

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



Forord

Denne masteroppgaven ble gjennomført ved Bioforsk Plantehelse i Ås. Jeg er veldig takknemlig for at jeg fikk mulighet til å ta masteroppgaven min ved avdeling genetik og bioteknologi. Hele avdelingen fortjener en stor takk til svar på spørsmål og annen hjelp innimellom til masteroppgaven. Det har vært et spennende, og lærerikt år her hos dere som jeg ikke ville vært foruten. Jeg har stortrivdes!

Tusen takk til Yara for stipendet til masteroppgaven! Et flott tilbud som har kommet godt med!

Jeg vil få rette en stor takk til mine veiledere ved Bioforsk, Sonja S. Klemsdal og Erik Lysøe. Sonja: Tusen takk for all støtte og god hjelp med masteroppgaven. Din tålmodighet og evne til å bry deg om alle rundt deg er imponerende, og du har alltid tid til et spørsmål. Erik: Tusen takk for god hjelp i labarbeidet og skriveprosessen.

Videre vil jeg også rette en stor takk til min internveileder og hovedveilder ved UMB, Tor Lea. Tusen takk for gode tips til skrivearbeidet, og at du tok deg tid til å lese igjennom og gi tilbakemeldinger på skriftlige deler.

Jeg vil også rette en stor takk til Lise Bøe og Martha Tveit for god hjelp, støtte og motivasjon gjennom hele året. Det setter jeg stor pris på!

Min kjære samboer fortjener en stor takk, siden han har vært så tålmodig med meg gjennom hele året, og spesielt de siste hektiske månedene, og jeg må si det har vært deilig å komme hjem til nyvaskede klær og ryddig leilighet.

Mamma og pappa – dere fortjener også en stor takk for deres engasjement i studiene mine og den gode og trygge støtten fra dere gjennom hele masteroppgaven.

Ås, 15. august 2012

Christin Anstensrud

Sammendrag

Fusarium er en kompleks soppsekt med mange arter som angriper cerealer over hele verden. *Fusarium* kan gi aksfusariose i korn om er en sykdom der kornaksene angripes. Dette kan føre til dårlig kornkvalitet og betydelige avlingstap. Flere arter av *Fusarium* kan produsere mykotoksiner av ulik toksisitet. Disse kan gi negative helseeffekter hos både mennesker og dyr. For at mykotoksinproduksjon hos en *Fusarium*-art skal kunne skje, må alle genene i biosynteseveien for slike toksiner være uttrykt. Slike gener koder for bestemte enzymer som katalyserer viktige reaksjonstrinn i synteseveien til mykotoksiner. Det kan skje interaksjoner mellom *Fusarium*-arter som er tilstede samtidig, men det kan også skje interaksjoner mellom *Fusarium*-arter og den infiserte planten. Dette kan påvirke toksinproduksjonen hos en art, som en følge av endringer i genekspressjonen av gener som er involvert i synteseveien av disse mykotoksinene.

I denne masteroppgaven ble ekspresjonsanalyser av ulike gener som inngår i synteseveien til slike mykotoksiner utført. Dette var toksinrelaterte gener fra de fire *Fusarium*-artene; *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* og *F. langsethiae*. Det ble ekstrahert RNA fra *Fusarium*-infisert havre fra 10 og 14 dager etter inokulering (dpi). Havreprøvene som det ble ekstrahert RNA fra, var på forhånd sprayinokulert med kombinasjoner av *F. langsethiae* med hver av de tre andre artene, i tillegg til sprayinokuleringer med hver av de fire artene for seg. cDNA ble syntetisert fra RNA og brukt til videre ekspresjonsanalyser med "Real time quantitative polymerase chain reaction" (qPCR).

Resultatene fra genekspressionsanalysene indikerte at det for noen gener var forskjell mellom uttrykket på de to tidspunktene (10 og 14 dpi). I tillegg var genuttrykkene generelt noe forskjellig når en art var alene og i kombinasjon med en annen. Uttrykket av *Tri1* og *Tri16* der det var full dose av *F. langsethiae* alene 10 dpi var signifikant forskjellig fra *F. langsethiae* halv dose ved samme tidspunkt. Uttrykket av *Tri16* ved 14 dpi, der *F. langsethiae* vokste i kombinasjon med *F. avenaceum* og der *F. langsethiae* vokste i kombinasjon med *F. culmorum*, var signifikant forskjellig fra *F. langsethiae* (halv dose) 14 dpi. Uttrykket av *Esyn* der *F. avenaceum* var i kombinasjon med *F. langsethiae* 10 dpi var signifikant forskjellig fra *F. avenaceum* alene (halv dose).

Abstract

Fusarium is a complex fungi genus with a lot of species, attacking cereals all over the world. *Fusarium* can cause *Fusarium* head blight in cereals, a disease attacking ears in cereals, resulting in reduced cereal quality and important reduction in yield. Different species of *Fusarium* can produce mycotoxins of different toxicity, and can result in large negative impacts on human and animal health. All genes included in the biosynthesis for such mycotoxins must be expressed for mycotoxin production to be active by a *Fusarium* species. Such genes code for specific enzymes which catalyze important steps in biosynthesis to mycotoxins. Interactions between *Fusarium* species which are present at the same time may happen, but interactions between plant and *Fusarium* species may also happen.

In this master thesis gene expression studies from different genes active in the biosynthesis of mycotoxins have been done. This was toxin related genes from the four *Fusarium* species; *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* and *F. langsethiae*. RNA was extracted from *Fusarium* infected oats from 10 and 14 days post inoculation (dpi). Oat samples which RNA was extracted from, had earlier been spray inoculated by *F. langsethiae* in combination with each of the three other species. In addition spray inoculations of each of the other species were done straight. It was synthesized cDNA from RNA. This was used for further expression analyses by Real Time quantitative polymerase chain reaction (qPCR).

The results from the gene expression analyses indicated difference in expression between the two sample times (10 and 14 dpi) for some genes. Gene expressions were also often changed when two *Fusarium* species were together, compared to when the specific *Fusarium* specie was alone. The expressions of *Tri1* and *Tri16* when full dose rate of *F. langsethiae* alone at 10 dpi was significantly different from *F. langsethiae* half dose rate at the same time. Expression of *Tri16* at 14 dpi, where *F. langsethiae* grew in combination with *F. avenaceum*, and where *F. langsethiae* grew in combination with *F. culmorum*, were significantly different from *F. langsethiae* (half dose rate) 14 dpi. Expression of *Esyn* where *F. avenaceum* grew in combination with *F. langsethiae* 10 dpi was significantly different from *F. avenaceum* alone (half dose rate).

Innholdsfortegnelse

1.0	Introduksjon.....	6
1.1	<i>Fusarium</i> – en alvorlig soppsykdom i korn	6
1.2	Aksfusariose og livssyklusen til <i>Fusarium</i>	7
1.3	Taksonomi og fylogeni	10
1.4	<i>F. avenaceum</i>	11
1.5	<i>F. culmorum</i>	11
1.6	<i>F. graminearum</i>	11
1.7	<i>F. langsethiae</i>	12
1.8	Mykotoksiner	13
1.8.1	Trichothecener	13
1.8.2	Zearalenoner	17
1.8.3	Enniatiner, beauvericin og moniliformin.....	17
1.9	Samspill	19
1.10	<i>Fusarium</i> i havre	20
1.11	<i>Fusarium</i> og helseeffekter	22
1.12	Formål.....	24
2.0	Materialer.....	25
2.1	Prøvemateriale	25
2.2	Kjemikalier.....	26
2.3	Kit, buffere og mastermikser	27
2.4	Primere og prober	28
2.5	Laboratorie-instrumenter og generelt utstyr	30
2.6	Programvare.....	32
3.0	Metoder.....	33
3.1	Soppmateriale, produksjon av inokulum og veksthusforsøk.....	33
3.2	Genekspresjonsstudier av <i>Fusarium</i> -inifisert havre.....	34
3.2.1	Ekstraksjon av RNA, kvantifisering og optimalisering	34
3.2.2	cDNA-syntese.....	41
3.2.3	Primerdesign	44
3.2.4	Genekspresjonsstudier med qPCR	44
3.3	Data-analyser	47

4.0	Resultater	49
4.1	RNA ekstraksjon, kvantifisering og optimalisering	50
4.1.2	Test av DNA-kontaminering i RNA-prøvene	51
4.1.3	Beregning av RNA-konsentrasjon og RNA-volum	52
4.1.4	cDNA-syntese, kvalitetstest og rensing	52
4.1.5	Primerdesign og spesifisitet- og effektivitetstester	53
4.2	Genekspresjonsstudier ved qPCR og dataanalyser	59
5.0	Diskusjon	69
5.1	Veksthusforsøk	69
5.2	Optimalisering av RNA-ekstraksjon og genekspresjonsanalyser	70
5.2.1	RNA-ekstraksjon	70
5.2.2	cDNA-syntese	71
5.2.3	Primerdesign, -spesifisitet og -effektivitet	72
5.3	Genekspresjonsanalyser	73
5.3.1	Esyn – <i>F. avenaceum</i>	73
5.3.2	Tri1 – <i>F. culmorum</i> og <i>F. graminearum</i>	74
5.3.3	Tri1 og Tri16 – <i>F. langsethiae</i>	77
5.3.4	Dep5 – <i>F. langsethiae</i>	80
5.4	Konklusjon	82
5.5	Framtidige aspekter	83
6.0	Referanser	84

1.0 Introduksjon

1.1 *Fusarium* – en alvorlig soppsykdom i korn

Fusarium er en stor og kompleks soppsekt med en rekke arter (Richard et al. 2003). Soppen *Fusarium* er en av flere plantepatogener i korn, og anses som en av de viktigste (Parry et al. 1995). Flere *Fusarium*-arter er utbredt over hele verden, både i vestlige land og U-land. *Fusarium*-angrep skjer spesielt i hvete, bygg, havre, rug og triticale.

Fusarium-arter finnes for eksempel i jord, i underjordiske og grønne plantedeler, planteavfall og andre organiske substrater (Nelson et al. 1994). Det er vanlig at *Fusarium* forekommer i tropiske og tempererte regioner, men arter av denne soppen finnes også i tørre, klimatiske områder, slik som ørken, alpine områder og arktiske strøk (Nelson et al. 1994). Mange arter av *Fusarium* forekommer rikelig i fruktbar og dyrket jord, men også i utmarkjord, i motsetning til skogsjord, hvor de er forholdsvis uvanlige (Nelson et al. 1994).

Denne soppsekten er patogener som kan forårsake flere alvorlige sykdommer i cerealer, som for eksempel råte i roten og stengelen, i tillegg til aksfusariose. Det er under dyrkingen, og spesielt blomstringen, at cerealer kan angripes av *Fusarium* (Magan & Olsen 2004). I oversiktsartikkelen til Parry et al. (1995) er det blant annet beskrevet at infeksjon som skyldes *Fusarium*, er mest hyppig i varme og våte perioder. Ifølge mye av den dokumenterte litteraturen som beskriver epidemi av aksfusariose, kan det tyde på at regn har en viktig rolle i spredning av inokulum fra *Fusarium* og etablering av denne soppsekten (Parry et al. 1995). Også landbruksmessige faktorer kan virke inn på risikoen for soppvekst og mykotoksinproduksjon, som for eksempel dårlig høstpraksis og feil lagring (Wagacha & Muthomi 2008). I tillegg kan forhold som ikke er optimale under transport og bearbeiding virke inn (Wagacha & Muthomi 2008). Slike faktorer er ofte karakteristiske i afrikanske land, og av den grunn er risikoen for mykotoksiner i avlinger bekymringsfullt i disse landene (Wagacha & Muthomi 2008).

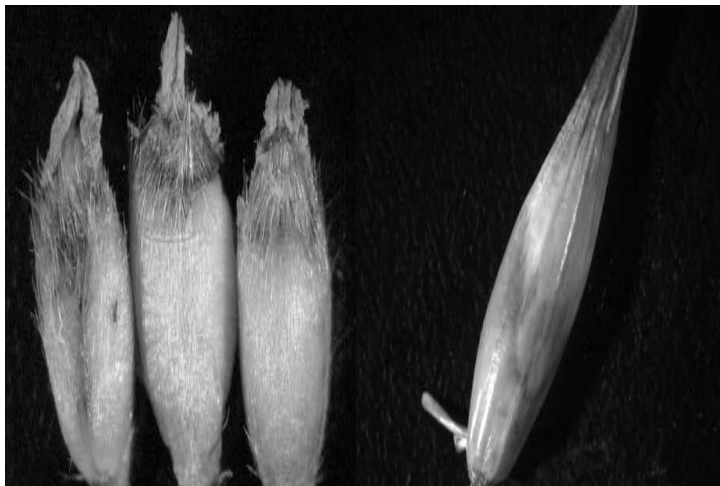
Fusarium kan fortsette å vokse dersom forholdene ligger til rette under lagring, for eksempel ved høy fuktighet og optimal temperatur i kornet (Richard et al. 2003). Som oftest krever *Fusarium*-arter en høy vannaktivitet (a_w), vanligvis over 0,90, for å kolonisere i kornet (Richard et al. 2003). Eksempler på *Fusarium*-arter som kan finnes i lagret korn, er *F. culmorum*, *F. graminearum* og *F. avenaceum*, men dette er avhengig av kornart (Richard et al. 2003). Studier gjort av Halstensen et al. (2006) viste at *F. avenaceum* var den dominante *Fusarium*-arten i kornstøv.

Mange *Fusarium*-arter har evne til å produsere mykotoksiner i korn (Sweeney & Dobson 1999). *Fusarium* kan medføre betydelige avlingstap, i tillegg til å redusere kornkvaliteten som høyt innhold av toksiner, lavere næringsverdi, misfarging og dårlig smak (Kosiak et al. 2003; Magan & Olsen 2004; Xu et al. 2005). Sykdommer forårsaket av *Fusarium* kan ødelegge en meget god kornavling bare i løpet av noen uker (McMullen et al. 1997). DON er et mykotoksin, nærmere bestemt et type B trichothecen (Li et al. 2011), og ifølge Kornguiden til Felleskjøpet, sesongen 2012/13, har det fra og med 2011/2012 blitt innført pristrekk i havre ved høye (DON)-verdier i Norge. Dersom korn inneholder høye toksinverdier, medfører dette begrensninger når det kommer til anvendelsesområder, samtidig som at kornet har en lavere verdi knyttet til kraftfôr (Felleskjøpet 2012).

1.2 Aksfusariose og livssyklusen til *Fusarium*

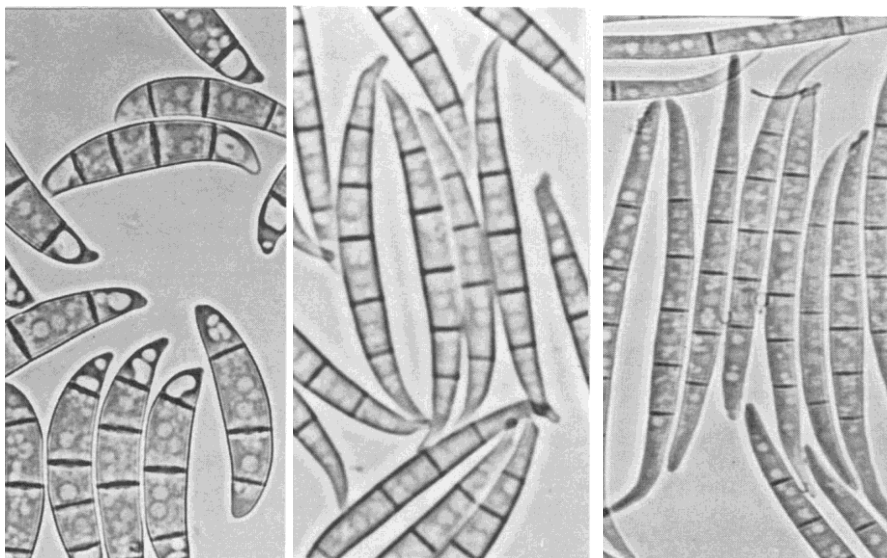
Som sammenfattet i oversiktsartikkelen til Parry et al. (1995), er aksfusariose (“*Fusarium* head blight”) en sykdom som angriper akset på kornplantene (tilsvarer risler i havre). Det er en ødeleggende sykdom i korn over hele verden. Blant de mest vanlige artene som forårsaker denne sykdommen er *F. avenaceum*, *F. culmorum* og *F. graminearum* (Bottalico & Perrone 2002). Mange av *Fusarium*-artene som kan forårsake aksfusariose, kan i tillegg forårsake spiringsfusariose og fotsjuka (Parry et al. 1995).

Ved *Fusarium*-smitte blir småaks vasstrukne, samtidig som de mister klorofyll og blir blekgule (Bottalico & Perrone 2002; Parry et al. 1995). Når været blir varmt og fuktig, starter veksten av rød-rosa mycel og konidier, og infeksjonen sprer seg (Bottalico & Perrone 2002). Nedbør i juli-måned har vist å øke *Fusarium*-angrep, og det er i denne måneden kornet blomstrer (Bernhoft et al. 2010). Korn/kjerner som er smittet av *Fusarium*, kjennetegnes ved at de skrumper og blir misfargede (hvite, rosa eller lys brune) som følge av mycelvekst (Bottalico & Perrone 2002). Havrekorn kan for eksempel bli råtne og nekrotiske etter angrep av *Fusarium* (figur 1).



Figur 1: Bildet viser råtne korn hos havresorten Belinda (til venstre) og visnet småaks (til høyre). Agner og områdene rundtpollenbærerne er misfargede. (Bjørnstad & Skinnes 2008)

Som Nelson et al. (1994) beskriver i sin oversiktsartikkel, er det tre typer sporer som *Fusarium*-arter kan produsere, og disse kalles makrokonidia, mikrokonidia og klamydosporer. Noen arter produserer alle disse tre sporene i motsetning til andre. Figur 2 viser eksempler på makrokonidier hos de tre *Fusarium*-artene; *F. culmorum* (a), *F. graminearum* (b) og *F. avenaceum* (c)



Figur 2: Makrokonidier hos tre *Fusarium*-arter.

a) *F. culmorum*

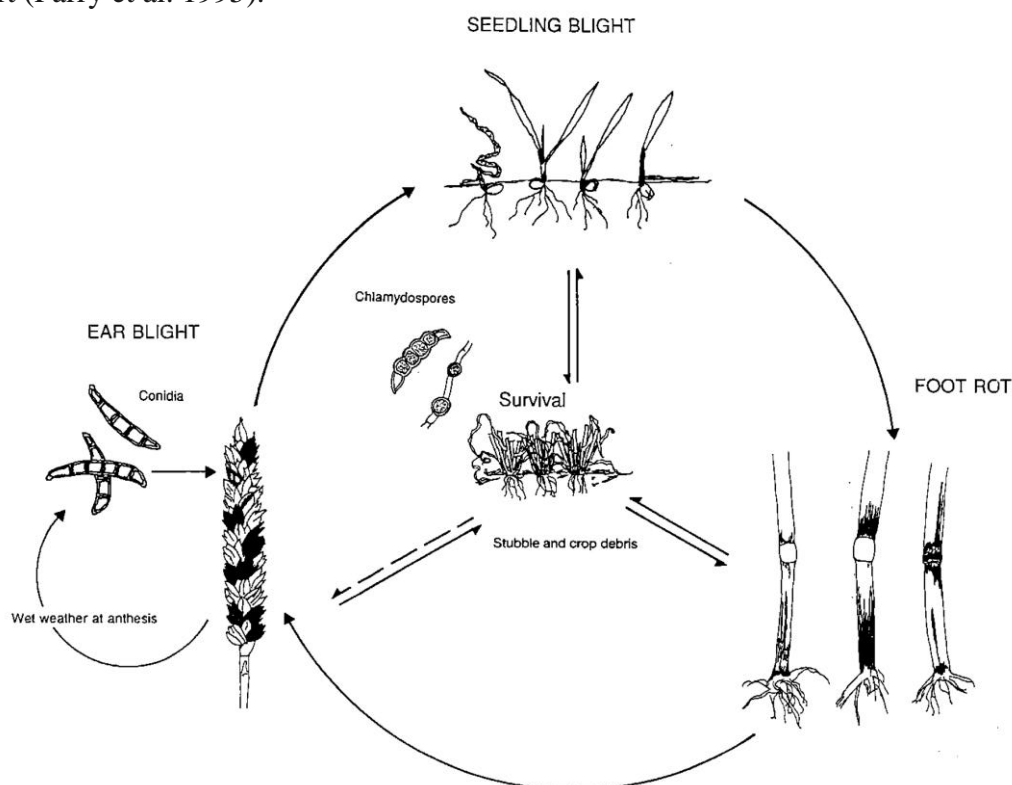
b) *F. graminearum*

c) *F. avenaceum*

(Nelson et al. 1994)

Sammenlignet med makrokonidia, produseres mikrokonidier bare i luftmycel og ikke i sporodochier ifølge oversiktsartikkelen til Nelson et al. 1994. Klamydosporer har tykke vegger og er fylt med et lipidliknende materiale som sørger for at soppen overlever i jorden over vinteren, dersom en egnet vert ikke er til stede (Nelson et al. 1994). Disse sporene kan forekomme som enkle, i par, i klaser eller i kjeder, og den ytre veggen kan være glatt eller grov (Nelson et al. 1994). Makrokonidier har lettere for å overleve i jorda, sammenlignet med mikrokonidier, noe som har betydning for en arts evne til overvintring (Wagacha et al. 2012).

En oversikt over sykdomssyklusen av *Fusarium* i små korn illustreres i figur 3. Parry et al. (1995) har i sin oversiktsartikkel beskrevet sykdomssyklusen til *Fusarium*. Den opprinnelige kilden av *Fusarium*-smitte i jord, som overlever i form av saprofyttisk mycel eller som klamydosporer (blant annet på stubb- og halmrester) har stor betydning i denne sykdomssyklusen. Dersom såkorn blir sådd i jord som er smittet med *Fusarium*, kan dette forårsake infeksjon i kornet og dermed utvikle sykdommene spiringsfusariose og fotsjuka i planten. Etter hvert som vekstsesongen forløper, kan kornet bli smittet av inokulum fra luften, vanligvis i form av konidier eller askosporer (kun for *F. graminearum*), og det er dette som kan føre til aksfusariose. Hvis korn som er smittet med *Fusarium* brukes til såkorn, kan dette være en sentral kilde til smitte som kan utvikle spiringsfusariose, og på denne måten er livssyklusen fullført (Parry et al. 1995).



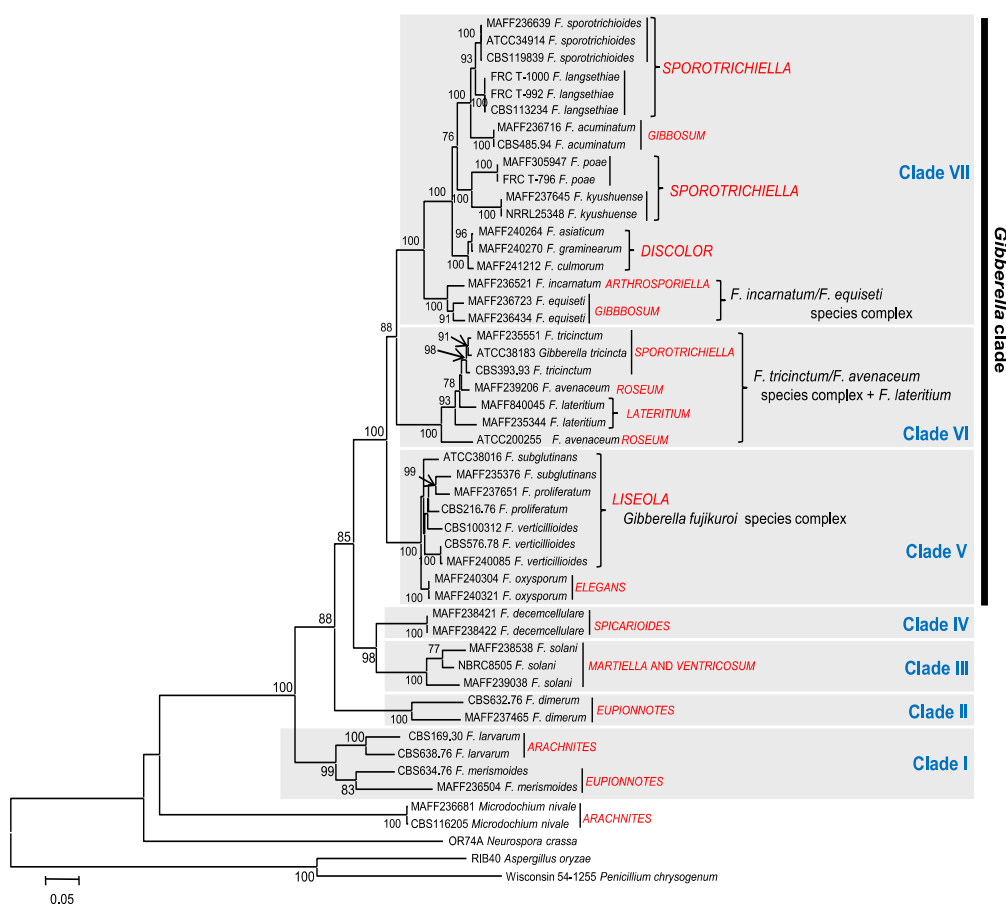
Figur 3: En generell oversikt over sykdomssyklusen av *Fusarium* hos korn (Parry et al. 1995)

1.3 Taksonomi og fylogeni

Det er vanskelig å lage et presist taksonomisystem for *Fusarium* (Watanabe et al. 2011). Som sammenfattet i oversiktsartikkelen til Nelson et al. (1994), varierer slekten *Fusarium* både i morfologiske og fysiologiske egenskaper mellom arter og innenfor en art.

