Fusarium-homeiden lajikirjo viljelymenetelmällä

Fusarium-tartuntaa seurattiin tähkänäytteistä aina tähkälletulosta sadonkorjuuseen 2 viikon välein. Lajikirjon määrittämiseksi kenttäkokeen ruuduilta kerätyistä tähkistä/röyhyistä maljattiin 40 tähkylää peptoni-PCBN-alustalle. Lajisto määritettiin morfologisin menetelmin perunadekstroosialustalle siirrostetuista sienikasvustoista (Parikka ym. 2005). Lisäksi tehtiin vielä määritykset puidusta, lajitellusta sadosta. Koealueilta kerättiin myös näytteet *Fusarium*-määrityksiin korjuun jälkeen sängestä ja oljesta. Olkinäytteitä asetettiin talven ajaksi muokkaamattomalle vilja-alueelle *Fusarium*-sienten talvehtimisen selvittämiseksi. Oljesta ja sängestä määritettiin *Fusarium*-tartunta ja lajien yleisyys maljaamalla korrenpaloja PCNB-alustalle. Vuosina 2011 ja 2012 tutkittiin lisäksi kylvösiemenen *Fusarium*-tartunta sekä tartunta oraista kesäkuun alussa. Tartunta määritettiin maljaamalla peittaamattomien ja peitattujen ruutujen oraista pinta-steriloituja tyvipaloja PCNB-alustalle.



Kuvat 2. Näytteenotto koeruuduilta *Fusarium*-lajiston -määrityksiä varten ja PCNB-alustalla jyvistä kasvavaa *Fusarium*-rihmastoa (viljelymenetelmä)

Fusarium-sienten kvantitointi reaaliaikaisella PCR menetelmällä

Fusarium-sienten kvantitointia varten ohramyllyllä jauhettujen näytteiden DNA eristettiin kaupallisella FastDNA® SPIN Kit for Soil-menetelmällä (Q-BIOgene, 6560-200). Eristystä varten jauhettuja ohranjyviä tai pakkaskuivattuja/jauhettuja tähkänäytteitä punnittiin 0,1 g hajotusputkiin, ja DNA-eristyksen mekaaninen hienonnuvaihe suoritettiin FastPrep®-24-laitteella (MP Biomedicals, Ranska). Valmistajan ohjeista poiketen näytteitä hienonnettiin 2 x 60 s ja hienonnusten välissä näytteitä pidettiin jäissä viiden minuutin ajan. Kaikki DNA-eristysten sentrifugoinnit suoritettiin 13 000 x g:n voimalla valmistajan ohjeiden mukaisilla ajoilla. Lopuksi eristettyjen DNA-liuosten DNA-pitoisuus ja puhtausaste määritettiin NanoDrop 2000 -spektrofotometrillä (Thermo Scientific, USA).

Fusarium-sienten määrän kvantitointiin käytettiin reaaliaikaista PCR-menetelmää (qPCR; Sarlin ym 2006). Menetelmässä hyödynnettiin PiKA Weihenstephan GmbH:n kaupallista kittiä (TM Screen *Fusarium* Sp, PiKA Weihenstephan GmbH), joka sisältää alukkeet ja koettimen *Fusarium*-ryhmäspesifiseen qPCR:ää varten. PCR-monistus ja koettimien fluoresenssin seuraaminen suoritettiin LightCycler®480 -laitteella (Roche Diagnostics GmbH, Saksa). Näytteiden DNA-pitoisuuksien absoluuttinen kvantitointi tehtiin ajon sisäistä standardisuoraa hyödyntäen LightCycler 480 -ohjelmassa (v1,5, Roche Diagnostics GmbH, Germany). *Fusarium*-sieniryhmän qPCR-monistusta varten 5 µl DNA:ta sekoitettiin 10 µl:aan Buffer B -liuosta ja 15 µl:aan Roehen LightCycler480 Probes Master -puskuria (Roche Diagnostics GmbH, Saksa). qPCR-reaktioissa käytetty ajo-ohjelma on esitetty Taulukossa 3.

Taulukko 3. Reaaliaikaisessa PCR-menetelmässä käytetty LightCycler®480-laitteen ajo-ohjelma

	Syklit	Lämpötila	Acq. Mode	Aika	Ramp Rate (°C/s)
Alkulämmitys	1	95 °C	None	10 min	4,4
Monistus	45	95 °C	None	10 s	4,4
		60 °C	None	45 s	2,2
		72 °C	Single	1 s	4,4
Jäähdytys	1	40 °C	None	10 s	1,5

2.1.3 . *Fusarium*-aktiivisuuden ja toksiinien tuoton seuraaminen transkriptioprofilointimenetelmällä (TRAC)

RNA-eristys

Kokonaiset tähkänäytteet (vihneet poistettu) jauhettiin IKA-myllyllä ja RNA-eristykseen käytettiin MMM VILJATRAC-projektissa (Haittamikrobien ja niiden tuottamien toksiinien varhainen osoittaminen rehussa ja viljoissa uudella transkriptioprofilointimenetelmällä, Dnro 4775/501/2005) ohran RNA eristykseen kehitettyä Trizol (Invitrogen Concert Plant) -protokollaa.

TRAC-koettimet ja TRAC-analysit (ohra ja kaura)

Fusarium-koettimet suunniteltiin MMM VILJATRAC projektissa (Taulukko 4). Suunnittelussa käytettiin *Fusarium graminearum* -genomin sekvenssiä ja testattiin myös saatavilla olevia *Fusarium* -geenisekvenssejä vastaan (erityisesti *F. culmorum* ja *F. sporotrichoides*). Tri-geenit olivat 82–100 % samanlaisia eri *Fusarium*-lajien välillä. Steriiliä ohran kallussolukkoa ja *S. cerevisiae* -genomia käytettiin negatiivisinä vertailunäytteinä.

TRAC-koettimien soveltuvuutta testattiin steriileille kaurakallusnäytteille. Suunniteltujen *Fusarium*-koettimien spesifisyyden testaamiseksi tuotettiin mikrobeista vapaata kauran solukkoviljelmää. Pintasteriloiduista, kypsistä kauranjyvistä eristettiin alkioita, joita viljeltiin kallusta (=erilaistumaton solukko) indusoivalla alustalla. Mikrobivapaista solukoista eristettiin RNA ja tehtiin TRAC-analyysi *Fusarium*-koettimilla.

SAFECEREAL-tutkimuksissa käytetty koetinsetti sisälsi sekä homeen kasvuun ja aktiivisuuteen liittyviä geenejä että trikotekeenisynteesin geenejä. Lisäksi vertailukoettimena valittiin mukaan ohran lipoksygenaasi-entsyymin aktiivisuutta kuvaava geeni (*Lox2/lox*). Tämän avulla voitiin seurata ohran aktiivisuuden muutoksia kasvukaudella.

Taulukko 4. TRAC-koettimet SAFECEREAL projektissa.*avaingenejä trikotekeenien biosynteesissä (Schmidt-Heydt et al. 2010)

Geeni	Toiminta (mitä koodaa)	Rooli
<i>Fusarium</i> -sienten kasvu ja toiminta		
ACS1	Asetyyli-CoA-syntetaasi	Nälkiintymismarkkeri
EFA1A	Elongaatiofaktori-1-alpha	Proteiinisynteesi ribosomeissa
TBB	Beta-tubuliini	Solun muoto ja solun sisäinen kuljetus
UBC	Ubikitiini-proteiiniligaasi	Ohjelmoitu solukuolema
HFB	Hydrofobiini (<i>F. graminearum</i>)	Sienen interaktio ympäristön kanssa
Trikotekeenisynteesi		
Tri3	C-15 -asetyyliitransferaasi	Esteriryhmien liittäminen / irrottaminen
Tri5*	Trikodieenisyntaasi	Katalysoi trikodieenin synteesiä
Tri7	C-4 -asetyyliitransferaasi	Esteriryhmien liittäminen / irrottaminen
Tri10*	Säätää Tri6-geeniä	Säätelygeeni
Tri11	C-15 -hydroksylaasi	Katalysoi hapetusta C-15 -asemassa
Tri12*	Trikotekeeni-pumppu, ulosvirtaus	Toksiinien kuljetus ulos solusta
Tri14	Ei täysin tunnettu	Tarvitaan trikotekeenien tuotantoon patogeenisissä, mutta ei kasvatusalustalla
Ohran aktiivisuus		
Lox2/loxc	ohran lipoksygenaasi-entsyymi	kuvaa ohran aktiivisuutta

2.1.4 Mykotoksiinien monimuotoisuuden ja määrän kehitys kemiallisilla monijäämämenetelmillä

Mykotoksiinianalyyysien tarkoituksena oli:

- tutkia *Fusarium*-sienten tuottamien mykotoksiinien, erityisesti T-2+HT-2-toksiinien muodostumista kaurassa ja ohrassa kasvukauden aikana
- selvittää fungisidien vaikutusta T-2+HT-2-toksiinien tuottajahomeisiin ja niiden toksiininmuodostukseen pelto-olosuhteissa
- seurata HT-2 ja T-2 –toksiinien suhteiden muutoksia kasvukauden aikana
- selvittää näytteiden mykotoksiiniprofiili sadonkorjuun aikana

Määritettäessä mykotoksiineja eri vaiheissa kasvukautta otetuista näytteistä saatiin tietoa mykotoksiinien biosynteesin käynnistymisestä sekä niiden pitoisuuksien suhteellisesta vaihtelusta kasvukauden aikana. Lisäksi sadonkorjuun yhteydessä kerättyjen näytteiden mykotoksiinianalyyysit osoittivat lopullisen sadon laadun.

Kasvukausien 2010–2012 aikana kerätyt näytteet sekä sadonkorjuun yhteydessä kerätyt näytteet analysoitiin hankkeessa kehitetyllä ja validoidulla kemiallisella nestekromatografi-tandemmassaspektrometrillä (LC-MS/MS) –menetelmällä. Näytteitä analysoitiin eri vuosina seuraavasti:

- 2010: kasvukausi+sadonkorjuu (ohra ja kaura)
- 2011: kasvukausi+sadonkorjuu (ohra) sekä sadonkorjuu (kaura)
- 2012: kasvukausi+sadonkorjuu (ohra)

Jauhetut viljanäytteet uutettiin 84 % asetonitriilillä ja uutteen suodatettiin. 5 ml suodosta haihdutettiin kiviin tyypellä ja liuotettiin nestekromatografiassa käytettyyn ajoliuokseen. Menetelmällä määritettiin viisi

Fusarium-homeiden (erit. *F.langsethiae* ja *F.sporotrichioides*) tuottamaa mykotoksiinia (neosolanioli (NEO), diasetoksiskirpenoli (DAS), HT-2-toksiini (HT-2), T-2-toksiini (T-2) ja beauverisiini (BEA)). Näistä NEO, DAS, HT-2 ja T-2 kuuluvat A-tyypin trikotekeeneihin ja BEA on nk. ionoforinen mykotoksiini, jonka toksisuudesta ja pitoisuuksista on vielä varsin vähän tietoa. On kuitenkin huomattava, että Euroopan Elintarviketurvallisuusviranomaisen EFSA on parhaillaan arvioimassa ionoforisten hometoksiinien (mm. BEA) merkitystä elintarvikkeiden ja rehujen haitta-aineina.

Sadonkorjuun yhteydessä kerätyt näytteet analysoitiin myös toisella LC-MS/MS-menetelmällä, jolla voidaan määrittää samanaikaisesti 31 mykotoksiinia (zearalenoni, deoksinivalenoli, diasetoksiskirpenoli, 3-asetyyli-deoksinivalenoli, fusarenon-X, nivalenoli, T-2- ja HT-2-toksiini, neosolanioli, moniliformiini, beauverisiini, enniatiinit A, A1, B ja B1, fumonisiinit B1 ja B2, antibiootti Y, penisilliinihappo, ergonoviini, ergokorniini, ergokristiini, ergokryptiini, ergotamiini, gliotoksiini, aflatoksiinit B1, B2, G1, G2, okratoksiini A ja mykofenolihappo) (Kokkonen ja Jestoi, 2009). Analysoitaessa näytteet tällä laajemmalla menetelmällä voitiin arvioida myös muiden kuin infektoinnissa käytettyjen homeiden tuottamien mykotoksiinien määrää ja laatua näytteissä eli nk. luontaisen kontaminaation aiheuttamaa mykotoksiiniprofiilia.

Yhteensä hankkeessa määritettiin mykotoksiinit em. menetelmillä 636 kasvukauden aikaisesta näytteestä sekä 152 sadonkorjuun yhteydessä kerätystä viljanäytteestä. Vuonna 2010 kasvukauden aikana kerätyt näytteet eivät olleet identtisesti samoja kuin VTT:llä TRAC-analyysiin käytetyt näytteet. Koska tuloksia vertaillaan todettiin suuri variaatio biologisessa materiaalissa, vuonna 2011 hometoksiinianalyysit tehtiin täsmälleen samoista näytteistä kuin TRAC-analyysit tämän variaation pienentämiseksi. Kaikki testatut viljalajikkeet oli jaettu neljään osaan peltokokeissa tehdyn käsittelyn perusteella, jotka olivat vertailunäyte (käsittelemätön), fungisidilla ruiskutettu näyte (torjunta), hometartutettu näyte (tartutus, ei torjuntaa) sekä hometartutettu ja fungisidilla ruiskutettu näyte (tartutus, torjunta). Käsittelyjen vaikutusta toksiinien tuotantoon ajan funktiona seurattiin kaikilla viljalajikkeilla.

2.2 Toksiinipitoisuuksien ennakointi ennustemallilla

Viljojen lauseurannassa 2006 – 2012 kerätyille näytteille haettiin hilasäätiotokannasta 3 tunnin lämpötila ja suhteellinen kosteus. Säätiotodot täsmätettiin lajikkeiden kukinnan puolivälin ja korjuun päiviin. Lajiketiedoilla ja täsmätyllä viikottaisella keskilämpötilalla ja korkean kosteuden kestolla (RH > 80 %) sekä näytteiden toksiinipitoisuuksilla luotiin logistinen regressiomalli korkean DON-pitoisuuden tapahtumariskistä. Mallin rakenne pohjautuu jyvää infektoivien *Fusarium*-homeiden tunnettuun epidemiologiaan. Regressiomenetelmällä on määritetty parametrien arvot sään vaikutukselle. Mallia ajettiin 2012 ja 2013 10 x 10 km hilasäällä, jolloin tulos oli myös 10x10 km hila. Ennuste sääkartat antavat yleiskuvan kasvukauden ja paikan mukaisesta riskistä.

2.3 Sadon mykotoksiinipitoisuuksien arviointi pikamenetelmillä

2.3.1 ELISA-kuoppalevyteknikka viljan T-2/HT-2 –toksiinien määrittämisessä.

Aikaisemmin markkinoilla olleet ELISA-tekniikkaan perustuvat kuoppalevyanalyysit oli suunniteltu vain T-2-toksiinin määrittämiseen, vaikka jotkut niistä lupasivat jonkinasteisen ristireaktion myös HT-2-toksiinille. Koska HT-2-toksiinin pitoisuus on yleensä T-2-toksiinia korkeampi suomalaisessa viljassa, valittiin kokeiltavaksi Neogen Veratox T-2/HT-2 -testi, jolle valmistaja lupaa 100 % ristireaktion kummallakin toksiinille. Luotettavalle pikamenetelmälle on entistä suurempi tarve, koska EU julkisti 27.3.2013 suositusraja-arvot T-2 ja HT-2 toksiinien summapitoisuudelle eri viljamatriiseissa.

Kitin käyttökelpoisuutta kauralla testattiin seuraavasti: Valittiin hankkeen satonäytteistä 20 kauranäytettä, joiden T-2/HT-2 pitoisuudet oli määritetty aikaisemmin Eviran LC-MS/MS –referenssimenetelmällä ja ne analysoitiin T-2/HT-2 –testillä elokuussa 2012. Testin suorittajat eivät tienneet edeltä referenssimenetelmällä mitattuja pitoisuuksia. Jauhettu näyte uutettiin 70 % metanolilla magneettisekoituksessa 30 minuutin ajan. Sakan annettiin laskeutua, tarvittava määrä uutetta suodatettiin. Uute laimennettiin 1:1 vedellä. Standardit ja näytteet siirrettiin kuoppiin valmistajan ohjeen mukaan. Koska korkein kalibraatiostandardi oli 250 µg/kg, näytteitä jouduttiin laimentamaan mittaukseen. Uutteesta (1:1) valmistettiin 1:1, 1:3 ja 1:7 laimennoksia 70 % metanolilla. Testeihin käytettiin saman valmistuserän kyttejä ja testit suoritettiin neljä-

nä peräkkäisenä päivänä. Absorbanssit mitattiin 650 nanometrillä Tecan Infinite F200 -kuoppalevylukijalla ja Magellan ohjelmalla. Kalibraatio-suorien korrelaatiot olivat hyvät tai erinomaiset.

2.3.2 NIR-menetelmä toksiinimäärityksessä

Hankkeen tavoitteena oli valita pikamenetelmien laajasta kirjosta parhaimmat menetelmät viljaerien hometoksiinipitoisuuksien mittaukseen sekä käytön ohjaukseen tilatasolla ja viljan vastaanotossa. NIR -menetelmän kehitystyössä käytettiin BÜCHI NIRFlex N-500 -laitteistoa. Laitteiston aallonpituusalue on 4000 - 10000 cm^{-1} , joka vastaa 1000 - 2500 nm. NIR -laitteen DON -kalibraatioiden kehittämisessä käytettiin apuna Vilja-alan yhteistyöryhmän (VYR) johtaman viljojen turvallisuusseurannan hometoksiinaineistoa vuosilta 2011 - 2012. Viljanäytteet mitattiin sekä jyvänä että 1 mm:n seulalla jauhettuna. Mittaukset NIR:llä suoritettiin kahdella rinnakkaisnäytteellä, jotka molemmat mitattiin kahteen kertaan. Tavoitteena oli kehittää omat kalibraatiot kauralle ja muille viljoille. Kemiallisena referenssimenetelmänä käytettiin MTT:n akkreditoitua GC-MS -menetelmää.

2.3.3 Homeisuuden määrittäminen kuvantamisella

Fusarium-sienten esiintymistä valmiissa ohrasadossa määritettiin monialaiseen kuvantamiseen perustuvan VideometerLab-laitteen avulla (Videometer A/S; Kuva 3). Laite hyödyntää kuvauksessa 18 eri aallonpituutta 405 nanometrillä 970 nanometriin (Møller 2011). Kuvantamiseen perustuva osoittaminen on usein nopeaa ja tulee laitteiden hintojen laskiessa koko ajan edullisemmaksi. VideometerLab-laitteita on jo käytössä muutamassa mallistamossa Euroopassa. Tässä tutkimuksessa jokainen näyte kuvattiin viisi kertaa valmistajan tuottamalla ohranjyvien *Fusarium*-kontaminaatioalaa mittaavalla ohjelmalla mittausten välissä jyviä sekoittaen. Standardeina mittausten yhteydessä käytettiin *Fusarium*-pitoisuuksiltaan ennalta tunnettuja ohranjyvänäytteitä. VideometerLab -laitteen kalibrointi toteutettiin yhdessä laitteen valmistajan kanssa, ja tutkimuksen kuluessa osallistuttiin myös laboratorioden väliseen rengastettiin. Tämän hankkeen aikana myös muissa VTT:n tutkimuksissa arvioitiin VideometerLab-laitteen hyödynnettävyyttä ohran *Fusarium*-kontaminaation osoittamiseen.

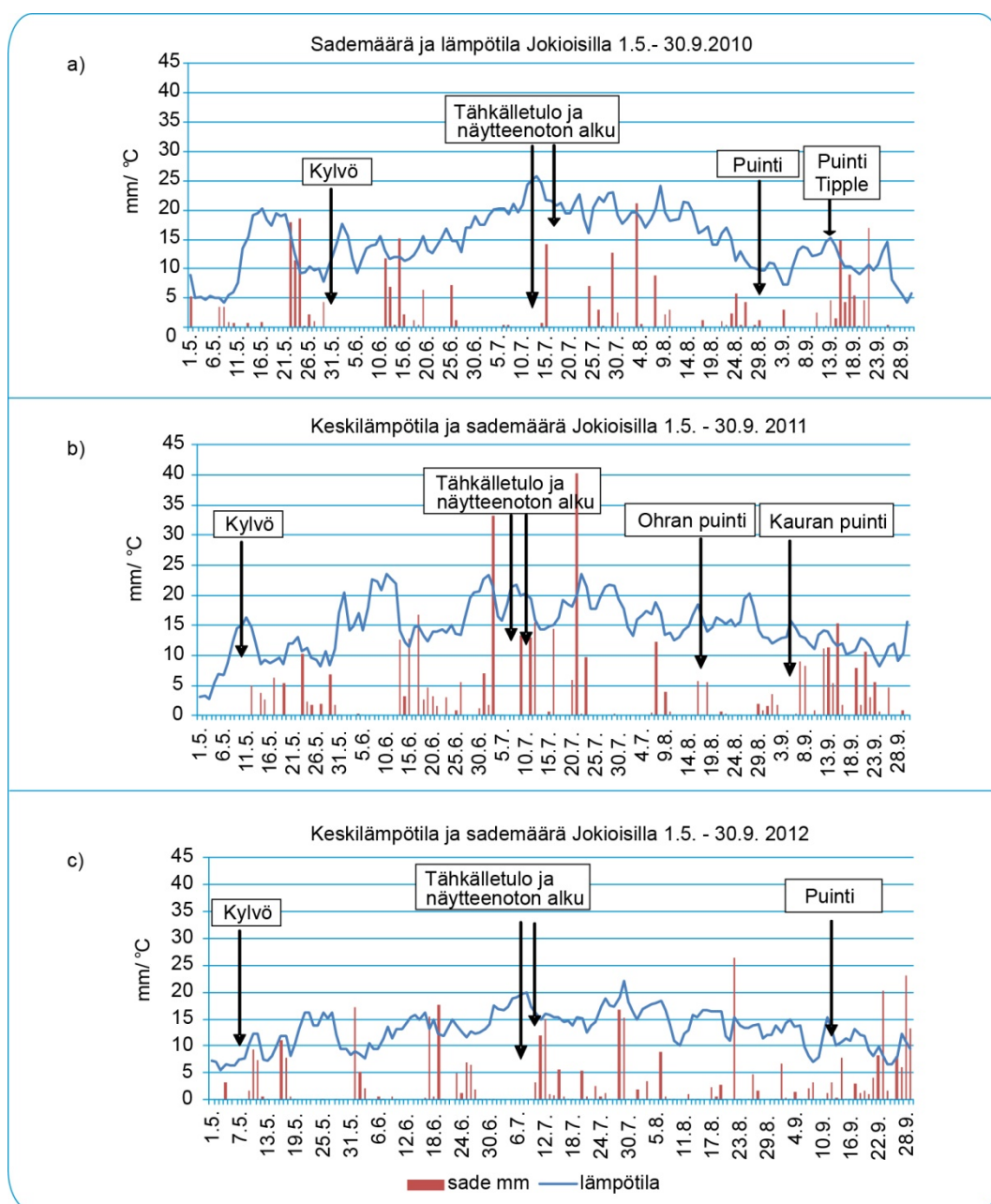


Kuva 3. Monialaiseen kuvantamiseen perustuva VideometerLab-laite.

3 Tutkimustulokset

3.1 Sääolot tutkimusvuosina

Tutkimuksen kenttäkokeet tehtiin hyvin erilaisina kasvukausina. Kasvukausi 2010 käynnistyi nopeasti toukokuun puolivälin helteillä. Hellejaksoa seurasivat runsaat ukkossateet, jotka viivästyttivät kylvöjen loppuunsaattamista. Viileä kesäkuu oli suotuisa kasvulle, mutta juhannuksen jälkeen alkaneet helteet vaikuttivat kasvien kehitykseen. Vuonna 2011 kasvukausi alkoi suotuisasti ja kylvöaika oli normaali. Kasvukauden sää oli lämmin ja ajoittain hyvin kostea. Viljan tähkälletulon aikaan sattui runsaita sateita ja elokuun sateet lakouttivat rehevästi kasvanutta viljaa. Vuonna 2012 sää oli selvästi viileämpi kuin edellisinä vuosina ja sateita oli runsaasti. Kasvustot kehittyivät hitaasti ja puintiaika siirtyi syyskuulle, lakoa ei kuitenkaan esiintynyt sateista huolimatta. Kasvukausien sääolot sekä kenttäkokeiden perustamis-, korjuu- ja näytteenottoajat on esitetty Kuvassa 4a-c.



Kuvat 4a-c. Sääolot Jokioisilla ja kenttäkokeiden kasvustojen kehitys 2010–2012.