Mange forskere har nylig benyttet seg av molekylære fylogenetiske analyser for å studere taksonomien til *Fusarium*-arter, og basert på fylogenetiske artsbegreper, har de foreslått nye taksonomiske systemer (Watanabe et al. 2011). Det er likevel få omfattende fylogenetiske analyser av *Fusarium*-slekten som har blitt gjennomført, og det er flere fylogenetiske relasjoner som forblir uklare (Watanabe et al. 2011). Fylogenetiske sammenligninger som hittil har blitt utført blant *Fusarium*-arter, indikerer likevel at det er et komplekst mønster når det gjelder utbredelsen og mangfoldet av mykotoksiner innenfor denne slekten (Desjardins 2006).

Watanabe et al. (2011) har blant annet konstruert et “maximum likelihood (ML)” -tre som indikerer at det finnes sju hovedklader i *Fusarium*-slekten (figur 4).



Figur 4: “Maximum likelihood tree” av *Fusarium*-slekten og relaterte slekter avledet fra de kombinerte sekvensene av rDNA “cluster”, β -*tub* og *EF- α* -gener (Watanabe et al. 2011).

Ifølge andre fylogenetiske trær utarbeidet av Watanabe et al. (2011), har artene i hver klade nære relasjoner til hverandre. De fleste *Fusarium*-artene som produserer trichothecener, er samlet i en “super” klade (figur 4), og det antas derfor at en felles stamfar har utviklet kapasiteten til å produsere trichothecener, og at dermed noen arter kan ha mistet denne egenskapen. Studiene til Watanabe et al. (2011) viste for øvrig at det er betraktelige forskjeller i evolusjonen til flere gener i slektslinjen til *Fusarium*, og fullstendige genomsekvenser av *Fusarium* er bare tilgjengelig for fire arter som tilhører *Gibberella*-kladen.

1.4 *F. avenaceum*

F. avenaceum hører innunder seksjonen Roseum (Benyon et al. 2000) og har blitt isolert fra korn i flere klimasoner (Parry et al. 1995). Denne *Fusarium*-arten produserer ikke klamydosporer (Desjardins 2006), men en blanding av mikro- og makrokonidier (figur 2). Sammenlignet med *F. culmorum* og *F. graminearum*, er *F. avenaceum* lite patogent (Kang et al. 2005). I motsetning til *F. culmorum* og *F. graminearum*, produserer ikke *F. avenaceum* mykotoksiner som hører inn under trichothecener eller zearalenon (Desjardins 2006).

1.5 *F. culmorum*

F. culmorum hører til seksjonen Discolour (Wagacha & Muthomi 2007). *F. culmorum* og *F. graminearum* er to nært beslektede arter (Miller et al. 1991). Det er i kaldere områder som Nord-Vest Europa og Sentral-Europa, at *F. culmorum* synes å dominere (Parry et al. 1995; Wagacha & Muthomi 2007). I motsetning til *F. graminearum*, er det ikke kjent at *F. culmorum* produserer askosporer, ifølge Wagacha et al. (2007). Denne *Fusarium*-arten produserer rikelig med makrokonidier (figur 2), men produserer ikke mikrokonidier (Desjardins 2006). Produksjonen av klamydosporer varierer hos *F. culmorum* (Desjardins 2006).

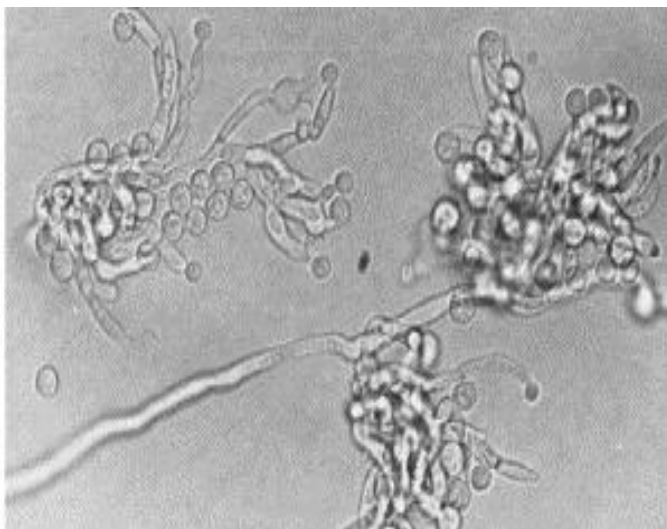
1.6 *F. graminearum*

Flere steder i verden er *F. graminearum* den største kilden til aksfusariose (Goswami & Kistler 2004). I likhet med *F. culmorum*, hører *F. graminearum* inn under seksjonen Discolour (Wagacha & Muthomi 2007). Den produserer makrokonidier (figur 2), men ikke mikrokonidier (Desjardins 2006). Klamydosporer hos *F. graminearum* er sjelden (Desjardins 2006). *F.*

graminearum kan overleve i planterester, og planterestene (som halm og halmstubb) fungerer derfor som en kilde for smitte til neste års avlinger (Richard et al. 2003). I hvete, bygg og havre er *F. graminearum* en vesentlig patogen (Richard et al. 2003). Kjennetegnet på infeksjon av *F. graminearum* i cerealer er rosa eller rødt mycel i kjernen (Richard et al. 2003). Denne *Fusarium*-arten er hovedprodusenten av trichothecenet DON i disse kornene (Richard et al. 2003). Ifølge resultatene i studiene til Proctor et al. (1995a), synes trichothecen-produksjon å bidra til virulens av *F. graminearum* hos noen cerealer, noe som kan bety at trichothecener spiller en rolle i patogenesen til *Fusarium*.

1.7 *F. langsethiae*

F. langsethiae er en *Fusarium*-art som ble identifisert for et drøyt tiår tilbake (Thrane et al. 2004; Torp & Langseth 1999). Denne arten hører til seksjonen *Sporotrichiella* (Yli-Mattila et al. 2004) Før den fikk navnet *F. langsethiae* ble den kalt “powdery *F. poae*”, siden morfologien lignet den hos *F. poae*, og utseende var pudderaktig (Torp & Langseth 1999). Ifølge studier gjort av Torp & Langseth (Torp & Langseth 1999) produserte isolater av *Fusarium*-arten mykotoksinene T-2, neosolaniol (NEOS) og andre T-2 relaterte metabolitter (Torp & Langseth 1999). *F. langsethiae* produserer bare mikrokonidier, men det er ikke kjent hvorvidt dette er grunnen til den svake patogenesen til *F. langsethiae* (Torp & Langseth 1999; Yli-Mattila 2010a). Denne *Fusarium*-arten produserer ikke klamydosporer (Torp & Langseth 1999). Figur 5 viser konidioforer hos *F. langsethiae*. I Skandinavia er *F. langsethiae* en viktig patogen i havre (Tamburic-Ilincic 2010).



Figur 5: Forgreinede konidioforer av *F. langsethiae* (Torp & Nirenberg 2004).

1.8 Mykotoksiner

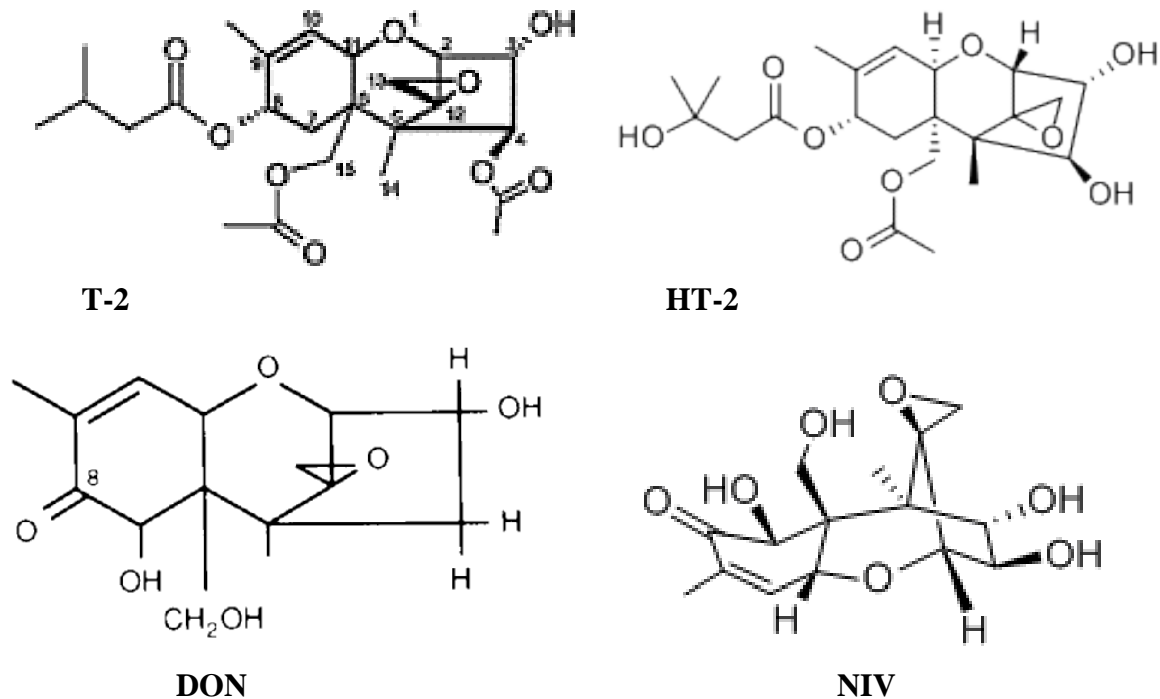
Bestemte *Fusarium*-arter kan produsere karakteristiske mykotoksiner, og ofte kan ulike arter produsere samme type mykotoksin. Mykotoksiner produsert av *Fusarium* har ulik grad av toksisitet. Mykotoksiner utgjør en global risiko for mattrygghet, og det er nødvendig å utvikle strategier som kan redusere mykotoksinproduksjon i matvarer, både før og etter høsting (Bryden 2007). Forekomst av mykotoksiner kan påvirkes av en rekke faktorer, og omfanget av kontamineringen av en spesifikk råvare med ett bestemt toksin varierer fra sted til sted, i tillegg til jordbrukspraksis, samt sårbarheten en råvare har overfor invasjon av sopp før høsting, under lagring, samt bearbeidingsperioder (Richard et al. 2003). Fung og Clark (2004) beskriver i sin oversiktsartikkel at toksinproduksjonen er generelt avhengig av næringsstoffer som er tilgjengelig for soppen, fuktighetsnivå, pH, temperatur, substrater og eventuelt bestemte gasser eller essensielle metaller. Av den grunn produseres det ikke mykotoksiner til enhver tid selv om den potensielt toksiske soppen er til stede.

1.8.1 Trichothecener

Trichothecener er den største gruppen av kjente mykotoksiner (Richard et al. 2003) og hører innunder en familie av “sesquiterpenoider”. Denne gruppen karakteriseres av at de har et 12-13-epoxy-trichothecen-skjelett og en binding med ulike kjemiske grupper i sidekjedene (Bennett & Klich 2003). Det er *Fusarium* som er mest kjent for å produsere disse selv om det også finnes andre produsenter av trichothecener (Richard et al. 2003).

Disse mykotoksinene kan deles inn i fire grupper; A, B, C og D (Li et al. 2011). I denne masteroppgaven er det bare gjort undersøkelser med type A og B. Videre omtale av type C og D trichothecener er derfor utelatt. Type A trichothecener omfatter hovedsakelig T-2, HT-2 og DAS, og disse har ikke en karbonylgruppe i C-8-posisjonen (Desjardins 2006; Li et al. 2011). *F. langsethiae* og *F. sporotrichioides* er eksempler på viktige produsenter av type A trichothecener og dermed disse tre toksinene (Placinta et al. 1999; Thrane et al. 2004). *F. poae* kan produsere DAS, mens bare noen stammer av denne *Fusarium*-arten er i stand til å produsere T-2 og HT-2 (Thrane et al. 2004). Type B trichothecener har derimot en karbonylgruppe i C-8-posisjonen, og problematiske trichothecener som hører til denne typen, er først og fremst DON og NIV. *F. culmorum* og *F. graminearum* er viktige produsenter av type B trichothecener og produserer

både DON og NIV (Desjardins 2006; Placinta et al. 1999) Figur 6 viser illustrasjoner av type A og B trichothecener.



Figur 6: Kjemiske strukturer av T-2-toksin og HT-2-toksin (type A trichothecener) og DON og NIV (type B trichothecener).

DON er et av de mest vanlige trichothecenene som finnes i korn. Dette toksinet omtales i noen tilfeller som vomitoksin (Richard et al. 2003). 3-acetyldeoxynivalenol (3-ADON) og 15-acetyldeoxynivalenol (15-ADON) er to acetylte former av DON som kan opptre sammen med DON, men ved mye lavere nivåer (Pestka 2010). Når det gjelder toksisiteten til disse to acetylte formene, er den enten tilsvarende som for DON eller lavere (Pestka 2010).

Biosynteseveier av type A og B trichothecener

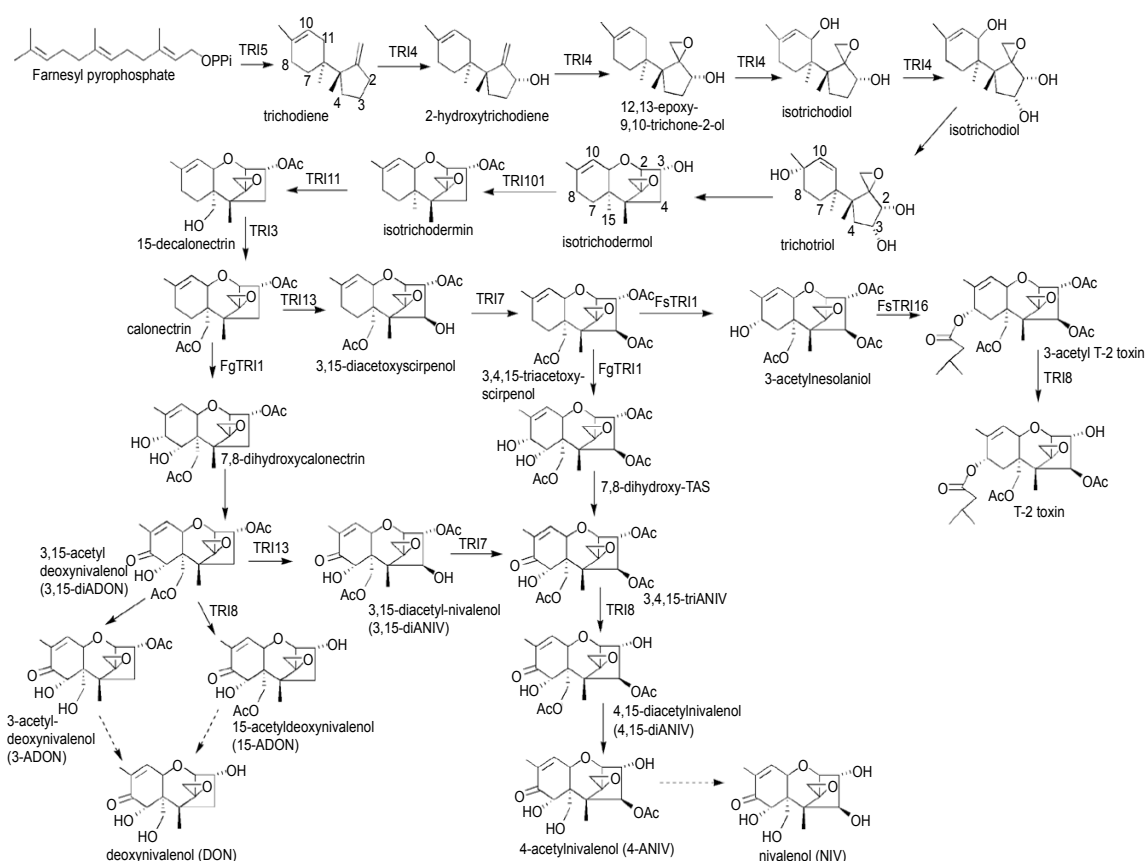
Biosynteseveien til trichothecenene er omfattende, og det er mange gener knyttet til dette ved at de koder for enzymer som inngår i denne synteseveien. Hvert bestemte trichothecen har sin bestemte syntesevei. Biosynteseveiene til T-2, HT-2, NIV og DON har flere av de samme intermediatene og mange av de samme reaksjonstrinnene (Alexander et al. 2009; Desjardins 2006). De fleste genene som koder for enzymer som inngår i denne biosynteseveien finnes samlet i ett lokus på genomet ("cluster") som kalles *TRI*. I tillegg finnes det to andre *Fusarium*-

lokus som koder for enzymer i trichothecen-synteseveien (Alexander et al. 2009). *Tri101* er det eneste biosyntetiske genet som inngår i det første lokuset og koder for acetyltransferase (Alexander et al. 2009; McCormick et al. 1999). Dette enzymet katalyserer esterifiseringen av acetyl til C-3 hydroksyl av trichothecenene. I dette trinnet reduseres faktisk toksisiteten av trichothecenene hos *Fusarium*, noe som trolig fungerer som en selv-beskyttende mekanisme hos *Fusarium*-arter som produserer trichothecener (Alexander et al. 2009). Det er to gener som inngår i det andre lokuset, det vil si *Tri1* og *Tri16* (Alexander et al. 2009). Uttrykket av gene på de tre ovennevnte lokusene koordineres til dels av to regulatoriske gener, *Tri6* og *Tri10*, som inngår i *TRI*-“clusteret” (Alexander et al. 2009; Peplow et al. 2003b; Tag et al. 2001). Nærmere bestemt er *Tri6* en transkripsjonsfaktor (Desjardins 2006; Proctor et al. 1995b). Dersom disse to gene inaktiveres, får dette konsekvenser ved at genekspressjonen av andre *Tri*-gener reduseres eller elimineres, noe som resulterer i blokkering av trichothecen-produksjon (Proctor et al. 1995b; Tag et al. 2001).

Første intermediat i trichothecen-biosynteseveien er farnesyl pyrofosfat (figur 7) (Desjardins 2006), og biosyntesen fortsetter videre gjennom trichodiene som er et hydrokarbon-intermediat (Desjardins 2006). Gjennom hele biosynteseveien foreligger det oksygeneringer, isomeriseringer, sykliseringer og esterifiseringer (Desjardins 2006). Biosynteseveien starter med en syklisering etterfulgt av åtte oksygeneringer og fire esterifiseringer (Desjardins 2006). Calonectrin er et intermediat lenger ned i synteseveien og fungerer hovedsakelig som et forgreiningspunkt (Desjardins 2006). Det innebærer at det er her resten av de spesifikke synteseveiene til type A og type B trichothecenene skiller lag (Desjardins 2006). Det er altså videre herfra at hver syntesevei blir mer spesifikk, og andre spesifikke gener inngår. Dette resulterer i ett bestemt trichothecen, enten T-2/HT-2, DON eller NIV (Alexander et al. 2009). *Tri13* er et gen som koder for et enzym som katalyserer oksygeneringen av C-4 (Desjardins 2006; Lee et al. 2002). Dette genet inngår i synteseveien til både T-2 og NIV (Desjardins 2006), men ikke i synteseveien til DON, der genet ikke er funksjonelt (Alexander et al. 2009; Brown et al. 2002; Lee et al. 2002). *Tri7* synes heller ikke å være funksjonelt for DON, men inngår i synteseveien til NIV og T-2 (Brown et al. 2001; Lee et al. 2002). Dette genet koder for et enzym som katalyserer acetyleringen av C-4-hydroksylgruppen (Desjardins 2006; Lee et al. 2002).

Tri1 inngår både i synteseveien til DON, NIV og T-2 (figur 7) og koder for P450 monooksygenase (Alexander et al. 2009; McCormick et al. 2006). *Tri1*-genet hos *F. culmorum* og *F. graminearum* og *Tri*-genet hos *F. langsethiae* er ortologer (Alexander et al. 2009; Brown et al. 2003). P450 monooksygenase er nødvendig for hydroksyleringen av C-7 og C-8 i synteseveien for produksjon av DON og NIV hos *F. culmorum* og *F. graminearum* (Alexander

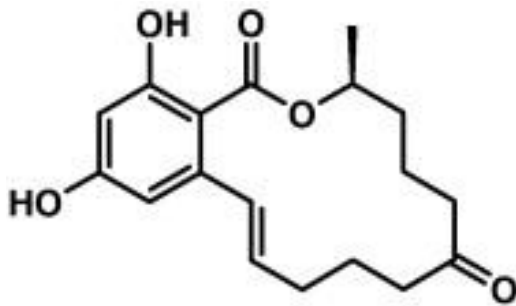
et al. 2009; McCormick et al. 2006). I synteseveien for produksjon av T-2/HT-2 kreves dette enzymet for hydroksyleringen av C-8, slik at 3,4,15-triacetoxyscirpenol blir til 3-acetylmesolaniol i synteseveien (Alexander et al. 2009; McCormick et al. 2006; Meek et al. 2003). *Tri16* inngår derimot bare i synteseveien til T-2/HT-2 (figur 7), siden det ikke er funksjonelt hos *F. graminearum* (Alexander et al. 2009; Brown et al. 2003). Genet koder for C-8 acyltransferase og er nødvendig for esterifiseringen av C-8 som kreves for T-2-produksjon (Peplow et al. 2003a). Ved siden av (nedstrøms for) *Tri1* ligger *Tri16* (Alexander et al. 2009; Brown et al. 2003; Peplow et al. 2003a). *Tri16*-genet koder for enzymet acyltransferase som katalyserer dannelsen av sidegrupper (i form av estere) på C-8, slik at 3-acetylmesolaniol blir til 3-acetyl T-2 toksin (Alexander et al. 2009; Peplow et al. 2003a). *Tri1* og *Tri16* er gener som altså har viktige oppgaver i biosynteseveien til T-2 toksin, ved at de begge har ansvar for bestemte sidegrupper på C-8 (Peplow et al. 2003a). Når *Tri16* er aktivt, medfører dette økt trichothecene-toksisitet (Peplow et al. 2003a).



Figur 7: Illustrasjon av biosyntesevei for type A og B trichothecener etter forslag fra Alexander et al. (2009). Figuren inkluderer blant annet genene *Tri1* og *Tri16*.

1.8.2 Zearalenoner

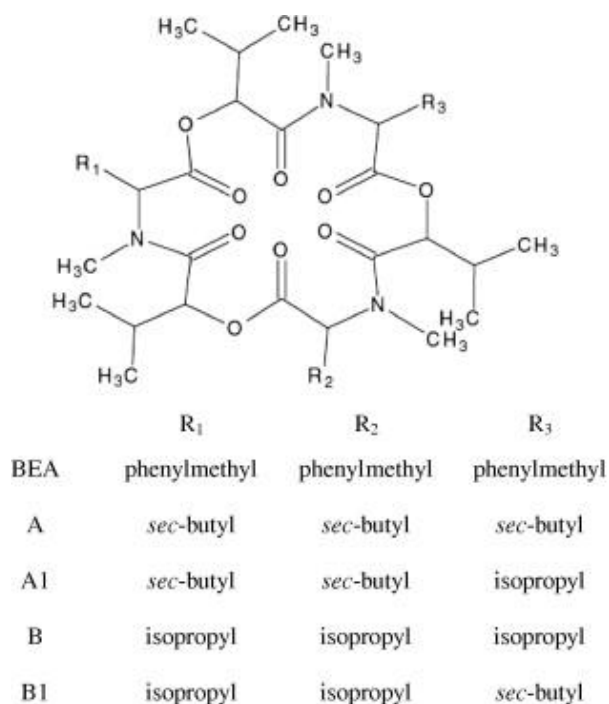
Zearalenoner (ZEN) er en annen type mykotoksiner (figur 8). Noen trichothecene-produserende *Fusarium*-arter kan også produsere denne, for eksempel *F. culmorum* og *F. graminearum* (Desjardins 2006; Placinta et al. 1999). ZEN forekommer ofte i form av fire hydroksoy-derivater (Placinta et al. 1999). Sammenlignet med konsentrasjonen av DON, er konsentrasjoner av ZEN i korn ofte lavere (Placinta et al. 1999).



Figur 8: Kjemisk struktur av zearalenon.

1.8.3 Enniatiner, beauvericin og moniliformin

Enniatiner er mykotoksiner som produseres blant annet av *F. avenaceum* (Desjardins 2006). Disse mykotoksinene er sykliske depsipeptider (figur 9) og har antibiotiske og fytotoksiske aktiviteter (Desjardins 2006; Jestoi 2008). Ifølge studier gjort av Hermann et al. (1996) på potetvev synes produksjonen av enniatin å bidra til virulens av *F. avenaceum*.



Figur 9: Kjemisk struktur av beauvericin og enniatiner av type A, A1, B og B1.

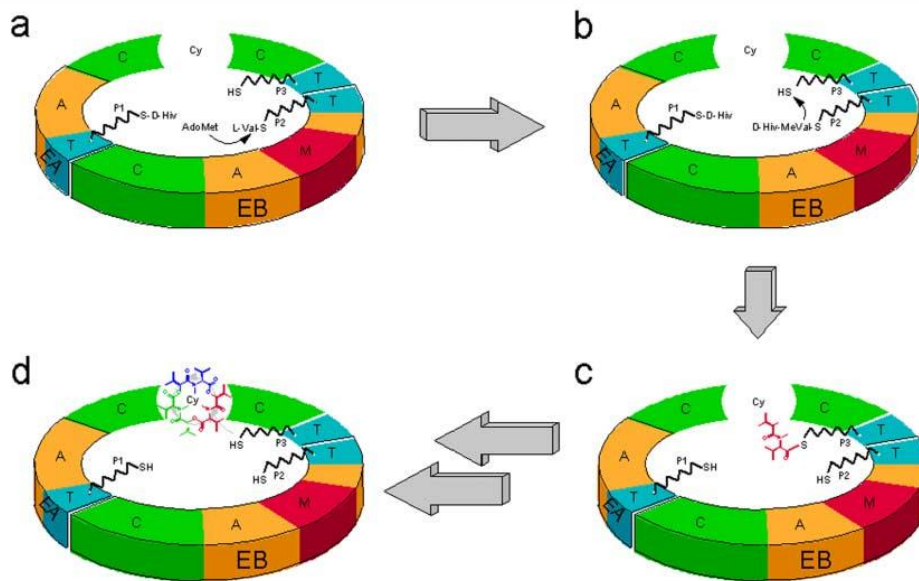
Beauvericin er, i likhet med enniatiner, sykliske heksadepsipeptider (figur 9) og produseres blant annet av *F. avenaceum* og *F. tricinctum* (Fernández-Ortuño et al. 2011; Jestoi 2008).

Moniliformin forekommer ofte som et natrium eller kalium salt og produseres blant annet av *F. avenaceum*, *F. proliferatum* og *F. subglutinans* (Desjardins 2006).

Biosyntesevei av enniatin

Esyn er et gen som koder for det multifunksjonelle enzymet enniatin syntetase som katalyserer biosyntesen av enniatin (Glinski et al. 2002). Dette enzymet kreves for den ikke-ribosomale dannelsen av disse mykotoksinene (Glinski et al. 2002). Enniatin syntetase er en monomer med en forlenget struktur (Glinski et al. 2002).

Ifølge studiene til Glinski et al. (2002) synes biosyntesen til enniatin å følge en intramolekylær reaksjonsmekanisme, der alle tre reaksjonssyklusene katalyseres av ett enkelt *Esyn*-molekyl for å gi et heksapeptidol som til slutt sykliseres på enzymet og gir enniatin (figur 10) (Glinski et al. 2002).



Figur 10: Mekanismer i biosynteseveien til enniatin ifølge Glinski et al. (2002). De grønne segmentene tilsvarer kondenseringsdomenene. Det er her katalysering av dannelsen av peptidbindinger skjer. De orange segmentene er adenyleringsdomenene som gjenkjenner og aktiverer korresponderende substrater. De blå segmentene tilsvarer tioleringsdomenene og katalyserer kovalent binding av substratet ved tioester-binding. I det røde segmentet er *N*-metyltransferase domenet (Glinski et al. 2002).

1.9 Samspill

Korn kan bli kontaminert av en rekke mykotoksiner som følge av at det kan oppstå interaksjoner mellom flere sopper som invaderer kornet (Richard et al. 2003). Ved andre arter tilstede kan dette påvirke både utviklingen og veksten av hver enkelt art (Aamot et al. 2010; Magan & Aldred 2007), samt toksinproduksjonen fra de ulike soppartene (Klemsdal et al. 2009). På den måten spiller samspillet mellom sopp en viktig rolle. Med hensyn til klima er temperatur og vannaktivitet de viktigste faktorene som har innvirkning på samspillet mellom ulike arter av *Fusarium*. I hvilken grad disse påvirker vekst og produksjon av toksiner hos hver art, avhenger av de ulike soppartene (Magan et al. 2003; Magan & Aldred 2007). Det har blitt publisert en rekke studier som viser at utviklingen av sopp og plantesykdom, er sterkt knyttet til konkurransen mellom ulike sopper. Studier gjort av Xu et al. (2007b) innebar undersøkelse av samspillet mellom fire *Fusarium*-arter; *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* og *F. poae* i hvete. Det ble gjort inokuleringer av hver art alene, men også inokuleringer der flere arter var

blandet i ulike kombinasjoner (to-tre arter). Resultatene i disse studiene viste at det kan være konkurranse mellom de ulike artene når de forekommer sammen. DNA-analyser viste kvantifiserbare mengder av patogen-DNA ved aksfusariose i nærmest alle prøvene der én sopp var inokulert alene. Ved analyse av prøver som var inokulert med flere arter, ble det derimot ofte observert tilstrekkelig DNA-mengde bare fra én av soppene. *F. graminearum* viste seg å være mest dominant blant de fire artene som var testet. Den skilte seg ut fra de andre ved at mengden sopp DNA var generelt det samme både når den vokste alene og sammen med de andre artene. Når det gjelder den totale akkumuleringen av mykotoksiner i ulike prøver, var denne i de fleste tilfeller betydelig større i prøver der flere sopper var inokulert, sammenlignet med inokulering av bare én sopp.

Konkurransedyktigheten av sopper som vokser i kombinasjon med hverandre, avhenger først og fremst av miljømessige faktorer (Von der Ohe & Miedaner 2011). Tilgjengeligheten av ulike næringsstoffer er også nødvendig for at *Fusarium*-arter skal kunne spire og vokse (Wagacha et al. 2012). Studier gjort av Beyer et al. (2004) viste at makrokonidia av *F. graminearum* spirte og vokste raskt dersom glukose og sukrose var tilgjengelig.

Det er også mange faktorer som kan virke inn på uttrykket av et gen i synteseveien til et mykotoksin, og dermed virke indirekte på mykotoksinproduksjonen hos en *Fusarium*-art. Studier gjort av Velluti et al. (2001) på strålebehandlet mais viste at både utviklingen av *Fusarium*-arter, samt mykotoksinproduksjonen påvirkes i ulik grad av faktorer knyttet til miljøet, for eksempel temperatur, vannaktivitet, men også interaksjoner sopper imellom.

1.10 *Fusarium* i havre

Fusarium-smitte og aksfusariose har i de nordiske landene blitt en alvorlig utfordring for havredyrking (figur 11) (Bjørnstad & Skinnnes 2008). Havre inneholder i disse landene mer mykotoksiner enn hvete og bygg (Yli-Mattila 2010b).

I norsk korn er det mellom de ulike regionene observert variasjon i utbredelsen av *Fusarium*-arter, men *F. avenaceum* synes å dominere over hele Norge, både i hvete, bygg og havre (Hofgaard et al. 2010; Kosiak et al. 2003). Studier gjort på norsk korn de senere årene har vist at det har skjedd en endring i utbredelse av *Fusarium*-arter i Norge i løpet av det siste tiåret (Hofgaard et al. 2010). På 1980-90-tallet syntes *F. avenaceum*, *F. poae*, *F. trincinctum* og *F. culmorum* å forekomme mest, men de siste årene har *F. graminearum* blitt mer vanlig her i

landet, og det er registrert økte konsentrasjoner av DON og 3-AcDON i norsk havre og vårhvete (Hofgaard et al. 2010). Videre har det blitt registrert en del HT-2 og T-2 i havre, og i Norge anses *F. langsethiae* som hovedprodusent av de sistnevnte toksinene (Hofgaard et al. 2010). Dette gjelder også i andre skandinaviske land og i Storbritannia (Edwards 2007; Nielsen, G. et al. 2010; Nielsen, L. et al. 2010).



Figur 11: *Fusarium*-smitte i havrerisler. Fotograf: Åsmund Langeland (Langeland 2010).

Havre er korn som er godt tilpasset et kaldere klima og er godt egnet til både mat og fôr (Bjørnstad & Skinnes 2008). I de nordiske landene er det rapportert om urovekkende nivåer av mykotoksinene DON, HT-2 og T-2 i havre (Bjørnstad & Skinnes 2008). Nordisk havre er svært utsatt for aksfusariose, men kan være vanskelig å vurdere i havre (Bjørnstad & Skinnes 2008). Det er først etter innhøstingen gjennom prosentandel av infiserte korn og toksindata at det er mulig å observere infeksjonen mer tydelig, men det er ikke alltid at disse to faktorene er i samsvar (Bjørnstad & Skinnes 2008).

Studier utført av Tekle et al. (2012) viste at blomstringsstadiet er det mest mottakelige stadiet for infeksjon av *F. graminearum* i havre. Under de tidlige stadiene av infeksjonsprosessen syntes pollenbærerne å være av betydning. Det ble i disse studiene observert at hyfer av *F. graminearum* vokste betraktelig mer på pollenbærerne enn på andre deler av blomstene i løpet av de første stadiene av infeksjonen. Dersom infeksjon av denne arten skjer ved blomstring, kan dette resultere i forråtnelse av korn eller infiserte kjerner med betydelig reduksjon i spiringsevne (figur 12), samt en økning i kontamineringen av mykotoksiner (Tekle et

al. 2012). På senere utviklingsstadier i havre syntes mottakeligheten for vellykket infeksjon å avta ifølge studiene til Tekle et al. (2012).



Figur 12: Infiserte havrekorn (sorten Hurdal), etter *Fusarium*-angrep (Bjørnstad et al. 2011).

1.11 *Fusarium* og helseeffekter

Det er viktig med diagnostikk og kontroll av *Fusarium* i avlinger med cerealer for å redusere risikoen for at toksinene kommer inn i maten. Mykotoksiner fra *Fusarium* kan føre til en rekke ulike sykdommer og andre helseproblemer hos både mennesker og dyr. *Fusarium*-infeksjoner hos mennesker har blitt rapportert fra store deler av verden (Nelson et al. 1994). Mykotoksikose er en betegnelse på sykdommer som er et resultat av eksponering av mykotoksiner, for eksempel gjennom mat og fôr. Det er vanlig at flere toksiner er involvert i mykotoksikose (Magan & Olsen 2004). Inntak av matvarer som er kontaminert med mykotoksiner, kan forårsake akutte og kroniske effekter (Fung & Clark 2004). Følsomheten overfor lavere nivåer av mykotoksiner som inntas gjennom mat, øker dersom en person er underernært (Nelson et al. 1994), noe som kan gjelde en høy andel av befolkningen i U-landene. Eksponering av mykotoksiner kan også forekomme ved kornstøv som er kontaminert med mykotoksiner, og det kan skje en inhalering av disse toksinene gjennom kornstøvet (Halstensen et al. 2006).

Ifølge oversiktsartikkelen til Fung og Clark (2004) lider pasienter som er rammet av mykotoksikose ofte av alvorlige allmennsymptomer. Det har også blitt kjent at *Fusarium*-arter kan forårsake sykdom (i verstefall livstruende) hos mennesker med svekkede immunsystemer (Anaissie et al. 1986; Fung & Clark 2004; Nelson et al. 1994). Humane infeksjoner som skyldes *Fusarium*-arter, kan være overfladiske eller begrenset til enkelte organer, selv hos friske

personer, men slike infeksjoner er sjelden (Nelson et al. 1994). Ofte er det ikke alltid like lett å gjenkjenne tegn på mykotoksikose, og dermed kan diagnosen være vanskelig (Magan & Olsen 2004). Hos dyr er tegn på toksiske effekter avhengig av typen mykotoksiner og deres konsentrasjon (Magan & Olsen 2004). Dyreforsøk viser at inntak av store doser av mykotoksiner kan resultere i svulster (Fung & Clark 2004). Det er hovedsakelig DON, NIV og DAS som forekommer mest i mat og fôr (Fung & Clark 2004). Ifølge Desjardins (2006) har ikke *F. avenaceum* blitt knyttet til mykotoksikose. Derimot er *F. graminearum* knyttet til dette, både hos mennesker og dyr (Desjardins 2006). ZEN fremmer østrogenaktivitet og har evne til å stimulere østrogensensitive svulster i bryst og livmohals (Fung & Clark 2004). Blant dyr er det griser som er mest sensitive til ZEN, hvor det blant annet kan gi sterilitet, mindre grisekull, samt svake griseunger (Nelson et al. 1994).

Ifølge oversiktsartikkelen til Fung og Clark (2004) absorberes type A og B trichothecener raskt i mage-tarmkanalen, og trichothecener kan hemme proteinsyntesen ved at de blokkerer syntesen av RNA og DNA ved å hemme peptidyltransferase. Videre i oversiktsartikkelen skriver Fung og Clark at dyreforsøk viser at det betydelig variasjon i toksisiteten til trichothecener. Type A trichothecener som T-2 og HT-2 er svært giftige (Medina & Magan 2010). T-2 kan hemme DNA, RNA og proteinsyntese, i tillegg til at dette toksinet kan svekke immunforsvaret (Canady et al. 2001). Mellom 1942 og 1948 døde minst 100.000 mennesker i Russland av sykdommen "alimentary toxic aleukia" (ATA) etter å ha spist overvintret korn som var kontaminert med T-2 (Foroud & Eudes 2009). Denne sykdommen starter med tarmirritasjon i form av brekning og diaré og etterfulgt av "aleukia" og anemi, noe som kan fortløpende føre til død (Foroud & Eudes 2009). Dersjant-Li (2003) beskriver i sin oversiktsartikkel at ifølge studier gjort med dyr er redusert fôrinntak og vekst eksempler på symptomer etter inntak av bestemte mykotoksiner. Blant trichothecener er DON det største problemet for dyrenes helse (Richard et al. 2003). Griser synes å være svært sensitive til DON, og symptomene er ofte oppkast, diaré, muskelsvakhet, skjelvninger og koma. Sammenlignet med gris, ser det ut til at kylling er mindre sensitive. (Richard et al. 2003). Når det gjelder drøvtyggere, er disse forholdsvis lite sensitive til DON, noe som skyldes at de har mikroorganismer i vomma som er i stand til å bryte ned toksinet eller gjøre det mindre toksisk (Richard et al. 2003). Ved kronisk eksponering av DON, kan det medføre svekkelse av immunforsvaret. Mus som er fôret med lave DON-nivåer, har i noen eksperimenter vist å få i en økning av serum IgA. (Richard et al. 2003). Enniatiner er vist å være fytotoksisk, har antimikrobielle egenskaper og kan forstyrre leverceller (Burmeister & Plattner 1987; Tomoda et al. 1992).

Fung og Clark (2004) beskriver også i sin oversiktsartikkel at det er vanskelig å sette toleransegrenser for nivåer av trichothecener som følge av at toksiner med ulik toksisitet ofte forekommer sammen.

Nedre grense for DON er 200 µg/kg i baby-mat, 1250 µg/kg for ubearbeidet korn annet enn durum hvete, havre og mais, og for havre og durumhvene er grenseverdien 1750 µg/kg i uberarbeidet cerealer (Commission 2006)

1.12 Formål

Formålet med oppgaven er å undersøke genuttrykket hos *Fusarium* under infeksjon av havre for å kunne se når genene som trengs for toksinproduksjon er aktive, og om ulike arter av *Fusarium* interagerer og påvirker produksjon av mykotoksiner hos hverandre. De fire *Fusarium*-artene som inngår i oppgaven er *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* og *F. langsethiae*. Bestemte gener fra hver av de fire artene er undersøkt, både ved 10 og 14 dpi. Genene som ble undersøkt, er: *Esn* hos *F. avenaceum*, *Tri1* hos *F. culmorum* og *F. graminearum* og *Tri1*, *Tri16* og *Dep5* hos *F. langsethiae*.

Det er flere faktorer som kan påvirke både veksten og mykotoksinproduksjonen hos en *Fusarium*-art. Mykotoksinproduksjonen hos en *Fusarium*-art er styrt av bestemte gener som koder for enzymer som inngår i synteseveien til de ulike toksinene, og det er slike gener som er en del av denne oppgaven. Uttrykket av disse genene kan variere avhengig av tid, abiotiske miljøfaktorer og eventuell tilstedeværelse av andre sopper. Når andre *Fusarium*-arter er tilstede, kan dette for eksempel hemme eller stimulere mykotoksinproduksjonen hos den andre arten. Det foregår dermed et samspill mellom artene, og de kan påvirke hverandre i ulik grad, hvorav den ene kan være mer konkurransedyktig og dominant enn den andre. *Fusarium*-arter som lever sammen kan stresse hverandre og konkurrere om for eksempel næringsstoffer. Stress kan blant annet gi økt toksinproduksjon hos en *Fusarium*-art. Det foregår både interaksjoner mellom soppen og planten (i dette tilfellet havre) og interaksjoner mellom ulike arter av *Fusarium*.

Det er altså mange faktorer som spiller inn om et gen er uttrykt og om det forekommer toksinproduksjon hos *Fusarium*. Hele dette samspillet er ganske komplekst, og denne masteroppgaven tar for seg hvordan bestemte genuttrykk og toksinproduksjonen hos fire viktige *Fusarium*-arter i Norge påvirkes av når soppen er alene og vokser sammen med en annen art. Hovedvekten i oppgaven er lagt på *F. langsethiae*, og denne *Fusarium*-arten inngår derfor i alle kombinasjonene, der to sopper er sammen, men alle de fire artene har også vokst alene.

2.0 Materialer

2.1 Prøvemateriale

Tabell 1: Oversikt over *Fusarium*-arter, isolater og sporekonsentrasjon som ble benyttet ved inokulering av havre og som prøvene i denne masteroppgaven er basert på.

<i>Fusarium</i> -art	Isolat	Sporekonsentrasjon
<i>F. graminearum</i>	2007-059 ^a	<u>Halv dose:</u>
	2008-028 ^a	0,5x10 ⁵ sporer/ml
	2008-140 ^a	(makrokonidier)
<i>F. langsethiae</i>	2010-058 ^b	<u>Halv dose:</u>
	IBT9951 ^{b-e}	2x10 ⁶ sporer/ml (mikrokonidier)
	IBT9956 ^{b-e}	<u>Hel dose:</u> 4x10 ⁶ sporer/ml (mikrokonidier)
<i>F. avenaceum</i>	6A ^d	<u>Halv dose:</u>
	11A ^d	0,5x10 ⁵ sporer/ml
	21A ^d	(makrokonidier)
<i>F. culmorum</i>	9C ^d	<u>Halv dose:</u>
	14C ^d	0,5x10 ⁵ sporer/ml
	27C ^d	(makrokonidier)

^a Lokale Bioforsk-isolater, upublisert data

^b Divon et al. 2012

^c Thrane et al. 2004

^d Bioforsk Plantehelse

Tabell 2: Oversikt over ulike *Fusarium*-arter som inngår i de ulike behandlingene.

Behandling	<i>Fusarium</i>-arter
1	<i>F. avenaceum</i> (halv dose)
3	<i>F. culmorum</i> (halv dose)
5	<i>F. graminearum</i> (halv dose)
10	<i>F. langsethiae</i> (halv dose)
11	<i>F. langsethiae</i> (hel dose)
12	<i>F. langsethiae</i> (halv dose) + <i>F. avenaceum</i> (halv dose)
13	<i>F. langsethiae</i> (halv dose) + <i>F. culmorum</i> (halv dose)
14	<i>F. langsethiae</i> (halv dose) + <i>F. graminearum</i> (halv dose)
Kontroll (K)	Ikke infisert med <i>Fusarium</i>

* Se tabell 1 for de ulike dosene for hver art

2.2 Kjemikalier

Tabell 2: Oversikt over kjemikalier som er benyttet og deres leverandører/produsenter.

Kjemikalie	Produsent	By, land
Agarose (SeaKem [®] LE)	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Etanol, 75 %	Kemetyl Norge AS	Vestby, Norge
Etanol, 96 %	Kemetyl Norge AS	Vestby, Norge
Etidiumbromid, 0,07 %	VWR	Haasrode, Belgia
Isopropanol	Merck	Darmstadt, Tyskland
Kloroform	Merck	Darmstadt, Tyskland
Ladder, 100bp	New England Biolabs	Ipswich, MA, USA
Ladder, 1kb	New England Biolabs	Ipswich, MA, USA
Nukleasefritt vann	Ambion	Austin, TX, USA

2.3 Kit, buffere og mastermikser

Tabell 3: Oversikt over kit, buffere og mastermikser som er brukt og deres leverandører/produsenter.