3.2 Fusarium-homeiden lajikirjo ja kvantitointi

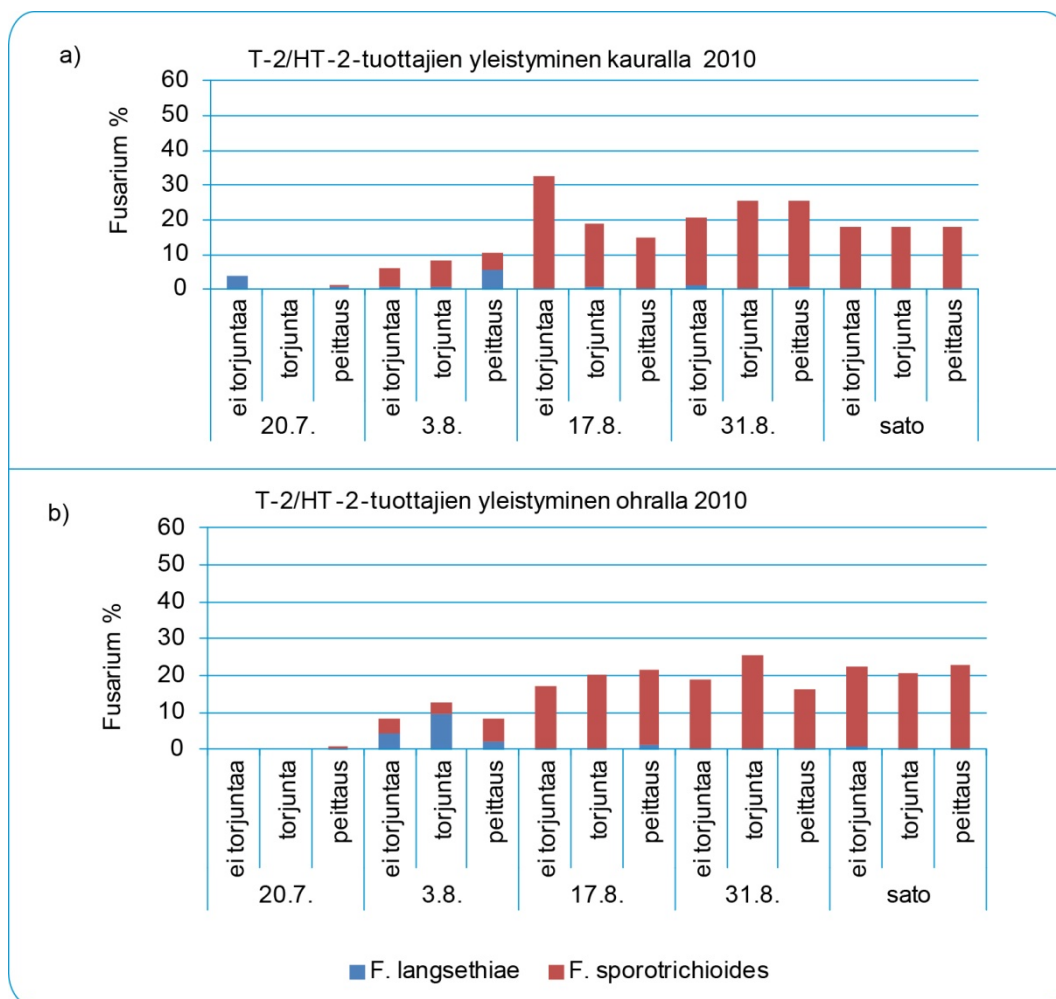
3.2.1 Fusarium-homeiden lajikirjo viljelymenetelmällä

Vuosi 2010

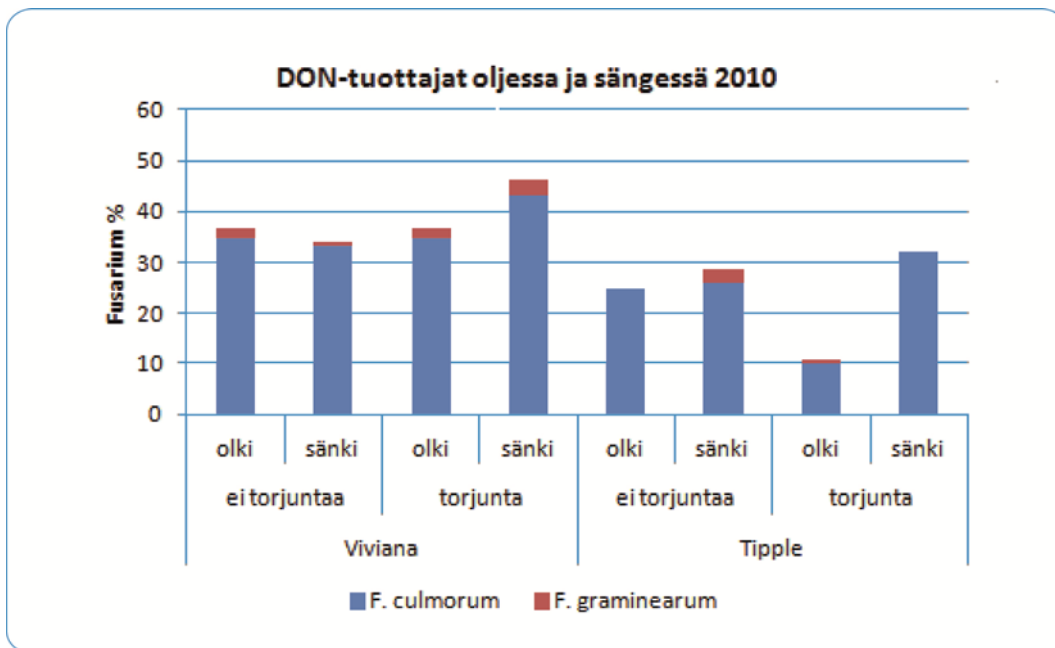
Myöhäinen kylvä ja heinäkuun korkeat lämpötilat ja kuivuus haittasivat kasvua kenttäkokeessa. Kauran jyväkoko jäi hyvin pieneksi. Ohranäytteissä erityisesti Saana-lajikkeella osa jyvistä surkastui ja sato jäi heikoksi. Kasvukauden kuivuus ja korkeat lämpötilat vaikuttivat myös *Fusarium*-tartuntaan. Aikaisin ja koko kauden ajan vallitseva *Fusarium*-laji kehittyvissä jyvissä oli *F. poae*, joka tartutti sekä ohraa että kauraa luontaisesti. DON-tuottajia esiintyi kuivuuden vuoksi vähemmän kuin normaalisti ja ne runsastuivat myöhään, vasta lähellä korjuuta. T-2/HT-2 tuottajista *F. langsethiae* ei ollut missään vaiheessa merkittävän runsas ja se väheni nopeasti.

Tartutetuilla ruuduilla *F. sporotrichioides* yleisty nopeasti sekä kauralla että ohralla ja tartunta lisääntyi voimakkaasti. Se myös levisi luontaisesti jonkin verran muulle koalueelle. Lajikkeiden välillä ei ollut suuria eroja *F. culmorum* ja *F. graminearum*-tartunnan runsaudessa, mutta tartunta oli yleisempää ohralla kuin kauralla. T-2/HT-2 tuottajista *F. langsethiae* oli kehityksen alussa hieman yleisempi ohralla kuin kauralla, mutta väheni sitten nopeasti (Kuva 5a,b.). *F. poae* oli kauralla runsaampi kuin ohralla.

Lämpimissä oloissa erityisesti *F. culmorum* lisääntyi ja sitä esiintyi runsaasti sekä sängessä että oljessa (Kuva 6.). *F. graminearum* oli kasvustoissa harvinainen. Tautitorjunnalla ei ollut vaikutusta kauran oljen tai sängän *Fusarium*-tartuntaan.

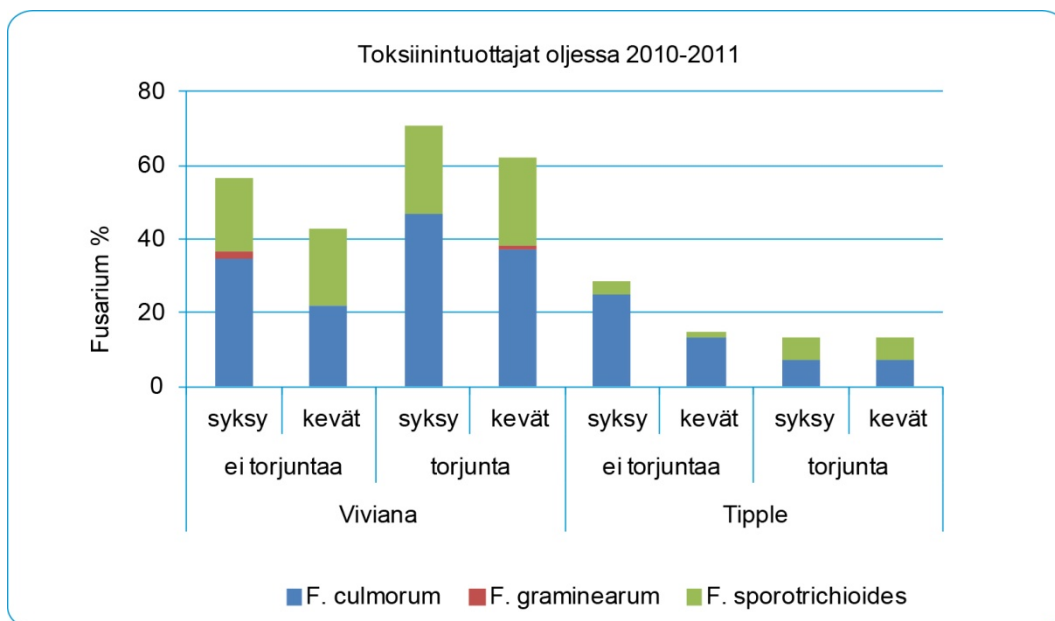


Kuva 5a-b. T-2/HT-2 tuottajista *F. sporotrichioides* yleistyi kuukauden kuluessa tähkälle tulosta. Osa havaitusta tartunnasta kentän käsittelemättömillä alueilla saattoi olla kontaminaatiota muille osille tehdystä tartutuksesta. Kuvien kauralajike Viviana, ohra NFC Tipple.



Kuva 6. DON-tuottajia oli kesän 2010 sadossa vähän, mutta runsaammin sängessä ja oljessa. Lämpimissä oloissa erityisesti *F. culmorum* lisääntyi ja sitä esiintyi runsaasti sekä sängessä että oljessa.

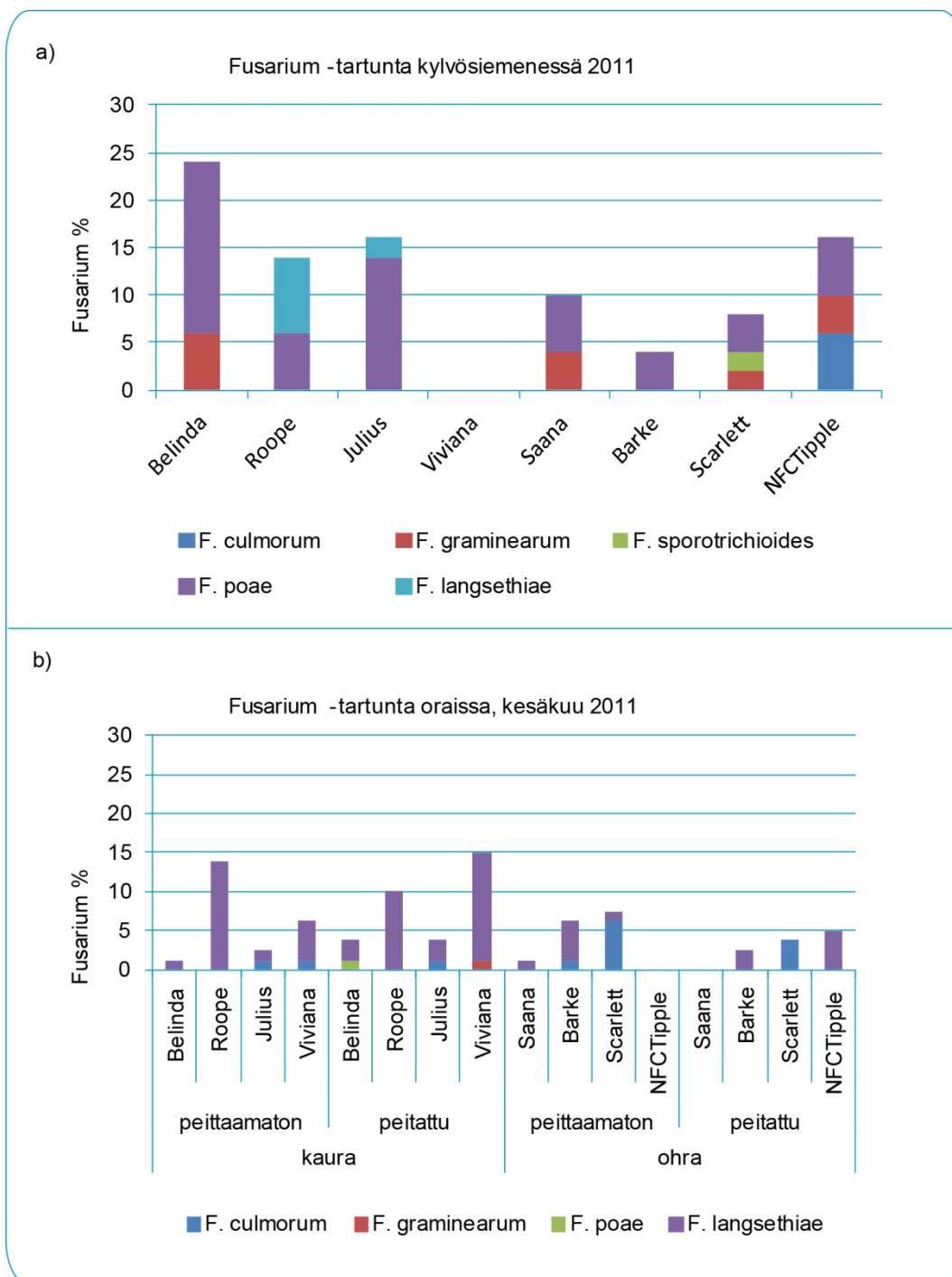
Fusarium sporotrichioides-tartunta säilyi hyvin talven yli maan pinnalla säilytetyssä oljessa (Kuva 7). Parhaiten säilyi *F. culmorum*, jota oli runsaasti sekä oljessa että sängessä, samoin *F. avenaceum* ja *F. trincinctum* säilyvät hyvin kasvinjätteessä. *F. langsethiae*-lajeja oli hyvin niukasti vuoden 2010 kasvustoissa ja sitä ei tavattu lainkaan sängestä eikä oljesta syksyllä. Lajista saatiin kuitenkin yksi havainto talven yli säilytetyistä olkinäytteistä.



Kuva 7: Toksiinintuottajien säilyminen kauran ja ohran oljessa maan pinnalla

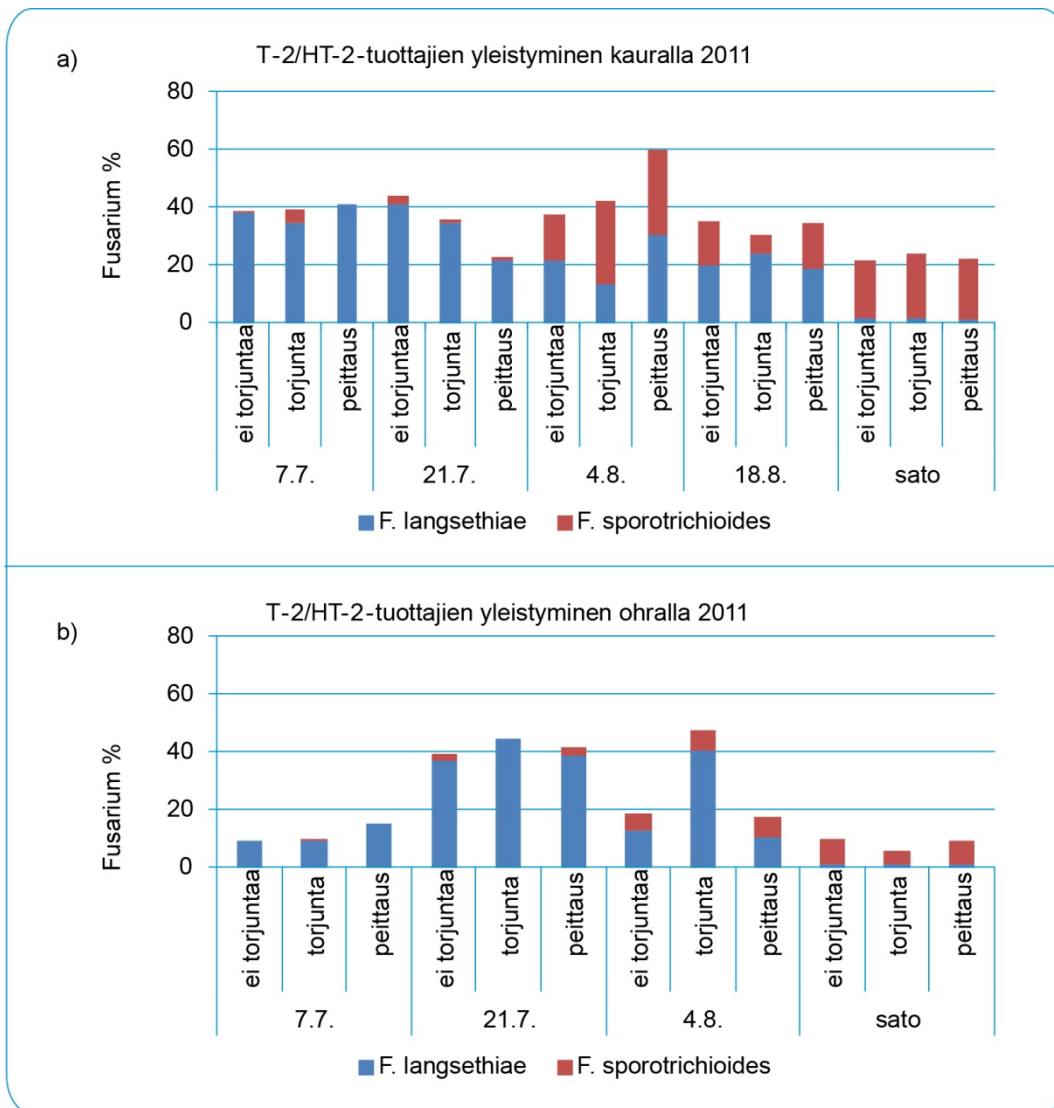
Vuosi 2011

Kylvöt orastuivat hyvin ja kasvustot olivat tiheitä. Peittäminen ei vaikuttanut *F. langsethiae*-tartuntaan, jota esiintyi jonkin verran kauran oraissa, vähemmän ohralla (kuva 8b.). Muihin lajeihin, joita oli vähemmän, sillä oli jonkin verran vaikutusta. Peittaamattomassa kylvösiemenessä havaittiin vain vähän *F. langsethiae*- ja *F. culmorum*-tartuntaa (Kuva 8a.), joten oraisten tartunta voi olla lähtöisin myös lohkon esikasvin jätteistä.

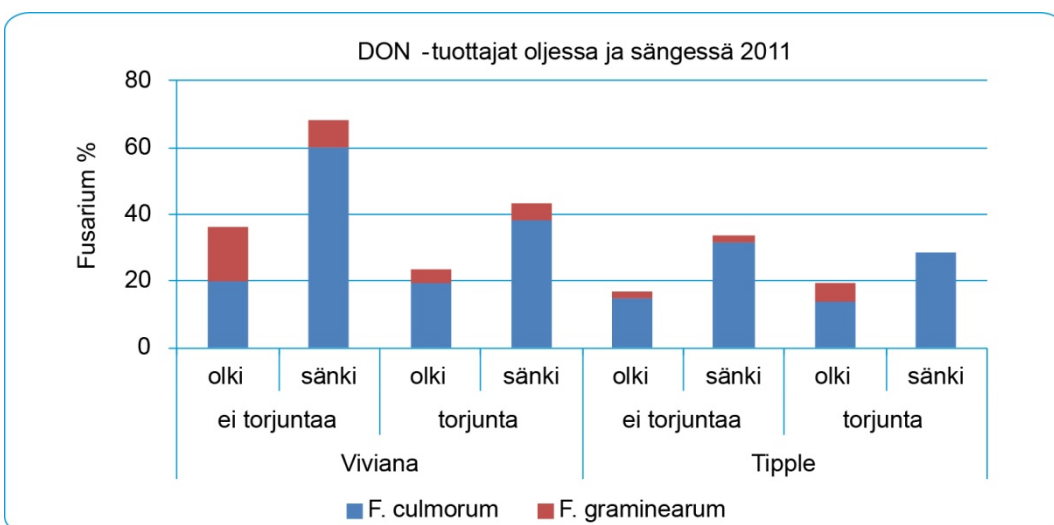


Kuva 8a, b. Kenttäkokeessa vuonna 2011 käytetyn kylvösiemenen *Fusarium*-tartunta ja kesäkuussa havaittu tartunta peittaamattomalla ja peitatulla siemenellä kylvetyin kasvuston oraissa.

Kasvustojen tartutus *F. sporotrichioides*-sienellä sekä torjuntakäsittely tehtiin melko lämpimässä ja hyvin kosteassa säässä. Tartutus onnistui hyvin sekä kauralla että ohralla. Heti tähkälle tulon jälkeen kerätyissä näytteissä oli yleisesti *F. langsethiae*-tartuntaa, aluksi kauralla (kuva 9 a.), mutta myöhemmin myös ohralla (Kuva 9 b.). Torjuntakäsittely ei vaikuttanut *F. langsethiae*-tartunnan määrään kauralla tai ohralla, mutta sen sijaan vähensi selvästi *F. sporotrichioides*-tartuntaa. Lakoa esiintyi ohrassa heinäkuun lopulta lähtien. DON-tuottajia esiintyi syksyllä 2011 oljessa ja sängessä vähemmän kuin kuivan kesän 2010 jälkeen (Kuva 10).

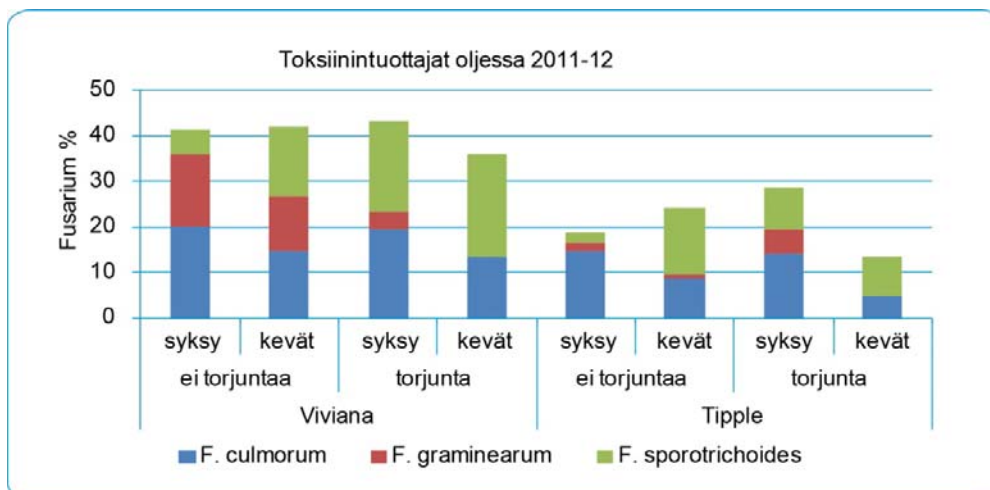


Kuvat 9. *F. langsethiae*-tartunta kehittyi kauralla nopeasti, ohralla kehitys oli hitaampaa. *F. sporotrichioides* lisääntyi vasta heinäkuun lopulla kauralla, ohralla se ei yleistynyt tartuttamattomilla alueilla selvästi. Torjunnalla ei ollut vaikutusta luontaiseen *F. sporotrichioides*- tai *F. langsethiae*-tartuntaan. Kuvien kauralajike Viviana, ohra NFC Tipple.



Kuva 10: DON-tuottajat kauran ja ohran oljessa ja sängessä syksyllä 2011.

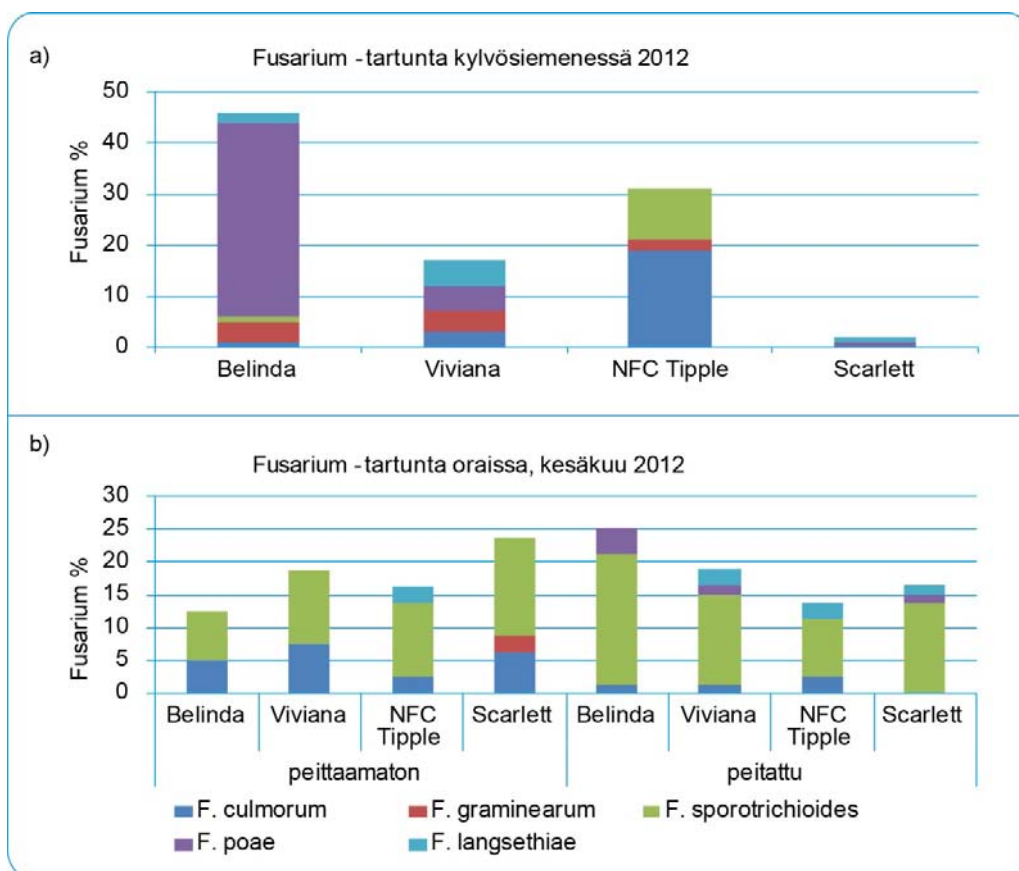
F. culmorum ja *F. sporotrichioides* säilyivät olkijätteessä parhaiten talven 2011–2012 ajan (Kuva 11). Samoin *F. avenaceum* ja *F. tricinctum* talvehtivat hyvin kasvinjätteessä.



Kuva 11. Toksiinintuottajien säilyminen talven yli kauran ja ohran oljessa.