Navn	Produsent (by, land)
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Vilnius, Litauen
DNA-free™ Kit	Ambion, Austin, TX, USA
Fast RNA Pro Kit	qBiogene, Irvine, CA, USA
GenElute™ PCR Clean-Up Kit	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Spectrum™ Plant Total RNA Kit	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit	Invitrogen, Carlsbad, California, USA
TURBO DNA-free™ Kit	Ambion, Austin, TX, USA
Loading buffer	<u>Bromfenolblått:</u> Merck, Darmstadt, Tyskland
<u>Oppskrift:</u> 0,25 % bromfenolblått og 40 % sukrose i destillert vann	<u>Sukrose:</u> Duchefa Biochemie, Haarlem, Nederland
10 X TBE	<u>Trisbase:</u> Duchefa Biochemie, Haarlem, Nederland
<u>Oppskrift:</u> 1 liter 10X TBE var laget av 108 g Tris-base, 55 g borsyre og 40 ml 0,5M EDTA (pH 8). Reagentene ble fullstendig løst under røring i 800 ml destillert vann. Blandingen ble fortynnet med destillert vann helt til volumet var 1 liter.	<u>Borsyre:</u> Duchefa Biochemie, Haarlem, Nederland <u>EDTA:</u> Duchefa Biochemie, Haarlem, Nederland
2x qPCR Master Mix (TaqMan)	Eurogentec, Seraing, Belgia
Power Sybr® Green PCR Master Mix (2X) (5 ml)	Applied Biosystems, Warrington, UK
Trizol Reagent	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

2.4 Primere og prober

Tabell 4: Oversikt over primerpar, Cox-probe og sekvenser for disse. Alle primerne er levert av Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK. Cox-proben er levert av Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA

Primerpar/probe	Målorganisme – arter og målgener	Primersekvenser (5' → 3')
<i>Cox</i>		
Cox Fw/Cox Rev (COX554-f/COX554-r) ¹	Plantespesifikke primere (cytochrome c oxidase)	GGTTGTTGCCACCAAGTCTCTT/ TGCCGCTGCCAACTTC
<i>Cox</i> probe (COX554-p) ¹	Plantespesifikk probe (cytochrome c oxidase)	FAM-CTCCTATTAAGCTCAGCCTT- MGB
Husholdningsgener		
FavenBTUBf1/FavenBTUBr1 ²	<i>F. avenaceum</i> – <i>beta-tubulin</i>	CTTCCGGCAACAAGTACGTC/ CGGGTCGGAAAAGCTGA
FavenBTUBf2/FavenBTUBr2 ²	<i>F. avenaceum</i> – <i>beta-tubulin</i>	TCGAGA ACTCCGATGAGACC/ ACGGAGACAGGTGGTGACA
FavenUBCf1/FavenUBCr3 ³ (Designet av Sonja Klemsdal og testet av masterstudent Martha Nymoen Tveit, 2012)	<i>F. avenaceum</i> – <i>UBC</i> (ubiquitin konjugerende-enzym)	TGCTTGGACATTCTGCGA/ CAGAGGGTCGTCAGGGTTA
FgcBTUBf1/FgcBTUBr1 ²	<i>F. graminearum</i> / <i>F. culmorum</i> – <i>beta-tubulin</i>	ACCCTCTCCGTCCATCAAT/ CGGACATGACGGCAGAG
FgraUBCf1/FgraUBCr1 ³ (Designet av Sonja Klemsdal og testet av masterstudent Martha Nymoen Tveit, 2012)	<i>F. graminearum</i> / <i>F. culmorum</i> – <i>UBC</i> (ubiquitin konjugerende-enzym)	ATGCTGACTTTGTTCCACAGAG/ GGAGTCAGAAGGACCCATGA
FlanBTUBf1/FlanBTUBr1 ²	<i>F. langsethiae</i> – <i>beta-tubulin</i>	CTCGACAGCAATGGTGTTTATC/ CTGTCCGAAGGGACCAGA
FlanBTUBf2/FlanBTUBr2 ²	<i>F. langsethiae</i> –	GTCGAGA ACTCTGACGAAACC/

	<i>beta-tubulin</i>	GGAAACGGAGACAGGTCGTA
FlanUBCf1/FlanUBCr1 ³	<i>F. langsethiae</i> – <i>UBC</i> (ubiquitin konjugerende-enzym)	GCTACGATTATGGGACCTTCTG/ ATGCTTCCGTTGGAGTTGATA
FlanUBCf2/FlanUBCr2 ³	<i>F. langsethiae</i> – <i>UBC</i> (ubiquitin konjugerende-enzym)	GGTGTCTTCTTCCTTGCGATT/ AGAAGAACTTTGGAGATGGTCAG
Mykotoksin-relaterede gener		
ELFAEsyn 1b-f/ELFAEsyn 1b-r ⁴	<i>F. avenaceum</i> – <i>Esyn</i> (enniatin syntase)	TCCCCGGTGACTCGTATGAAG/ ACGAGCTCTAGTTGCGGTAAGTC
EsynF1/EsynR1 ⁴	<i>F. avenaceum</i> – <i>Esyn</i> (enniatin syntase)	CAAGTTCGCAGGAAAAGCCA/ CGGGTGTGGGGAAGTATT
EsynF2/EsynR2 ⁴	<i>F. avenaceum</i> – <i>Esyn</i> (enniatin syntase)	CAGGAAAAGCCAAGGTCCAC/ GAATGTCGATGAGGCCGT
EsynF3/EsynR2 ⁴	<i>F. avenaceum</i> – <i>Esyn</i> (enniatin syntase)	AGTTCGCAGGAAAAGCCA/ GAATGTCGATGAGGCCGT
EsynF4/EsynR2 ⁴	<i>F. avenaceum</i> – <i>Esyn</i> (enniatin syntase)	AGGAAAAGCCAAGGTCCAC/ GAATGTCGATGAGGCCGT
EsynModf/EsynModr ⁴	<i>F. avenaceum</i> – <i>Esyn</i> (enniatin syntase)	CCCGGTGACTCGTATGAAG/ CGAGCTCTAGTTGCGGTAAGTC
EsynSKf/EsynSKr ³	<i>F. avenaceum</i> – <i>Esyn</i> (enniatin syntase)	AACAACGCCACCAAGGATAG/ GTGAAGAAGGCAGGCTCAAC
ELFGTri1f-f/ELFGTri1f-r ⁴	<i>F. graminearum</i> / <i>F. culmorum</i> – <i>Tri1</i>	GTTTGGCGGGTGGTGTGAAGG/ GTTGCCTTTCTCGTCGTAGTATCC
FGTri1SK/FGTri1SKr ³	<i>F. graminearum</i> / <i>F. culmorum</i> – <i>Tri1</i>	AAGGATCTACGAGAACCCTGAA/ CTTCTCTGGCGGATTGTTGT
DepPKSf1/DepPKSr1 ³	<i>F. langsethiae</i> – <i>Dep5</i>	TCCTTCTTCCCAGTCGCTTA/ ATGTAGCGTCAGAGCGGAGT

	(depudecin polyketid syntase)	
DepPKSf2/DepPKSr2 ³	<i>F. langsethiae</i> – <i>Dep5</i> (depudecin polyketid syntase)	CATATCCTCGGTGGACTGCT/ TAAGCGACTGGGAAGAAGGA
ELFSTri1e-f/ELFSTri1e-r ⁴	<i>F. langsethiae</i> / <i>F. sporotrichioides</i> – <i>Tri1</i>	TCGCCTCGGGTTCAGCAGA/ GGGACGCGCAGTACAATGGTT
ELTri16c-f/ELTri16c-r ⁴	<i>F. langsethiae</i> – <i>Tri16</i>	TTTGTGCGGTATCCGTATATTGA/ CCTCCGTCTTGGCAGCAA
FLTri1f/FLTri1r ³	<i>F. langsethiae</i> – <i>Tri1</i>	GAACCCCTCCAGGTTCTCA/ GCACCTCCAGTTCAAAGTTG
LANTri16f/LANTri16r ³	<i>F. langsethiae</i> – <i>Tri16</i>	CCAGCCTAGCAAGGATCAAG/ GGGTGAGATTGCTTCGATGT

¹Divon et al. 2012

²Designet av Christin Anstensrud

³Designet av Sonja Klemsdal

⁴Designet av Erik Lysøe

2.5 Laboratorie-instrumenter og generelt utstyr

Tabell 5: Oversikt over instrumenter og generelt utstyr som er benyttet, samt deres leverandører/produsenter.

Utstyr/teknikk	Modell	Produsent
Eppendorfrør	2ml	-----
Sentrifugerør	15 ml	-----
For fotografering av geler	Molecular Imager Gel Doc XR System	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
Mikrosentrifugerør	1,5 ml	-----
PCR-plater	Thermo Fast 96 PCR	Thermo Fisher Scientific

	Detection Plates	Inc., Waltham, MA, USA
PCR-plater	MicroAmp(r) Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Biopolis Road, Singapore
PCR/cDNA-syntese	T100™ Thermal Cycler	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
PCR/cDNA-syntese	C1000™ Thermal Cycler	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
PCR-rør	0,2 ml Semi-skirted 96-well PCR Plate	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Pipetteringsrobot	epMotion 5070	Eppendorf, New York, USA
Pistil + morter	-----	-----
Plastfolie til forsegling av PCR plate	MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA
Real-time qPCR	7900HT Fast Real-time PCR System	Applied Biosystems, Carlsbad CA, USA
RNA analyse	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Morges, Sveits
RNA analyse med spektrofotometer	NanoDrop 2000 Spectrophotometer	NanoDrop products, Wilmington, DE, USA
Sentrifugering	Galaxy Mini Centrifuge	VWR International, Darmstadt, Tyskland
Sentrifugering	Biofuge pico	Heraeus Instruments, Osterode, Tyskland
Sentrifugering	Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Tyskland
Sentrifugering (kjølesentrifuge)	Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Tyskland
Varmeblokk	QBT2 varmeblokk	Grant Instruments Cambridge, UK
Vortexer	VWR Collection lab dancer test tube shaker	VWR International, Darmstadt, Tyskland
Vortexer	Reax	VWR International, Darmstadt, Tyskland

Vortexer	MS2 <i>Minishaker</i>	IKA [®] Works, Wilmington, NC, USA
Vortexer til bioanalyser chip	MS2 S9-Agilent Vortexer Mini Shaker	IKA [®] Works, Wilmington, NC, USA

2.6 Programvare

Tabell 6: Oversikt over programvarer og deres kilder.

Programvare	Kilde
BestKeeper v. 1	Pfaffl m. fl. (2004) http://gene-quantification.de/bestkeeper.html
BLAST	Altschul m. fl. (1990), National Center for Biotechnology Information (NCBI) http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
ClustalW	Lopez og Lloyd (1997), European Bioinformatics Institute (EBI) http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/
MegAlign v. 5.05	Lasergene, DNASTAR, Madison, WI, USA
Primer3 v.0.4.0	Rozen og Skaletsky (2000) http://frodo.wi.mit.edu/
Quantity One versjon 4.5.1	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
SDS v. 2.3	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA

3.0 Metoder

3.1 Soppmateriale, produksjon av inokulum og veksthusforsøk

I denne masteroppgaven ble gener relatert til produksjon av mykotoksiner i ulike *Fusarium*-arter studert, under infeksjon av havre. Arbeidet beskrevet i dette avsnittet av oppgaven (avsnitt 3.1) er utført av Aamot et al. (ikke publisert), og her vil det bare bli gitt et kort referat av hvordan disse eksperimentene ble utført. Det ble gjort veksthusforsøk som innebar sprayinokulering i havresorten Lena med sporesuspensjon av isolater fra fire ulike *Fusarium*-arter; *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* og *F. langsethiae*. Alle artene ble brukt i blandinger med tre isolater, som har bidratt like mye i sporekonsentrasjonen for den bestemte arten. I tabell 1 under materialer er det en oversikt over total sporekonsentrasjon for hver art.

For å lage sporer ble *Fusarium* dyrket opp på petriskåler med mung bean agar (MBA) i romtemperatur, og konidiesuspensjoner ble laget ved å tilføre litt vann til disse skålene, skrape lett med en steril glasstav og telle antall sporer pr. ml ved hjelp av engangs-tellekammer. Videre ble det tilsatt dH₂O til ønsket sporekonsentrasjon ble oppnådd (mellom 1 og 5 x 10⁵ sporer pr. ml). Det ble overført en ml av dette til nye MBA-skåler og spredt utover overflaten av mediet. Skålene ble inkubert ved 22 °C under en kombinasjon av hvitt og svart UVA-lys i en 12-timers periode. Kulturene fikk vokse i 15-20 dager, og deretter ble konidiene vasket ut fra overflaten av MBA ved hjelp av dH₂O og sterile glasstaver. For å fjerne fragmenter av mycel og agar, ble suspensjonene filtrert gjennom steril bomull. Ved hjelp av et Bürker hemocytometer, ble konsentrasjoner av sporer bestemt, og det ble tilført dH₂O og gelatin til en sluttkonsentrasjon av 0,25 %.

Havre (sorten Lena) ble dyrket i to liters pottes (LOG A/S Norge) i veksthus med P-jord, en blanding av torv med 10 % jord (LOG A/S, Norge) tilsatt perlitt. I hver potte ble det sådd ti havrekorn, og de ble inkubert ved hvitt lys (HPI) under en 14-timers periode. Den relative luftfuktigheten var 60 %, og de laveste temperaturene for dag og natt var henholdsvis 25 °C og 18 °C. Disse temperaturene ble endret til respektive 20°C og 15°C etter fem uker. Plantene ble vannet ved behov, og en gang i uka fikk de tilførsel av gjødselvann.

Under blomstringen ble havrerisler sprayinokulert med *Fusarium*-sporer og dekket med plastposer for å sørge for høy relativ luftfuktighet under infeksjonen. Etter seks dager ble plastposene fjernet. Konsentrasjonene for dosene vises i tabell 1 under materialer. Når to arter var i kombinasjon, ble det bare brukt halv dose fra hver av artene. I tillegg til disse

behandlingene var det også kontroll-behandlinger, der plantene ble sprayet med 0,25 % gelatin i vann. Behandlingene ble gjentatt tre ganger med planter sådd til ulik tid. Dette utgjorde dermed tre uavhengige biologiske replikater. Havrekornene som ble benyttet i analysene i denne masteroppgaven, var høstet 10 og 14 dager dpi. Disse kornene var plukket fra havrerisler fra ulike planter og pottes og deretter lagret i aluminiumspakker ved -80°C.

3.2 Genekspresjonsstudier av *Fusarium*-infisert havre

Havrekorn fra åtte ulike behandlinger fra både 10 og 14 dpi med *Fusarium*, i tillegg til uinfiserte kontrollbehandlinger, ble valgt ut (tabell 1 og 2 under materialer). Det var alt i alt 54 prøver som ble benyttet i analysene som inngår i denne masteroppgaven.

3.2.1 Ekstraksjon av RNA, kvantifisering og optimalisering

RNA-ekstraksjon med Trizol Reagent

Til RNA-ekstraksjon med Trizol Reagent ble det brukt to ulike sentrifuger, hvorav den ene var kjølesentrifuge (Centrifuge 5417R, Eppendorf). Dersom ikke noe annet er oppgitt, er det brukt vanlig sentrifuge (Biofuge pico fra Heraeus Instruments). For hver behandling ble havrekorn plukket fra ulike havrerisler og knust fortløpende i morter med flytende nitrogen (N₂). En spatelspiss av materialet ble overført til rør som hver var fylt med 2 ml Trizol og inkubert i romtemperatur (RT) i henhold til protokollen fra Invitrogen, før det ble sentrifugert på 13 000 rpm i ti minutter. Under sentrifugeringen ble det dannet pelletter og klare supernatanter. Supernatanten ble overført til nye eppendorfrør som deretter ble tilsatt 0,2 ml kloroform/ml Trizol og ristet for hånd i 15 sekunder. Videre ble disse inkubert i RT i tre minutter, før de ble sentrifugert i kjølesentrifuge på maksimal hastighet i 15 minutter ved 4 °C. Etter endt sentrifugering ble den øvre fasen fra hver prøve overført til et nytt eppendorfrør som ble tilsatt 500 µl isopropanol/ml Trizol. Dette ble blandet godt ved hjelp av en vortexer og deretter inkubert i ti minutter i romtemperatur. Etter inkuberingen ble rørene sentrifugert i kjølesentrifuge på 13 000 rpm i ti minutter i RT. Da sentrifugeringen var ferdig, ble supernatanten fjernet. Hver pellet ble vasket i 500 µl 75 % etanol for deretter å bli sentrifugert i kjølesentrifuge på 11 000 rpm i fem minutter ved 4 °C. Som sist ble det også denne gangen fjernet alt unntatt pelletene.

Disse ble lufttørket i fem til ti minutter og tilsatt 100 µl nukleasefritt vann. Til slutt ble de løst i det nukleasefrie vannet, før prøvene ble lagt i fryser ved – 80 °C.

RNA-ekstraksjon med Spectrum™ Plant Total RNA Kit” (Sigma-Aldrich)

Til RNA-ekstraksjon med Spectrum™ Plant Total RNA Kit ble bare én type sentrifuge benyttet, Biofuge pico fra Heraeus Instruments. Før selve RNA-ekstraksjonen kunne begynne ble lyseringsløsning og 2-mercaptoetanol blandet i et 15 ml sentrifugerør og vortexet. For hver ml av lyseringsløsning ble 10 µl 2-mercaptoetanol tilsatt. Til hver prøve ble 500 µl av denne blandingen brukt. For å unngå reduksjon i RNA utbytte, var det viktig at blandingen med lyseringsløsning og 2-mercaptoetanol ble laget like før ekstraksjonen skulle utføres. Filtreringskolonner og bindingskolonner ble plassert i 2 ml oppsamlingsrør og klargjort før ekstraksjonen startet.

Fra hver prøve ble havrekorn fra ulike havrerisler plukket og knust til et fint pulver i morter med flytende N₂. En spatelspiss av det fine pulveret med knust havre ble overført til et eppendorfrør som allerede var tilsatt 500 µl lyseringsløsning og 2-mercaptoetanol. Røret ble blandet godt i 30 sekunder ved hjelp av en vortexer og inkubert i RT ifølge protokollen til Sigma-Aldrich. Etter inkuberingen ble eppendorfrørene med prøvene sentrifugert på maksimal hastighet i fem minutter. Supernatantene ble overført til filtreringskolonner som var plassert i oppsamlingsrør. Ved overføring var det viktig å plassere pipettespissene vekk fra pelletene for å unngå kontakt med disse. Oppsamlingsrørene med filterkolonnene og prøvene ble sentrifugert ved RT i fem minutter på maksimal hastighet. Dette ble gjort for å filtrere materialet igjennom filterkolonnen. Som følge av at noe av materialet var vanskelig å filtrere igjennom, ble restene overført til en ny kolonne som ble plassert i det opprinnelige oppsamlingsrøret med resten av den filtrerte væsken. Oppsamlingsrørene med de nye kolonnene ble sentrifugert ved fem minutter, tilsvarende som sist. Når alt materialet fra en prøve var rent igjennom filtreringskolonnen under sentrifugering, ble den filtrerte væsken i bunnen av oppsamlingsrøret tatt vare på, mens selve filterkolonnene ble kastet.

Videre ble 250 µl binding solution tilsatt hvert rør med lysat, og dette ble blandet ved å pipettere opp og ned sju-åtte ganger. Det var viktig at disse blandingene ikke ble sentrifugert, men overført til bindingskolonner som var plassert i oppsamlingsrør. Oppsamlingsrørene ble sentrifugert på maksimal hastighet ved romtemperatur i ett minutt for å binde RNA. Væsken som hadde rent igjennom hver av bindingskolonnene under sentrifugering, ble kastet, og

oppsamlingsrørene ble ristet forsiktig opp ned på rent, tørt papir for at de skulle tørke. Bindingskolonnene ble tatt vare på for å brukes videre, siden det var i disse RNA var bundet. Før videre trinn i selve RNA-ekstraksjonen ble prøvene DNase-behandlet for å fjerne spormengder av DNA. Dette var svært viktig å fjerne, spesielt dersom prøvene skulle benyttes til kvantitativ revers transkriptase (RT) PCR.

På forhånd ble DNase-blandingen laget, og for hver behandling ble 10 µl DNase I og 70 µl DNase digestion buffer brukt. Dette ble blandet forsiktig sammen ved å pipettere opp og ned, siden DNase I er sensitiv for fysisk denaturering. Blandingen ble satt på is til den skulle brukes. Før DNase-blandingen ble overført til prøvene, ble bindingskolonnene tilsatt 300 µl vaskeløsning 1 og sentrifugert ved romtemperatur på maksimal hastighet i ett minutt. Væsken som hadde gått igjennom hver bindingskolonne, ble kastet, og oppsamlingsrøret ble tørket ved å riste det forsiktig opp ned på et papir. Bindingskolonnen ble tatt vare på for å brukes videre. Av DNase-blandingen som var laget på forhånd, ble 80 µl overført direkte til sentrum av filteret på innsiden av hver bindingskolonne. Oppsamlingsrørene med bindingskolonnene ble lukket og satt til inkubering i romtemperatur i 15 minutter. Etter inkuberingen ble bindingskolonnene tilsatt 500 µl av vaskeløsning 1. Rørene ble igjen sentrifugert ved romtemperatur på maksimal hastighet i ett minutt. Dette var for å fjerne nedbrutt DNA. Væsken som hadde rent igjennom hver bindingskolonne under sentrifugering, ble kastet, og oppsamlingsrørene ble på nytt tørket ved å riste dem opp ned på et tørt papir.

Etter DNase-behandlingen fortsatte selve RNA-ekstraksjonen videre. Av fortynnet vaskeløsning 2 ble 500 µl overført til hver bindingskolonne. Oppsamlingsrørene med bindingskolonnene ble sentrifugert på maksimal hastighet ved romtemperatur i 30 sekunder. Væsken som hadde rent igjennom hver bindingskolonne, ble kastet, og oppsamlingsrørene ble tørket. En ny vasking med 500 µl vaskeløsning 2 ble gjennomført med påfølgende sentrifugering. Etter endt vasking ble oppsamlingsrørene med bindingskolonnene tørket ved sentrifugering på maksimal hastighet ved romtemperatur i ett minutt. Da hvert rør ble tatt ut av sentrifugen, var det viktig å være forsiktig for å unngå at væsken som lå i bunnen av oppsamlingsrøret, kom i kontakt med den tørre bindingskolonnen. Bindingskolonnene ble fjernet fra oppsamlingsrørene og overført til nye og tørre 2 ml oppsamlingsrør. Deretter ble 50 µl elution solution overført til sentrum på innsiden av hver bindingskolonne. Lokkene på oppsamlingsrørene med bindingskolonnene ble satt på, og rørene ble satt til inkubering i ett minutt ved romtemperatur. Videre ble de sentrifugert i ett minutt for eluering. Etter sentrifugering var det rensset RNA i væsken (eluatet) som hadde gått

igjennom bindingskolonnene. Etter endt eluering ble bindingskolonnen kastet, mens oppsamlingsrøret med eluatet som inneholdt RNA, ble lagt i fryser ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Agarose gelelektroforese

Gelkar som agarosegel skulle støpes i, ble forseglet godt med teip på begge ender. Kammene som ble brukt til å lage brønner, var relativt tykke og tilpasset størrelsen til gelkaret. For et 50 ml gelkar ble 50 ml ferdigblandet 1X TBE målt opp i en Erlenmeyerkolbe. Agarosen som ble brukt var Sea kem LE Agarose (Sigma-Aldrich), og mengden av denne var 0,8 % for total RNA. Ved analyse med cDNA (som beskrives senere) ble 1,0 % agarose brukt. Kolben ble dekket med plastfolie med en liten åpning for å unngå overtrykk før den skulle varmes i mikrobølgeovn et par minutter. Når alt var løst, ble blandingen overført til gelkaret så snart temperaturen var rundt $50\text{-}55\text{ }^{\circ}\text{C}$. Videre ble en dråpe 0,07 % etidiumbromid tilsatt blandingen for hver 50 ml, til en endelig konsentrasjon på $0,5\text{ }\mu\text{g/ml}$. Agaroseløsningen med etidiumbromid ble blandet forsiktig og deretter overført til gelkaret. Det var viktig å unngå luftbobler under støpingen.

Etter at agarosegelen var ferdig stivnet, ble teipen og kammene forsiktig fjernet, og gelkaret med ferdigstøpt gel ble overført til gelelektroforesekaret. I første brønn ble $3\text{ }\mu\text{l}$ 1 kb DNA ladder applisert, og i de øvrige brønnene ble RNA som var tilsatt loading buffer tilsatt. Strømmen ble satt på, og gelen ble kjørt ved 90 eller 120 volt i omtrent 40 minutter. Etter kjøring ble gelen fotografert i ultrafiolett lys ved bruk av et Gel Doc XR instrument og programvaren Quantity One.

Analysering av RNA med Agilent 2100 Bioanalyser

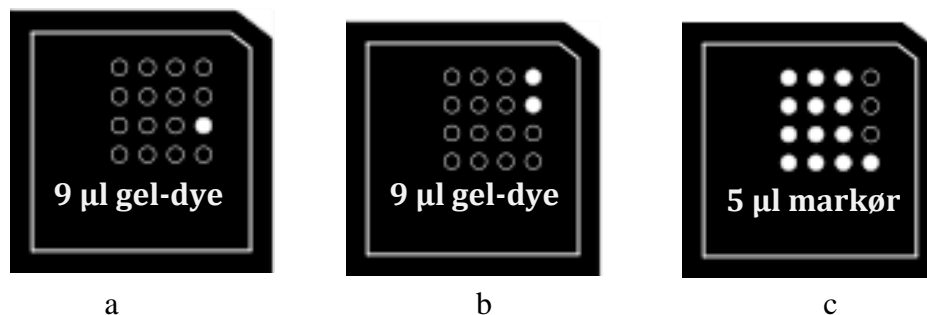
For å sjekke kvaliteten på RNA, ble RNA-prøvene analysert ved bruk av Agilent RNA 6000 Nano Kit og Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies). Ved analyse med Agilent 2100 Bioanalyser, kan RNA-konsentrasjonen og RIN (RNA Integrity Number) -verdiene leses av, samtidig som et kromatogram med RIN-verdier sier noe om kvaliteten på RNA (Schroeder et al. 2006). En RIN-verdi på 10 er den høyeste verdien som kan oppnås, noe som indikerer en meget bra kvalitet på RNA. En RIN-verdi på 1 indikerer degradert RNA (Schroeder et al. 2006).

Før første gangs analyse med Agilent 2100 Bioanalyser ble gjort, ble en spesiell gel til denne analysen laget. Først ble $550\text{ }\mu\text{l}$ av RNA 6000 Nano gel matrix (Agilent Technologies) overført til et spinnfilter som deretter ble sentrifugert ved 4000 rpm i romtemperatur i ti minutter ved hjelp av sentrifugen Biofuge pico (Heraeus Instruments). Den filtrerte gelen ble videre

fordelt i ulike 0,5 ml RNase-frie mikrofugerør, der hvert rør skulle inneholde 65 µl filtrert gel. Det var viktig at gelene ble brukt innen fire uker.

Prøvene med RNA stod på is, og RNA 6000 Nano dye-konsentratet (del av Agilent RNA 6000 Nano Kit) ble satt i romtemperatur i en halv time for å stabilisere seg. Det var viktig at røret til dye-konsentratet var pakket inn i aluminiumsfolie for å unngå eksponering av lys. Etter stabiliseringen ble konsentratet blandet ved hjelp av vortexer i ti sekunder og deretter spunnet ned i en Galaxy Mini Centrifuge. Av praktiske grunner ble 65 µl filtrert gel overført fra et 0,2 ml RNase-fritt mikrofugerør og over til et 0,5 ml RNase-fritt mikrofugerør. I dette eppendorfrøret med gel ble det tilsatt 1 µl av RNA 6000 Nano dye, og dette ble blandet godt i en vortexer og spunnet ned i ti minutter i romtemperatur på 13 000 rpm. Det var viktig at den ferdige blandingen med filtrert gel og RNA 6000 Nano dye ble brukt innen en dag.

Etter sentrifugeringen ble 9 µl av blandingen med gel og RNA 6000 Nano Dye overført til én bestemt brønn i en RNA 6000 Nano chip (se hvite markeringer i figur 13a), før priming station ble klargjort.



Figur 13: RNA 6000 Nano chip som brukes i analyse med Agilent 2100 Bioanalyzer

a: Brønn som tilsettes 9 µl gel-dye før priming station klargjøres.

b: Brønner som tilsettes 9 µl del-dye etter klargjøring av priming station.

c: Oversikt over brønner som tilsettes 5 µl markør og 1 µl RNA. Vær obs på at brønnen helt nederst til høyre tilsettes 1 µl RNA ladder i stedet for RNA.

(<http://icob.sinica.edu.tw/pubweb/Core%20Facilities/Data/R401-core/RNA6000Nanomanual.pdf>, Agilent Technologies, 2001, 2003-2006)

Når priming station ble klargjort, var det viktig at stempelet var i 1 ml posisjonen, før priming station ble lukket igjen. Stempelet ble presset ned helt til det ble holdt igjen av en klemme, og der ble det holdt i nøyaktig 30 sekunder, før stempelet ble sluppet. Idet stempelet ble frigjort fra festet, måtte det gå fem sekunder før det ble trukket forsiktig tilbake til utgangsposisjonen, det

vil si ved 1 ml. Priming station som nå var klargjort, ble åpnet, og resten av gelen ble overført til to andre brønner, 9 µl i hver brønn (se hvite markeringer i figur 13b). Videre ble 5 µl av RNA 6000 Nano-markøren overført til de resterende tomme brønnene, (se hvite markeringer i figur 13c). I brønnen nederst til høyre i figur 13c ble 1 µl RNA-ladder tilsatt. I hver av de tolv andre brønnene i figur 13c ble 1 µl RNA-eluat tilsatt. Maksimalt tolv prøver kunne analyseres av gangen. Dersom noen brønner ikke var tilsatt RNA-eluat, ble disse fylt med 1 µl markør, slik at volumene ble like i alle brønnene som er merket i hvitt på figur 13c.

Etter at alle brønnene var ferdig fylt, ble chip'en plassert horisontalt i en IKA vortexer og vortexet ved 2400 rpm i ett minutt. Den ble deretter plassert med én gang i en Agilent 2100 Bioanalyser. Det var viktig at det ikke gikk mer enn fem minutter mellom disse trinnene. Programmet som prøvene skulle analyseres med, ble stilt til "RNA" og "Eukaryot Total RNA Nano".

Test av DNA kontaminering i RNA-prøvene

Etter endt RNA-ekstraksjon ble prøvene testet med qPCR for å se om det fremdeles var rester av genomisk DNA etter RNA-ekstraksjonen. Til dette ble plantespesifikke *Cox*-primere og *Cox*-probe brukt (tabell 4 under materialer). Målgenet til *Cox* er cytochrome c oxidase (Divon et al. 2012). Genomisk DNA fra havre (50 ng/µl) ble brukt som positiv kontroll. Som negativ kontroll ble nukleasefritt vann brukt. Fra hver prøve ble 1 µl RNA-eluat brukt til test med qPCR. Tillaging av reaksjonsblandingen ble gjort på is.

Mastermiks per prøve:

2,5 µl	<i>Cox</i> forward primer (3 pmol/µl)
2,5 µl	<i>Cox</i> reverse primer (3 pmol/µl)
2,5 µl	<i>Cox</i> probe (1 pmol/µl)
4,0 µl	nukleasefritt H ₂ O
<u>12,5 µl</u>	<u>2x TaqMan (qPCR mastermiks)</u>
24,0 µl	Totalt

Dette ble blandet i et eppendorfrør og vortexet godt. I hver brønn ble 1 µl templat tilsatt, slik at totalvolumet ble 25 µl. PCR-platen ble forseglet godt med plastfolie og sentrifugert ved 1000 rpm i ett minutt ved bruk av Centrifuge 5810 R (Eppendorf) for å unngå luftbobler i brønnene, noe som i verste fall kan forstyrre fluorescensen under qPCR. Analyse med qPCR oppgir CT

(cycle threshold)-verdier og amplifikasjonsplott som viser om det er DNA til stede i prøvene gjennom CT-verdier. Jo lavere CT-verdi, desto mer DNA, og jo høyere CT-verdi, desto mindre DNA i prøvene. Det ble satt en grense på 37 i CT-verdi, slik at alle prøver som hadde CT-verdi under 37, måtte DNase-behandles ytterligere, mens prøver med CT-verdi over 37 ikke trengte mer DNase-behandling. Prøver som hadde rester av genomisk DNA, måtte i tillegg behandles med Ambion Turbo DNA-free.

DNase-behandling med Ambion Turbo DNA-free Kit

Til sentrifugestegene ved DNase-behandling ble Biofuge pico (Heraeus Instruments) brukt som sentrifuge. Hver prøve ble tilsatt 0,1 volum av 10X TURBO DNase Buffer og 1 µl TURBO DNase. Dette ble blandet godt med en pipettespiss og satt til inkubering i 37 °C i 30 minutter. Etter inkuberingen ble 0,1 volum DNase inaktiveringsreagens tilsatt, og rørene ble vortexet forsiktig i ett sekund. Det var viktig å vortexe denne inaktiveringsreagenset på forhånd, slik at den var tilstrekkelig resuspendert før bruk. Etter at inaktiveringsreagens var tilsatt, ble rørene inkubert ved romtemperatur i fem minutter og blandet to til tre ganger ved forsiktig risting for hånd. Videre ble prøvene sentrifugert i to minutter ved 10 000 rpm, og supernatanten (som inneholdt RNA) fra hvert rør ble sugd opp og overført til nytt rør. DNase inaktiveringsreagenset hadde under sentrifugeringen lagt seg som en pellet, og av den grunn var det viktig å ikke komme nær denne når supernatantene ble sugd opp. Grunnen er at DNase inaktiveringsreagens kan binde divalente kationer og endre bufferforholdene ved enzymatiske reaksjoner, samt hemme RT-PCR-reaksjonen. Hensikten med DNase inaktiveringsreagenset er at den binder DNase enzymet, i tillegg til å fjerne divalente kationer, slik som magnesium og kalsium som kan katalysere degradering av RNA dersom en prøve med RNA varmes opp til over 60 °C (produktbeskrivelse til Ambion Turbo DNA-free Kit, Applied Biosystems, 2009). Dersom noe pellet kom med da supernatantene for prøvene ble sugd opp, måtte prøvene sentrifugeres på nytt, og supernatantene måtte på nytt overføres til nye rør. Noen prøver ble også DNase-behandlet med Ambion DNA-free Kit. Hensikten og fremgangsmåten for dette kittet var tilsvarende som for Ambion Turbo DNA-free Kit. Den eneste forskjellen var at prøvene ble inkubert i romtemperatur med inaktiveringsreagenset i to minutter, og ikke fem minutter som ved bruk av Ambion Turbo DNA-free Kit.

For hver DNase-behandling ble prøvene testet med qPCR som beskrevet over. *Cox*-primerne som ble benyttet, er plantespesifikke, og rester av DNA fra *Fusarium* ville i så fall være så lite at det ikke vil leutgjøre noen problemer for genekspressjon.

Måling av RNA-konsentrasjon med NanoDrop

I tillegg til Agilent 2100 Bioanalyser, ble NanoDrop brukt til å måle RNA-konsentrasjonen av hver prøve. NanoDrop-instrumentet ble stilt inn for analyse av RNA. Til nullstilling av NanoDrop før måling ble 1,5 µl elueringsløsning fra Sigma-Aldrich brukt, det vil si den samme løsningen som RNA-prøvene var eluert i. Det ble pipettert 1,5µl fra hver RNA-prøve til å måle konsentrasjonen. Hver prøve ble målt minst to ganger for å få en så tilnærmet sikker konsentrasjon som mulig, og noen prøver ble også målt opp til fire ganger dersom det var betydelig forskjell mellom første og andre måling. RNA-konsentrasjonene ble angitt i nanogram/mikroliter (ng/µl). Dersom RNA-konsentrasjonen var under 97 ng/µl, ble det utført nye ekstraksjoner av prøven eller prøvene det gjaldt.

Beregning av RNA-konsentrasjon

En tredjedel av RNA-prøvene ble ikke analysert med Agilent 2100 Bioanalyser rett etter RNA-ekstraksjon, men istedet etter fullført DNase-behandling. Grunnen til endring i rekkefølge, var at det i starten var viktig å undersøke kvaliteten på RNA som var ekstrahert med metoden fra Sigma-Aldrich, siden dette var den nye ekstraksjonsmetoden som ble bestemt å bruke. Etersom resultatene fra Agilent 2100 Bioanalyser viste at denne metoden ga optimal RNA-kvalitet, ble det besluttet å vente med analyse på Agilent 2100 Bioanalyser av de resterende prøvene (en tredjedel av prøvene) til de var ferdig DNase-behandlet.

RNA-konsentrasjoner fra analyse med Agilent 2100 Bioanalyser for de prøvene som ble analysert etter DNase-behandling, ble sammen med konsentrasjonene fra NanoDrop brukt til å beregne gjennomsnittlig RNA-konsentrasjon. Hos de prøvene som hadde blitt analysert på Agilent 2100 Bioanalyser før DNase-behandling, ble RNA-konsentrasjonene beregnet basert på målinger bare fra NanoDrop, siden alle NanoDrop-målingene var målt etter endt DNase-behandling.

3.2.2 cDNA-syntese

Prøven med lavest RNA-konsentrasjon (97 ng/µl) ble brukt som utgangspunkt for å beregne det RNA-volumet som trengtes fra hver enkelt prøve til syntese av cDNA ved bruk av revers transkriptase. Av denne prøven ble det brukt maksimal mengde, det vil si 14 µl, og av de andre

prøvene ble det brukt samme antall nanogram. Siden prøvene hadde ulike RNA-konsentrasjoner, ble også RNA-volumet til syntese av cDNA forskjellig mellom prøvene. Prøvene som hadde et RNA-volum på mindre enn 14 µl, ble tilsatt et visst volum av nukleasefritt vann for å få totalvolumet til å bli 20 µl.

Siden det var behov for større mengder cDNA enn 20 µl, ble flere tekniske replikater av cDNA-syntesen utført, og deretter samlet i ett rør etter kvalitetstest på agarosegel. Prøvene stod på is, og reaksjonsblandningene ble også utarbeidet på is.

Reaksjonsblanding:

5X VILO™ Reaction Mix	4 µl
10X SuperScript® Enzyme Mix	2 µl
RNA	x µl
Nukleasefritt H ₂ O	Opp til 20 µl
Totalvolum	20 µl

Reagensene ble blandet i brønner på en PCR-plate, vortexet forsiktig og sentrifugert ved 1000 rpm i ett minutt ved hjelp av Centrifuge 5810 R (Eppendorf). Det var viktig at de ble blandet tilstrekkelig før reaksjonen, samtidig som det var vesentlig å unngå luftbobler i brønnene. Innstillingene for syntese av cDNA var:

25 °C i 10 minutter

42 °C i 60 minutter

85 °C i 5 minutter

Etter endt syntese av cDNA ble alle tekniske replikater av hver cDNA-prøve testet ved 1% agarose gelelektroforese. Dette var for å kunne se om transkripsjonen med revers transkriptase var utført riktig og om kvaliteten på cDNA var optimal for å kunne brukes videre til de endelige genekspressjonsstudiene med qPCR. Godt cDNA kjennetegnes av en ”utsmøring” (”smear”) etter test med agarose gelelektroforese. cDNA som ikke hadde optimal kvalitet, ble rensset med GenElute PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich) (se avsnitt nedenfor), og cDNA ble lagret ved -20 °C.

For noen prøver ble det nødvendig å gjenta cDNA-syntese med en modifisert protokoll med denaturering av RNA før cDNA-syntese. Dette er ikke beskrevet i manualen til cDNA-syntese fra SuperScript® VILO™ (Invitrogen), men har kommet som et forslag fra andre. Denaturering

ble gjort ved å inkubere RNA-prøvene ved 65 °C i fem minutter, og disse ble satt direkte på is etter denatureringen. Det ble deretter syntetisert nytt cDNA på vanlig måte med de denaturerte RNA-prøvene. Dette viste seg å løse problemer som oppsto med noen cDNA-synteser.

Noen cDNA-synteser så ikke ut til å ha fungert riktig (se figur 17 i resultatdelen), og disse prøvene ble forsøkt rensset med GenElute Clean-Up Kit fra Sigma-Aldrich. Der det var flere tekniske replikater av en prøve som måtte renses, ble alle disse replikatene slått sammen på forhånd.

Til sentrifugeringssteg ved rensing av cDNA ble Biofuge pico (Heraeus Instruments) brukt som sentrifuge. Som forberedelse til hver rensing ble en mini spinn-kolonnie til hver prøve satt inn i et 2 ml oppsamlingsrør. For hver av mini spinn-kolonnene i oppsamlingsrørene ble 500 µl kolonne prepareringsløsning tilsatt, og rørene ble sentrifugert på maksimal hastighet i ett minutt. Eluatet ble kastet. Kolonne-prepareringsløsningen skulle gi maksimal binding av DNA til membranen (produktbeskrivelse til GenElute PCR Clean-Up Kit fra Sigma-Aldrich). Forholdet mellom cDNA og bindingsløsning var 1:5. For hver prøve ble dette blandet godt sammen i et eget eppendorfrør, før det ble overført til en bindingskolonne. Kolonnene ble sentrifugert på maksimal hastighet i ett minutt, og eluatet ble kastet, mens oppsamlingsrørene ble tatt vare på. Bindingskolonnene ble satt tilbake i respektive oppsamlingsrør, og 500 µl fortynnet vaskeløsning ble overført til hver kolonne. Den fortynnede vaskeløsningen var på forhånd fortynnet med 48 ml 96 % etanol. Rørene ble sentrifugert på maksimal hastighet i ett minutt, og eluatet ble kastet. Oppsamlingsrørene ble igjen tatt vare på, og bindingskolonnene ble satt tilbake i tilhørende oppsamlingsrør. Rørene ble videre sentrifugert på maksimal hastighet, denne gangen i 2 minutter uten noe ekstra vaskeløsning. Dette ble gjort for å fjerne eventuelle rester av etanol fra vaskeløsningen. Eluatene fra sentrifugeringen ble kastet, i tillegg til oppsamlingsrørene. Bindingskolonnene ble overført til nye 2 ml oppsamlingsrør, og eluat i form av nukleasefritt vann ble tilsatt i sentrum av hver kolonne. For hver 20 µl cDNA ble det tilsatt 20 µl eluat, og hver prøve fikk i tillegg 5 µl ekstra eluat i slingringsmonn, slik at 60 µl cDNA ble tilsatt 65 µl eluat, og 80 µl cDNA ble tilsatt 85 µl eluat. Rørene ble inkubert i romtemperatur i to minutter. Siden elueringen var i form av nukleasefritt vann, var det viktig at pH var mellom 5,5 og 8,5 (produktbeskrivelse til GenElute PCR Clean-Up Kit fra Sigma-Aldrich). For å eluere DNA, ble kolonnene sentrifugert på maksimal hastighet i ett minutt. Etter sentrifugeringen lå eluat for hver prøve i bunnen av de respektive oppsamlingsrørene, og PCR-produktet (renset cDNA) var i dette eluatet. De rensede cDNA-prøvene ble testet med 1 % agarose gelelektroforese for å sjekke kvaliteten på cDNA etter rensing.

Reaksjonsparallellene (tekniske paralleller) av resten av cDNA-prøvene som ikke trengte å bli rensset, hadde altså god kvalitet ifølge agarose gelektroforesene. Disse replikatene ble derfor direkte slått sammen i felles eppendorfrør for hver prøve. Totalvolumet av cDNA fra hver prøve ble målt, og noe nukleasefritt vann ble tilsatt der noe cDNA hadde gått tapt i ulike reaksjonssteg.

3.2.3 Primerdesign

Som forberedelse til primerdesign av husholdningsgenet *beta-tubulin* (β -*tubulin*), ble sekvenser for dette genet hos de fire artene; *F. avenaceum*, *F. langsethiae*, *F. culmorum* og *F. graminearum*, alignet ved hjelp av ClustalW. Alle sekvenser som ble brukt i denne alignmenten, var hentet fra GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov>). Programmet Primer3 (versjon 0.4.0.) ble brukt til primerdesign ved å bruke sekvensene som var alignet. For å finne artsspesifikke primere, ble forward primere og reverse primere funnet manuelt og testet i Primer3. Produktstørrelsen, det vil si størrelsen fra første nukleotid som forward primer binder, og til siste nukleotid som reverse primer binder, ble stilt inn på mellom 70 og 150 basepar, men noe slingringsmonn ble godtatt hvis det var vanskelig å finne gode primerpar. Størrelsen på primerne ble stilt til å være minst 16-25 og maksimalt 25 nukleotider lange. Smeltetemperaturen måtte være så nær 60 °C som mulig. Innholdet av basene guanin og cytosin (GC) ble satt til 40-60 %, og i 3'enden ble det tillatt med maksimalt to eller tre av basene G og C, i tillegg til at siste base ikke kunne ende på G. Disse kriteriene var av betydning for å finne primerpar som ville binde så godt som mulig. I tillegg var det viktig at det var lite selvkomplementaritet og komplementaritet for hvert primerpar, slik at det ikke ble dannet hårnålstrukturer og primer-dimers.

3.2.4 Genekspresjonsstudier med qPCR

Test av primerspesifisitet og effektivitet

I tillegg til de designede primerparene for *β-tubulin*, var det allerede designet primerpar for *UBC* (som koder for ubiquitin konjugerende-enzym) og de mykotoksin-relaterte genene; *Dep5*, *Tri1* og *Tri16* for *F. langsethiae*, *Esyn* for *F. avenaceum* og *Tri1* for både *F. culmorum* og *F. graminearum*. I noen tilfeller var det designet flere alternative primerpar for ett bestemt gen.

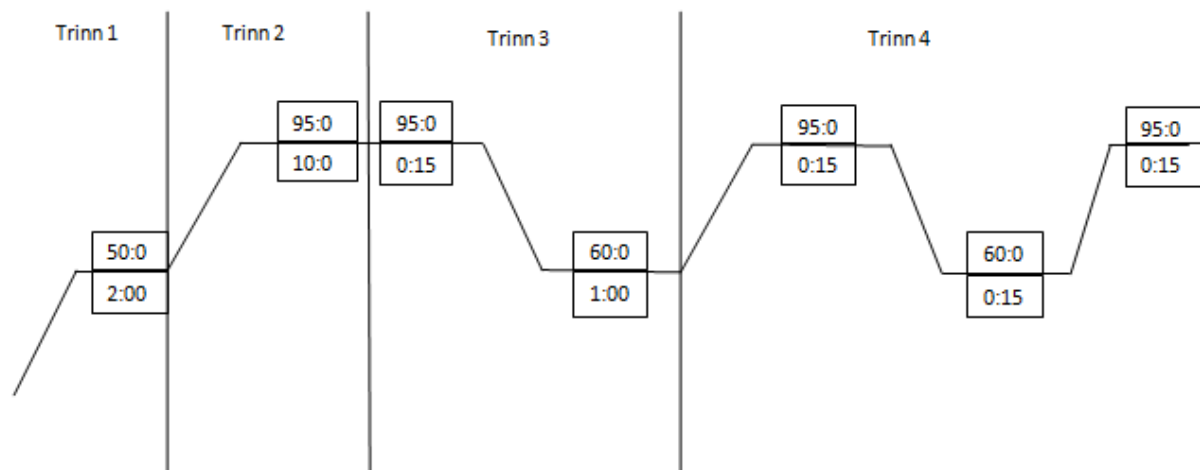
Primerparene ble testet for spesifisitet og effektivitet. Hensikten med spesifisitetstester var å finne hvilke primerpar som fungerte best til ett bestemt gen hos hver av de fire *Fusarium*-artene, samt at det ikke ga resultat hos de andre artene. Tilsvarende ble effektivitetstester utført for å beregne E-verdier som ble brukt under beregning av genekspresjon. Tabell 4 under materialer viser en oversikt over primerpar for husholdningsgener og mykotoksin-relaterte gener hos de fire *Fusarium*-artene som ble testet i denne oppgaven. Alle primerne som var tilsendt fra Invitrogen, var frysetørket og ble derfor løst i sterilt vann til en stockløsning med konsentrasjon på 0,1 nmol/μl. Videre ble det laget en bruksløsning på 2 pmol/μl.

Primerparenes spesifisitet ble testet ved qPCR med SybrGreen. Genomisk DNA for hver av de fire *Fusarium*-artene, 21A (*F. avenaceum*), 14C (*F. culmorum*), 34G (*F. graminearum*) og 88L (*F. langsethiae*), ble brukt som templat ved spesifisitetstestene. Det genomiske DNAet til hver art ble fortynnet til en konsentrasjon på 0,05 ng/μl, og det ble laget en egen mastermiks for hvert primerpar som ble testet for spesifisitet. Denne ble utarbeidet på is.

Mastermiks for hver prøve:

Sybr Green, 2X	10,0 μl
Forward primer, 2pmol/μl	2,0 μl
Reverse primer, 2pmol/μl	2,0 μl
<u>Sterilt H₂O</u>	<u>4,0 μl</u>
Totalvolum mastermiks	18,0 μl

Totalvolumet for hver prøve var 20 μl, og volumet av genomisk DNA utgjorde 2 μl. Som negative kontroller ble 2 μl havre-DNA (50 ng/μl) og 2 μl sterilt vann brukt, i ulike brønner. Det ble benyttet tekniske paralleller for hver prøve i PCR-platen, også for kontrollene. Etter endt pipettering av mastermiks og templat på 2 μl, ble platen forseglet med plast og sentrifugert ved 4000 rpm i to minutter ved hjelp av Centrifuge 5810 R (Eppendorf), før den ble analysert med qPCR, etterfulgt av en smeltepunktsanalyse (se figur 14).



Figur 14: qPCR program brukt til å teste spesifisitet og effektivitet av primerparene. Dissosiasjonskurven ble analysert i form av et utvidet steg (trinn 4).

Primerparene som ga spesifikk amplifisering hos bestemte *Fusarium*-arter, ble også testet på uforynnnet cDNA, unntatt cDNA av kontrollprøvene (som ikke ble infisert med *Fusarium*). Analysen ble da utført med qPCR. Mykotoksin-relaterte gener for *F. langsethiae*, *F. culmorum* og *F. graminearum*, samt primerparet EsynSKf/EsynSKr for *F. avenaceum*, ble testet på prøver høstet 14 dpi. De resterende primerparene for *Esyn* for *F. avenaceum*, samt alle husholdningsgenene for de fire *Fusarium*-artene ble testet på prøver høstet 10 dpi. Begge dagene ble valgt for ikke å bruke for mye cDNA fra én dag. Hvert primerpar hadde hver sin positive kontroll, i dette tilfellet genomisk DNA fra bestemt *Fusarium*-art. Sterilt vann ble brukt som negativ kontroll. Det ble også denne gangen brukt to tekniske replikater av hver prøve, og fremgangsmåten og volumene var de samme som ved spesifisitetstest med genomisk DNA.

De primerparene som viste seg å være spesifikke, ble videre testet for PCR-effektivitet, og i denne forbindelse ble ti ganger fortyningsserier av genomisk DNA benyttet for hver av de fire artene. Fortyningsserien gikk fra 1 picogram (pg) til 10 nanogram (ng). Tabell 7 i resultatdelen viser oversikt over primerparene som ble testet for effektivitet. Det genomiske DNAet og mastermiksen var de samme som brukt ved første spesifisitetstest, og volumene var også de samme. Til test av effektivitet ble det i likhet med spesifisitetstestene brukt to tekniske replikater av hver prøve. Selv om det i dette tilfellet ble brukt fortyningsserier av genomisk DNA, var ellers fremgangsmåten tilsvarende som ved test av spesifisitet, med 45 syklere i qPCR-reaksjonen, fulgt av en smeltepunktsanalyse. Analyse av data fra qPCR ble gjort gjennom programvaren SDS, versjon 2.3 (Applied Biosystems), ved hjelp av en standardkurve.