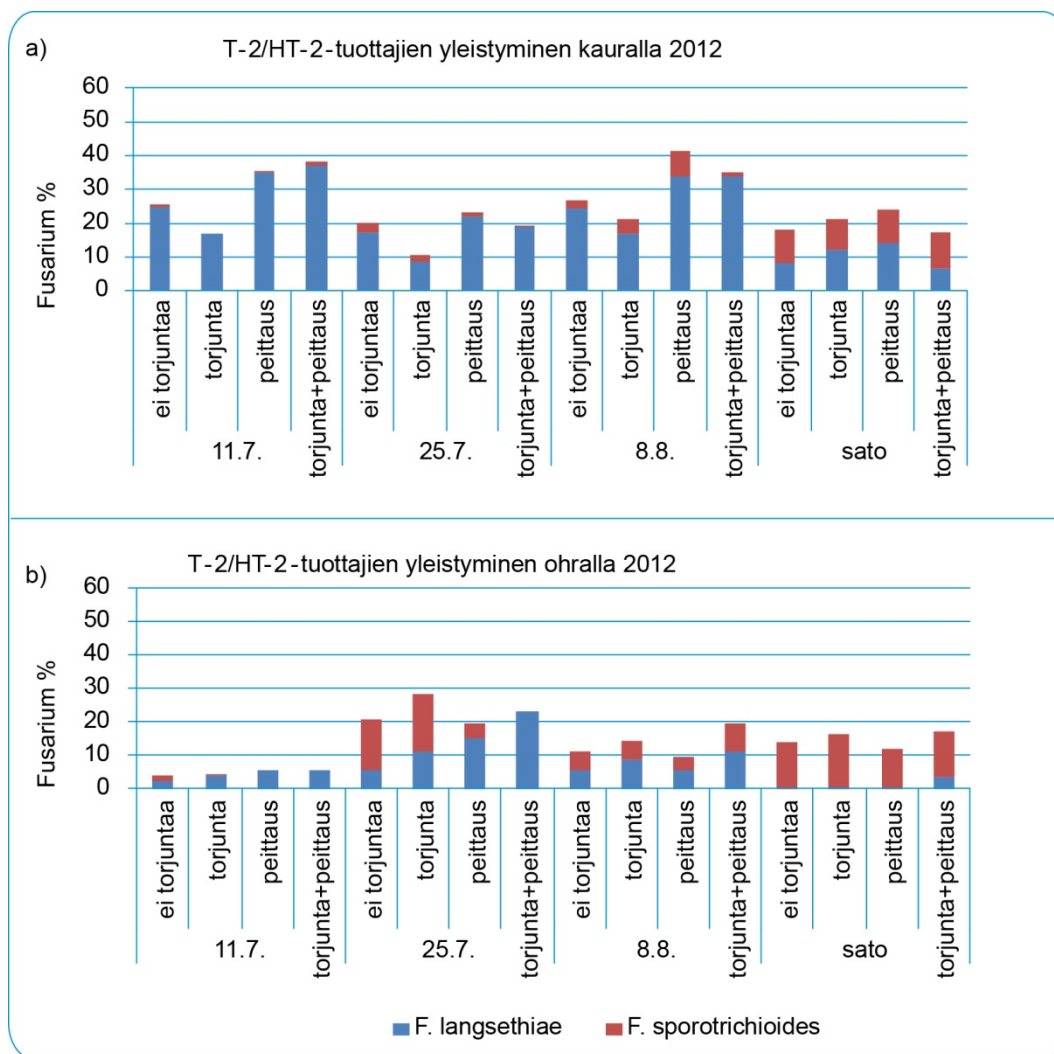
Vuosi 2012

Kylvöt orastuivat hyvin ja kasvustot olivat tiheitä. Kylvösiemenessä esiintyi *Fusarium*-tartuntaa erityisesti Belinda- ja Tipple-lajikkeilla (Kuva 12a.). Peittäus ei vaikuttanut *F. langsethiae*-tartuntaan, jota esiintyi jonkin verran oraissa. Muihin lajeihin sillä oli jonkin verran vaikutusta (Kuva 12b.). Peittaamattomassa kylvösiemenessä havaittiin vain vähän *F. langsethiae*-, *F. culmorum*- ja *F. sporotrichioides*-tartuntaa, joiden oraisten tartunta on todennäköisimmin lähtöisin lohkon esikasvin jätteistä.

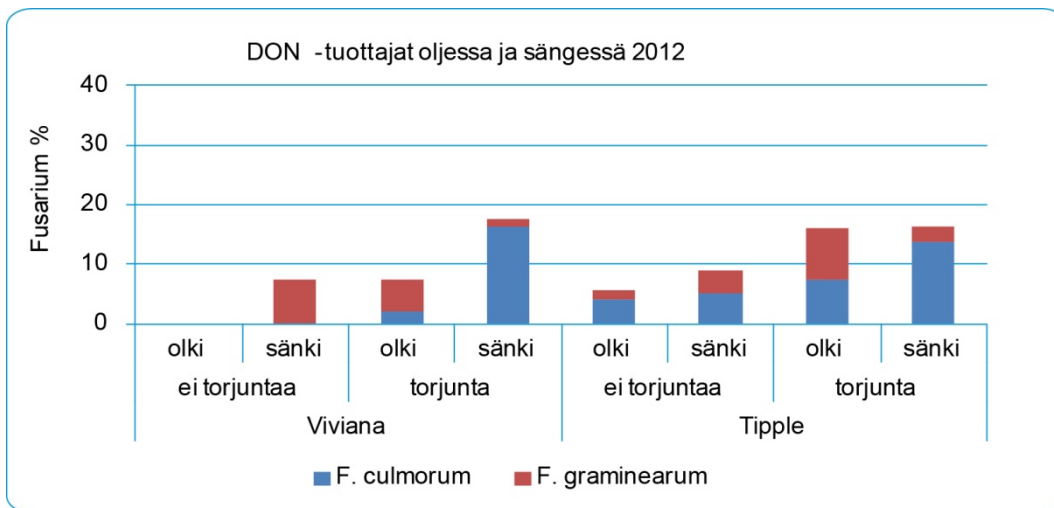


Kuva 12a, b. Kenttäkokeessa vuonna 2012 käytetyn kylvösiemenen *Fusarium*-tartunta ja kesäkuussa havaittu tartunta peittaamattomalla ja peitatusella siemenellä kylvetyin kasvuston oraissa.

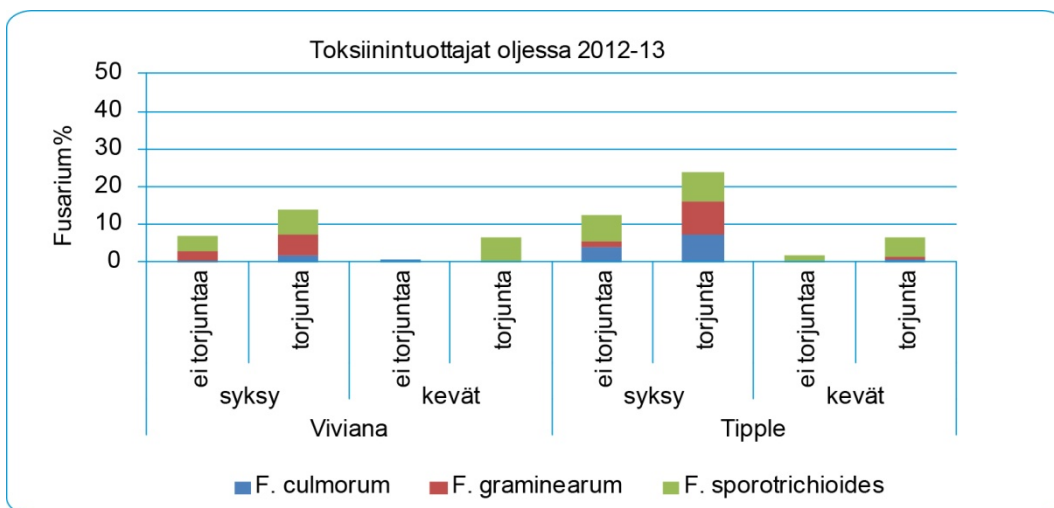
Heti tähkälle tulon jälkeen kerätyissä näytteissä oli selvästi *F. langsethiae*-tartuntaa, runsaammin kauralla kuin ohralla (Kuva 13). Torjuntakäsittely ei vaikuttanut *F. langsethiae*-tartunnan määrään kauralla tai ohralla. Oletuksista poiketen *F. culmorum* ja *F. graminearum* eivät runsastuneet kosteissa oloissa, niitä esiintyi runsaammin vasta kauralla elokuussa. Määrät jäivät kuitenkin silloinkin alhaisiksi, eikä torjuntakäsittelyllä ollut kaikkiaan lajeihin vaikutusta. Myös oljessa ja sängessä lajeja oli niukemmin kuin lämpimänä vuosina (Kuva 14). Talven yli säilytetyssä oljessa toksiinintuottajia havaittiin selvästi vähemmän kuin edellisinä vuosina. Jo syksyllä niitä oli vähän ja keväällä DON-tuottajia havaittiin erittäin niukasti (Kuva 15).



Kuva 13 (a, b). *Fusarium langsethiae* oli jyvän kehityksen alkuvaiheissa runsas kauralla ja sitä tavattiin vielä sadossakin. *F. sporotrichioides* runsastui vasta elokuussa. Kuvien kauralajike Viviana, ohra NFC Tipple.



Kuva 14. Viileänä ja kosteana kesänä oljessa ja sängessä oli vähemmän DON-tuottajia kuin aikaisempina vuosina. Kuitenkin *F. graminearum* oli suhteellisesti yleisempi kuin aikaisemmin.



Kuva 15. Talven 2012–13 jälkeen oljessa oli vähän toksiinintuottajia, runsaimpina *F. sporotrichioides*.

Yhteenveto kenttäkokeista

Kenttäkokeiden kaksi ensimmäistä vuotta olivat hyvin lämpimiä, mutta kosteusoloiltaan erilaisia. Tämä vaikutti sienilajistoon ja sen kehitykseen, ja kasvuston kehityksen eri vaikeissa havaittu lajisto oli lajisuh-teiltaan erilainen eri vuosina. Kesällä 2010 keskikesän kuivissa oloissa *F. poae* oli vallitseva laji ja aikai-semmista kokemuksista poiketen *F. langsethiae* ei ollut yleinen. Nopeasti kasvavat *F. culmorum* ja *F. graminearum* eivät pystyneet runsastumaan kuivissa oloissa. Merkille pantavaa on *F. equiseti*-lajin runsa-us sadossa. *F. langsethiae* oli runsas sekä 2011 että 2012 erityisesti kauralla jo aikaisessa vaiheessa. Peit-taus ei vaikuttanut oraisa havaittuun tartuntaan.

Peittaus ei vaikuttanut *F. langsethiae*-lajin esiintymiseen oraisa, mutta vähensi *F. culmorum*-tartuntaa. Edellisen vuoden kasvustojätteistä tuli oraisiin jo aikaisessa vaiheessa *Fusarium*-tartuntaa. Erityisesti *F. sporotrichioides* havaittiin jo kuukauden kuluttua kylvöstä. Myös *F. langsethiae* oli oraisa yleisempi kuin kylvösiemenessä. Peittauksella tai torjunnalla ei ollut vaikutusta tähkylöiden tai jyvien *Fusarium*-tartuntaan yhtenäkkään vuonna. Torjuntakäsittely kyllä vähensi *Fusarium*-kontaminaatiota keinotekoisesti *F. sporotrichioides*- tartutetuissa kasvustoissa. Torjunta ei vaikuttanut *F. langsethiae* – lajin yleisyyteen kehittyvissä jyvissä tai sadossa eikä *F. culmorum*-tartuntaan sadossa. Se kuitenkin vähensi *F. avenaceum*-lajin yleisyyttä tutkituissa tähkylöissä kasvukaudella.

F. culmorum oli yleinen erityisesti kauran oljessa ja sängessä ja se sekä *F. sporotrichioides* säilyvät hyvin seuraavaan vuoteen. Vuoden 2011 kenttä oli eri lohkokolla, joten tartunta ei siirtynyt siihen. Kuitenkin siirtyminen näkyi vuoden 2011 kentän jälkeen jääneessä kasvinjätteessä, joka tartutti vuonna 2012 oraita samalla alueella. Kasvinjätteessä *F. graminearum* runsastui suhteessa *F. culmorum*-lajiin viileänä kesänä, mutta talven yli tartuntaa säilyi niukasti. *F. sporotrichioides*-tartutus onnistui hyvin kaikkina vuosina, myös 2010 huolimatta välittömästi tartutuksen jälkeen alkaneesta voimakkaasta sateesta.

3.2.2 *Fusarium*-sienten määrä ohrassa reaaliaikaisella PCR-menetelmällä määritettynä

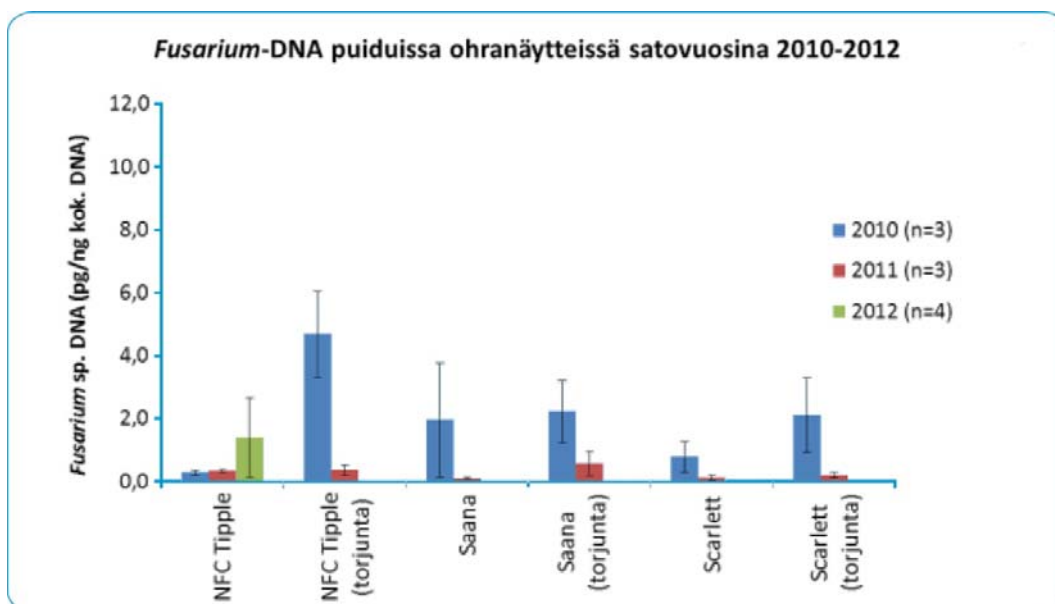
Reaaliaikaisen PCR-menetelmän avulla päästiin ensimmäistä kertaa kvantitoimaan *Fusarium*-sienten määrää monimuotoisessa mikrobiyhteisössä, missä läsnä on myös useita muita sieniryhmiä. Homeiden osoittamista viljanäytteistä on haitannut kvantitatiivisen ja selektiivisen määritysmenetelmän puuttuminen. Perinteiset viljelymenetelmät ovat pääasiassa perustuneet menetelmään, jossa lasketaan *Fusarium*-sienillä kontaminoituneiden jyvien lukumäärä. Se ei kuitenkaan anna kuvaa *Fusarium*-sienten biomassan kokonaismäärästä näytteessä. Lisäksi helposti leviävät homelajit häiritsevät viljelypohjaisissa menetelmissä ja voivat antaa vääriä positiivisia tuloksia.

Fusarium-DNA osuus koko näytteen DNA-pitoisuudesta oli < 1 % (Taulukko 5)

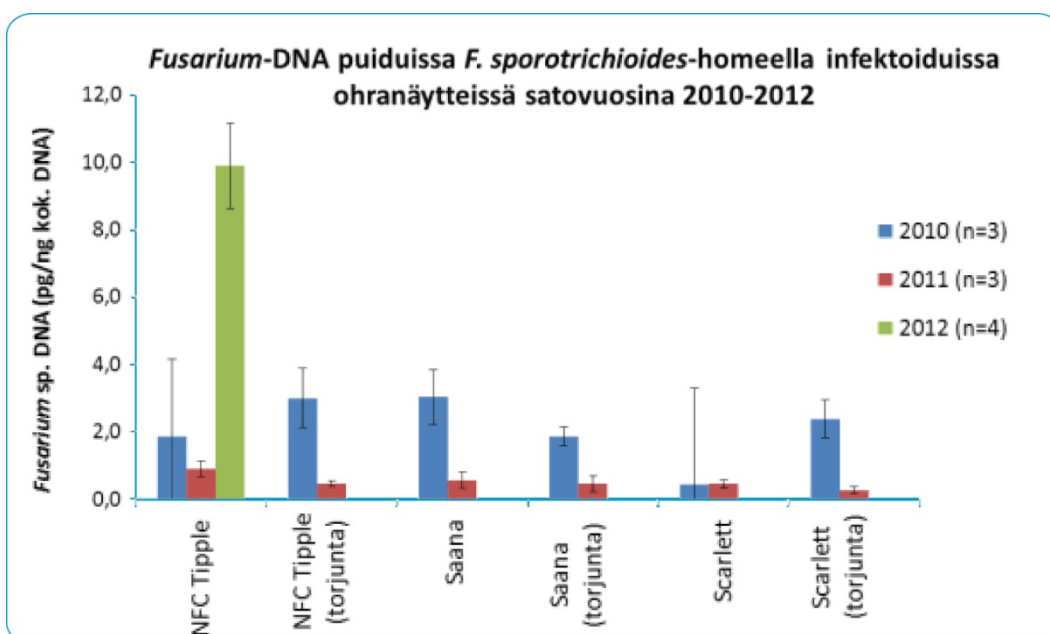
Taulukko 5. *Fusarium* DNA:n osuus (%) koko DNA-määrästä puiduissa ohranäytteissä. VV = vertailu, VT = vertailunäyte + torjuntakäsittely, IV = *F. sporotrichioides* infektiio, IT *F. sporotrichioides* infektiio+ torjunta

		2010	2011	2012
Vertailu	NFC Tipple VV	0,02	0,03	0,14
	Saana VV	0,5	0,01	-
	Scarlett VV	0,1	0,01	-
Vertailunäyte + torjuntakäsittely	NFC Tipple VT	0,3	0,04	-
	Saana VT	0,3	0,06	-
	Scarlett VT	0,2	0,02	-
Infektoitu	NFC Tipple IV	0,4	0,09	0,99
	Saana IV	0,2	0,06	-
	Scarlett IV	0,3	0,05	-
	NFC Tipple IT	0,2	0,05	-
	Saana IT	0,2	0,05	-
	Scarlett IT	0,2	0,03	-

Fusarium-sienten määrä valmiissa sadossa vaihteli suuresti vuosina 2010–2012 (Liite 1; Kuvat 16–17). Vuonna 2010 *Fusarium*-sieniä oli kaikissa tutkituissa lajikkeissa huomattavasti enemmän verrattuna vuoteen 2011. Torjuntakäsittely ei vaikuttanut puidun sadon *Fusarium*-DNA kokonaismäärään vertailunäytteissä. Puiduista ohranäytteistä määritettiin jopa suurempia *Fusarium*-DNA-pitoisuuksia torjuntakäsittelyn jälkeen kuin käsittelemättömistä vertailunäytteistä (Taulukko 5). *F. sporotrichioides*-infektion jälkeen *Fusarium*-DNA-määrät olivat infektoiduissa näytteissä yleisesti ottaen noin 2–6 kertaa suurempia kuin vertailunäytteissä vuosina 2010 ja 2011. Vuoden 2010 ja 2011 sääolosuhteet eivät suosineet *Fusarium*-sienten kasvua. Erityisesti kesän 2011 näytteissä *Fusarium*-tasot olivat noin 5 kertaa alhaisempia vertailunäytteissä kesän 2010 näytteisiin verrattuna. Kesä 2012 oli huomattavasti suotuisampi *Fusarium*-kasvulle sekä luontaisille *Fusarium*-sienille että lisätyn *F. sporotrichioides* kasvulle.



Kuva 16. *Fusarium*-DNA puiduissa vertailuohranäytteissä satovuosina 2010–2012 reaaliaikaisella PCR-menetelmällä määritettynä.

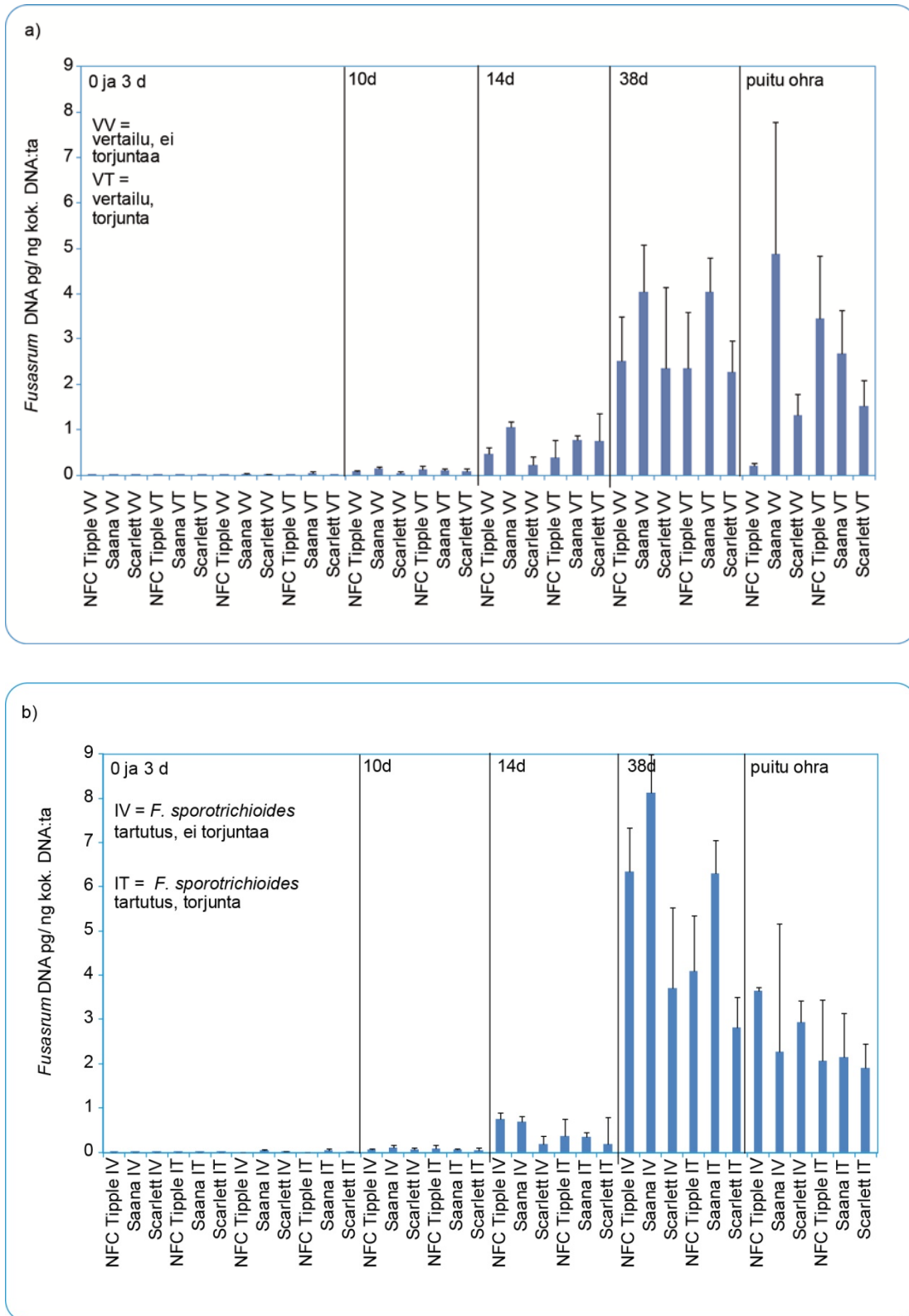


Kuva 17. *Fusarium*-DNA puiduissa *F. sporotrichioides*-homeella infektoiduissa ohranäytteissä satovuosina 2010–2012 reaaliaikaisella PCR-menetelmällä määritettynä.

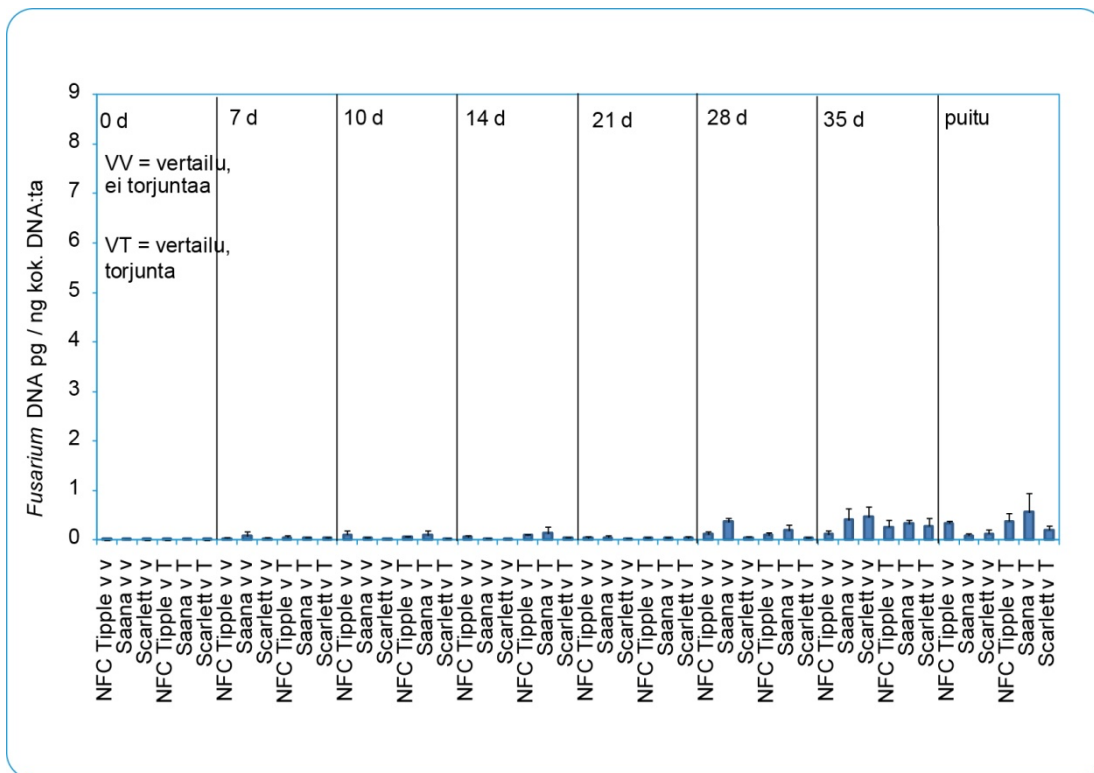
Fusarium-sienten määrää kvantitointiin reaaliaikaisella PCR-menetelmän avulla myös kasvukauden aikana. Vuonna 2010 *Fusarium*-sienten biomassan määrä nousi selvästi 10–15 päivän päästä tähkälle tulosta (Kuvat 18). Vuonna 2011 biomassan määrä lähti nousuun selvästi vasta 20 päivän jälkeen, ja määrät olivat kokonaisuudessaan pienempiä. Kuvasta 19 nähdään, että torjunnalla ei ollut merkittävää vaikutusta *Fusarium* DNA:n määrään vertailuohrassa kasvukauden aikana. Torjunnan vaikutus kasvukaudella kuitenkin näkyi *F. sporotrichioides*-homeella saastutetuissa näytteissä pienempinä *Fusarium* DNA:n kvantitointituloksina (Kuva 18a ja b).

Tämä tutkimus osoitti suuren biologisen vaihtelun *Fusarium*-kontaminaatiotasoissa saman koekentän eri rinnakkaisten näytelohkojen välillä. Kasvukauden lopussa (38d tähkälle tulon jälkeen) rinnakkaisten näytelohkojen välinen ero *Fusarium* DNA-määrissä oli jopa 2–3-kertainen.

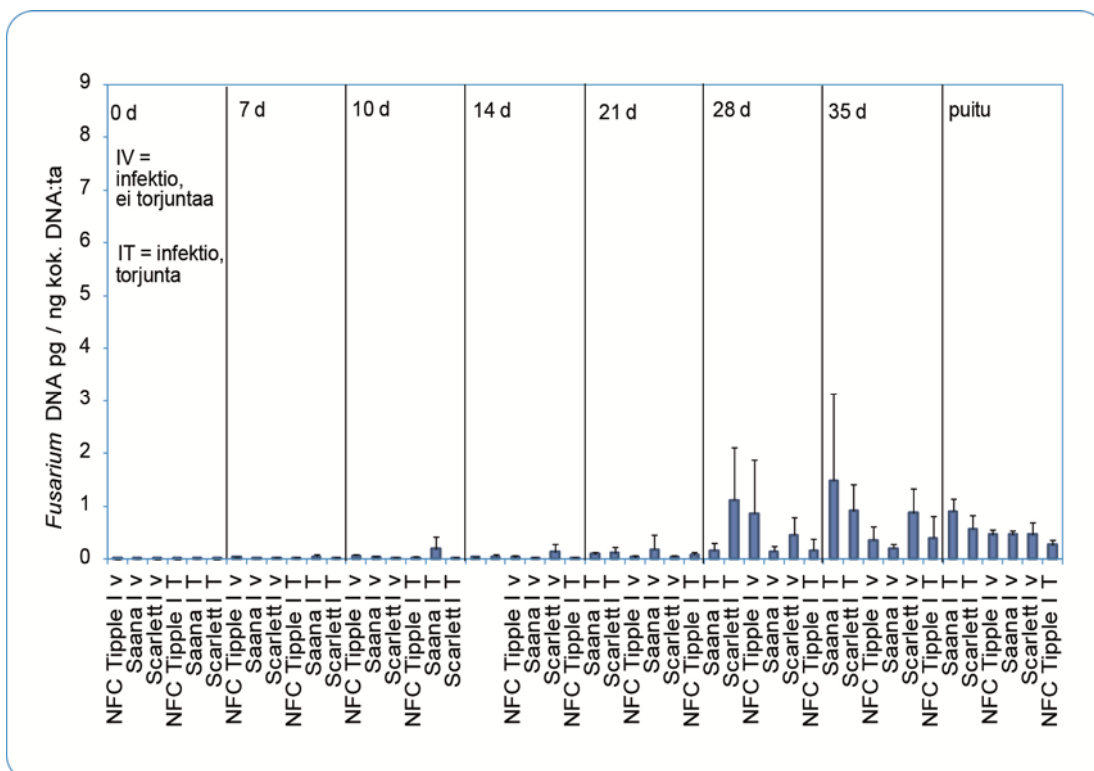
2012 tehtiin peltokoe ainoastaan Tipple lajikkeelle (Kuva 21). Kenttäkokeesta otettiin näytteet viljelyihin ja DNA-määrittelyksiä varten. TRAC näytteitä ei kerätty vuoden 2012 kenttäkokeesta. Kuten kuvasta 19 havaitaan, niin kesän 2012 kasvuolosuhteet olivat erittäin suotuisat lisätyn *F. sporotrichoides* sienen kas-
vulle.



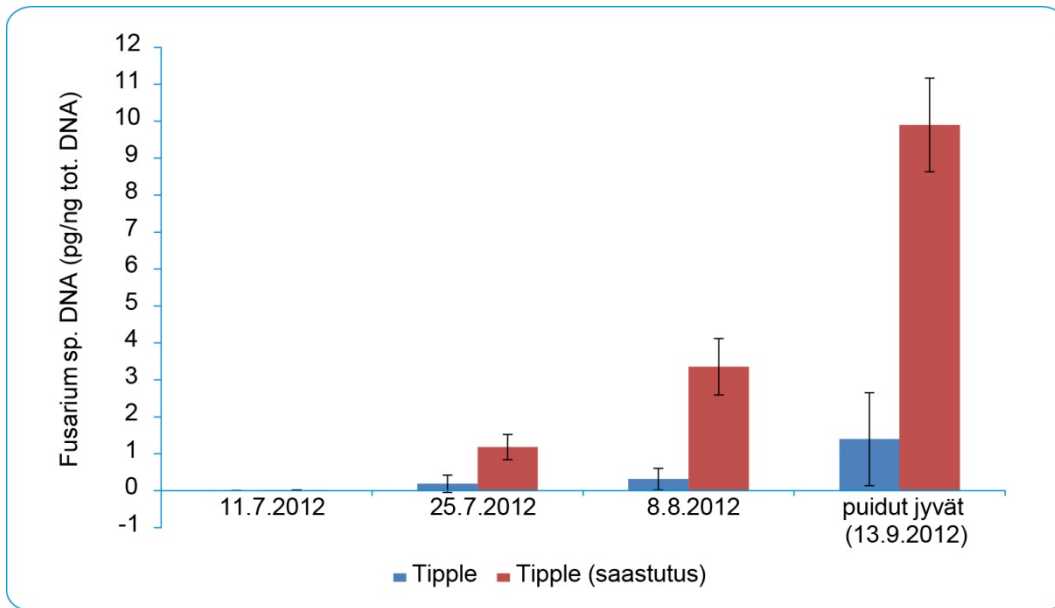
Kuva 18. *Fusarium* sp. DNA vertailuohrissa (n=3) kasvukaudella (a.) ja *F. sporotrichoides* sienellä tartutetuissa (b.) näytteissä 2010. VV = vertailu, ei torjuntakäsittely, VT = vertailunäyte, torjuntakäsittely, IV = *F. sporotrichoides* tartutus, ei torjuntaa, IT = *F. sporotrichoides* tartutus, torjuntakäsittely



Kuva 19. *Fusarium* sp. DNA vertailuohrissa (n=3) kasvukaudella 2011.



Kuva 20. *Fusarium* sp. DNA *F. sporotrichioides*-homeella tartutetussa ohrassa (n=3) kasvukaudella 2011.



Kuva 21. *Fusarium sp.* DNA vertailuohrassa ja *F. sporotrichioides*-homeella tartutetussa Tipple ohrassa (n=3) kasvukaudella 2012.

3.2.3 Mykotoksiinien muodostuminen viljaan kasvukaudella

Fusarium-aktiivisuuden ja toksiinien tuoton seuraaminen transkriptioprofilointimenetelmällä (TRAC)

Tässä projektissa *Fusarium*-sienten aktiivisuuden ja toksiinien tuoton käynnistymistä tutkittiin VTT:n kehittämällä TRAC-menetelmällä. Menetelmän avulla seurattiin lähetti-RNA:n eli lähetti-ribonukleinihapon tasoja. Lähetti-RNA tasojen perusteella voidaan ennakoida, mitä elävä solu on seuraavaksi tekemässä.

RNA-tutkimuksen suurin haaste on, että lähetti-RNA on erittäin epästabiili ja herkästi hajoava yhdiste. Siksi RNA näytteiden otto ja RNA-eristys ovat transkriptioprofiloinnin kriittisimmät vaiheet. SAFECEREAL-projektissa pystytettiin näytteenottosysteemi peltonäytteiden TRAC-analyysyä varten. Tähtänäytteet kerättiin pellolta ja toimitettiin mahdollisimman nopeasti suoraan nestetyypeen ja sen jälkeen säilytettiin -80°C (Kuva 20). Tämä oli ensimmäinen kerta, kun sekä ohra- että kauranäytteitä kerättiin viljojen kasvukaudelta transkriptioprofilointia varten. Tutkimus osoitti, että kenttäkokeiden näytteenotto onnistui. Tähtänäytteistä eristetty RNA oli laadultaan hyvää ja RNA-saanto oli erinomainen.

1. Tähkänäyttelöiden keruu ja vihneiden polsto



2. Tähklien esikäsitely ja pussitus



3. Pakastus nestetyyppeen



5. Säilytys -80°C ja kulvajälissä kuljetus VTT:lle

Jauhatus IKA-myllyllä ja jauhettujen näyttelöiden säilytys -80°C



Kuva 22. Kenttänäytteiden keruu RNA-eristyksiä varten.

TRAC-menetelmä perustuu spesifiin koettiin, jotka hybridisoituvat analysoitavan RNA:n kanssa. Koetin on nukleiinihappoketju, joka on pyritty suunnittelemaan *in silico* niin, että se sitoutuu vain haluttuun lähetti-RNA-molekyylisiin. Koettiin on liitetty fluoresoiva leima. Leimoja voi olla erilaisia. Lisäksi menetelmässä käytettävät koettimet ovat keskenään eripituisia, jolloin ne voidaan erottaa fluoresenssin ja koon perustella toisistaan kapillaarielektroforesilla (Rautio et al. 2006). Koettimien suunnittelu ja testaus on raportoitu MMM VILJATRAC (Haittamikrobien ja niiden tuottamien toksien varhainen osoittaminen rehuissa ja viljoissa uudella transkriptioprofilointimenetelmällä) projektin loppuraportissa (Dnro 4775/501/2005).

Kesän 2010 koesarjoissa käytettiin VILJATRAC-projektin alukkeita (tilattu 2008). Kesän 2011 kokeita varten jouduttiin tilaamaan uudet koettimet. Koettimissa oli sama sekvenssi, mutta niissä käytettiin uusia kirkkaampia leimoja. Uudet koettimet olivat herkempiä. Ne antoivat korkeampaa signaalia, mutta myös lisäsivät taustan ”taustakohinan” tasoa. Uudet koettimet antoivat noin 2–4x korkeampaa signaalia, joten 2010 ja 2011 tulosten lukuarvot eivät ole suoraan vertailtavissa keskenään. Ilmenemisprofiilit ovat kuitenkin vertailtavissa, sillä 2011 tulokset ovat ainoastaan korkeammalla signaalitasolla johtuen herkemmistä koettimista.

Tässä projektissa varmistettiin VILJATRAC-projektissa suunniteltujen ylläpitogeneille suunnattujen (EFA, ACS ja UBC) alukkeiden *Fusarium*-spesifisyys vertaamalla koettimien sekvenssejä geenipankista löytyviin homeiden ja hiivojen sekvensseihin (Taulukko 4). TRAC koettimien suunnittelussa alun perin käytettiin *F. graminearum* genomia. Vertailutulosten mukaan ylläpitogeneien koettimia voidaan pitää *Fusarium*-spesifisinä. Samankaltaisuus muiden relevanttien hiiva ja homeryhmien kanssa oli selkeästi alle 85%, paitsi *Pyrenophora* –homeen elongaatiofaktorigeenin alue oli 89% samankaltainen *Fusarium*-sientien kanssa. Sekin oli kuitenkin selkeästi erotettavissa muista *Fusarium*-sienistä. Jos sekvenssien samankaltaisuudessa on yli 15% ero, niin koetin ei todennäköisesti sitoudu ja signaali on heikko. Suunniteltu UBC koetin voi jopa olla *F. graminearum* spesifinen.

Taulukko 6. *Fusarium* ylläpitogeenien spesifisyys (FASTA linjaus). Sekvenssien samankaltaisuus (%) muiden relevanttien hiivojen ja homeiden kanssa.

Sienilaji	EFA1	ACS	UBC
<i>F. graminearum</i>	100	100	100
<i>F. oxysporum</i>	97	90	77
<i>F. verticilloides</i>	95	94	77
<i>Aspergillus flavus</i>	78	84	74
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	78	77	74
<i>Cryptococcus neoformans</i>	81	77	74
<i>Rhizopus oligosporus</i>	78	84	77
<i>Pyrenophora tritici</i>	89	87	77
<i>Penicillium chrysogenum</i>	84	84	77

Fusarium-sienten lähetti-RNA signaalin määrittäminen viljasta on haastavaa. Viljamatriisi sisältää runsaasti kuollutta solukkoa ja vain vähän eläviä soluja. Lisäksi suurin osa RNA:sta on peräisin kasvista. Noin 95–98 % totaali-RNasta oli peräisin ohrasta. Mikrobiperäisen RNA:n osuus oli vain noin 2–5 %. Tämä RNA-kokonaisuus sisältää *Fusarium*-sienten lisäksi muiden homeiden, hiivojen ja bakteerien RNA:n. Uudella transkriptioprofilointimenetelmällä sekä VILJATRAC- että SAFECEREAL -projekteissa suunniteltujen spesifisten *Fusarium*-koettimien avulla päästiin kuitenkin ensimmäistä kertaa määrittämään *Fusarium*-sienten toimintaa monimuotoisessa ekosysteemissä, vaikka *Fusarium*-sienten perimäaineksen osuus (DNA) oli vain <1 % koko ohranäytteen perimäaineksestä.

Tämä tutkimus osoitti, että kaikki *Fusarium*-koettimet toimivat kenttäkoenäytteille. Kaikki geenit ilmenivät ohran kasvukaudella ja koettimien avulla saatiin signaalit. Rinnakkaisten lohkojen välillä oli valtavan suuret erot ilmenemisprofiileissa ja myös *Fusarium*-DNA tasoissa ja mykotoksiipitoisuuksissa. Tutkimus osoitti, että ohramatriisin tausta antoi signaalia. *Fusarium*-koettimien antaman signaalin pitää ylittää kaksi kertaa taustan signaali, jotta voidaan varmuudella todeta, että signaali on peräisin *Fusarium*-sienistä.

Tri12 oli varhain ilmenevä geeni, havaittavissa jo 3–7d tähkälle tulon jälkeen. *Tri12* koodaa ionipumpua, jota tarvitaan trikotekeeni-toksiinien uloskuljetukseen solusta. *Tri10* ja *Tri11* geenien ilmeneminen havaittiin 10 päivän jälkeen. *Tri14* ja *Tri7* geenit ilmenivät konstitutiivisesti kolmen viikon jälkeen (21d) vuoden 2011 kenttäkokeessa. Vuoden 2011 kenttäkokeessa *Tri3* ja *Tri5* geenien ilmeneminen ei erottunut ”taustakohinasta”. *Tri5* geenin signaalissa oli voimakas tausta. Tälle geenille olisi myös vaihtoehtoinen sekvenssi, jolle koetin voitaisiin suunnitella.

Tässä tutkimuksessa RNA näytteet otettiin noin viikon välein. Geenien ilmentymistä ajatellen näytteenottofrekvenssi oli harva. Tiedetään, että useiden geenien ilmeneminen on nopeaa. Lähetti RNA-tasot voivat vaihdella suuresti eri päivinä tai jopa tuntitasolla. Sekä hiivoilla että homeilla on osoitettu sekä olosuhteiden muutosten että solusyklin vaiheen vaikuttavan voimakkaasti useiden geenien ilmentymiseen alle yhdessä tunnissa. Ilmentymistasot myös palaavat yhtä nopeasti alkuperäiselle tasolle olosuhteiden palautuessa muutosta edeltävälle tasolle (Rautio ym. 2006, Rautio ym. 2007). Esimerkiksi *Tri6* ja *Tri10* geenien ilmentymisaika on lyhyt. Tämä osaltaan voi selittää isoa vaihtelua joka havaittiin tässä tutkimuksessa. Lisäksi peltolohkojen säätilan seuranta dataloggereiden avulla osoitti, että lohkokohittaiset olosuhteet voivat vaihdella voimakkaasti yhden vuorokauden aikana. Esimerkiksi lämpötilat voivat vaihdella merkittävästi. Esimerkiksi suurimman ja alhaisimman lämpötilan välillä oli jopa 15–20 asteen ero saman vuorokauden aikana. Lisäksi peltolohkon sisäisessä ”mikroilmastossa” kosteusolosuhteissa oli suuria vaihteluita jopa vuorokauden sisällä. Tämä lämpötilan ja kosteuden voimakas oskillointi todennäköisesti vaikuttaa myös homeiden geenien ilmentymiseen ja aineenvaihduntaan.

Fusarium-aktiivisuuden kehittymisen kannalta mielenkiintoinen ajanjakso sijoittuu 10–14 päivää tähkälle tulon jälkeen sekä kasvukauden loppupuolella 1–2 viikkoa ennen puintia (Kuva 23). Elongaatiofaktori 1-alpha (EFA1A) liittyy proteiinisynteesiin ribosomeissa ja sen ilmeneminen voimistui koko kasvukauden ajan. Tämän geenin ilmeneminen kuvasi parhaiten *Fusarium*-sienten aktiivisuuden muutoksia ohran kas-

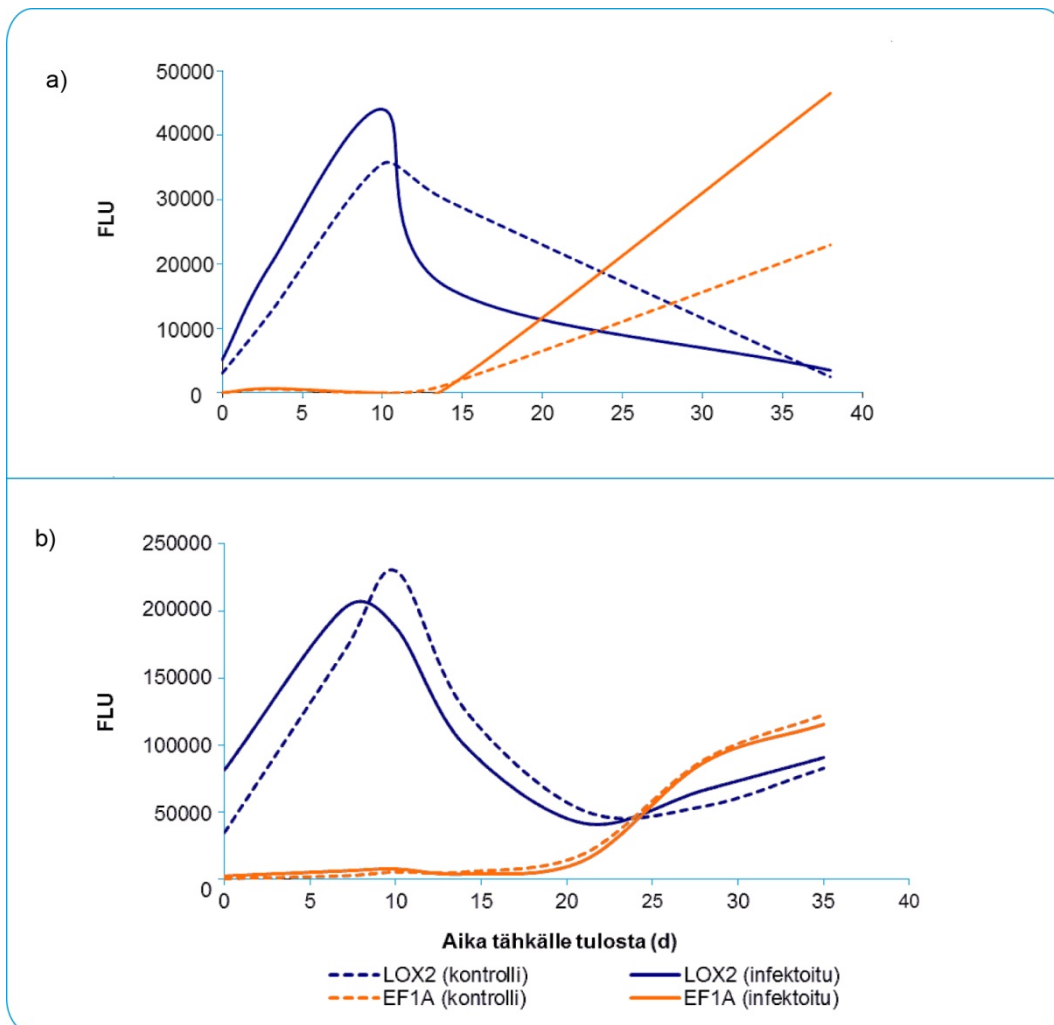
vukauden aikana. Sen ilmeneminen oli voimakasta kahden kolmen viikon kuluttua tähkälle tulon jälkeen sekä kasvukauden lopussa.

Kasvukauden olosuhteet vuosina 2010 ja 2011 olivat keskenään hyvin erilaiset. Erot oli havaittavissa myös *Fusarium*-sienten kasvussa ja aktiivisuudessa. Useimmat *tri*-geenit ilmenivät voimakkaasti 2010 kenttäkokeessa jo 14 vuorokauden tähkälle tulos jälkeen. Vuoden 2011 olosuhteissa *Fusarium*-aktivaatio havaittiin selkeästi myöhemmin, vasta kolmen viikon kuluttua tähkälle tulosta (Kuva 23).

Esimerkkinä ohran aktiivisuuden kehittymisestä mitattiin lipoksygenaasigeenin (*LOX*) ilmenemistä. TRAC-menetelmän etuna oli, että samaan koetinsettiin voidaan liittää sekä viljan että mikrobin aktiivisuuden määrittämiseen suunniteltuja koettimia, jolloin samasta näytteestä voidaan samanaikaisesti määrittää useamman organismin toimintaa.

Kesä 2010 kenttäkokeessa infektoidut näytteet poikkesivat selvästi vertailunäytteistä. Kesän 2011 kokeessa sekä vertailunäytteiden että infektoidujen näytteiden aktiivisuudet eivät poikenneet toisistaan (Kuvat 23 ja 24).

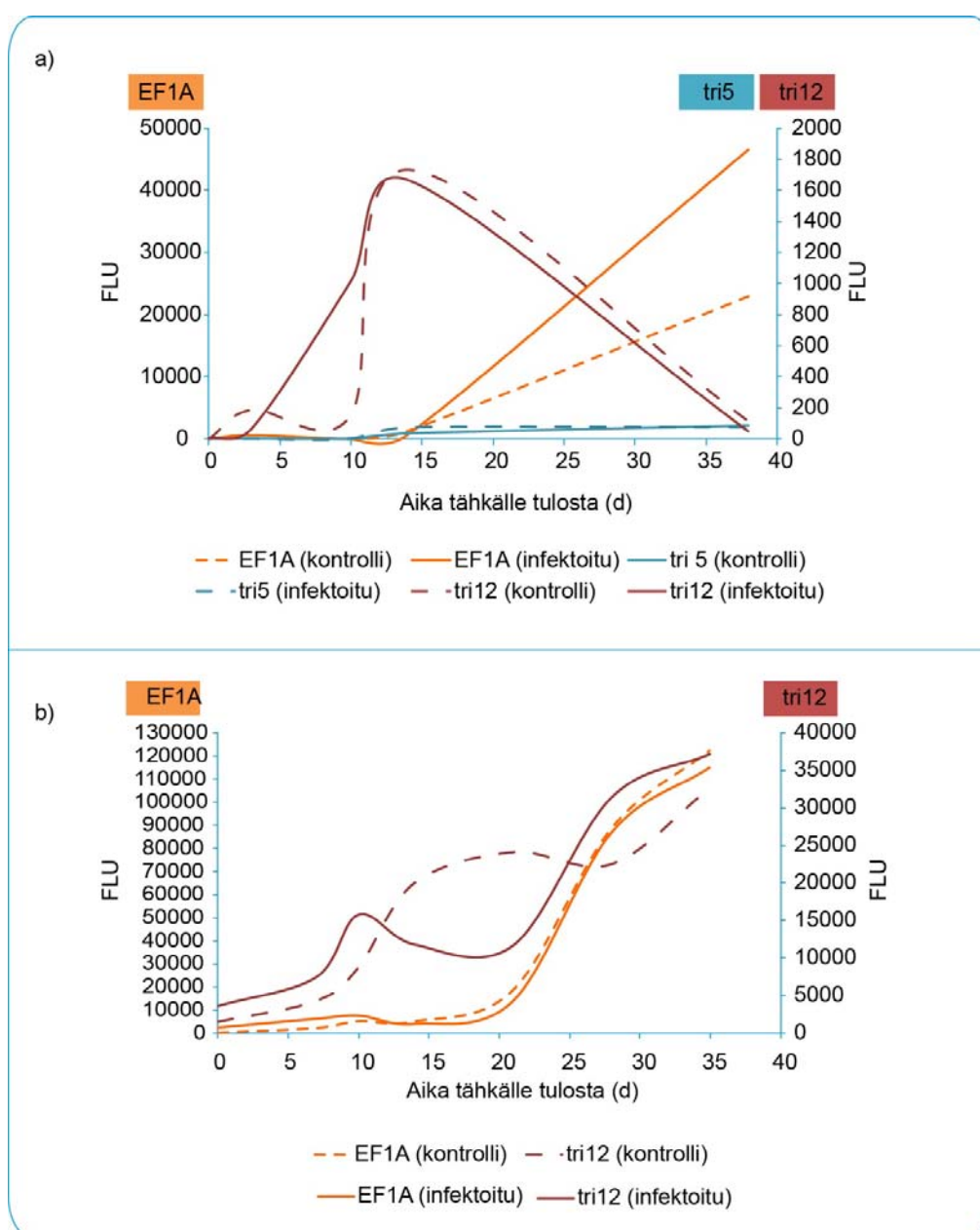
Kesän 2011 kokeessa signaalitasot (FLU-arvot) ovat noin 4x suuremmat kesän 2010 TRAC-tuloksiin verrattuna, johtuen herkemmissä koettimista (Kuvat 23 ja 24).



Kuva 23. Ohran ja *Fusarium* aktiivisuuden kehittyminen kasvukaudella 2010 (a) ja 2011 (b). Ohran aktiivisuus mitattu LOX geenin ilmenemisenä ja *Fusarium*-aktiivisuus elongaatiofaktorin EFA1A ilmenemisenä. Tulokset laskettu 3 ohralajikkeen ja 3 rinnakkaisen lohko keskiarvona (n=9). *Fusarium*-ilmentymisarvot normalisoitu olettaen, että ilmentymisen 0d pisteessä on taustakohinaa.

Projektin yhtenä tavoitteena oli etsiä varhaisia biomarkkereita, jotka ennakoisivat haittayhdisteiden synteesin käynnistymistä eri kasvuvaiheissa. *Fusarium*-aktiivisuuden kehittämisessä havaittiin yhtäläisyyksiä kasvukausien 2010 ja 2011 välillä. Ionipumppua koodaava *Tri12* geenin (tarvitaan toksien kuljettamiseen ulos solusta) aktivaatio havaittiin molempina vuosina ensimmäisenä, selkeästi ennen elongaatiofaktorin ilmenemistä (Kuva 24).

Vaikka kesällä 2011 oli epäsuotuisat olosuhteet T2/HT2 -tuottajien kasvulle ja *Fusarium*-määrät selkeästi alhaisempia kuin 2010 kenttäkokeessa, silti *Fusarium*-aktiivisuutta oli selkeästi havaittavissa koko kasvukauden ajan. Esimerkiksi 2010 kenttäkokeessa *Tri12* geenin ilmenemisessä oli selkeä piikki kahden viikon tähkälle tulon jälkeen. Vuoden 2011 kokeessa *Tri12* geenin ilmeneminen voimistui kasvukauden loppua kohti. Vuoden 2011 kokeissa mitattiin suurempia HT2/T2 -pitoisuuksia kasvukauden aikana otetuissa näytteissä (Taulukko 7).