Stigningstallet til standardkurven ble brukt til å beregne effektiviteten av hvert primerpar ved hjelp av følgende formel:

$$E = 10^{-1/\text{stigningstall}} \quad (\text{Dorak 2006})$$

Intervallene som kan godtas for effektivitetsverdier strekker seg fra $E = 1,60$ til $E = 2,10$. I teorien kan effektivitetsverdien maksimalt være 2,0, siden dette tilsvarer 100 %, men til tross for det, kan E -verdier opp til 2,10 godtas (Pfaffl 2004).

Ekspresjonsanalyser med cDNA

Ett primerpar for hvert enkelt gen hos de fire *Fusarium*-artene ble valgt ut på bakgrunn av effektivitetstestene. De med best effektivitet ble benyttet til hovedanalysene av genekspressionsstudiene med cDNA (se tabell 7 i resultatdel). For hver av de fire artene ble det utført qPCR av de to husholdningsgenene; *β -tubulin* og *UBC*, i tillegg til de ulike mykotoksinrelaterte genene. Det ble laget en egen mastermiks for hvert primerpar som ble utarbeidet på is (se oppsett under avsnittet for spesifisitetstest). Fra hver prøve ble det brukt 2 μ l cDNA i en brønn. Som positiv kontroll ble 2 μ l genomisk DNA fra hver enkelt art benyttet, og som negativ kontroll ble 2 μ l sterilt vann benyttet. Det ble også denne gangen benyttet to tekniske replikater. Pipetteringen av mastermiks og templat i PCR-platen ble enten utført manuelt eller ved hjelp av pipetteringsroboten *epmotion 5070*. PCR-platen ble forseglet med plastfolie og sentrifugert ved 4000 rpm i to minutter ved hjelp av Centrifuge 5810 R (Eppendorf). Programmet for qPCR var det samme som for testing av spesifisitet (se figur 14).

3.3 Data-analyser

Resultatene fra qPCR-reaksjonen ble videre analysert ved hjelp av SDS-programvaren (versjon 2.3) fra Applied Biosystems. Resultatene fra qPCR var i form av CT-verdier, replikasjonsplott og dissosiasjonskurver. Replikasjonsplottene og dissosiasjonskurvene ble studert nøye sammen med CT-verdiene. Det var viktig å se om CT-verdiene var sanne for å skille mellom gener som

faktisk var uttrykt og hvilke som ikke var det. Dersom de ikke var det, kunne dette observeres i dissosiasjonskurvene ved at det ikke var signal ved riktig smeltetemperatur, samt uspesifikk reaksjon. Dissosiasjonskurvene og CT-verdiene til de tekniske replikatene for hver prøve ble sammenlignet spesielt godt for å se samsvaret mellom disse, siden de inneholdt identisk templat. Dersom den ene tekniske replikaten ga uttrykk, mens den andre tekniske replikaten ikke gjorde det, var det grunnlag for en ny analyse av denne prøven med det bestemte primerparet det gjaldt. Det var viktig å sjekke om husholdningsgenene var uttrykt i alle prøvene, siden dette er gener som er essensielle for at celler skal kunne overleve (Thellin et al. 1999) og som skulle brukes til normalisering av de mykotoksin-relaterte genene. Dersom et husholdningsgen ikke var uttrykt, ble prøvene der dette var tilfelle studert nærmere for å finne eventuell årsak til feilkilde.

Videre ble gjennomsnittsverdiene for CT-verdiene fra de tekniske replikatene fra en prøve benyttet i analysene. Det ble satt grenser for standardavvik og forskjell mellom CT-verdiene hos de tekniske replikatene av en prøve for å kunne ha tydelige avgrensninger for akseptable forskjeller. Dersom det var mer enn 1 CT-verdi i forskjell mellom disse, eller maksimalt 0,75 i standardavvik, ble prøvene kjørt på nytt. De gjennomsnittlige CT-verdiene var grunnlaget for videre dataanalyser. Når husholdningsgenene var uttrykt og samsvaret mellom de tekniske replikatene i alle prøvene var akseptabelt, ble gjennomsnittet av CT-verdiene for alle prøvene beregnet. Disse gjennomsnittsverdiene skulle brukes videre i dataanalyser ved hjelp av bioinformatiske programvarer. Husholdningsgener ble benyttet for å normalisere prøvene som ble benyttet i genekspresjonsstudiene (Dheda et al. 2004), og de gjennomsnittlige CT-verdiene fra disse genene ble kjørt i programvaren BestKeeper versjon 1 (Pfaffl et al. 2004). Hensikten var å undersøke om de valgte husholdningsgenene var egnet for normalisering og kombinere dem i en indeks, en BestKeeper-verdi (Pfaffl et al. 2004), som ble brukt til å normalisere målgener ved hjelp av formelen til Pfaffl et al. (2001), med små modifikasjoner (se formel I nedenfor). Videre ble de mykotoksin-relaterte genene sammenlignet mot én bestemt prøve som ble satt til verdi 1. Også her ble de gjennomsnittlige CT-verdiene fra hver prøve brukt. Utgangspunktet for å velge en prøve, basert på dens biologiske replikater, var prøver som var høstet ved 10 dpi og der en *Fusarium*-art var alene og inokulert med halv dose. Dette gjaldt ikke genet *Dep5*, der referansen var *F. langsethiae* alene på agarskål (se nærmere beskrivelse i resultatdel). Grunnen til disse kriteriene var at det gjorde det lettere å se hvordan uttrykk av et gen eventuelt forandrer seg når soppen er alene og sammen med andre. I tillegg var det fordel å velge det tidligste tidspunktet for å lettere se hvordan uttrykket eventuelt utviklet seg eller forandret seg ved senere tidspunkt. Alle biologiske replikater fra hver prøve ble analysert

individuelt og ikke som et gjennomsnitt ved beregningen av relativ genekspressjon. Dette var for å få fram variasjonen i de biologiske replikatene.

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{tar}})^{\Delta\text{Ct tar}} (\text{Mean control} - \text{Individual sample})}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{Ct ref}} (\text{Mean control} - \text{Individual sample})} \quad (\text{I})$$

Der R = relativ genekspressjon, E = effektivitet, og target og ref står for henholdsvis mykotoksin-relatert gen (målgen) og referansebehandling. Modifisert utgave er at individuelle prøver for målgener og referanse er sammenlignet mot gjennomsnittsverdiene. Dette var for å få fram variasjonen innenfor de biologiske replikatene (Pfaffl 2001).

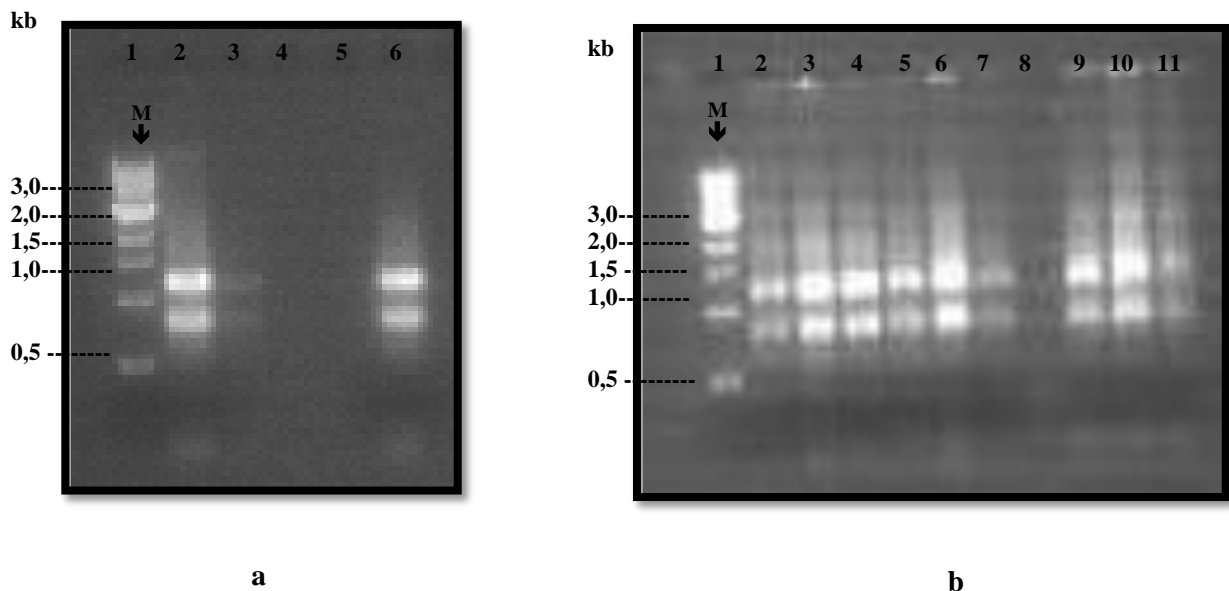
For hvert gen var prøvene relativt uttrykt beregnet i forhold til en bestemt kontrollprøve. Relativ genekspressjon for ett bestemt gen hos hver *Fusarium*-art ble ved hjelp av disse beregningene vist i et Whiskers plott, basert på 25-, 50- og 75 % kvartiler og minimums-/maksimumsverdier som feilfelt. Det ble også utført en toveis students t-test (Target CT – Referanse CT) for alle prøvene, som ble sammenlignet mot en kontroll for å finne eventuelle signifikante forskjeller (P -verdi = < 0,05).

4.0 Resultater

Målet med denne oppgaven var å undersøke når toksingener fra de fire *Fusarium*-artene; *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* og *F. langsethiae*, er aktive i havre, og om ulike *Fusarium*-arter interagerer og påvirker genekspressjon av disse genene. Disse analysene ble utført ved hjelp av qPCR. Resultatdelen vil ta for seg hvilke vurderinger og optimaliseringer som ble gjort fra RNA-ekstraksjon og fram til analysene med cDNA. Resultatene fra genekspressjonsstudiet beskrives som opp- eller nedregulering av de mykotoksin-relaterte genene ved ulike tidspunkt etter inokulering med *Fusarium* i havre.

4.1 RNA ekstraksjon, kvantifisering og optimalisering

Det første trinnet var å ekstrahere total RNA fra havrekorn 10 og 14 dpi med ulike sporekonsentrasjoner eller kombinasjoner av *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* og *F. langsethiae*. Til å begynne med ble to tester for RNA-ekstraksjon prøvd ut for å finne en god metode til dette formålet, Fast RNA Pro Kit (qBiogene) og Trizol Reagent (Invitrogen) med havreprøver fra dag 6. Ifølge agarosegelelektroforese så begge ekstraksjonsmetodene ut til å fungere på dag 6, siden det var klare bånd for 18S og 25S RNA for havre og eventuelt noe 18S og 28S RNA for sopp. Uansett er det viktig å være klar over at det meste av ribosomalt RNA skyldes havre, siden det ribosomale RNAet fra soppen var minimal med tanke på at RNA-ekstraksjonen er tatt utgangspunkt i havrekorn som er smittet med *Fusarium*. Det ble besluttet å bruke Trizol Reagent videre. På RNA-prøver fra 10 og 14 dager fungerte derimot Trizol Reagent dårlig, noe som kan tyde på at senere utviklingsstadier (10 og 14 dpi) påvirket RNA-ekstraksjonen. Årsaken kan være det høyere innholdet av fett og stivelse på dag 10 og 14, i forhold til dag 6. Det ble besluttet å forsøke en annen ekstraksjonsmetode, Spectrum™ Plant Total RNA Kit fra Sigma-Aldrich, hvor både 6 og 14 dpi ble brukt som test for å undersøke om utviklingsstadier av havrekorn hadde innvirkning på kvaliteten av RNA-ekstraksjon. Den nye ekstraksjonsmetoden viste seg å virke greit for både prøver fra 6, 10 og 14 dpi (figur 15a og b), hvor det var tydelige bånd for 18S og 25S RNA (havre) og eventuelt 18S og 28S RNA (sopp). Det ble derfor besluttet å bruke Sigma Spectrum™ Plant Total RNA Kit videre.

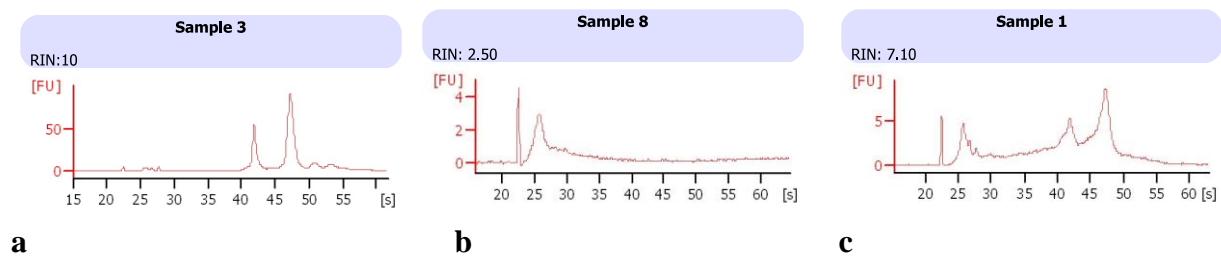


Figur 15: Agarose gelelektroforese (0,8 %) av RNA ekstrahert med Spectrum™ Plant Total RNA Kit.

a) To RNA-prøver høstet 6 og 14 dpi. Brønn 1 ble applisert med markør, **M**, og brønn 2 og 6 inneholder 3 µl RNA fra henholdsvis 6 og 14 dpi.

b) Forskjellige RNA-prøver (10 og 14 dpi) som ble ekstrahert med Spectrum™ Plant Total RNA Kit. I brønn nr. 1 ble markør, **M**, applisert. I resten av brønnene ble 3 µl RNA applisert.

Det ble videre besluttet å bruke Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies) for kontroll av RNA-kvalitet, siden denne metoden gir et mer nøyaktig bilde av kvaliteten og konsentrasjonen til RNA. Elektroferogrammer ble gitt for hver av de analyserte RNA-prøvene, sammen med RNA-konsentrasjoner og RIN-verdier. Dersom Bioanalyser viste tydelige bånd for 18S og 25S RNA (havre) og høye RIN-verdier (8-10), indikerte dette svært god RNA-kvalitet (Fleige & Pfaffl 2006). Figur 16 viser eksempel på svært god (a), dårlig (b) og middels (c) RNA-kvalitet av prøvene.



Figur 16: Resultat av tre ulike RNA-prøver analysert med Agilent 2100 Bioanalyser, med meget god RNA-kvalitet (a), dårlig RNA-kvalitet (b) og middels RNA-kvalitet (c).

De fleste prøvene viste beste kvalitet (RIN-verdi 10). Prøver med dårligere RIN-verdi enn 7 ble ekstrahert på nytt.

Det ble testet om ekstra DNase-behandling med Ambion Turbo DNA-free Kit eller Ambion DNA-free Kit påvirket kvaliteten på RNA. Denne hadde ingen innvirkning, og en testprøve med RIN-verdi på 10 før DNase-behandling, hadde også RIN-verdi 10 etter DNase-behandling (resultat ikke vist).

4.1.2 Test av DNA-kontaminering i RNA-prøvene

RNA-prøvene ble videre testet på qPCR for å se omfanget av DNA-kontaminering i prøvene, selv etter DNase-behandling. Til videre analyser var det viktig at det ikke var noe DNA i

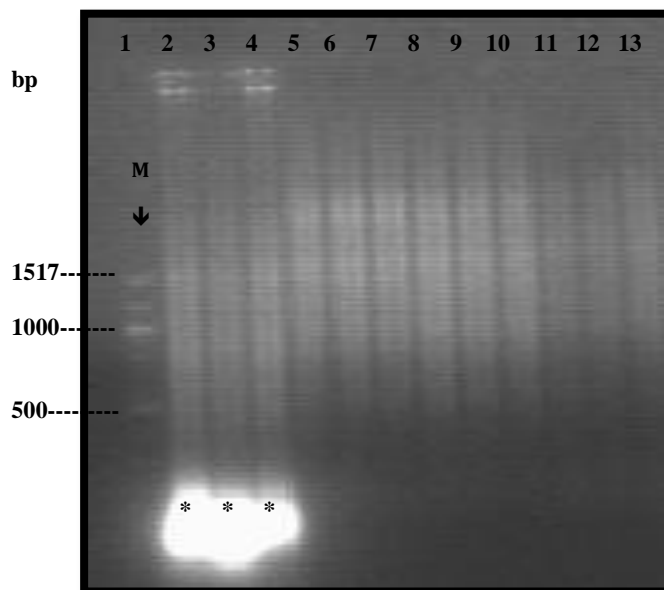
prøvene, og det måtte ofte tre DNase-behandlinger til før RNA-prøvene ble benyttet til cDNA-syntese og videre analyser.

4.1.3 Beregning av RNA-konsentrasjon og RNA-volum

Konsentrasjon av RNA for alle prøvene ble målt både med Agilent 2100 Bioanalyser og med NanoDrop. Gjennomsnittet av RNA-konsentrasjonene for hver prøve alt i alt varierte fra 97,0 ng/ μ l til 676,9 ng/ μ l. Det var ti prøver som måtte ekstraheres på nytt (2-4 ganger), siden de hadde en gjennomsnittlig RNA-konsentrasjon lavere enn 97 ng/ μ l. Av disse ti var åtte prøver høstet 14 dpi.

4.1.4 cDNA-syntese, kvalitetstest og rensing

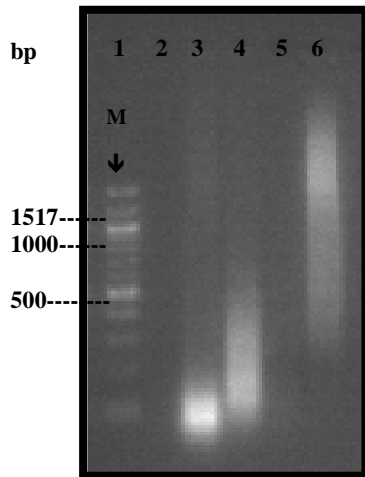
Det ble laget flere tekniske replikater av hver prøve i forbindelse med cDNA-syntese for å få nok materiale til genekspressjon. Ved gelelektroforese var det mulig å se hvilke cDNA-prøver som hadde fungert bra og hvilke som ikke hadde det (figur 17). cDNA-prøver fra samme RNA-prøve, der alle tekniske replikatene var av god kvalitet, ble slått sammen til én felles prøve.



Figur 17: Eksempel på 1 % agarosegelelektroforese av utvalgte cDNA-prøver. Av hver prøve var det tre tekniske replikater. Som markør (M) ble 3 μ l 100 bp ladder brukt. Det ble applisert 3 μ l cDNA i de andre brønnene. Noen prøver skiller seg ut, og disse er markert med symbolet *.

cDNA-prøvene vist som ”utsmøringer” (”smears”) ved analyse på gel, men noen skilte seg ut ved en oppsamling av lavmolekylært materiale (figur 17). Slike oppsamlinger kunne tyde på

dårlig kvalitet av cDNA, og disse ble derfor renset med GenElute Clean-Up Kit fra Sigma-Aldrich for å forsøke og forbedre kvaliteten. De andre prøvene som syntes å ha optimal kvalitet, ble ikke renset. Det var fem ulike prøver, hvor cDNA fra én eller flere tekniske replikater ble renset. Blant disse var fire prøver fra 14 dpi. Figur 18 viser resultater med fire av de rensede cDNA-prøvene, det vil si prøver høstet 14 dpi.



Figur 18: Agarose gelelektroforese (1 %) med cDNA renset med GenElute PCR Clean-Up Kit. Som markør (M) ble 3 μ l 100 bp ladder brukt. Brønn 2 er tom, og brønn 3-6 ble applisert med 1 μ l cDNA.

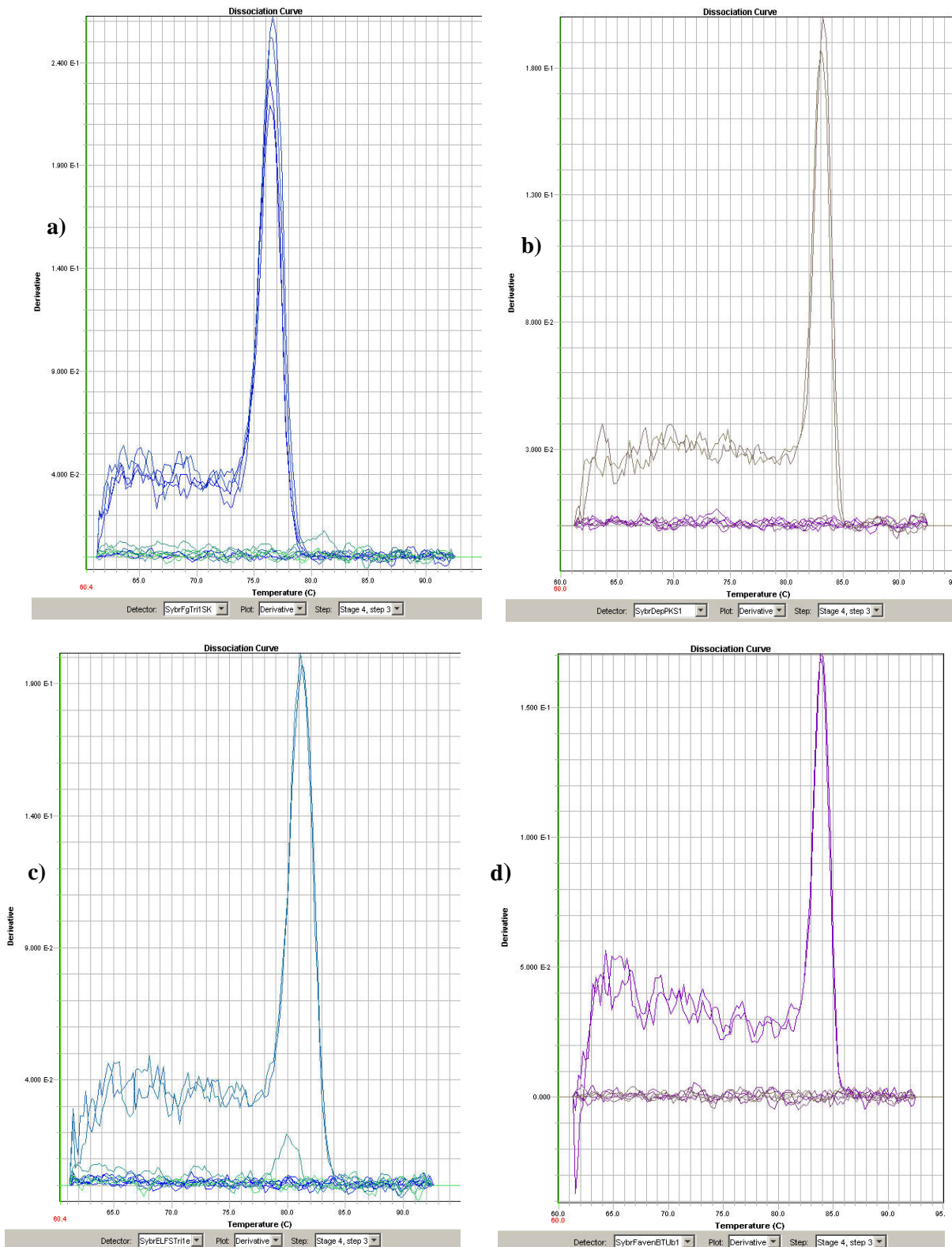
Ifølge figur 18 var det blitt noe forbedring, men de er allikevel ikke av samme cDNA-kvalitet som cDNA-prøvene med god kvalitet i figur 18 over. Prøvene ble besluttet å bruke til videre analyser med genekspressjon.

4.1.5 Primerdesign og spesifisitets- og effektivitetstester

Primerpar for husholdningsgenet *β -tubulin* ble designet for artene *F. avenaceum*, *F. langsethiae*, *F. culmorum* og *F. graminearum* (tabell 4). Det ble også forsøkt å designe primerpar for et annet husholdningsgen, *elongeringsfaktor* (EF-1 α), men for få forskjeller i sekvensene mellom de fire *Fusarium*-artene gjorde at dette genet ble utelukket. I stedet ble det bestemt å bruke husholdningsgenet *UBC*. Primerpar for dette genet var allerede designet fra før på Bioforsk Plantehelse.

Alle primerparene for husholdningsgenene og de mykotoksin-relaterte genene (tabell 4) ble testet for spesifisitet. Spesifisitet for et primerpar kunne observeres ved en dissosiasjonskurve

ved riktig smeltetemperatur hos den aktuelle arten, men ikke hos de andre artene. Figur 19 viser eksempler på primerpar som ga gode dissosiasjonskurver ved spesifisitetstest med genomisk DNA.



Figur 19: Gode dissosiasjonskurver og spesifikke primerpar etter test med bruk av genomisk DNA som templat.