Kuva24. Elongaatiofaktorin (EFA1A) ja Tri 12 geenin ilmentyminen (ionipumppu) kesän 2010 (a) ja 2011 (b) kenttänäytteissä. Tulokset ovat kolmen ohralajikkeen ja kolmen rinnakkaisen lohkon keskiarvo (n=9). Kontrolli = luontaisesti saastunut vertailunäyte, infektoitu = *F. sporotrichioides* kannalla saastutettu.

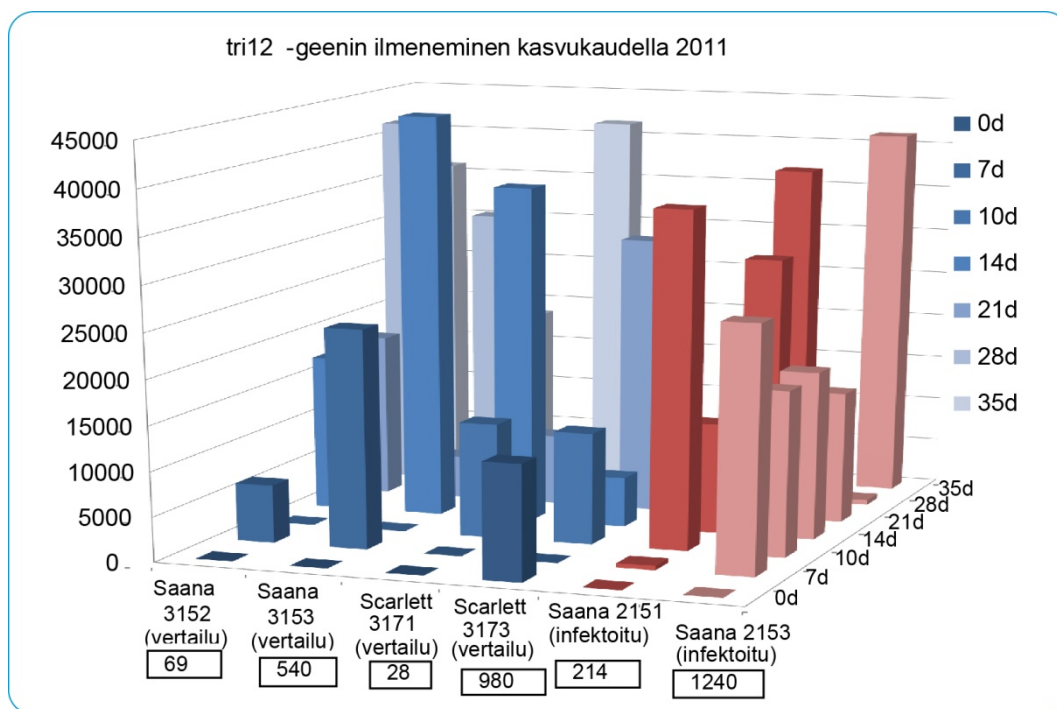
Taulukko 7. T2/HT2-summa ohranäytteissä vuosina 2010–2012.

T2/HT2-summa (µg/kg)																	
Vuosi	Päivä	Vertailuohra				Vertailu + torjunta				Infektoitu ohra				Infektointi+ torjunta			
		ka	min	max	+	ka	min	max	+	ka	min	max	+	ka	min	max	+
2010	4	0	0	0	0	16	0	122	2	15	0	135	1	8	0	45	2
(n=9)	11	12	0	29	6	19	0	51	6	25	0	73	6	26	0	90	7
	18	19	0	60	5	161	0	1340	6	163	7	610	9	54	0	150	7
	39	53	0	215	8	25	0	85	7	188	0	1080	8	48	7	234	9
	sato	37	0	185	8	130	20	590	9	281	25	770	9	159	22	380	9
2011	0	21	0	108	2	23	0	80	5	9	0	52	2	28	0	115	4
(n=9)	7	156	0	278	8	178	70	470	9	280	58	610	9	204	39	420	9
	10	180	0	670	8	173	28	306	9	217	96	510	9	242	60	800	9
	14	95	9	370	9	163	45	680	9	240	53	490	9	87	32	198	9
	21	132	17	350	9	174	25	430	9	372	17	840	9	116	49	195	9
	28	92	17	460	9	283	17	1310	9	295	35	740	9	152	17	430	9
	35	208	17	960	9	88	42	211	9	279	37	1240	9	130	47	379	9
	sato	41	9	83	9	63	28	111	9	103	49	198	9	56	9	93	9
2012	11.7	0	0	0						0	0	0					
	25.7	47	12	96						1490	1310	1600					
	8.8	29	0	97						6925	6200	8200					
	sato	16	0	31						2465	1800	3190					

+ = T2/HT2-positiivisten näytteiden määrä.

Tri12 ilmeneminen voisi olla kiinnostava biomarkkeri. Se ilmenee varhaisessa vaiheessa. Kuvaan 25 on valittu peltolohkoparit (kesä 2011), jossa toisessa on mitattu selkeästi enemmän HT2/T2 -toksiineja kasvukauden lopussa, 35d vuorokauden kohdalla. Hypoteesina oli, että *Tri12* pitäisi näkyä aiemmin tai ilmentyä voimakkaammin tapauksissa, joissa toksiinia tuottuu enemmän. Näytteissä, joissa mykotoksiinia muodostunut enemmän, niin *Tri12* geenin ilmeneminen havaittiin joko aiemmin tai korkeammassa tasossa (Kuva 25).

Kuva 25 kuvastaa myös rinnakkaisten peltolohkojen välistä valtavaa vaihtelua. Kyseessä on saman näytteen rinnakkaiset lohkot. Johtopäätösten tekeminen tällaisesta aineistosta on haastavaa. 2011 oli ainoa koesarja, jossa TRAC ja toksiinit määritetty samasta näytteestä. Kesän 2012 kenttäkokeesta ei ole kerätty TRAC näytteitä.



Kuva 25. Tri12 geenin ilmeneminen Saana ja Scarlett ohrien kesän 2011 kenttäkokeessa. Koepareiksi valittiin lohkot, joissa toisessa havaittu voimakkaampi toksiini tuotanto. Kuvaanmerkitty laatikoihin HT2/T2 summa kasvukauden lopussa (35d tähtikalle tulon jälkeen)

3.2.4 Mykotoksiinien monimuotoisuuden ja määrän kehitys kemiallisilla monijäämämenetelmillä

Hometoksiinit kaurassa

Vuonna 2010 kaikkia määritettyjä toksiineja (NEO, DAS, HT-2, T-2, BEA) havaittiin kaurassa kaikilla testatuilla viljalajikkeilla (Belinda, Julius, Viviana). NEO- ja DAS-toksiineja havaittiin lähinnä alle määrittelyrajojen olevissa pitoisuuksissa. T-2-toksiinia ja BEA:a havaittiin yksittäisissä vertailunäytteissä (käsittelemätön) jo kasvukauden ensimmäisen aikapisteen (4d) kohdalla, mutta niiden määrät olivat pieniä.

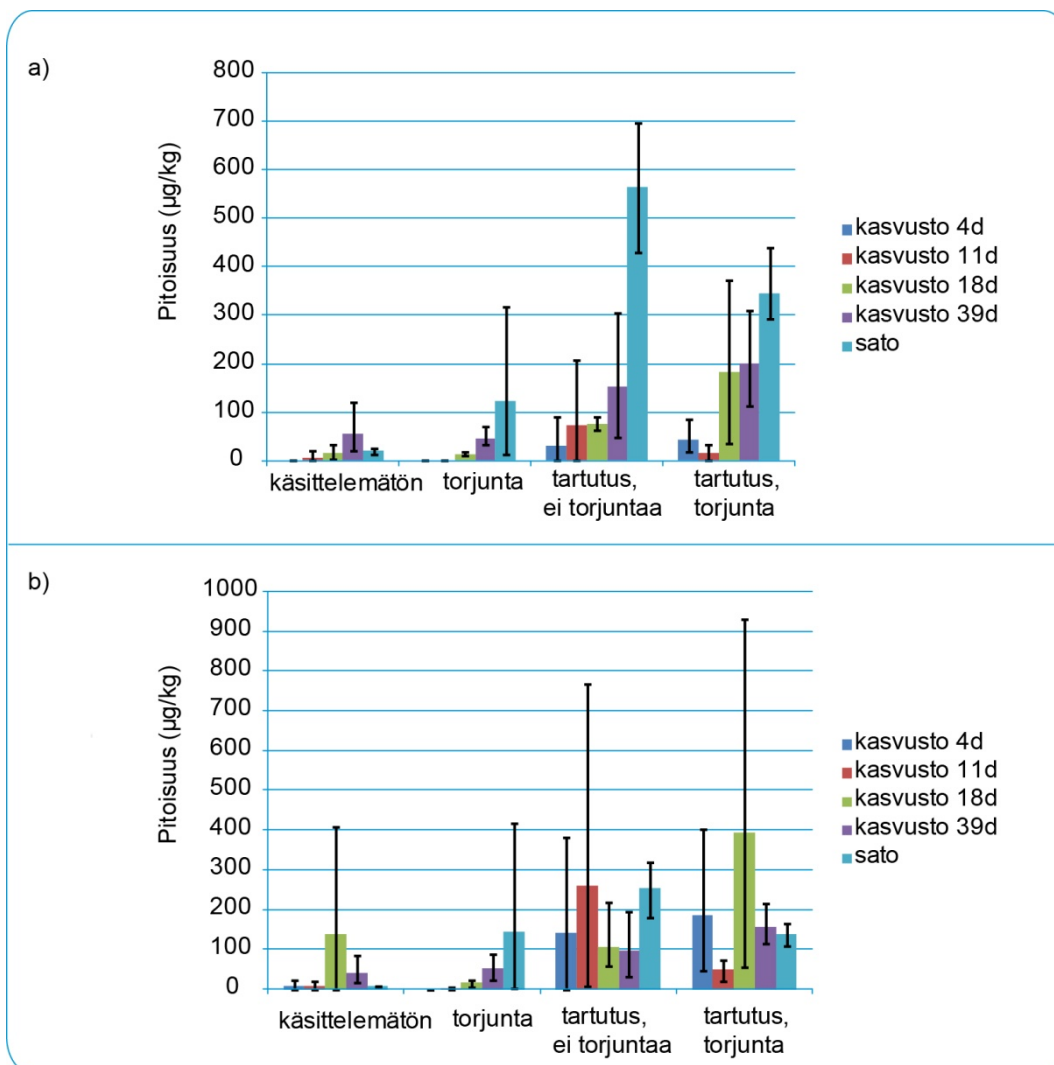
Suurimmat yksittäiset HT-2- ja T-2-toksiinien pitoisuudet kauran vertailunäytteissä (käsittelemätön) olivat Belinda- ja Julius-lajikkeiden kasvustonäytteissä (Taulukko 8.).

Taulukko 8. Kauran suurimmat HT-2- ja T-2-pitoisuudet vertailunäytteissä (käsittelemätön) vuonna 2010.

lajike	käsittely	aikapiste	Näyte	HT-2 (ppb)	T-2 (ppb)	ΣHT-2/T-2
Belinda	käsittelemätön	39 d	1	130	150	280
Belinda	käsittelemätön	39 d	3	250	85	335
Julius	käsittelemätön	18 d	3	33	410	443
Julius	käsittelemätön	39 d	3	120	84	204
Viviana	käsittelemätön	39 d	2	60	52	112

Eniten HT-2-toksiinia muodostui Julius-lajikkeella hometartutetuissa satonäytteissä (tartutus, ei torjuntaa), joissa pitoisuus oli suurimmillaan 700 ppb (Kuva 26.a). Kuvasta voidaan havaita myös rinnakkaisten näytteiden välinen variaatio, sillä kerrannaisten pitoisuudet vaihtelevat 430–700 ppb:n välillä.

T-2-toksiinia mitattiin eniten hometartutetussa ja fungisidilla ruiskutetussa kasvustonäytteessä (tartutus, torjunta, 18 d) Julius-lajikkeella, mutta myös näiden rinnakkaisten näytteiden välillä variaatio oli suuri (55–930 ppb) (Kuva 26.b).



Kuva 26. Kauran suurimmat a) HT-2- ja b) T-2-pitoisuudet Julius-lajikkeella vuonna 2010.

Vuonna 2011 kauran satonäytteistä havaittiin kaikkia määritettyjä toksiineja (NEO, DAS, HT-2, T-2, BEA) kaikilla testatuilla viljalajikkeilla (Belinda, Julius, Viviana). NEO-, DAS- ja BEA-toksiineja havaittiin lähinnä alle määrittämissä rajoissa. Suurin havaittu HT-2+T-2-toksiinipitoisuus kauran vertailunäytteissä (640 ppb) oli Belindalla (Taulukko 9.), jolla havaittiin myös suurin HT-2-toksiinipitoisuus (520 ppb). Suurin T-2-toksiinipitoisuus havaittiin Vivianalla (230 ppb). Vuoden 2010 vertailusatonäytteessä suurin HT-2+T-2-toksiinipitoisuus oli 119 ppb (Belinda).

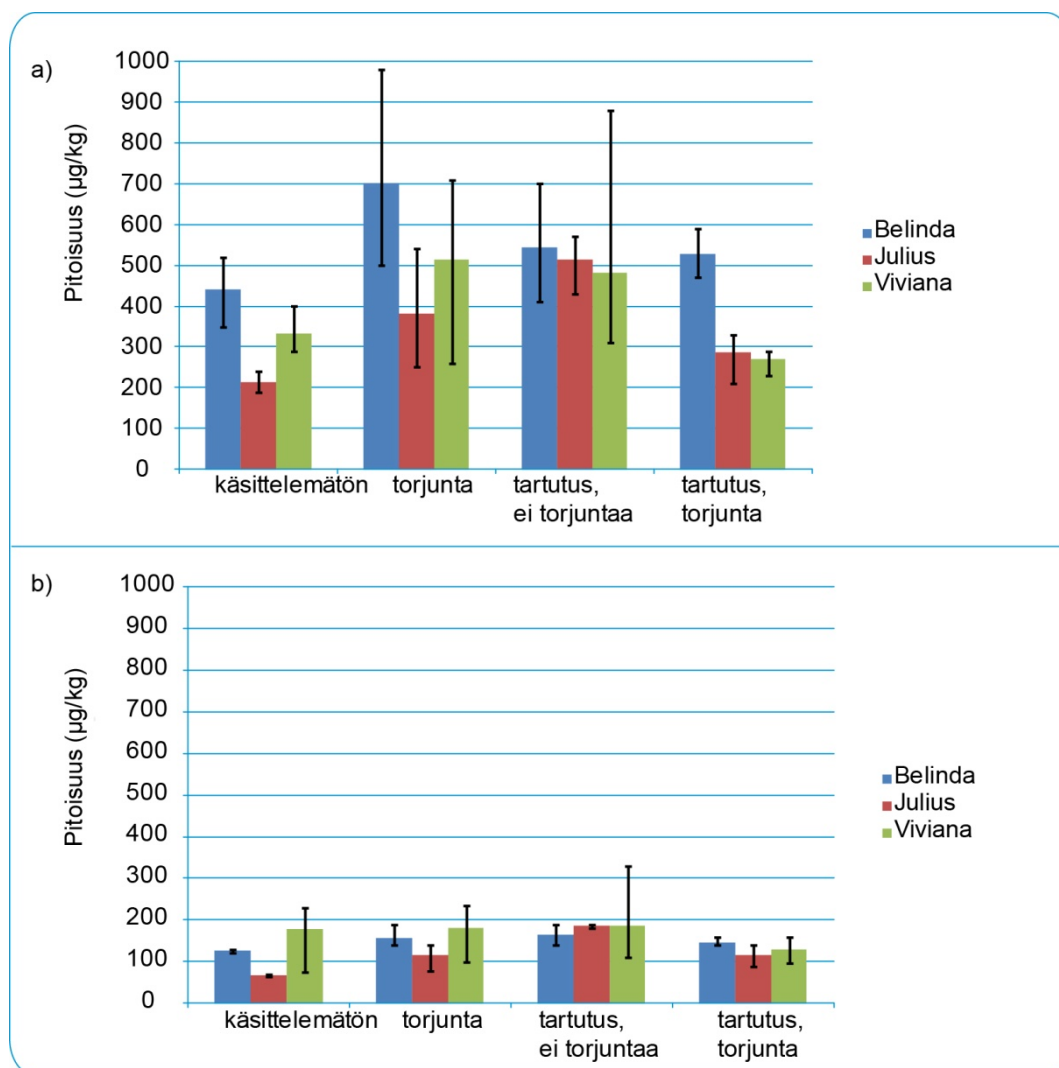
Taulukko 9. Kaurasadon suurimmat HT-2- ja T-2-pitoisuudet vertailunäytteissä (käsitlemätön) vuonna 2011.

lajike	käsittely	Näyte	HT-2 (ppb)	T-2 (ppb)	HT-2+T-2 (ppb)	Suhde (HT2/T2)
Belinda	käsitlemätön	2	520	120	640	4.3
Julius	käsitlemätön	1	240	69	309	3.5
Viviana	käsitlemätön	1	300	230	530	1.3
Viviana	käsitlemätön	3	370	210	580	1.8

Eniten HT-2-toksiinia muodostui Belinda-lajikkeella (980 ppb) fungisidilla käsitellyssä näytteessä ja T-2-toksiinia Viviana-lajikkeella (330 ppb) ”tartutettu, ei torjuntaa” -näytteessä (Kuva 27). Yksittäisen näytteen suurin HT2+T2-pitoisuus oli 1210 ppb (Viviana; tartutus, ei torjuntaa) (Taulukko10.).

Taulukko 10. Kaurasadon suurimmat HT-2- ja T-2-pitoisuudet vuonna 2011.

lajike	käsittely	Näyte	HT-2 (ppb)	T-2 (ppb)	HT-2+T-2 (ppb)	Suhde (HT2/T2)
Belinda	torjunta	3	980	140	1120	7.0
Julius	tartutus, ei torjuntaa	3	570	180	750	3.2
Viviana	tartutus, ei torjuntaa	2	880	330	1210	2.7



Kuva 27. Kauran satonäytteiden a) HT-2- ja b) T-2-toksiinipitoisuudet vuonna 2011.

Kauran satonäytteet vuosilta 2010 ja 2011 analysoitiin myös toisella monijäämämenetelmällä ja em. toksiinien lisäksi näytteissä havaittiin deoksinivalenolia, moniliformiinia ja antibiootti Y:tä alle määritysrajojen (< LOQ). Suurin havaittu enniatiinin (B1) pitoisuus oli 130 ppb. Enniatiineja (A+A1+B+B1) kyseisessä näytteessä mitattiin yhteensä 290 ppb (Belinda v. 2011; tartutus, ei torjuntaa).

Hometoksiinit ohrassa

Vuonna 2010 kaikkia määritettyjä toksiineja (NEO, DAS, HT-2, T-2, BEA) havaittiin myös ohralla kaikilla testatuilla viljalajikkeilla (Saana, Scarlett, Tipple), mutta NEO- ja DAS-pitoisuudet olivat pääasiassa alle määritysrajojen olevissa pitoisuuksissa. Toksiineja havaittiin ohran vertailunäytteissä (käsittämätön) toisen aikapisteen (11 d) kohdalla (Taulukko 11.).

Taulukko 11. Ohralajikkeiden toksiinipitoisuudet kasvustonäytteessä (11 d) vuonna 2010.

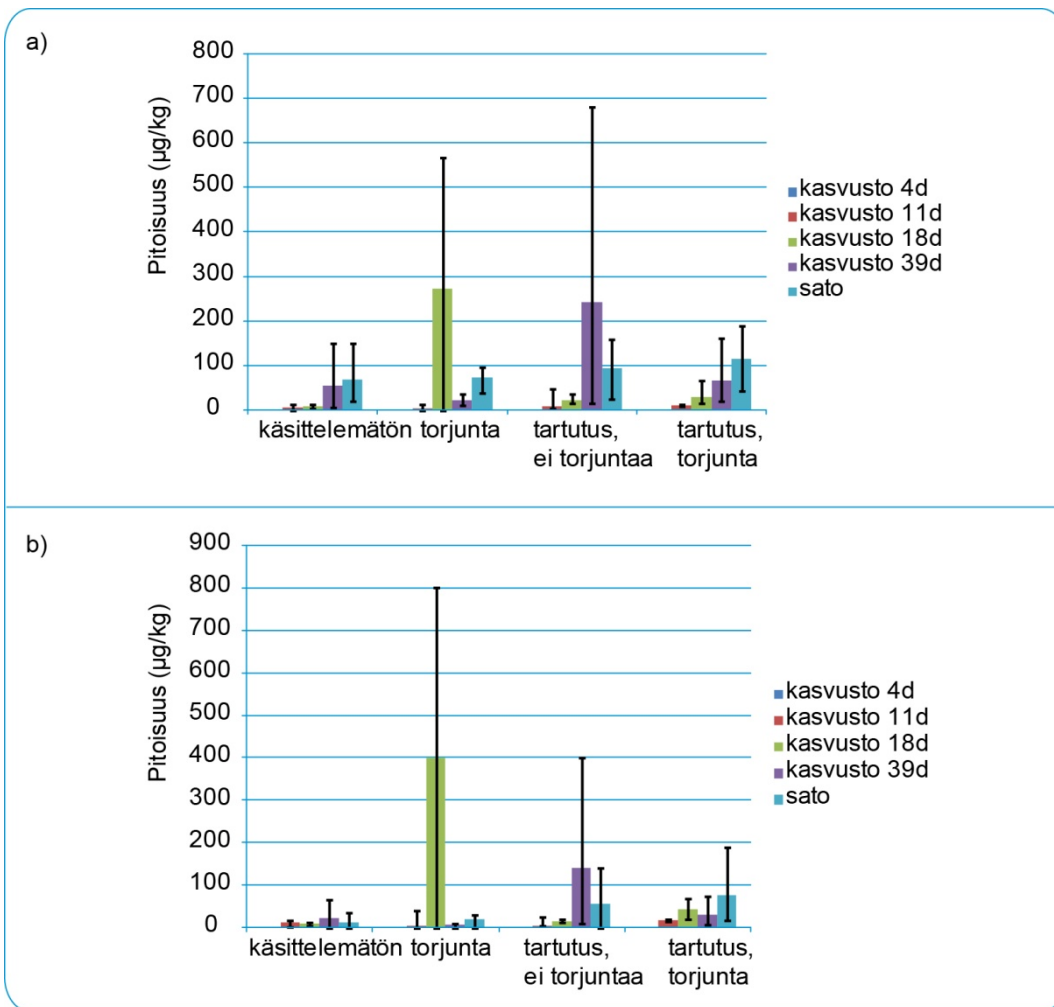
lajike	käsittely	Näyte	NEO (ppb)	DAS (ppb)	HT-2 (ppb)	T-2 (ppb)	BEA (ppb)
Saana	käsittämätön	1	< 4.7	< 3	12	15	< 5.5
		2	8.2	6.8	9.2	< 6.8	26
		3	< 4.7	< 3	11	< 6.8	< 5.5
Scarlett	käsittämätön	1	8.2	10	0	0	< 5.5
		2	0	< 3	0	0	< 5.5
		3	6.9	6.4	< 6.6	11	18
Tipple	käsittämätön	1	< 4.7	< 3	0	< 6.8	< 5.5
		2	< 4.7	< 3	14	15	0
		3	< 4.7	< 3	< 6.6	17	0

HT-2- ja T-2-toksiinien pitoisuudet ohran vertailunäytteissä (käsittämätön) olivat pääsääntöisesti pienemmät kuin kauralla. Suurimmat HT-2- ja T-2-toksiinipitoisuudet olivat Tipple-lajikkeen kasvustonäytteessä (39 d) (Taulukko 12.).

Taulukko 12. Ohran suurimmat HT-2- ja T-2-toksiinien pitoisuudet vertailunäytteissä (käsittämätön) vuonna 2010.

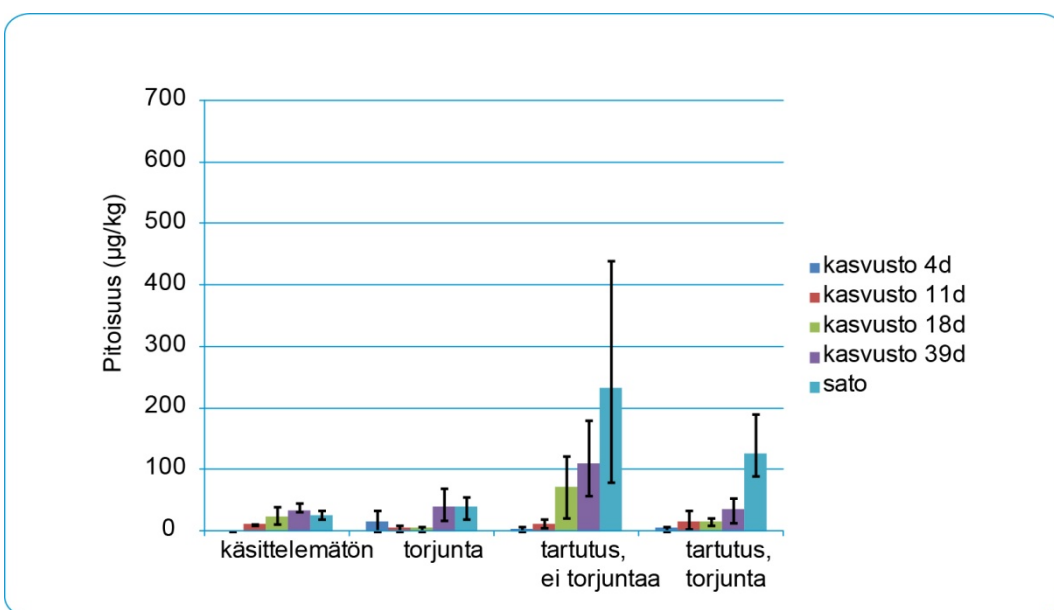
Lajike	Käsittely	Aikapiste	Näyte	HT-2(ppb)	T-2(ppb=)	ΣHT-2/T-2
Saana	käsittämätön	18 d	2	21	39	60
Saana	käsittämätön	39 d	3	45	8	53
Scarlett	käsittämätön	39 d	3	81	34	115
Tipple	käsittämätön	39 d	1	150	65	215

Eniten HT-2-toksiinia (680 ppb) muodostui Tipple-lajikkeella hometartutetussa kasvustonäytteessä (tartutus, ei torjuntaa, 39 d) (Kuva 28 a). Myös T-2-toksiinia havaittiin eniten Tipple-lajikkeella (800 ppb) fungisidilla ruiskutetussa kasvustonäytteessä (torjunta, 18 d) (Kuva 28 b).



Kuva 28. Ohran suurimmat pitoisuudet a) HT-2- ja b) T-2-toksiinilla Tipple-lajikkeella.

Myös ohralla oli suurta vaihtelua rinnakkaisten näytteiden välisissä toksiinipitoisuuksissa. Esimerkiksi Saana-lajikkeen kolmen rinnakkaisen sato näytteen (tartutus, ei torjuntaa) HT-2-toksiinipitoisuudet vaihtelivat välillä 80–440 ppb (Kuva 29.).



Kuva 29. HT-2-toksiinin muodostuminen Saana-lajikkeessa.

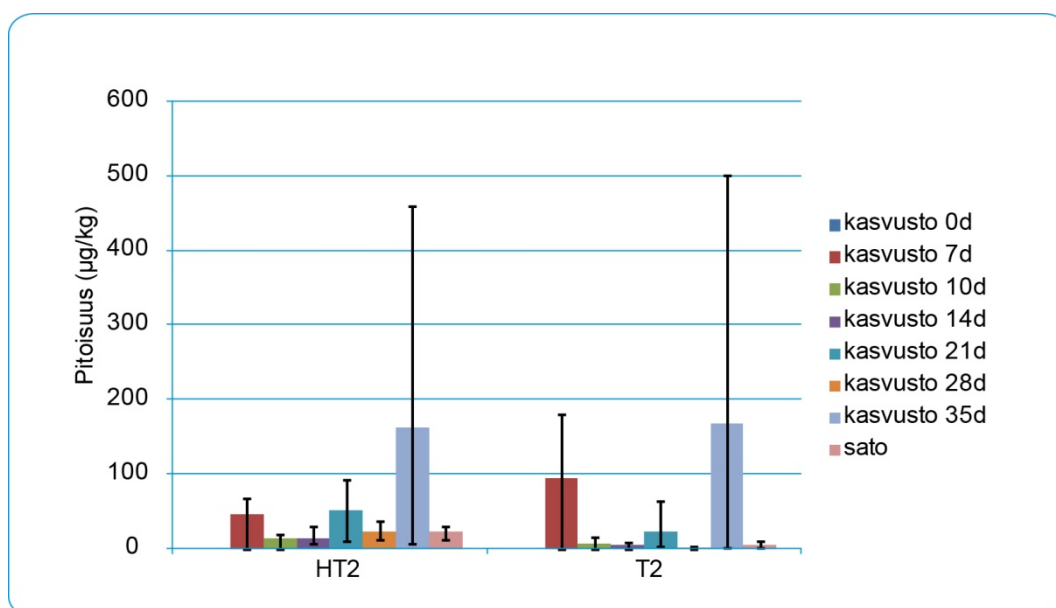
BEA-toksiinin kvantitoitavia pitoisuuksia ohralla muodostui aikapisteen (11d) kohdalla. Suurimmat mitatut pitoisuudet olivat pääsääntöisesti alle 300 ppb.

Vuonna 2011 kaikkia määritettyjä toksiineja (NEO, DAS, HT-2, T-2, BEA) havaittiin myös ohralla kaikilla tutkituilla viljalajikkeilla (Saana, Scarlett, Tipple). NEO-, DAS- ja BEA-toksiinipitoisuudet olivat kuitenkin pääasiassa alle määrittelyrajojen olevissa pitoisuuksissa.

HT-2- ja T-2-toksiineja havaittiin Saana-lajikkeen vertailunäytteissä (käsittlemätön) heti ensimmäisen aikapisteen (0 d) kohdalla, mutta muilla lajikkeilla vasta toisessa aikapisteessä (7d). Vertailunäytteissä NEO- ja DAS-toksiineja havaittiin kaikilla lajikkeilla toisessa aikapisteessä (7d) ja BEA-toksiinia havaittiin kolmannessa aikapisteessä (10d). Suurin HT-2- ja T-2-toksiinien sekä edelleen Σ HT-2+T-2-pitoisuus vertailunäytteessä oli Scarlett-lajikkeen 35d-kasvustonäytteessä (960 ppb) (Taulukko 13.). Myös vuonna 2011 rinnakkaisten välillä oli suurta variaatiota (Kuva 30.).

Taulukko 13. Ohran suurimmat HT-2- ja T-2-toksiinien pitoisuudet vertailunäytteissä (käsittlemätön) vuonna 2011.

lajike	käsittely	aikapiste	näyte	HT-2 (ppb)	T-2 (ppb)	HT-2+T-2 (ppb)	Suhde (HT2/T2)
Saana	käsittlemätön	35 d	3	290	250	540	1.2
Scarlett	käsittlemätön	35 d	3	460	500	960	0.9
Tipple	käsittlemätön	10 d	2	360	310	670	1.2

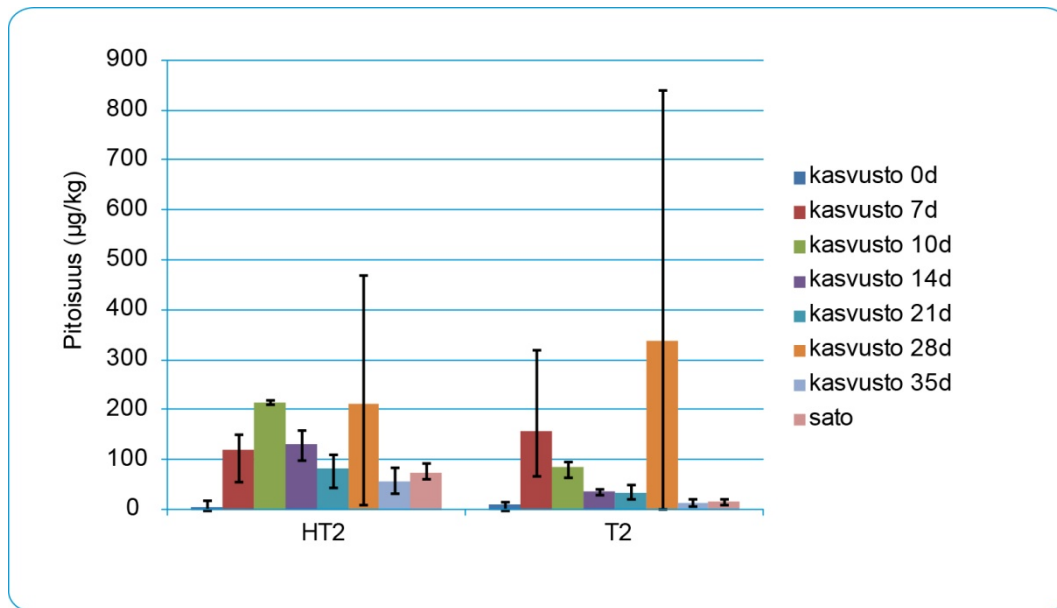


Kuva 30. HT-2- ja T-2-toksiinin pitoisuudet vertailunäytteissä Scarlett-lajikkeella vuonna 2011.

Eniten HT-2-toksiinia muodostui Saana-lajikkeella (10 d; 630 ppb; tartutus, torjunta) ja T-2-toksiinia Tipple-lajikkeella (28 d; 840 ppb; torjunta). Yksittäisen näytteen suurin HT-2+T-2-pitoisuus oli 1310 ppb (Tipple, 28 d, torjunta) (Taulukko 14.). Tipple-lajikkeen HT-2- ja T-2 -pitoisuudet on esitetty kuvassa 31.

Taulukko 14. Ohran suurimmat HT-2- ja T-2-toksiinien pitoisuudet vuonna 2011.

lajike	käsittely	aikapiste	näyte	HT-2 (ppb)	T-2 (ppb)	HT-2+T-2 (ppb)	Suhde (HT2/T2)
Saana	tartutus, torjunta	10 d	1	630	170	800	3.7
Saana	tartutus, ei torjuntaa	35 d	3	430	810	1240	0.5
Scarlett	käsittelemätön	35 d	3	460	500	960	0.9
Tipple	torjunta	28 d	3	470	840	1310	0.6



Kuva 31. HT-2- ja T-2-toksiinien pitoisuudet vertailunäytteissä Tipple-lajikkeella vuonna 2011.

Vuonna 2012 tutkituista toksiineista BEA- ja DAS-toksiineja ei havaittu tutkitulla Tipple-lajikkeella. Vain T-2 -toksiinia havaittiin alle määrittämissä aikapisteissä ensimmäisen aikapisteeseen kohdalla. HT-2-toksiinia havaittiin vasta toisen aikapisteeseen kohdalla. Suurin pitoisuus HT-2-toksiinia havaittiin aikapisteessä 14d (78 ppb; 25.7.12) ja suurin pitoisuus T-2 -toksiinia aikapisteessä 28d (19 ppb; 8.8.12). Eniten HT-2 -toksiinia (6000 ppb) vuonna 2012 muodostui hometartutettuun kasvustonäytteeseen (8.8.12). Myös suurin pitoisuus T-2 -toksiinia havaittiin samassa näytteessä.

Ohran satonäytteet analysoitiin kaikkina satovuosina myös toisella monijäämämenetelmällä ja em. toksiinien lisäksi näytteissä havaittiin 3-asetyyliideoksinivalenolia ja antibiootti Y:tä alle määrittämissä rajojen. Suurin havaittu deoksinivalenolin pitoisuus vuonna 2011 oli 93 ppb (Scarlett, käsittelemätön) ja enniatiinin (B1) pitoisuus 920 ppb (Tipple, tartutus, torjunta). Enniatiineja (A+A1+B+B1) kyseisessä näytteessä mitattiin yhteensä 1700 ppb.

Fungisidikäsitteilyn vaikutus T-2 ja HT-2 -toksiinien muodostumiseen

KAURA: Vuonna 2010 hometartutettujen (tartutus, ei torjuntaa) satonäytteiden ja hometartutettujen sekä fungisidillä ruiskutettujen (tartutus, torjunta) satonäytteiden välillä havaittiin vähäisiä eroja T-2- ja HT-2-toksiinipitoisuuksissa (Taulukko 15.). Yksittäisistä lajikkeista Juliuksella havaittiin suurin HT-2+T-2-pitoisuusero ”tartutus, ei torjuntaa” -näytteiden ja ”tartutus, torjunta” -näytteiden välillä (820 ppb/480 ppb). Erot lajikkeiden välillä olivat kuitenkin pienet.

Vuonna 2011 hometartutettujen (tartutus, ei torjuntaa) satonäytteiden ja hometartutettujen sekä fungisidillä ruiskutettujen (tartutus, torjunta) satonäytteiden välillä havaittiin jonkin verran eroja T-2- ja HT-2-toksiinipitoisuuksissa (Taulukko 16.). Lajikkeista Vivianalla havaittiin suurin HT-2+T-2-pitoisuusero ”tartutus, ei torjuntaa” -näytteiden ja ”tartutus, torjunta” -näytteiden välillä (727 ppb/382 ppb). Yksittäisistä lajikkeista Belindalla fungisidikäsitteily ei juuri tuonut eroa toksiinipitoisuuksiin.

Taulukko 15. Fungisidi-ruiskutuksen vaikutus T-2- ja HT-2- toksiinin muodostumiseen kauran satonäytteissä vuonna 2010.

lajike	käsittely	HT-2 (ppb)	T-2 (ppb)	ΣHT-2+T-2 (ppb)
Belinda	tartutus, ei torjuntaa	417	160	577
Belinda	tartutus, torjunta	487	173	660
	erotus	-70	-13	-83
Julius	tartutus, ei torjuntaa	567	253	820
Julius	tartutus, torjunta	343	137	480
	erotus	224	116	340
Viviana	tartutus, ei torjuntaa	343	229	572
Viviana	tartutus, torjunta	514	233	747
	erotus	-171	-4	-175

Taulukko 16. Fungisidi-ruiskutuksen vaikutus T-2- ja HT-2- toksiinin muodostumiseen kauran satonäytteissä vuonna 2011.

lajike	käsittely	HT-2 (ppb)	T-2 (ppb)	HT-2+T-2 (ppb)	Suhde (HT2/T2)
Belinda	tartutus, ei torjuntaa	543	163	706	3.3
Belinda	tartutus, torjunta	527	147	674	3.6
	erotus	16	16	32	
Julius	tartutus, ei torjuntaa	513	187	700	2.7
Julius	tartutus, torjunta	287	116	403	2.5
	erotus	226	71	297	
Viviana	tartutus, ei torjuntaa	530	197	727	2.7
Viviana	tartutus, torjunta	263	119	382	2.2
	erotus	267	78	345	

OHRA: Vuonna 2010 ohralla fungisidikäsittely vaikutti eniten Saana- ja Scarlett-lajikkeiden HT-2- ja T-2-toksiinipitoisuuksiin. Saanalla ”tartutus, ei torjuntaa” -näytteiden HT-2+T-2-toksiinien keskiarvon summa oli 356 ppb ja ”tartutus, torjunta” -näytteillä 152 ppb (Taulukko 17). Samantyyppinen trendi havaittiin Scarlett-lajikkeella. Pienempi toksiinipitoisuusero havaittiin Tipple-lajikkeen näytteillä (148 ppb/192 ppb). Kun tuloksia verrattiin kauran vastaaviin näytteisiin, ohralla HT-2- ja T-2-toksiinien pitoisuudet olivat pienemmät (Taulukko 17 ja 18).

Vuonna 2011 hometartutettujen (tartutus, ei torjuntaa) näytteiden ja hometartutettujen sekä homeentorjunta-aineella ruiskutettujen (tartutus, torjunta) näytteiden välillä havaittiin suurempia eroja T-2- ja HT-2-toksiinipitoisuuksissa kasvustonäytteissä ohrasatonäytteisiin verrattuna (Taulukko 18 ja 19). Lajikkeista Tipplellä havaittiin suurin HT-2+T-2-pitoisuusero ”tartutus, ei torjuntaa” -kasvustonäytteiden ja ”tartutus, torjunta” -kasvustonäytteiden välillä (429 ppb/88 ppb) aikapisteessä 21d.

Taulukko 17. Fungisidi-ruiskutuksen vaikutus T-2- ja HT-2- toksiinin muodostumiseen ohran satonäytteissä vuonna 2010.

lajike	käsittely	HT-2 (ppb)	T-2 (ppb)	HT-2+T-2 (ppb)
Saana	tartutus, ei torjuntaa	233	123	356
Saana	tartutus, torjunta	126	25	152
	erotus	107	98	204
Scarlett	tartutus, ei torjuntaa	251	87	337
Scarlett	tartutus, torjunta	107	28	135
	erotus	144	59	202
Tipple	tartutus, ei torjuntaa	94	54	148
Tipple	tartutus, torjunta	115	77	192
	erotus	-21	-23	-44

Taulukko 18. Fungisidi-ruiskutuksen vaikutus T-2- ja HT-2- toksiinin muodostumiseen ohran kasvustonäytteissä (suurimmat pitoisuuserot) vuonna 2011.

lajike	käsittely	Aikapiste (d)	HT-2 (ppb)	T-2 (ppb)	HT-2 +T-2 (ppb)	Suhde (HT2/T2)
Saana	tartutus, ei torjuntaa	14	161	59	219	2.7
Saana	tartutus, torjunta	14	39	8	47	4.9
	erotus		122	51	172	
Scarlett	tartutus, ei torjuntaa	14	143	59	202	2.4
Scarlett	tartutus, torjunta	14	59	18	77	3.3
	erotus		84	41	125	
Tipple	tartutus, ei torjuntaa	21	289	141	429	2.0
Tipple	tartutus, torjunta	21	72	16	88	4.5
	erotus		217	125	341	

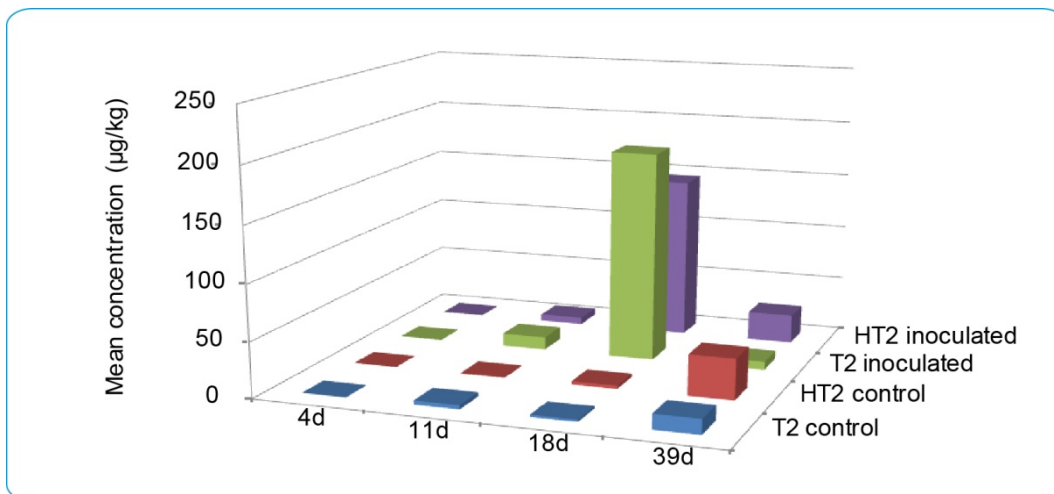
Taulukko 19. Fungisidi-ruiskutuksen vaikutus T-2- ja HT-2- toksiinin muodostumiseen ohran satonäytteissä vuonna 2011.

lajike	käsittely	HT-2 (ppb)	T-2 (ppb)	HT-2+T-2 (ppb)	Suhde (HT2/T2)
Saana	tartutus, ei torjuntaa	62	5	67	12.4
Saana	tartutus, torjunta	59	8	67	7.4
	erotus	3	-3	0	
Scarlett	tartutus, ei torjuntaa	50	4	54	12.5
Scarlett	tartutus, torjunta	26	2	28	13.0
	erotus	24	2	26	
Tipple	tartutus, ei torjuntaa	160	20	180	8.0
Tipple	tartutus, torjunta	61	7	68	8.7
	erotus	99	13	112	

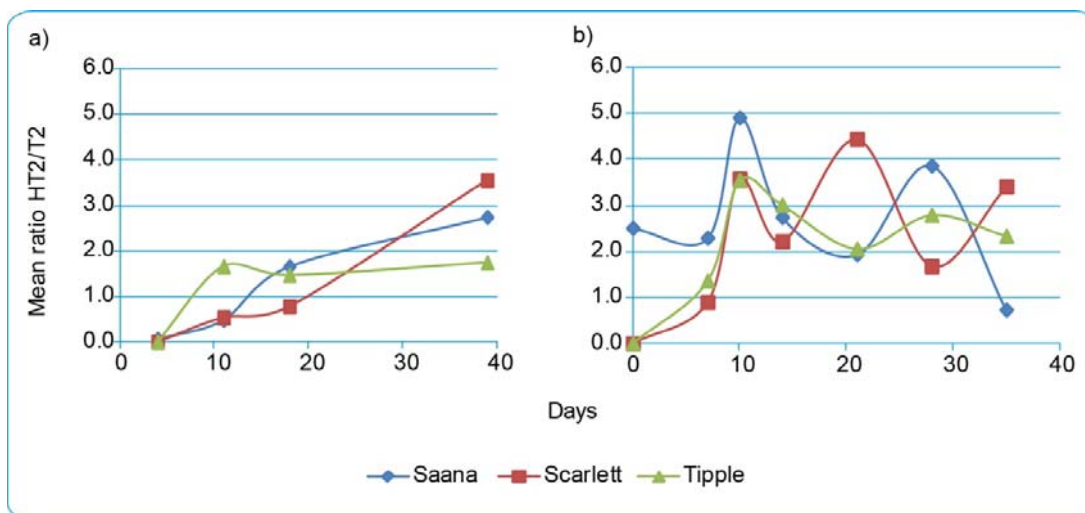
HT-2- ja T-2 –toksiinien muutokset kasvukauden aikana (ohra)

Saana-ohrassa havaittiin HT-2 ja T-2 –toksiineja jo ensimmäisessä kasvukauden aikaisessa näytepisteessä molempina tutkimusvuosina (2010: 4d, 2011: 0d). Scarlett- ja Tipple –lajikkeissa toksiineja havaittiin vasta myöhemmin (2010: 11d, 2011: 7d). Vuonna 2010 HT-2 –toksiinin määrä Saana-lajikkeessa kasvoi koko kasvukauden ajan, kun taas T-2 –toksiinin pitoisuuksissa havaittiin suurta vaihtelua. Kuten odotettua, tartutetuissa näytteissä oli poikkeuksetta suuremmat pitoisuudet HT-2 – ja T-2 –toksiineja. Suurimmat pitoisuudet havaittiin yleensä sadonkorjuun hetkellä, poikkeuksena Scarlett-lajike, jossa HT-2 –pitoisuus laski aikapisteiden 18d ja 39d välillä (Kuva 32).

Vuonna 2010 HT-2/T-2 –toksiinien suhde muuttui Saana-lajikkeella kasvukauden aikana 0,1:stä 2,7:ään. Scarlett ja Tipple –lajikkeilla suhdemuutos oli 0–3.5 ja 0–1.7. (Kuva 33a.). Vuonna 2011 toksiinien suhde muuttui Saanalla 2.5–4.9, Scarletilla 0–4.4 ja Tipplellä 0–3.5 (Kuva 33b). Vuonna 2010 toksiinipitoisuudet olivat, kuten odotettua, suuremmat infektoiduissa näytteissä, mutta vuonna 2011 ero ei ollut näin selkeä. Vuonna 2010 suurin HT2+T-2 pitoisuus oli Tipplessä (1080 µg/kg) ja vuonna 2011 Saanassa (1240 µg/kg). Kontrollinäytteissä suurimmat HT2+T2-pitoisuudet olivat vuonna 2010 Tipplessä (215 µg/kg) ja vuonna 2011 Scarlettissa (960 µg/kg).



Kuva 32. HT-2 – ja T-2 –toksiinien keskimääräiset pitoisuudet ohranäytteissä kasvukauden aikana Scarlett-lajikkeessa v. 2010.



Kuva 33. Keskimääräiset HT2/T2-suhteet infektoiduissa näytteissä kasvukauden aikana vuonna 2010 (a) ja vuonna 2011 (b).

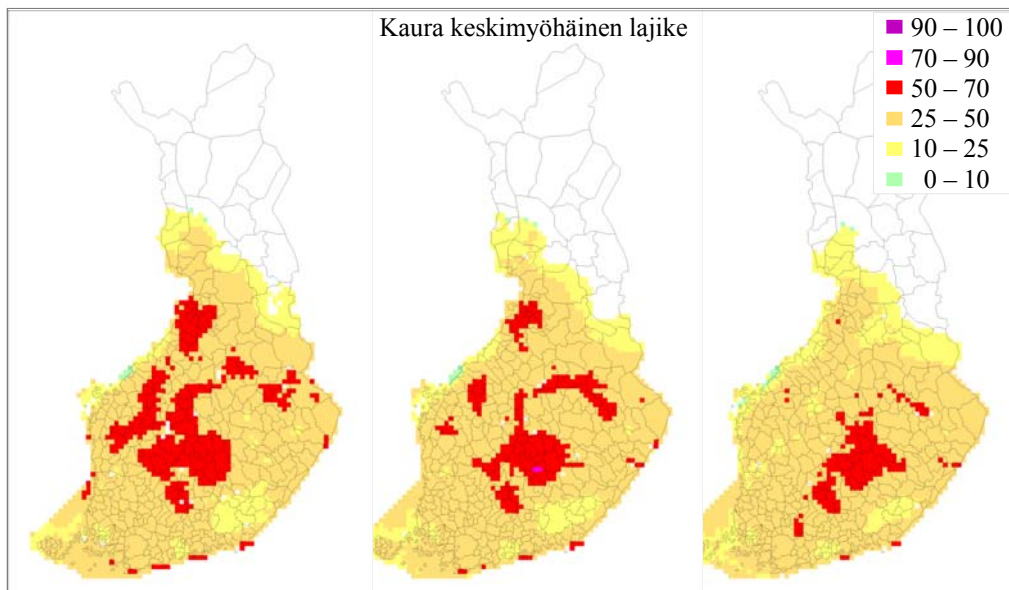
F. langsethiaen on todettu olevan yksi ensimmäisistä viljassa esiintyvistä *Fusarium*-lajeista heti kukinnan jälkeen ja se on saattanut tuottaa HT-2- ja T-2 –toksiineja jo ennen infektointia, mikä selittää positiiviset toksiinihavainnot jo ensimmäisissä aikapisteissä. Vuonna 2010 T-2 –toksiinia muodostui aluksi nopeammin kuin HT-2 –toksiinia, mutta Saana- ja Scarlett-lajikkeilla HT2/T2-suhde kasvoi kasvukauden edetessä. Tipple-lajikkeella HT-2 –pitoisuus oli suurempi kuin T-2-pitoisuus koko kasvukauden ajan. On esitetty, että home itse voisi metaboloida T-2 –toksiinia HT-2 –toksiiniksi. Vuonna 2011 HT2/T2-suhteet vaihtelivat enemmän kuin vuonna 2010, mikä johtunee useammasta havainnoidusta aikapisteestä.

3.3 Toksiinipitoisuuksien ennakointi ennustemallilla

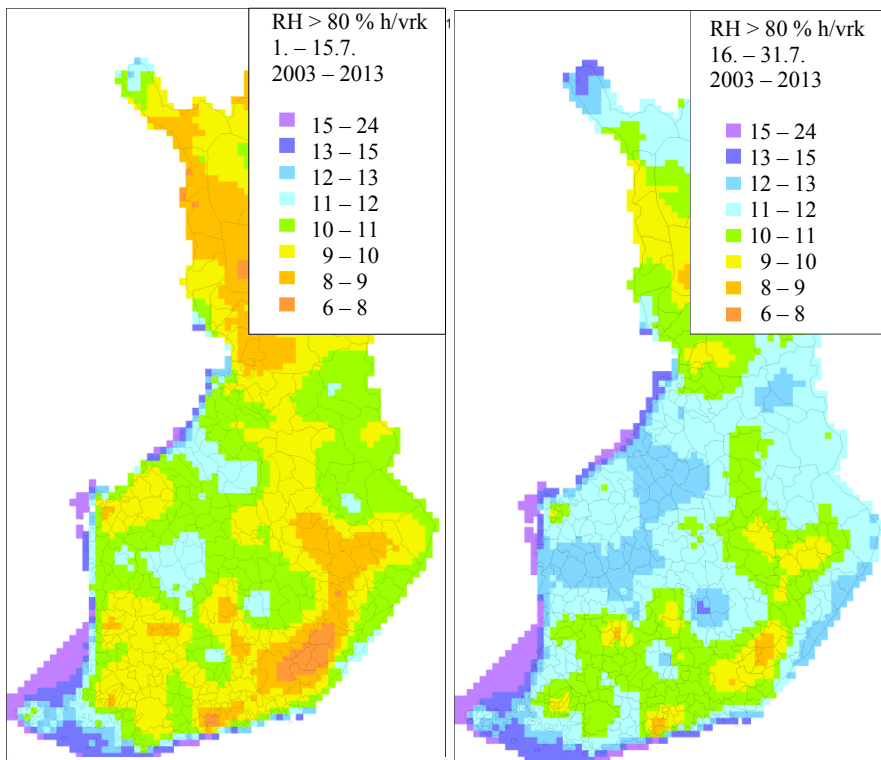
Deoksivalenolin esiintymisen riskimallia laskettiin kahdesti kesän aikana vuosina 2012 ja 2013. Vuonna 2012 DON-ennuste ei toiminut hyvin elokuun alussa ja lopussa. Syinä olivat ilmeisesti kasvustojen epätasainen kehitys, mutta myös puutteellinen havaintoaineisto. Vuoden 2012 korkeat DON-pitoisuudet toivat paljon uutta dataa ennusteen tekoon ja vuosina 2006 – 2012 kerätyn toksiinidatan tarkempi liittäminen säätietoihin vuoden 2013 ennustetta varten mahdollisti osuvamman ennusteen. Ensimmäinen laskenta elokuun alussa ei vielä osoittanut merkittäviä riskejä, mutta elokuun puolivälin jälkeen riskitasot olivat selvästi nousseet. Ennusteen pohjana olevaa havaintoaineistoa voidaan hyödyntää tarkemmin, kun vuotta 2006 edeltävän ajan hilamuotoinen säätieto on käytettävissä ja havaintoaineiston peltojen sijaintia on tarkennettu.