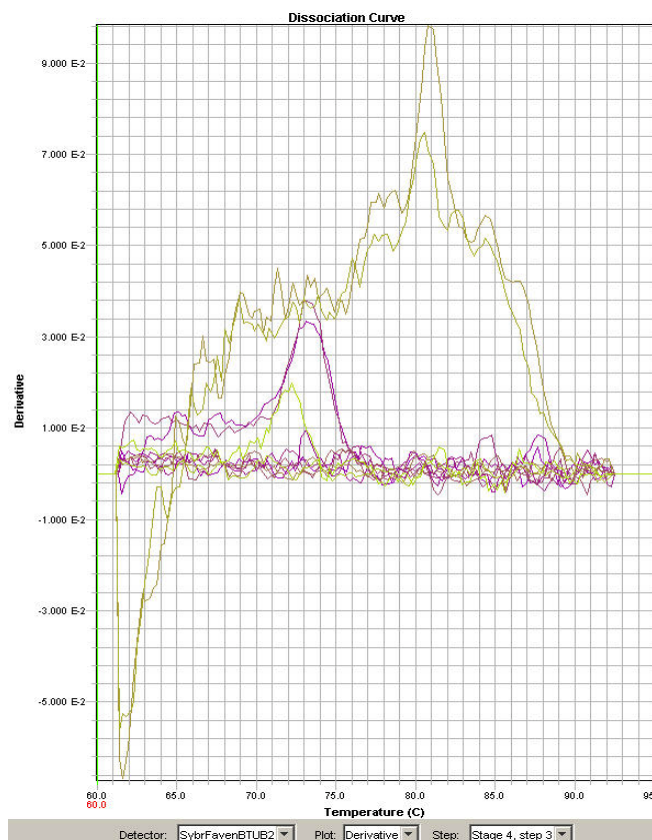
a) FgTri1SKf/FgTri1SKr – *Tri1* – *F. graminearum*/*F. culmorum*

b) DepPKS1f/DepPKSr1 – *Dep5* – *F. langsethiae*

c) ELFSTri1e-f/ELFSTri1e-r – *Tri1* – *F. langsethiae*

d) FavenBTUBf1/FavenBTUBr1 – β -*tubulin* – *F. avenaceum*

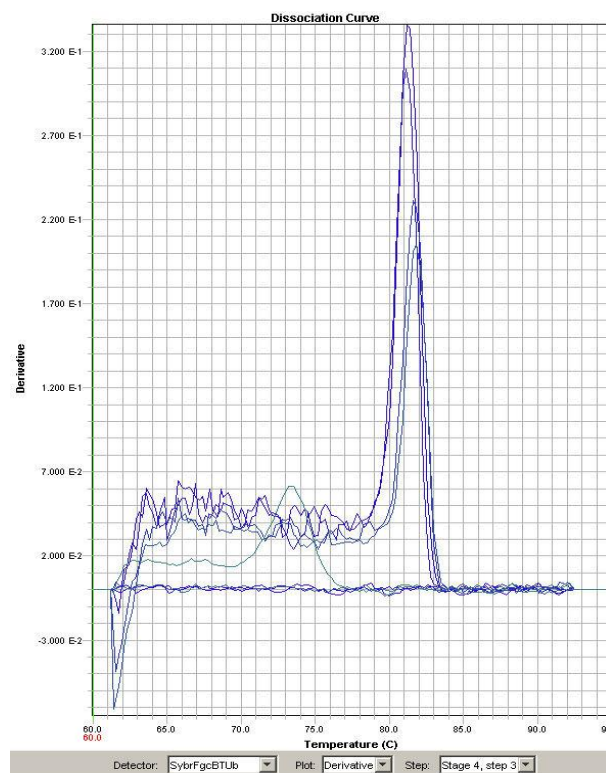
Dissosiasjonskurvene i figur 19 viste at disse primerparene var spesifikke for ett bestemt gen hos en av artene ved at det var én bestemt art som ga utslag i en ren dissosiasjonskurve. I hver av dissosiasjonskurvene i figur 19 var det noe ”grums” helt nederst som skyldtes andre arter som ikke primerparet var spesifikt til. De ble dermed brukt videre til testing av effektivitet. Det var ikke alle primerparene som viste seg å fungere like godt, og et slikt eksempel er vist i figur 20 nedenfor.



Figur 20: Dissosiasjonskurve som viser et ikke-spesifikt primerpar. Primerparet som ble testet her, er FavenBTUBf2/FavenBTUBr2 – (β -*tubulin* – *F. avenaceum*).

Primerparet FavenBTUBf2/FavenBTUBr2 viste seg å være uspesifikt og ble derfor ikke testet videre for effektivitet.

Det var også noen primerpar som var spesifikke for samme gen hos to nært beslektede *Fusarium*-arter. Et eksempel på dette er vist i figur 21 nedenfor.

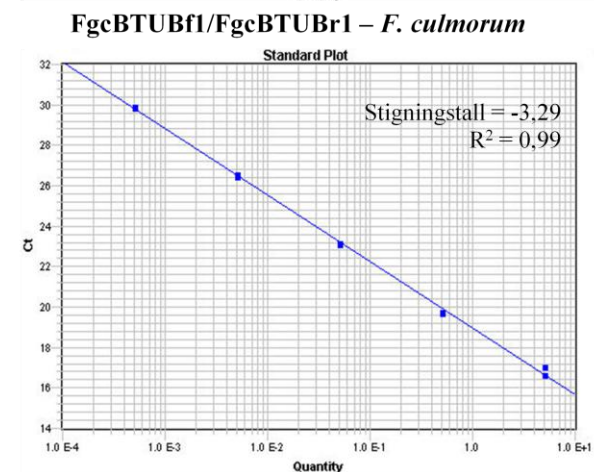
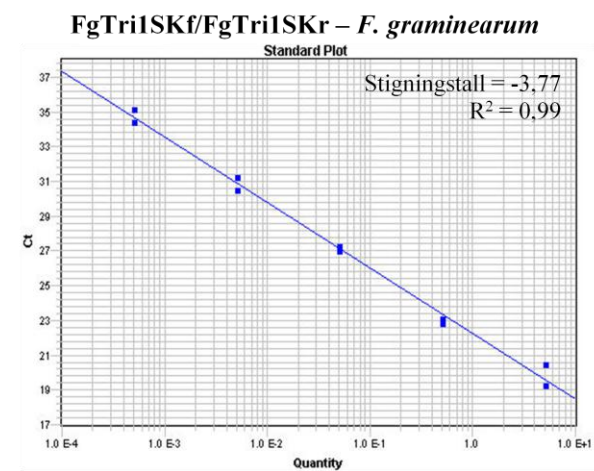
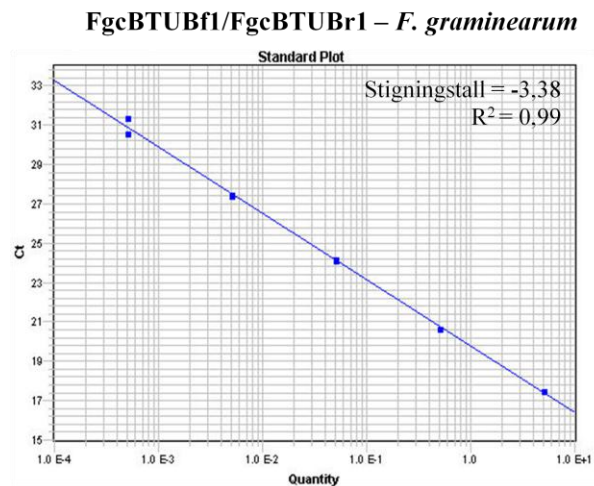


Figur 21: Primerparet FgcBTUbf1/FgcBTUbr1 (β -tubulin) som viste å være spesifikt for både *F. graminearum* og *F. culmorum*.

Primerparene FgTri1SKf/FgTri1SKr, FgcBTUBf1/FgcBTUBr1 og ELFGTri1f-f/ELFGTri1f-r var alle spesifikke for de to nært beslektede *Fusarium*-artene, *F. graminearum* og *F. culmorum*.

Det var for alle genene minst ett primerpar som viste seg å være spesifikt, både på genomisk DNA og cDNA. Samlet oversikt over primerpar som viste seg å være spesifikke etter spesifisitetstest med genomisk DNA og som ble testet for effektivitet, er vist i tabell 7. Bortsett fra primerparet EsynSKf/EsynSKr, fungerte de spesifikke primerparene (tabell 7) også på uforynnet cDNA (resultat ikke vist).

De primerparene som viste seg å være spesifikke med genomisk DNA (tabell 7), ble videre testet for PCR-effektivitet med ti ganger fortyningsserier av genomisk DNA. Eksempler på effektivitet med standardkurver er vist i figur 22 (a, b, c).



Figur 22: Eksempler på standardkurver for ulike primerpar. Stigningstallene og R²-verdiene for hver av standardkurvene er oppgitt.

- a) FgcBTUBf1/FgcBTUBr1 (β -tubulin) for *F. graminearum*.
- b) FgcBTUBf1/FgcBTUBr1 (β -tubulin) for *F. culmorum*.
- b) FGTri1SKf/FGTri1SK (*Tri1*) for *F. graminearum*.

Ifølge standardkurvene i figur 22 var primerparet FgcBTUBf1/FgcBTUBr1 (*β-tubulin*) og FgTri1SKf/FgTri1SKr (*Tri1*) effektive primerpar, og begge viste god effektivitet hos både *F. graminearum* og *F. culmorum*, der punktene i standardkurven ligger på en tilnærmet rett linje. Når det gjelder primerparet EsynSKf/EsynSKr (*Esyn*) for *F. avenaceum* (resultat ikke vist), viste primerparet seg å være lite effektivt og dermed lite gunstig til videre genekspressjonsstudier.

Effektivitetsverdiene for primerparene som ble valgt ut til de videre genekspressjonsanalysene lå innenfor intervallet i henhold til ”Quantification strategies in real-time PCR” (Pfaffl 2004). For noen gener var det to primerpar som var spesifikke for samme gen. Her ble det primerparet med best effektivitet og som lå innenfor dette intervallet, valgt ut (tabell 7). Primerne som ikke ble tatt med videre på bakgrunn av utvalgsriterier beskrevet over, er merket med * i tabell 7 nedenfor.

Tabell 7: Oversikt over primerparene som ble testet for effektivitet og deres verdier for effektivitet (E), basert på stigningstallet til standardkurven for hver prøve og formelen beskrevet over. Merket * er brukt for å markere hvilke prøver som ikke ble valgt videre, som følge av at det andre primerparet for ett bestemt gen hadde høyere effektivitet. De øvrige prøvene er valgt videre.

Primerpar	R ²	Effektivitet (E = 10 ^{-1/stigningstall})
<i>Mykotoksin-relaterte gener, primerpar og respektive Fusarium-arter</i>		
<i>Dep5</i> - DepPKsf1 / DepPKsr1 – <i>F. langsethiae</i>	0,99	1,86
<i>Tri16</i> - LANTri16f / LANTri16r – <i>F. langsethiae</i>	0,99	1,84
<i>Tri16</i> - ELTri16c-f/ELTri16c-r – <i>F. langsethiae</i>	0,99	1,83 *
<i>Tri1</i> - ELFSTri1e-f / ELFSTri1e-r – <i>F. langsethiae</i>	0,99	1,84
<i>Tri1</i> - FLTrif/FLTri1r – <i>F. langsethiae</i>	0,98	1,77 *
<i>Esyn</i> - EsynF1/EsynR1 – <i>F. avenaceum</i>	0,98	2,03
<i>Esyn</i> - EsynF2/EsynR1 – <i>F. avenaceum</i>	0,99	2,18 *
<i>Esyn</i> - EsynSKf/EsynSKr – <i>F. avenaceum</i>	0,98	2,1 *
<i>Tri1</i> - FGTri1SKf / FGTri1SKr – <i>F. graminearum</i> / <i>F. culmorum</i>	F. g.: 0,99 F. c.: 1	F. g.: 1,83/ F. c.: 1,96
<i>Tri1</i> - ELFGTri1f-f/ELFGTri1f-r –	0,99	1,77 *

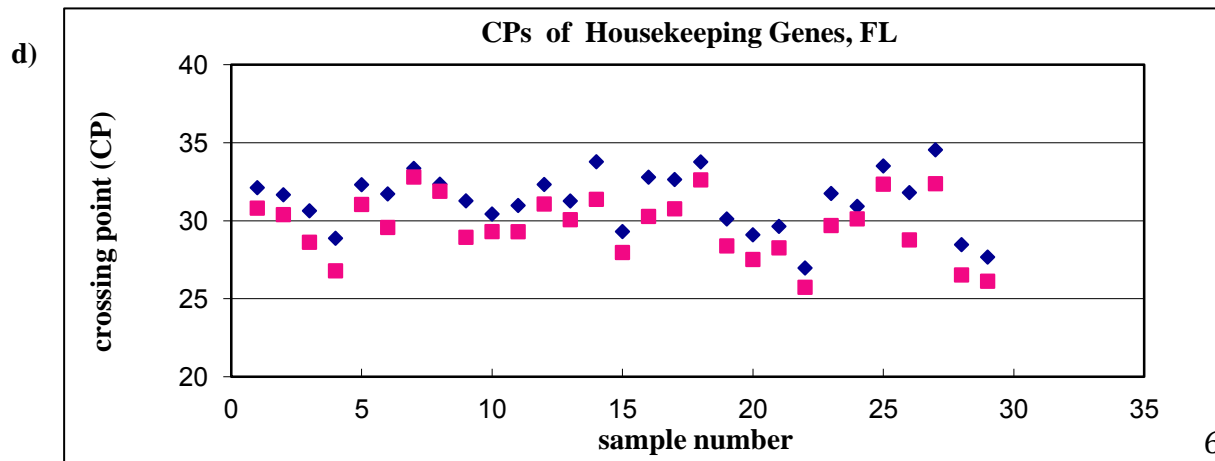
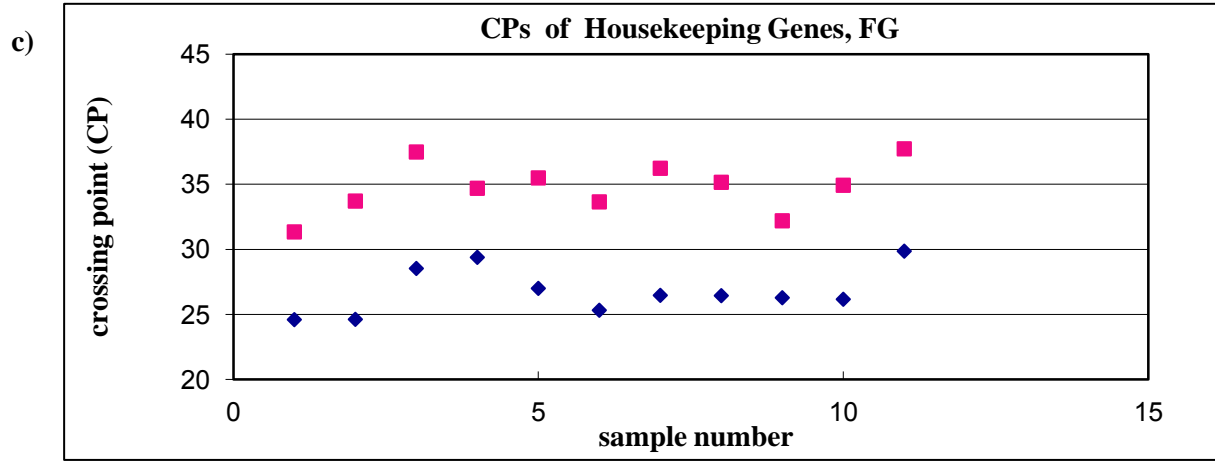
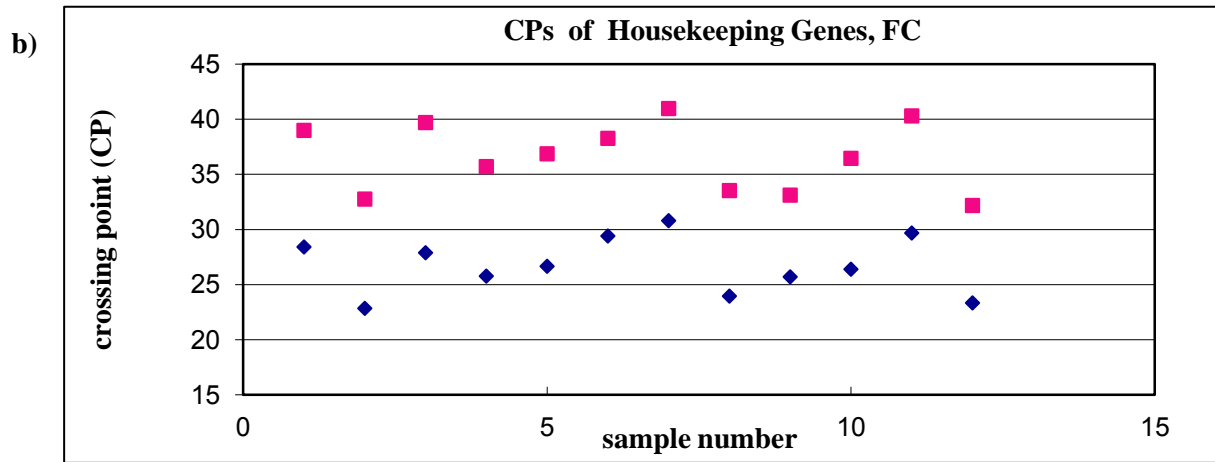
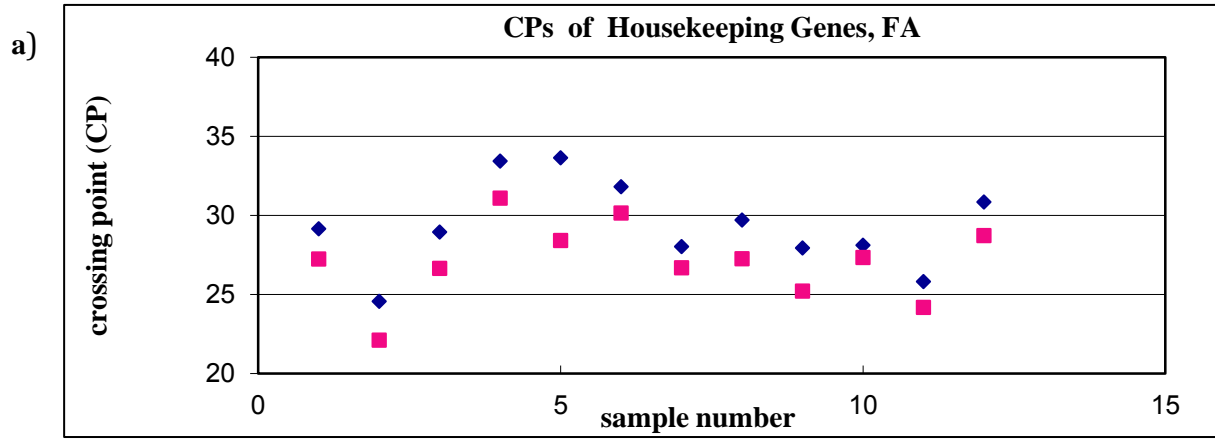
<i>F. graminearum/F. culmorum</i>		
Husholdningsgener og respektiv <i>Fusarium</i>-art		
<i>β-tubulin</i> - FlanBTUBf2/FlanBTUBr2 – <i>F. langsethiae</i>	0,98	2,08
<i>UBC</i> - FlanUBCf2/FlanUBCr2 – <i>F. langsethiae</i>	0,96	2,05
<i>β-tubulin</i> - FavenBTUBf1/FavenBTUBr1 – <i>F. avenaceum</i>	0,99	2,17
<i>UBC</i> - FavenUBCf1/FavenUBCr3 - <i>F. avenaceum</i> (Testet av masterstudent Martha Nymoene Tveit, 2012)	0,99	1,96
<i>β-tubulin</i> - FgcBTUBf1/FgcBTUBr1 – <i>F. graminearum/F. culmorum</i>	F. g.: 0,99 F. c.: 0,99	F. g.: 1,98 / F. c.: 2,01
<i>UBC</i> - FgraUBCf1/FgraUBCr1 – <i>F. graminearum/F. culmorum</i> (Testet på cDNA med <i>F. graminearum</i> av masterstudent Martha Nymoene Tveit, 2012)	0,99	1,96

4.2 Genekspresjonsstudier ved qPCR og dataanalyser

Det ble besluttet å bruke en *epmotion 5070* pipetteringsrobot ved genekspresjonsstudiet for å gjøre arbeidet mer effektivt. Det ble imidlertid observert unøyaktigheter i pipetteringen, og da spesielt ved pipettering av Sybr Green, og prøvene ble deretter i stedet pipettert manuelt.

Første prioritet var å sjekke om det var noen hemming i noen av prøvene. Ingen av de fire rensede prøvene fra 14 dpi viste noe uttrykk av husholdningsgenene *β-tubulin* og *UBC*. Utover dette var det også sju andre prøver som ikke ga uttrykk av ett eller begge husholdningsgenene. Siden totalt 11 prøver ikke ga uttrykk av ett eller begge husholdningsgenene, ble det besluttet å denaturere RNA fra disse prøvene, før cDNA-syntese og ny qPCR. Ved analyse av nye qPCR-data for disse prøvene (etter denaturering av RNA), viste prøvene uttrykk for husholdningsgenene, slik at prøvene kunne brukes videre til analyse.

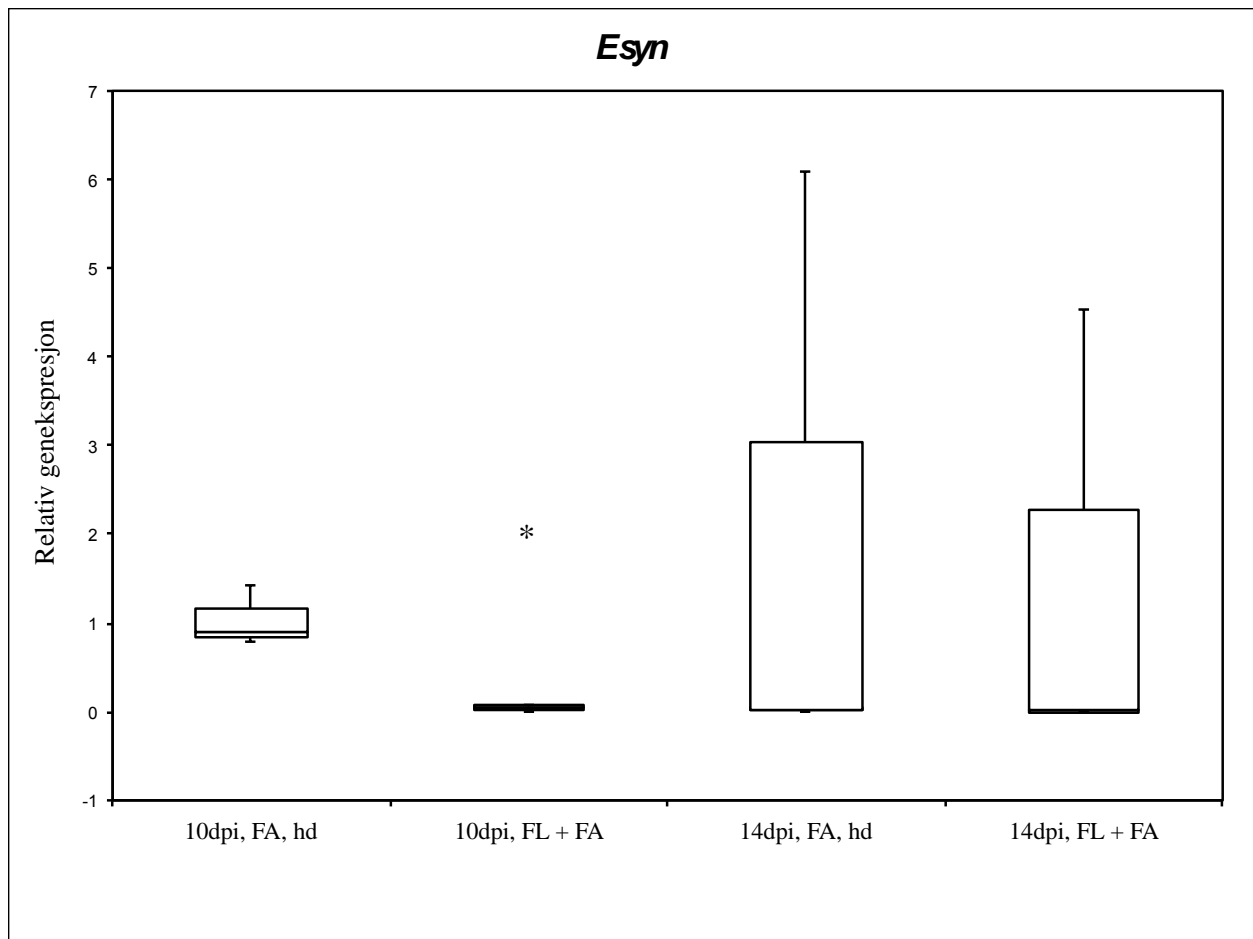
De gjennomsnittlige CT-verdiene for uttrykk av husholdningsgenene hos hver *Fusarium*-art ble videre analysert i programvaren BestKeeper for å se om husholdningsgenene var egnet for normalisering.