Kuvassa 34 esitetään ennustetulos syyskuun alussa 2013. Kuva 35 näyttää alueet, joilla yli 80 % suhteellisen kosteuden kesto on keskimäärin suurin viljan kukinnan aikaan ja sitä seuraavana parina viikkona. Kosteimpia alueita tähän aikaan ovat korkeat alueet Pohjanmaalla ja Keski-Suomessa. Kuivimpia ovat Etelä-Suomi ja Itä-Suomen järviolue. Toksiiniseurannan analyysi osoittaa, että käytettävissä olevista hila- lamuotoisista säämuuttujista parhaiten DON-riskiä ennustaa yli 80 % kosteuden kesto, ja korkeimmat toksiinipitoisuudet ovat yleisimpiä kuvan kosteilla alueilla.

Pitkäaikaisten seurantahavaintojen mukaan T-2 ja HT-2-toksiineja tuottavat *Fusarium*-homeet, joita havaitaan korjatussa sadossa, reagoivat selvästi positiivisesti lämpötilaan ja negatiivisesti kosteuden keston kukinnasta korjuuseen. Yhteys sään ja T-2 ja HT-2-toksiinien välillä on kuitenkin heikompi kuin DON-toksiinin kohdalla, joten T-2- ja HT-2-toksiineja on ainakin toistaiseksi vaikea ennustaa säätiedon avulla.



Kuva34. Esimerkki alueellisen ennusteen tuloksesta. Myöhäinen kaura 2013. Korkean DON-pitoisuuden (>400 ppb) riski %. Kuvat vasemmalta oikealle: kylvöaika 7 vrk alueen 2013 normaalia kylvöaikaa aikaisempi, normaali ja 7 vrk normaalia myöhäisempi kylvöaika.



Kuva 35. Kosteus säilyy kauemmin heinäkuussa viljan kukinnan ja sitä seuraavan parin viikon aikaan Pohjanmaalla ja Keski-Suomessa.

DON-ennusteen tarkkuutta voidaan parantaa lohko-kohtaisesti ja tehdä se käyttökelpoisemmaksi viljelijöille, jos huomioidaan viljelykierto, lajike ja tarkat kylvö- ja korjuuajat, jotka käytännössä täytyisi ottaa viljelysuunnitelmaohjelmasta. T-2- ja HT-2-toksiinien näennäisesti heikompi vaste sääille voi osittain johtua suuremmasta viljelymenetelmien vaikutuksesta. Näiden parempi tunteminen voi mahdollistaa toksiniriskin paikallisen ennustamisen.

3.4 Pikamenetelmien käyttökelpoisuus sadon laadunmäärityksessä

3.4.1 Pikatestit mykotoksiinien määrityksessä

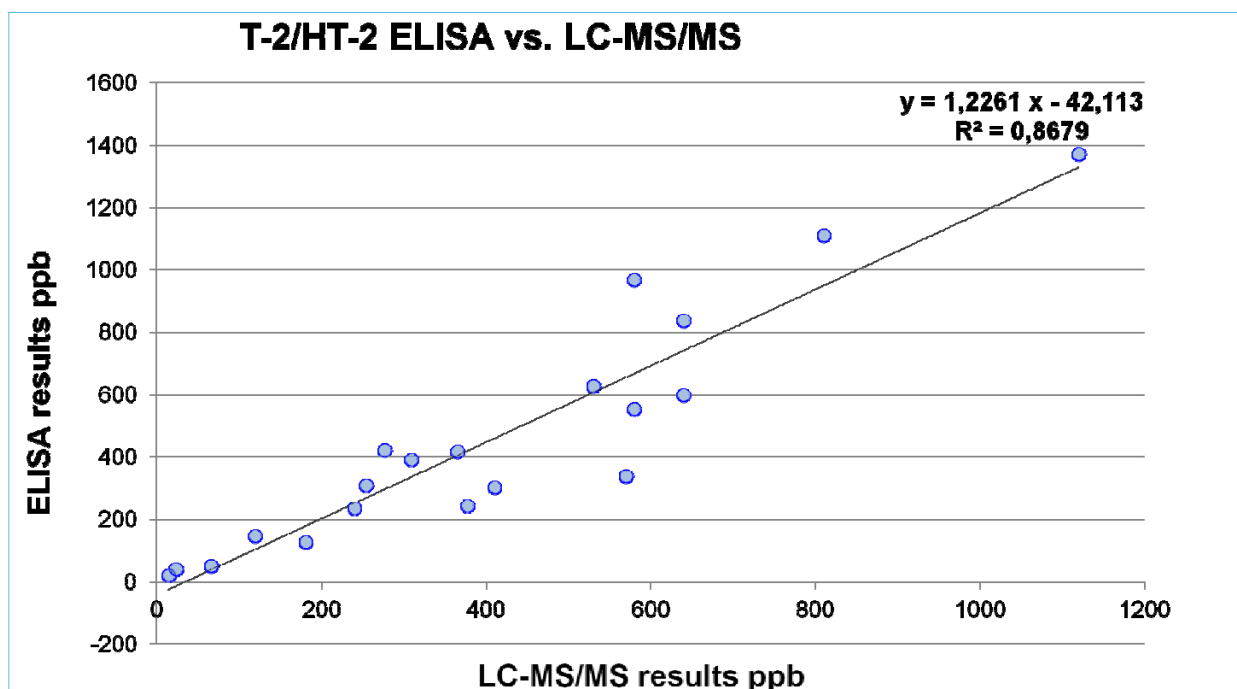
Hankkeessa testattiin pikatestin käyttökelpoisuutta viljanäytteiden T-2/HT-2 –pitoisuuden analysoimiseksi: onko testi helppokäyttöinen, esiintyykö matriisihäiriötä, mittaako se yhdisteiden summapiitoisuutta ja onko kalibraatioalue riittävä. Ensimmäiset analysoitavat näytteet olivat vehnä-, ohra- ja kauranäytteitä vuoden 2010 Turvallisuustietoseurannan näytteistä. Tuloksia verrattiin MTT:n GC-MS referenssimenetelmällä mitattuihin pitoisuuksiin (Taulukko 20). Testi toimi vehnä- ja ohra-äytteillä, kun T-2 ja HT-2 summapiitoisuus oli alle 100 µg/kg. Todettiin myös, että kauralle ja ohralle kannattaa tehdä matriisikalibraatiot; näytteeseen, jossa ei esiintynyt T-2/HT-2 –toksiinia, tehtiin standardilisäykset 25 – 250 µg/kg (ppb), jotka vastasivat kitin omaa kalibraatiota. Ohralla matriisihäiriö oli selkeä, mutta kauralla voitiin käyttää myös kitin omaa kalibraatiota.

Neogen Veratox T-2/HT-2 –testi näyttäisi toimivan hyvin, kun analysoidaan kitin kalibraatioalueella (25–250 µg/kg) olevia pitoisuuksia (kulmakerroin 1,2261) kauran sato-äytteistä (Kuva 36). Joissakin tapauksissa uutteen laimentaminen näytti kasvattavan pitoisuutta. Kannattaa huomioida, että kitin valmistaja ei ollut ohjeistanut uutteen laimentamista, jos korkein kalibraatiotaso ylittyy. Laimentamiseen olisi ehkä kannattanut käyttää T-2/HT-2 vapaata näyteuutetta 70 % metanolin sijaan. Toisaalta olisi kannattanut valmistaa kaikki kolme laimennosta niistä näyteuutteista, joissa laimentaminen katsottiin tarpeelliseksi.

Taulukko 20. Ruskealla pohjalla referenssimenetelmällä ja vihreällä ELISA-menetelmällä mitatut summapitoisuudet. Viereisissä sarakkeissa on alkuperäisen uutteen ja laimennosten mittaustulokset

MTT LIMS	lajike	Evira		Evira T2/HT2	MTT T2/HT2	Veratox:T2/HT2	1:1 laim.	1:3 laim.	1:7 laim.
		HT2 (ppb)	T2 (ppb)	LC-MS ppb	ELISA ppb	MTT ppb	MTT ppb	MTT ppb	MTT ppb
2012-235-1	Belinda	89	30	119	146	146			
2012-235-2	Viviana	<13	<15	14	21	21			
2012-235-3	Viviana	45	21	66	49	49			
2012-235-4	Viviana	15	<15	23	39	39			
2012-235-5	Belinda	300	110	410	303	314	303		
2012-235-6	Viviana	160	80	240	234	237	231		
2012-235-7	Viviana	280	97	377	243	247	240		
2012-235-8	Belinda	430	140	570	338	374	338		
2012-235-9	Viviana	93	88	181	127	127			
2012-235-10	Belinda	520	120	640	838	770		838	
2012-235-11	Belinda	450	130	580	966	1003			966
2012-235-12	Julius	240	69	309	391	447	391		
2012-235-13	Julius	210	67	277	421	411	421		
2012-235-14	Julius	190	64	254	307	304	307		
2012-235-15	Viviana	300	230	530	625	464	625		
2012-235-16	Viviana	290	75	365	417	355	417		
2012-235-17	Viviana	370	210	580	553	443	553		
2012-235-18	Belinda	500	140	640	598	608		1035	598
2012-235-19	Belinda	620	190	810	1109	569		1109	
2012-235-20	Belinda	980	140	1120	1371	712		1371	
MTT Referenssimateriaali: Multitoxin maize				640 (GC-MS)	1036	896	1098	1203	1036
2011-280-5	Belinda			30 (GC-MS)	39	39			

Neogen Veratox T-2/HT-2 on käyttökelpoinen vehnänäytteille sellaisenaan, mutta ohranäytteistä luotettavimmat tulokset saadaan matriisikalibraatiolla. Kitti soveltuu huonosti prosessoimattoman kauran analysointiin, mutta suoraan ihmisravinnoksi tarkoitetun kauran analysoimiseen sitä voidaan käyttää. Veratox Neogen T-2/HT-2 testi ei sovellu viljan kasvustonäytteille tai satonäytteille, jossa tuleentumattoman viljan osuus on suuri.



Kuva 36. T-2/HT-2 tulokset verrattuna LC-MS-MS tuloksiin

Hankkeen satonäytteiden lisäksi analysoitiin viisi kauran kasvustonäytettä. ELISA-menetelmällä mitatut tulokset olivat yli kaksi kertaa suuremmat kuin mitä MTT:n GC-MS menetelmällä oli mitattu. T-2 ja HT-2 toksiinien takaisinsaanto kaurasta on yleensä vähintään 80 % luokkaa, joten ero ei selity sillä. Kasvustonäytteet ovat satonäytteitä vihreämmät, mikä aiheuttaa ongelmia GC-MS analytiikassa ja tuloksena on pikemminkin todellista korkeampi kuin alhaisempi pitoisuus. ELISA-testin kaurauutteet olivat satonäytteiden uutteenä sameammat, joka saattoi vääristää tuloksia. Viime vuosina on lisäksi keskusteltu ns. kätkeytyistä mykotoksiineista (masked mykotoxin). On mahdollista, että kasvukauden aikana T-2 ja HT-2 toksiinit esiintyvät konjugoituneina muotoina, joita GC-MS tai LC-MS menetelmään ei ole sisällytetty, mutta reagoivat ELISA testin vasta-aineeseen kuten konjugoimattomat analyytit.

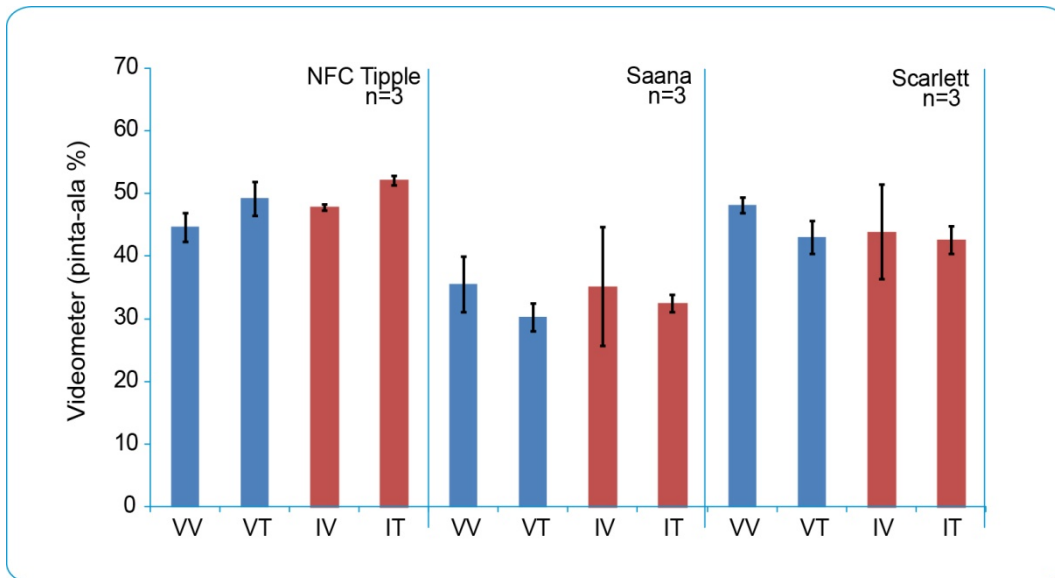
Tässä hankkeessa ei testattu DON:n analysoimiseen tarkoitettuja kuoppalevy- tai liuskatestianalyysijä. Näitä on tutkittu aikaisemmin Raision tutkimussäätiön rahoittaman Lajittelu- ja kuorinta –hankkeen yhteydessä. Vuonna 2012 viljateollisuus ja –kauppa ottivat käyttöön DON:n määrittämiseksi r-BioPharmin Rida Quick Scan –liuskatestin. Viljelijät epäilivät menetelmällä mitattujen kauranäytteiden DON-pitoisuuksia, joten MTT teki yhteistyötä menetelmän toimivuuden ja luotettavuuden osoittamiseksi Turun ammattikorkeakoulun kanssa. Marion Rauvolan analysoimat näytteet otettiin vuoden 2012 viljojen turvallisuustietoseurannan aineistosta, referenssimenetelmänä käytettiin MTT:n GC-MS-menetelmää.

3.4.2 NIR-tekniikka

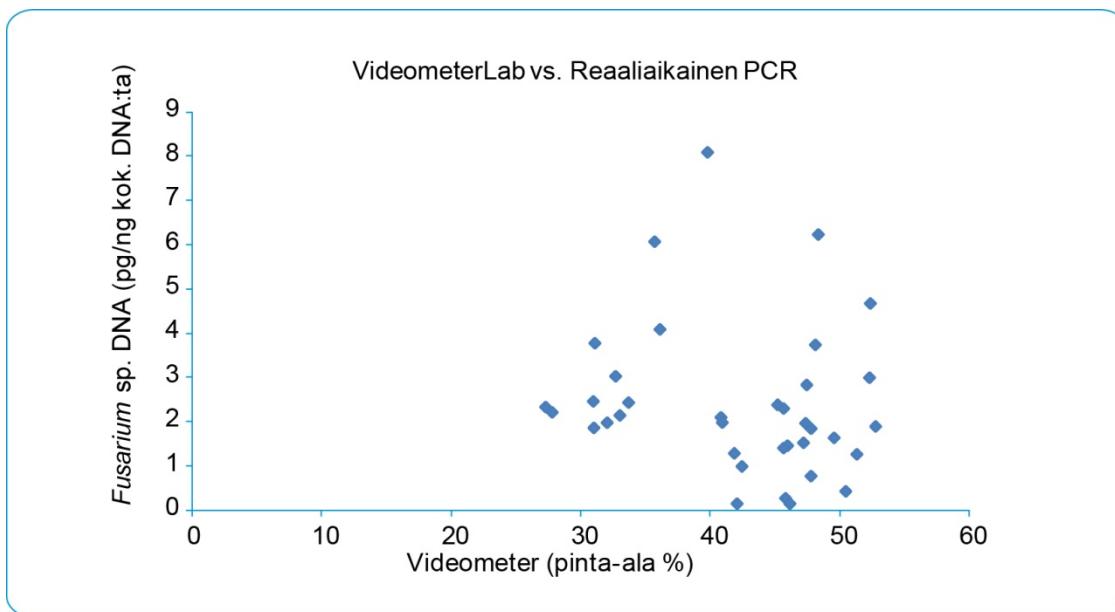
NIR -kalibraatioihin käytettävän aineiston heikkoutena oli DON -pitoisuuksien painottuminen kauralla 96 %:sti ja muilla viljoilla 90 %:sti elintarvikeraja-arvojen alapuolelle. Lisäksi 68 % aineiston DON -pitoisuuksista olivat alle 500 µg/kg. Jatkossa tavoitteena on laajentaa kalibraatioaineistoa pitoisuusalueelle 1000 - 3000 µg/kg riittävän kalibraatioalueen kattamiseksi ja kalibraatioiden testaamiseksi. Lisäaineistoa ei voida keinotekoisesti tuottaa esim. sekoittamalla kahta eri pitoisuusalueen näytettä keskenään, koska tällä tavoin homogeenisen näytteen saaminen on vaikeaa lisäen myös mittausepävarmuutta entisestään. NIR -mittausten keskihajonta oli nelinkertainen kemialliseen referenssimääritykseen verrattuna. Tähänastisten tulosten perusteella NIR -menetelmän kehitystyötä on tarkoituksenmukaista jatkaa, ja tavoitteena on lähitulevaisuudessa saada käyttöön nopea viljojen hometoksiinien skreenausmenetelmä kokojoille.

3.4.3 *Fusarium*-sienten osoittaminen monialaiseen kuvantamiseen perustuvalla VideometerLab-laitteella

Tässä tutkimuksessa selvitettiin myös kuvantamisen mahdollisuuksia *Fusarium*-sienten osoittamisessa. Videometer A/S on kehittänyt monialaiseen kuvantamiseen perustuvan laitteen, jonka tavoitteena oli mitata *Fusarium*-kontaminaation tasoa ohranjyvissä. Tämä tutkimus osoitti, ettei menetelmä ole vielä valmis ja ettei laite pystynyt erottamaan keinotekoisesti *Fusarium*-saastutettuja näytteitä vertailunäytteistä (kuva 37). Saadut tulokset eivät myöskään korreloineet viljelymenetelmällä tai reaaliaikaisella PCR-menetelmällä saatujen *Fusarium*-tulosten kanssa (kuva 38). Tutkimus osoitti, että eri ohralajikkeella saatua olla vaikutus tulokseen. Esimerkiksi Saana-ohrissa Videometer-laitteella saadut *Fusarium*-kontaminaatiotulokset olivat kaikki alhaisempia kuin Tipple- ja Scarlett-lajikkeilla. Eri ohralajikkeiden pigmentti- ja muiden ominaisuuksien eroja ei sovelluksen kehittämisvaiheessa välttämättä ole huomioitu. Valmistaja on optimoinut menetelmän pääosin keskieuropalaisilla ohranäytteillä. *Fusarium*-sienten lajien esiintyvyyksissä on kuitenkin suuria maantieteellisiä eroja (Parry ym. 1995, Starkey ym. 2007). Lisäksi eri lajit ovat pigmentiltään erilaisia ja niiden toimintaa voi olla haastavaa havaita kuvantamisen avulla.



Kuva 37. *Fusarium*-sienten määrä puiduissa ohranäytteissä vuonna 2010 VideometerLab-laitteella määritettynä. (VV= vertailuohra, VT= torjuttu vertailuohra, IV= *F. sporotrichioides*-homeella tartutettu ohra, IT= *F. sporotrichioides*-homeella tartutettu ja torjuttu ohra)



Kuva 38. *Fusarium*-sienten määrä puiduissa ohranäytteissä (sato 2010) VideometerLab-laitteella ja reaaliaikaisella PCR-menetelmällä määritettynä.

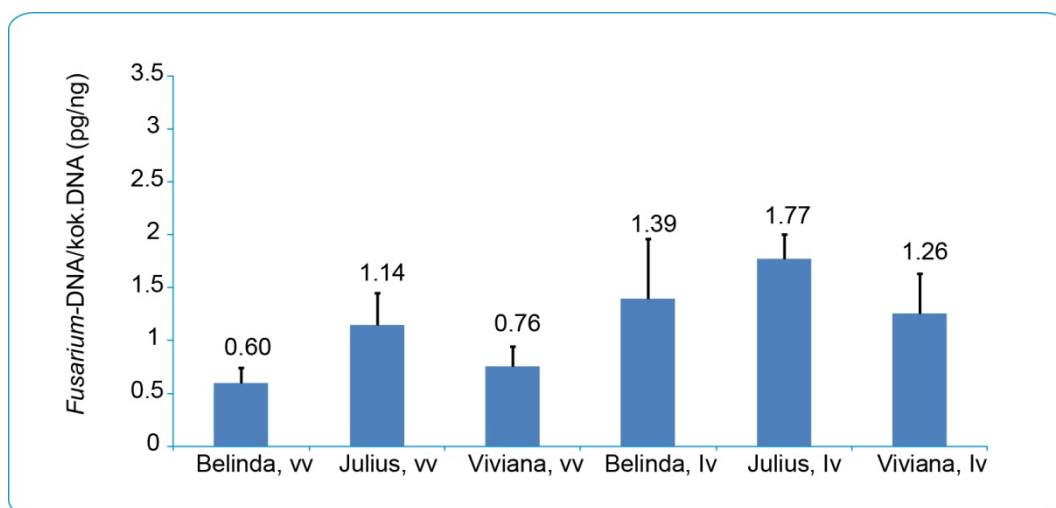
Laitevalmistaja (Videometer A/S) on kerännyt informaatiota eri käyttäjien projekteista. He ovat päivittäneet *Fusarium*-sienten osoittamiseen suunniteltua sovellustaan. Heidän mukaansa vanha sovellus osoitti näytteistä punapigmentoivia *Fusarium*-lajeja. Yhtiö huomasi, että tietyt pinnan muutokset jyvissä (esimerkiksi kosteus jyvän pinnalla) saattoivat johtaa väärin positiivisiin tuloksiin. SAFECEREAL-projektin mittaukset suoritettiin vielä vanhalla sovelluksella. Valmistajan mukaan uudella sovelluksella voitaisiin osoittaa punahomeet ja harmaat homeet erikseen. VTT keräsi eurooppalaisia eriasteisesti *Fusarium*-sienillä kontaminoituneita ohranjyviä ja lähetti niitä Videometer A/S -yhtiölle analysoitavaksi. Uudella sovelluksella mitattuja analyysituloksia verrattiin VTT:llä reaaliaikaisella PCR:llä mitattuihin *Fusarium* sp. DNA -pitoisuuksiin, ja havaittiin, että tulokset eivät korreloineet keskenään.

Kvantamiseen perustuvissa *Fusarium*-osoitusmenetelmissä nähdään paljon kehitysmahdollisuuksia. Esimerkiksi VideometerLab-laitteen etu on mittaussnopeus ja kustannustehokkuus, yhden näytteen analysointi kestää ainoastaan muutaman minuutin. Menetelmät kuitenkin vaativat vielä huomattavaa kehitystyötä. Videometer A/S yhtiöllä on tällä hetkellä meneillään Aarhusin yliopiston ja Carlsbergin kanssa yhteinen nelivuotinen tutkimushanke, jonka tulosten pohjalta menetelmää edelleen kehitetään.

3.5 Reaaliaikaisen PCR menetelmän ja transkriptioprofiloinnin soveltuvuus kauranäytteille

SAFECEREAL-projektin budjettileikkauksen vuoksi tässä projektissa keskityttiin mykotoksiinisynteesin käynnistymiseen ohrassa. Kolmantena projektivuotena ehdittiin kuitenkin testata reaaliaikainen PCR-menetelmä sekä TRAC-koettimet valikoiduille kauranäytteille.

DNA-eristyskitti ja *Fusarium*-sienten reaaliaikainen PCR-menetelmä soveltuivat sellaisenaan kauranäytteille. Kuvassa 39 on esitetty vuoden 2011 valmiin sadon kauranäytteiden *Fusarium*-DNA -pitoisuudet. Kesän 2011 olosuhteet olivat epäsuotuisat *Fusarium*-sienten kasvulle. *Fusarium*-sienten kontaminaatiotasoa oli alhainen myös luontaisesti saastuneissa puiduissa kauranäytteissä (Kuva 39). *Fusarium*-DNA määrä oli kuitenkin selkeästi korkeampi sekä luontaisesti saastuneissa että keinotekoisesti saastutetuissa kaurissa kuin kesän 2011 puiduissa ohranäytteissä. *Fusarium*-DNA -määrä puiduissa ohranäytteissä oli keskimäärin 0,18 pg/ng (n=9, vaihteluväli 0,05–0,37 pg/ng) ja *F. sporotrichoides* saastutetuissa ohrissa 0,65 pg/ng (n=9, 0,35–1,07).



Kuva 39. *Fusarium*-DNA määrä puiduissa kauranäytteissä vuoden 2011 kenttäkokeessa. vv=vertailunäyte, lv=*F. sporotrichoides* sienellä infektoitu

Tässä projektissa testattiin myös TRAC-koettimien soveltuvuutta kauralle. Koettimet on alkujaan suunniteltu ohrasovelluksiin ja tällöin kauran genomia ei oltu otettu huomioon koettimien suunnittelussa. Koettimien spesifisyyden testaamiseksi tuotettiin mikrobeista vapaata olevaa kauran solukko- ja solukkoiljelmää. Tutkimus osoitti, että ohralle kehitetty menetelmä ei sellaisenaan sovi kauralle ja vaatii lisätutkimusta ja mahdollisesti uusien koettimien suunnittelua. Seuraavat *Fusarium*-spesifiset koettimet osoittautuivat toimiviksi myös kauramatriissa: EFAIA, Tri10, Tri7 ja Tri3. Seuraavat koettimet antoivat melko korkeaa taustatasoa, mutta olisivat mahdollisesti käyttökelpoisia: Tri5, Tri 11, Tri12, Tri14.

4 Tulosten tarkastelu

Alkuperäisessä hankesuunnitelmassa oli tavoitteena tutkia toksiinien, myös deoksinivalenolin (DON), muodostumisen käynnistymistä sekä kauralla että ohralla kehittyvässä kasvustossa. Kuitenkin suunnitelmia jouduttiin muuttamaan käytettävissä olleiden varojen mukaan. Siksi luovuttiin *F. graminearum*-tartutuksista sekä DON-muodostumisen analytiikasta ja keskityttiin T2/HT-2 -tuottajiin. Myös TRAC-analyysijä kentältä vähennettiin keskittymällä mielenkiintoisimpiin lajikkeisiin. Tutkimuksessa pääpaino oli ohralla, sillä sille oli olemassa toimiva TRAC-menetelmä. Tämä projekti osoitti, että ohralle suunnitellut koettimet eivät sellaisenaan sovellu kauran tutkimiseen, vaan kauran transkriptioprofilointitutkimus vaatii erillisen projektin.

Näytteiden keruu RNA-eristykseen ja niiden pakastus pelto-oloissa onnistui hyvin, ja eristyksissä RNA-saanto oli hyvä. Aineistossa analyysitulosten hajonta oli kuitenkin suuri saman käsittelyn eri kerranteiden välillä. Tätä hajontaa on vaikea pienentää, koska *Fusarium*-tartunta on yksittäisissä tähkylöissä ja jyvissä erilainen ja analysoitavan kasviaineksen määrä pieni.

Hankkeessa tehtiin uusia havaintoja *Fusarium*-tartunnasta ja sen kehityksestä sekä toksiinien esiintymisestä. Kehittyvästä kasvustosta on aikaisemmin määritetty *Fusarium*-lajistoa (Parikka ym. 2005), mutta toksiineja vasta valmistuvasta tai valmiista sadosta. Kasvukausien sääolot olivat erilaiset, mikä vaikutti *Fusarium*-lajiston esiintymiseen kasvuston eri kehitysvaiheissa. Lajeista *F. poae* viihtyy kuivassa (Henriksen. 1999) ja oli runsain lämpimänä ja kuivana kesänä 2010, erityisesti jyvänkehityksen alkuvaiheissa. *F. langsethiae* -lajin tartunta havaitaan sekä kauralla että ohralla jo aikaisessa kehitysvaiheessa (Parikka ym. 2005). Kuitenkaan lajia ei 2010 esiintynyt yleisesti toisin kuin 2011 ja 2012. Sekä *F. langsethiae* että tutkimuksessa kasvustojen tartutukseen käytetty *F. sporotrichioides* muodostavat samoja yhdisteitä (T-2, HT-2- toksiinit, neosolanioli, diasetyyliscirpenoli) (Thrane ym. 2004). Vuoden 2010 alhaisen *F. langsethiae*-tartunnan perusteella voi arvioida pääosan havaituista A-tyypin trikotekeeneista olleen *F. sporotrichioides*-lajin tuottamia.

Vuonna 2011 luonnollinen *F. langsethiae*-tartunta oli hyvin yleinen kehittyvässä ohran jyväsadossa, ja sen voisi arvioida siksi olleen myös pääasiallinen toksiinien tuottaja. *F. langsethiae* on tärkein T-2/HT-2 -tuottaja sekä Ruotsissa (Fredlund ym. 2010) että Norjassa (Hofgaard ym. 2010). Lajin yleistymistä voi pitää syynä T-2/HT-2 toksiinien runsaampaan esiintymiseen Pohjoismaissa (Pettersson ym. 2008). Hankkeessa ei varsinaisesti seurattu deoksinivalenolin muodostumista, mutta satonäytteistä toksiini määritettiin. Koealueilla ei esiintynyt voimakkaita *F. culmorum*- tai *F. graminearum*-tartuntoja huolimatta 2011 ja 2012 vallinneista sääoloista, jotka suosivat DON-toksiinin tuottajia.

Tarkasteltaessa oljessa ja sängessä esiintyneitä *Fusarium*-lajeja ja niiden talvehtimistä, havaittiin, että kuivan kesän 2010 jälkeen *F. culmorum* oli runsas oljessa ja sängessä. Laji myös talvehti hyvin oljessa. Se on voimakas kilpailija kasvinjätteessä ja säilyy siinä hyvin (Petitt ym. 2005). Se myöshyötyy lämpimyydestä ja kasvien kärsimä kuivuusstressi altistaa niitä juuristo- ja tyvitartunnoille. Kosteampina vuosina *F. culmorum*-tartunta oli vähäisempää oljessa ja sängessä. Erityisesti hyvin märkä kasvukausi 2012 vähensi tartuntaa, jota säilyi talven yli niukasti. Sen sijaan tilalle tuli jonkin verran kosteassa viihtyvää *F. graminearum*-lajia. A-tyypin trikotekeenen tuottajista *F. sporotrichioides* oli melko runsas oljessa ja sängessä ja myös säilyi varsin hyvin talven yli kasvinjätteessä. *F. langsethiae*-lajia ei juurikaan tavattu oljesta tai sängestä. Sen sijaan se tulee kasvustoon kylvösiemenessä ja voi löytyä myös nuorista oraista.

Projektissa sovellettiin uusia työkaluja *Fusarium*-aktiivisuuden ja haittayhdisteiden tuotonseurantaan. *Fusarium*-spesifisten koettimien avulla päästiin ensimmäistä kertaa seuraamaan aktiivisuuden ja kasvun kehittymistä kasvavassa ohrassa. Hankkeessa mukana ollut suomalainen VTT spinn-off -yritys PlexPress Oy on ollut mukana tutkimassa ja kehittämässä *Fusarium*-sientenaktiivisuuden ja toksiinisynteesin transkriptioprofilointia. PlexPress tarjoaa TRAC-menetelmään liittyvää konsultaatiota, analyysipalveluita ja ohjelmistoa. Spesifisten koettimien avulla on mahdollista monitoroida useiden *Fusarium*-sienten toimintaa ja toksiinisynteesiin liittyvän geenin ilmenemistä monimuotoisissa ekosysteemeissä, joissa on läsnä useita erilaisia mikrobiryhmiä.

Reaaliaikaisen PCR-menetelmän avulla päästiin ensimmäistä kertaa kvantitoimaan *Fusarium*-sienten määrää monimuotoisessa mikrobiyhteisössä, missä läsnä on myös useita muita sieniryhmiä. Homeiden osoittamista viljanäytteistä on haitannut kvantitatiivisen ja selektiivisen määritysmenetelmän puuttuminen. Perinteiset viljelymenetelmät ovat pääasiassa perustuneet menetelmään, jossa lasketaan *Fusarium*-sienillä kontaminoituneiden jyvien lukumäärä. Se ei kuitenkaan anna kuvaa *Fusarium*-sienten biomassan kokonaismäärästä näytteessä. Lisäksi helposti leviävät homelajit häiritsevät viljelypohjaisissa menetelmissä ja voivat antaa vääriä positiivisia tuloksia. Tämä tutkimus toi selkeästi esille *Fusarium*-aktiivisuuden kannalta kriittiset vaiheet pelto-olosuhteissa. Tutkimustiedon avulla on mahdollista suunnata ja kehittää estotoimenpiteitä toksiinintuotannon kannalta kriittisiin vaiheisiin.

Kasvukauden aikaisella torjunnalla ei voitu vähentää *F. langsethiae*-tartuntaa kehittyvissä jyvissä eikä vaikuttaa toksiinimääriin sadossa. Peittäus ei vaikuta juurikaan itämistä pitemmälle ja vaikutusta *F. langsethiae*-tartuntaan sillä ei myöskään havaittu. Kasvukauden aikaiset käsittelyt tehtiin pian tähkälle/röyhylle tulon jälkeen, mikä saattoi olla ainakin kauralle liian aikainen ajankohta. Kuitenkin jo ennen kukintaa otetuissa näytteissä havaittiin *F. langsethiae*-tartuntaa, jopa T-2-toksiinia. Tutkimus vahvistaa siten jo aikaisemmin muualla tehdyn havainnon torjunnan heikosta vaikutuksesta T-2/HT-2 -tuottajiin (Klemsdal ym, 2009).

Toksiiniennusteen kehitystyötä jatkettiin aikaisemmin päättyneen EMTOX-hankkeen kokemusten pohjalta. DON-mallin rakentaminen alueelliseen riskinarviointiin onnistui, mutta viljelijäkohtaiseen sovellukseen työ ei vielä johtanut. T-2/HT-2 -ennustetta ei lähdetty rakentamaan, sillä siihen ei säämalli riitä. Pikatestien käyttö viljan laadunmääritykseen yleistyivät hankkeen aikana, erityisesti DON-määrityksissä. Siksi työtä painotettiin T-2/HT-2 -testin toimintaan ja erillisessä hankkeessa tarkasteltiin DON-pikatestin luotettavuutta. NIR-menetelmän arviointi jäi hankkeessa kesken, koska sopivaa kalibrointiaineistoa ei ollut riittävästi saatavissa. Työ jatkuu muissa hankkeissa edelleen. Videometer-laitteen testaus osoitti, että laitteen antamat arvot ja qPCR-tulokset eivät ole vertailukelpoisia, koska Videometer mittaa myös muita kuin homeiden aiheuttamia värinmuutoksia jyvissä.

Kahden viimeisen vuoden aikana viljan vastaanotossa on yhä enemmän määritetty pikamenetelmillä viljojen DON -toksiinipitoisuuksia. Viljan käytön ohjauksessa tulee olemaan yhä kasvava tarve luotettaville, helppokäyttöisille ja nopeille pikamenetelmille. Tässä tutkimuksessa selvitettiin potentiaalisten pikamenetelmien soveltuvuus ja luotettavuus viljojen hometoksiinimäärityksissä. Lisäksi testattiin DON -toksiinille NIR -menetelmän käyttökelpoisuutta. NIR -menetelmän etuina ovat mittaus kokojyvistä ilman jauhatusta ja kemiallista käsittelyä, nopeus ja mahdollisuus sekä DON- että T-2 ja HT-2 -toksiinien määrittämiseen. Menetelmän kehittäminen vaatii edelleen kalibraatioaineiston vahvistamista pitoisuusalueella 1 000 - 3 000 µg/kg.

Johtopäätöksiä

Tässä projektissa tutkittiin ensimmäistä kertaa *Fusarium*-geenien ilmenemistä kasvukauden aikana transkriptioprofilointimenetelmällä. Projekti toi uutta tietoa *Fusarium*-sienten kasvusta ja mykotoksiinintuoton käynnistymisestä kasvukauden aikana. *Fusarium*-spesifisten koettimien avulla voidaan tutkia sienten toimintaa ja niiden aineenvaihduntaa monimuotoisissa ekosysteemeissä, joissa on läsnä useita erilaisia mikrobiryhmiä. *Fusarium*-torjunnalla ei juurikaan ole vaikutusta T-2/HT-2 -toksiinien esiintymiseen kasvustossa tai sadossa. Koska haitallisia *Fusarium*-lajeja säilyy hyvin kylvösiemenessä, peittäus on kuitenkin tarpeen hyvän kasvuston kehittymiseksi. Lisäksi toksiinintuottajia säilyy kasvukaudesta toiseen oljessa ja sängessä, viljelykierto ja muokkaus ovat tarpeen tartunnan minimoimiseksi.

Turvallisen viljantuotannon takaaminen vaatii tuotannon, teollisuuden, tutkimuksen, valvonnan ja tiedotuksen yhteistyötä sekä kansallisella että kansainvälisellä tasolla. Tutkimuksen tulokset tukevat viljan laatustrategian tavoitteita. Tuottamalla tietoa viljojen *Fusarium*-sienistä ja niiden toksiinintuotannosta hanke tukee viljelijöiden toimenpiteitä hyvälaatuisen viljasadon tuottamisessa. Riskinhallintaan ja ennakkointiin kehitetyillä työkaluilla voidaan vaikuttaa varhaiseen viljasadon riskien tunnistamiseen, viljan tuotannon kannattavuuteen ja viljelijöiden toimeentuloon. Sitä kautta turvataan myös puhtaan raaka-aineen saanti viljaa jalostavalle teollisuudelle, edistetään kuluttajien ja eläinten ruokaturvallisuutta ja hyvinvointia sekä vahvistetaan alan työllisyyttä. Elintarvikkeiden ja rehujen turvallisuus ja *Fusarium* toksiinit ovat EU:n painopistealueita, erityisesti T-2 ja HT-2 -toksiinien muodostumisesta halutaan lisää tietoa valmisteilla olevien raja-arvojen määrittelyn pohjaksi.

4.1 Kirjallisuusviitteet

- BRODAL, G. ELEN, O., HOFGAARD, I.S., AAMOT, H.U., KLEMSDAL, S.S. 2008. Strategies to reduce Fusarium and mycotoxin contamination in Norwegian cereals. *Journal of Plant pathology* 90 (3 suppl.): 63
- D'MELLO, F.J.P., MACDONALD, A.M.C., POSTEL, D., DIJKSMA, W.T.P., DUJARDIN, A. and PLACINTA, C.M. 2004. Pesticide use and Mycotoxin production in Fusarium and Aspergillus Phytopathogens. *European Journal of Plant pathology* 104:741–751.
- EDWARDS, S. 2007. Investigation of Fusarium mycotoxins in UK barley and oat production. HGCA Project Report. Home Grown Cereals Authority, London, UK:2007, 415, 72 pp
- EDWARDS, S.G., BARRIER-GUILLOT, B., CLASEN, P.E., HIETANIEMI, V. PETTERSSON, H. 2009. emerging issues of HT-2 and T-2 toxins in European cereal production. *World Mycotoxin Journal* 2: 173–179.
- ELEN, O. , HOFGAARD, I.S. BRODAL, G.,, AAMOT, H.U., JESTOI, M and KLEMSDAL, S. 2008. Effect of fungicide treatment in field trials on different Fusarium spp. and mycotoxins. *Journal of Plant Pathology*, 90(3suppl.): 72
- FRANZ, E., BOOIJ, K. and VAN DER FELS-KLERX, I. 2009. Prediction of Deoxynivalenol Content in Dutch Winter Wheat. *Journal of Food Protection* 72:2170–2177.
- FREDLUND, E, GIDLUND, A, PETTERSSON, H., OLSEN, M, BÖRJESSON, T. 2010. Real-time PCR detection of Fusarium species in Swedish oats and correlation to T-2 and HT-2 toxin contents. *World Mycotox J.* 3:77–88.
- HEINIÖ, R.-L., LIUKKONEN, K.-H., MYLLYMÄKI, O., PIHLAVA, J.-M., ADLERCREUZ, H., HEINONEN, S.-M., POUTANEN, K. 2008. Quantities of phenolic compounds and their impacts on the perceived flavour attributes of rye grain. *Journal of cereal science* 47, 3: 566–575. doi:10.1016/j.jcs.2007.06.018
- HENRIKSEN, B. 1999. Factors affecting Fusarium infection and mycotoxin contents in cereal grains [dissertation] 98 p. Agricultural University of Norway.
- HIETANIEMI, V., KONTTURI, M., RÄMÖ, S., EUROLA, M., KANGAS, A., NISKANEN, M., SAASTAMOINEN, M., 2004. Contents of trichothecenes in oats during official variety, organic cultivation and nitrogen fertilization trials in Finland. *Agricultural and Food Science*, 13:54–67.
- HIETANIEMI V. et al. 2008. Viljojen mykotoksiinit Suomessa. http://www.smts.fi/mpol2008/index_tiedostot/Esitelmat/es061.pdf
- HOFGAARD, I.S., AAMOT, H.U., KLEMSDAL, S.S., ELEN, O, JESTOI, M., BRODAL, G. 2010. Occurrence of Fusarium spp. and mycotoxins in Norwegian wheat and oats. *Bioforsk FOKUS*. 5(7):7 (abst).
- HOOVER, D.C., SCHAAFSTMA, A.W. ja TAMBURIC-ILINCIC, L., 2002. Using weather variables pre- and post heading to predict deoxynivalenol content in winter wheat. *Plant Dis*. 86, 611–619.
- KLEMSDAL, S.S., AAMOT, H.U., HOFGAARD, I.S., ELEN, O., BRODAL, G. 2009. T-2 and HT-2 toxin and some other *Fusarium* toxins in Norwegian cereals. 6th Fusarium Toxin Forum, 9–10. February 2009, Brussels, Belgium. Available at: http://www.micotossine.it/public/pag_868.pdf.
- KOKKONEN, M., JESTOI, M. 2009. A multi-compound LC-MS/MS method for the screening of mycotoxins in grains. *Food Analytical Methods* 2:128–140.
- KONTTURI, M., RANTANEN, O., HIETANIEMI, V., EUROLA, M., PIHLAVA, J.-M., KANGAS, A., NISKANEN, M., TUURI, H., ja SAASTAMOINEN, M. 2001. Suomalaisen kauran laatu. In: Kaurasta elinvoimaa. Maa- ja metsätalousministeriön rahoittamat kansallisen kauraohjelman tutkimushankkeet 1998 – 2000. p. 23–38.
- MATTILA, P., PIHLAVA, J.-M., HELLSTRÖM, J. 2005. Contents of phenolic acids, alkyl- and alkenylresorcinols, and avenanthramides in commercial grain products. *Journal of agricultural and food chemistry* 53: 8290–8295.
- MUSA, T.; HECKER, A., VOGELGSANG, S., FORRER, H.R. 2007. Forecasting of FHB and DON in winter wheat with FusaProg. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 37, 283–289.
- PARIKKA, P., HIETANIEMI, V., RÄMÖ, S. 2005. The effect of tillage on Fusarium infection and mycotoxins on barley and oats. In: The BCPC international congress Crop science & technology 2005 congress proceedings, volume 1, SECC, Glasgow, Scotland, UK, 31 Oct - 2 Nov 2005. Glasgow:BCPC. p. 423–428.
- PARIKKA, P., HIETANIEMI, V., RÄMÖ, S., JALLI, H. 2007. The effect of cultivation practices on Fusarium langsethiae infections of oats and barley. In: Edited by S. Vogelgsang, M. Jalli, G. Kovács, G. Vida. Proceedings of the COST SUSVAR Fusarium workshop : Fusarium 23 diseases in cereals –potential impact from sustainable cropping systems, 01-02 June 2007, Velence, Hungary. Velence:COST. p. 15–18.
- PARIKKA, P., HIETANIEMI, V., RÄMÖ, S. 2007. Viljelymenetelmät ja punahomeet. In: Viljan punahomeet ja hometoksiinit : Tutkimushankkeen loppuseminaari Jokioisilla 28.11.2007 : Turvallisuusindikaattorien kehittäminen kotimaiselle viljaraaka-aineketjulle. Selvitys Fusarium-lajeista ja niiden tuottamista mykotoksiineista suomalaisessa viljassa. Jokioinen: MTT. p. 8–9.

- PARIKKA, P., HIETANIEMI, V., RÄMÖ, S., JALLI, H. 2008. Viljelytekniikan vaikutus viljan punahomeisiin ja toksiineihin. http://www.smts.fi/mpol2008/index_tiedostot/Esitelmat/es062.pdf
- PARRY, D.W., JENKINSON, P. McLEOD, L. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals. *Plant Pathology* 44: 207–238.
- PELTONEN, S., HIETANIEMI, V., RÄMÖ, S., KOIVISTO, T., PARIKKA, P. 2007. Punahomeet viljassa: Viljelytekniiset toimenpiteet hometoksiiniriskin pienentämiseksi. MMM Vilja-alan yhteistyöryhmä / Turvallisuustyöryhmä, Vammalan Kirjapaino Oy.
- PETTERSSON, H., BORJESSON, T., PERSSON, L., LEIRENIUS, C., BERG, G., GUSTAFSSON, G. 2008. T-2 and HT-2 toxins in oats grown in Northern Europe. *Cereal Res Comm.* 36B:591–592.
- PETITT, T., XU, X., PARRY, D. 2003. Association of *Fusarium* species in the wheat stem rot complex. *Eur J Plant Pathol.* 109:769–774.
- RAUTALA, T., HIETANIEMI, V., KOIVISTO, T., OVASKAINEN, M-L., SINKKO, H., KRONBERG-KIPPILÄ, C., HIRVONEN, T., LIUKKONEN, K-H., KARTIO, M. and HALLIKAINEN, A., 2008. *Fusarium*-toksiinit: saanti viljasta ja viljatuotteista aikuisilla Suomessa. *Eviran tutkimuksia 5/2008*, Multiprint Oy, Helsinki.
- RAUTALA, T., HIETANIEMI, V., KOIVISTO, T., OVASKAINEN, M-L., SINKKO, H., KRONBERG-KIPPILÄ, C., HIRVONEN, T., LIUKKONEN, K-H., KARTIO, M. and HALLIKAINEN, A., 2008. *Fusarium*-toksiinit: saanti viljasta ja viljatuotteista aikuisilla Suomessa. *Eviran tutkimuksia 5/2008*, Multiprint Oy, Helsinki.
- RAUTIO, J.J., HUUSKONEN, A., Vuokko, H., VIDGREN, V., LONDESBOROUGH, J. 2007. Monitoring yeast physiology during very high gravity wort fermentations by frequent analysis of gene expression. *Yeast.* 24:741–60.
- RAUTIO, J., KATAJA, K., SATOKARI, R., PENTTILÄ, M., SÖDERLUND, H., SALOHEIMO, M. 2006. Rapid and multiplexed transcript analysis of microbial cultures using capillary electrophoresis-detectable oligonucleotide probe pools. *J. Microbiol. Methods*, 65:404–416
- RAUTIO, J., LAITILA, A., WILHELMSON, A., KOKKONEN, M., JESTOI, M. & SATOKARI, R. 2007. Detection of *Fusarium trichothecene* biosynthesis using a novel transcript analysis method TRAC Proceedings of the 31st European Brewery Convention Congress. Venice, Italy, 6-10 May 2007. Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, 149: 1318–1322.
- RAUTIO J, SATOKARI R, VEHEMAAN-KREULA P, SERKKOLA E, SÖDERLUND H. 2008. TRAC in high-content gene expression analysis: applications in microbial population studies, process biotechnology and biomedical research. *Expert Rev. Mol Diagn.* 2008, 8(4), 379–385.
- RAUTIO, J.J., SMIT, B.A., WIEBE, M., PENTTILÄ, M., SALOHEIMO, M. 2006: Transcriptional monitoring of steady state and effects of anaerobic phases in chemostat cultures of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *BMC Genomics* 2006, 7:247.
- RÄMÖ, S., HIETANIEMI, V., PARIKKA, P. 2008. Viljan *Fusarium*-tartunta ja -toksiinit 2005–2006.
- RÄMÖ, S., HIETANIEMI, V., PARIKKA, P., HANKOMÄKI, J. 2008. Lajittelu ja kuorinta vähentävät viljojen hometoksiineja. *Maaseudun Tiede* 65, 3(13.10.2008): 16. <http://www.mtt.fi/maaseuduntiede/pdf/mtt-mt-v65n03s16a.pdf>
- SAASTAMOINEN, M., PIHLAVA, J-M., HIETANIEMI, V. 2001. Kauran laatuominaisuuksien jalostaminen – korkealaatuisten linjojen valinta. In: Kaurasta elinvoimaa. Maa- ja metsätalousministeriön rahoittamat kansallisen kauraohjelman tutkimushankkeet 1998 – 2000. p. 39–50.
- SARLIN, T.; YLI-MATTILA, T.; JESTOI, M.; RIZZO, A.; PAAVANEN-HUHTALA, S.; HAIKARA, A.. 2006. Real-time PCR for quantification of toxigenic *Fusarium* species in barley and malt . *European Journal of Plant Pathology*. Vol. 114 (2006) No: 4, 371–380
- SCHAAFSMA, A.W. and HOOKER, D.C. 2007. Climatic models to predict occurrence of *Fusarium* toxins in wheat and maize. *International Journal of Food microbiology* 119:116–125.
- SCHMIDT-HEYDT, M., PARRA, R., GEISEN, R., MAGAN, N. 2011. Modelling the relationship between environmental factors, transcriptional genes and deoxynivalenol mycotoxin production by strains of two *Fusarium* species. *J. R. Soc. Interface.* 8:117–126..
- STARKEY, D.E., WARD, T.J., AOKI, T., GALE, L.R., CORBY KISLER, H., GEISER, D.M., SUGA, H., TÓTH, B., VARGA, J., O'DONNELL, K. 2007. Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity. *Fungal Genetics and Biology* 44: 1191–1204.
- THRANE, U., ADLER, A., CLASEN, P.E., GALVANO, F., LANGSETH, W., LEW, H., LOGRIECO, A., NIELSEN, K.F., RITIENI, A. 2004. Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides*. *Int J Food Microbiol.* 95:257–266.
- VAN DER FELLS- KLERX, H.J., KANDHAI, M.C. and BOOIJ, C.J.H. 2007. A conceptual model for identification of emerging risks, applied to mycotoxins in wheat based supply chains. *World Mycotoxin Journal* 1:13-22.

Liite 1.

Taulukko 20. *Fusarium*-DNA (pg/ng kokonais-DNA:ta) puiduissa ohranäytteissä vuoden 2010–2012 saadoissa.

Näytteet	Infektio	Torjunta	2010 (n=3)		2011 (n=3)		2012 (n=4)	
			<i>Fusarium</i> -DNA	STDEV	<i>Fusarium</i> -DNA	STDEV	<i>Fusarium</i> -DNA	STDEV
NFC Tippale	-	-	0,28	0,07	0,34	0,04	1,40	1,26
Saana	-	-	1,96	1,81	0,09	0,04		
Scarlett	-	-	0,78	0,47	0,13	0,08		
NFC Tippale	-	+	4,68	1,37	0,37	0,16		
Saana	-	+	2,22	0,98	0,56	0,38		
Scarlett	-	+	2,11	1,18	0,21	0,09		
NFC Tippale	+	-	1,86	2,30	0,90	0,24	9,90	1,27
Saana	+	-	3,04	0,81	0,58	0,25		
Scarlett	+	-	0,44	2,87	0,47	0,10		
NFC Tippale	+	+	3,01	0,88	0,47	0,08		
Saana	+	+	1,87	0,29	0,47	0,24		
Scarlett	+	+	2,39	0,56	0,28	0,10		

MTT TEKEE TIETEESTÄ ELINVOIMAA

MTT RAPORTTI 153

www.mtt.fi/julkaisut

MTT Raportti -verkkojulkaisusarjassa julkaistaan maatalous- ja elintarviketutkimusta sekä maatalouden ympäristötutkimusta käsitteleviä tutkimusraportteja. Lukijoille tarjotaan tietoa MTT:n kaikilta tutkimusaloilta eli biologiasta, teknologiasta ja taloudesta.

MTT, 31600 Jokioinen.