Figur 23: Grafer fra BestKeeper som viser forholdet mellom husholdningsgenene β -tubulin (◆) og *UBC* (■) hos alle de fire *Fusarium*-artene; a) *F. avenaceum* (FA), b) *F. culmorum* (FC), c) *F. graminearum* (FG) og d) *F. langsethiae* (FL).

Som det framgår av figur 23 (a-d), fulgte husholdningsgenene (β -tubulin og *UBC*) hverandre ganske godt hos alle fire artene. Aller best fulgte de hverandre hos *F. avenaceum* og *F. culmorum*, hvor bare et par prøver hos de to artene skilte seg noe ut. Hos *F. graminearum* og *F. langsethiae* fulgte ikke husholdningsgenene hverandre like bra, der noen få prøver skilte seg noe mer ut. Konklusjonene av analysene var at både β -tubulin og *UBC* var egnet som referansegener for alle fire artene.

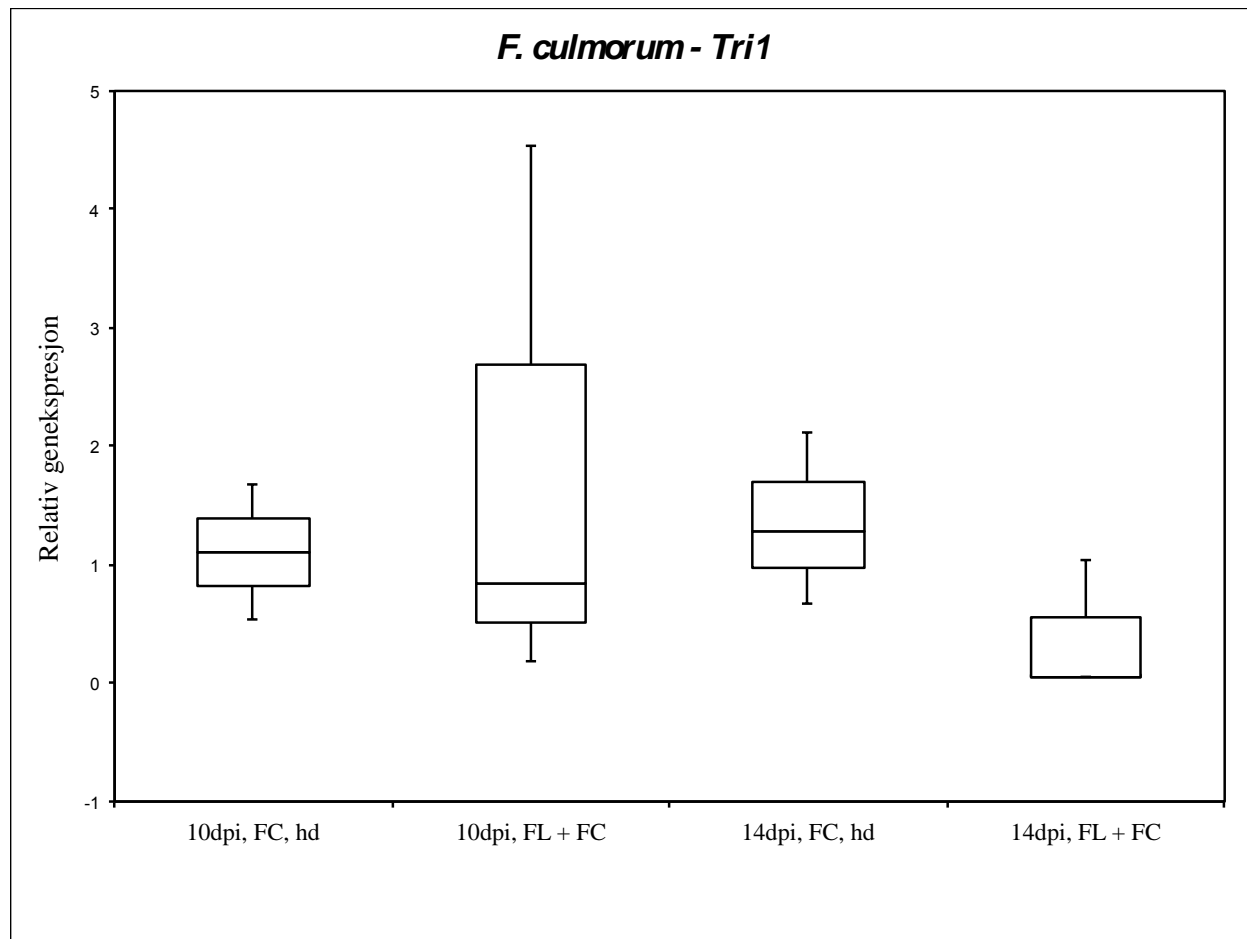
Uttrykket av de mykotoksin-relaterte genene ble derfor normalisert ved hjelp av BestKeeper-verdiene, og det relative ekspresjonsforholdet mellom prøvene og referanseprøven ble beregnet. Relativ genekspresjon for hvert av genene ble vist i Whiskers plott, og en toveis students t-test ble også utført. Figur 24 viser Whiskers plott for enniatin syntase (*Esyn*) hos *F. avenaceum*, der prøver av havre inokulert med *F. avenaceum* alene og med *F. avenaceum* sammen med *F. langsethiae*, fra 10 og 14 dpi, er undersøkt.



Figur 24: Relativ genekspressjon av *Esyn*, 10 og 14 dpi. Alle prøvene er relative til *F. avenaceum* (halv dose) 10 dpi som fungerer som referanse. Forkortelsene FA = *F. avenaceum*, FL = *F. langsethiae* og hd = halv dose. Alle prøvene, bortsett fra referanseprøven, er basert på to biologiske replikater. Feilfelt er minimums/maksimums-verdier. Symbolet * markerer prøven *F. langsethiae* + *F. avenaceum*, 10 dpi, som er signifikant forskjellig i forhold til referanseprøven i en toveis students t-test ($P = 0,005$).

F. langsethiae sammen med *F. avenaceum* 10 dpi var signifikant nedregulert i forhold til referanseprøven, FA 10dpi ($P = 0,005$). Det var ingen signifikant forskjell mellom *F. avenaceum* (halv dose) 14 dpi og *F. langsethiae* + *F. avenaceum* 14 dpi (P -verdi $> 0,05$), men *Esyn* hos disse var noe høyere enn samme prøver ved 10 dpi.

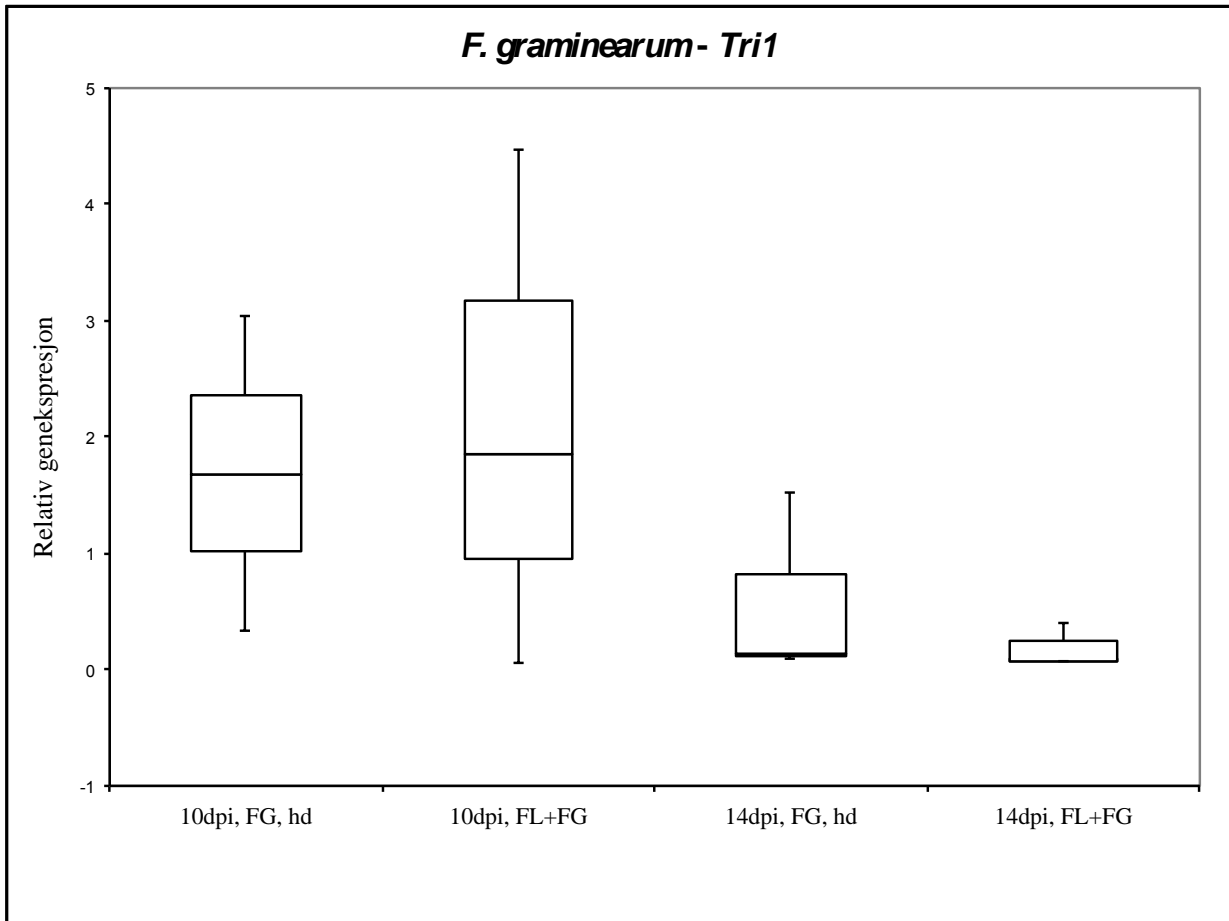
Whiskers plott i figur 25 viser relativ genekspressjon for *Tri1*-genet hos *F. culmorum*, der prøver med *F. culmorum* alene og *F. culmorum* sammen med *F. langsethiae* er undersøkt.



Figur 25: Relativ genekspressjon av *Tri1* hos *F. culmorum* (FC) alene og *F. culmorum* sammen med *F. langsethiae* (FL), 10 og 14 dpi. Prøvene er relative til *F. culmorum*, halv dose, 10 dpi. Forkortelsen hd står for halv dose. Alle prøvene er basert på tre biologiske replikater. Feilfelt er minimums-/maksimums-verdier.

Alle prøvene var beregnet relative til *F. culmorum* (halv dose) 10 dpi. Det var ingen av prøvene som viste seg å være signifikant forskjellig fra referanseprøven, og det var heller ingen signifikant forskjell mellom *F. culmorum* (halv dose) 14 dpi og *F. culmorum* + *F. langsethiae* 14 dpi. Uttrykket av *Tri1* hos *F. culmorum* + *F. langsethiae* 10 dpi syntes alt i alt å være ganske likt som referanseprøven, siden det bare var den ene biologiske replikaten hvor faktisk *Tri1* var høyere uttrykt, mens de to andre biologiske replikatene ga et lavere uttrykk. Der *F. langsethiae* vokste sammen med *F. culmorum* 14 dpi, syntes uttrykket å være noe lavere, sammenlignet med når *F. culmorum* vokste alene (halv dose) ved 14 dpi.

Relativ genekspressjon for *Tri1*-genet hos *F. graminearum*, der prøver med *F. graminearum* alene og *F. graminearum* sammen med *F. langsethiae* ble undersøkt, er vist i Whiskers plott i figur 26 nedenfor.

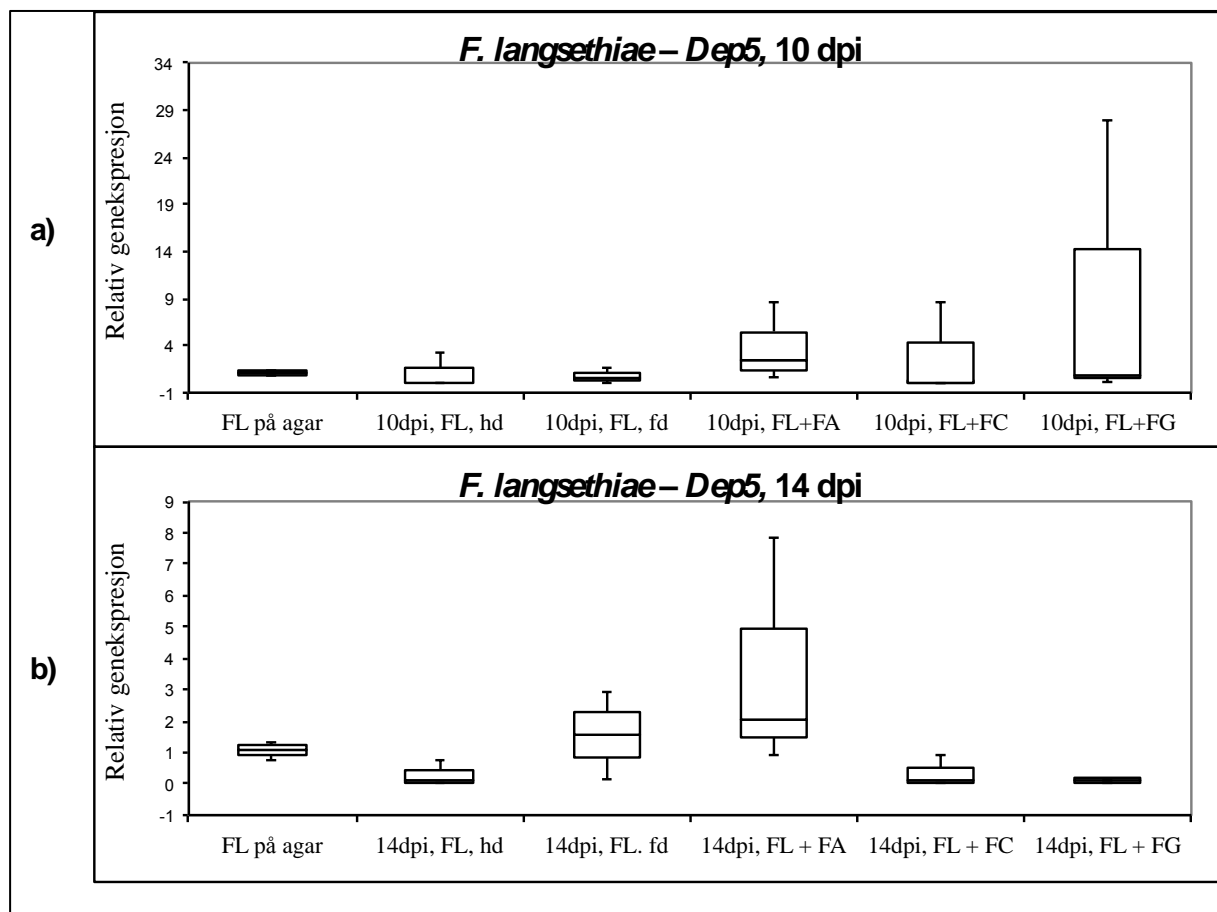


Figur 26: Relativ genekspressjon av *Tri1* for *F. graminearum* (FG) alene og *F. graminearum* sammen med *F. langsethiae* (FL), 10 og 14 dpi. Prøvene er relative til *F. graminearum*, halv dose, 10 dpi. Forkortelsen hd står for halv dose. Alle prøvene er basert på tre biologiske replikater, bortsett fra referanseprøven som er basert på to biologiske replikater. Feilfelt er minimums-/maksimums-verdier.

I dette tilfellet ble relativ genekspressjon beregnet i forhold til *F. graminearum* (halv dose) 10 dpi. I likhet med *Tri1* for *F. culmorum*, var det ingen av forskjellene som viste seg å være signifikante. Det var heller ingen signifikant forskjell mellom *F. graminearum* (halv dose) 14 dpi og *F. graminearum* + *F. langsethiae* 14dpi. Uttrykket av *Tri1* syntes å være omtrent det samme når *F. graminearum* vokste sammen med *F. langsethiae* 10 dpi, som uttrykket i referanseprøven. Det var for denne prøven (*F. graminearum* + *F. langsethiae*) bare én av de tre biologiske

replikatene som viste høyere uttrykk av dette genet. Uttrykket av *Tri1* så ut til å være forskjellig mellom 10 og 14 dpi, ved at uttrykket var generelt lavere ved 14 dpi, både for *F. graminearum* alene (halv dose) og der *F. graminearum* er sammen med *F. langsethiae*.

Figur 27 viser to Whiskers plott for relativ genekspressjon for depudecin polyketid syntase (*Dep5*) hos *F. langsethiae*, ett for 10 dpi (a) og ett for 14 dpi (b).



Figur 27: Relativ genekspressjon av *Dep5*. Alle prøvene er relative til *F. langsethiae* alene på agar.

Forkortelsene FL = *F. langsethiae*, FA = *F. avenaceum*, FC = *F. culmorum*, FG = *F. graminearum*, hd = halv dose, og fd = full dose. Feilfelt er minimums-/maksimums-verdier.

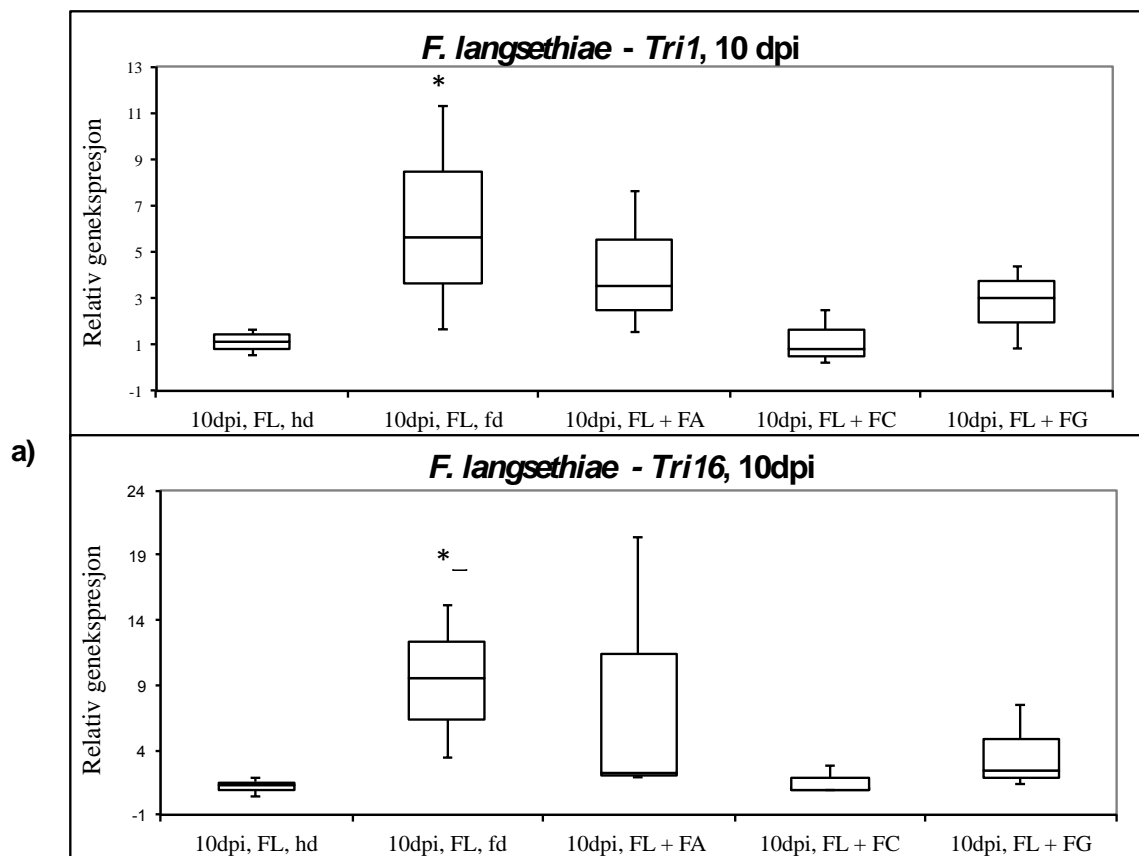
a) 10 dpi. Prøven *F. langsethiae* (full dose) er basert på to biologiske replikater i beregningen av relativ genekspressjon.

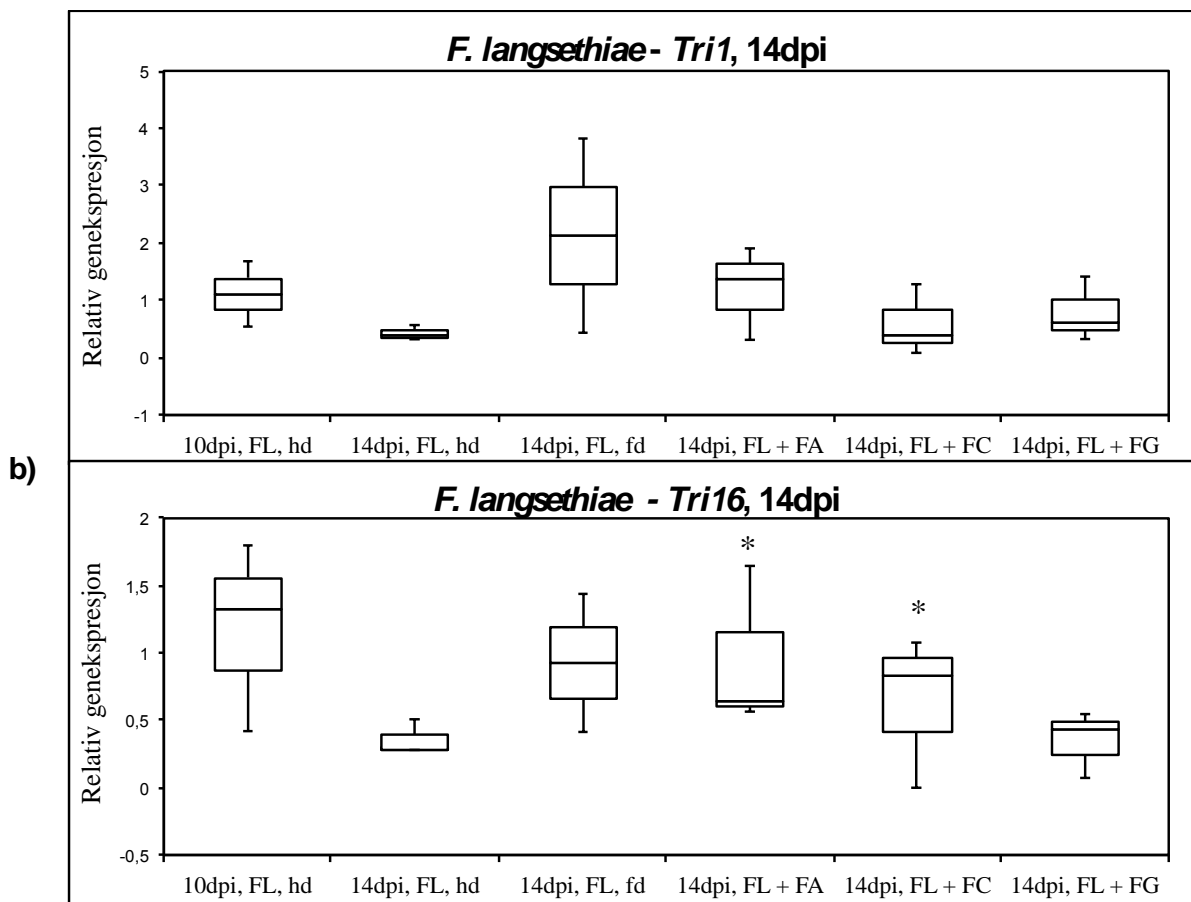
b) 14 dpi. Prøven *F. langsethiae* (full dose) var basert på bare to biologiske replikater.

Som det framgår av figuren, fungerte *F. langsethiae* dyrket alene på agar, som referanse. Grunnen til at ikke *F. langsethiae* (halv dose) 10dpi ble brukt som referanse i dette tilfellet, var

at bare én av tre biologiske replikater for denne prøven var uttrykt, og at denne prøven dermed var utilstrekkelig som referanseprøve. Ingen av prøvene hverken fra 10 eller 14 dpi viste signifikante forskjeller ifølge t-test (P -verdi $> 0,05$). *F. langsethiae* (full dose) 14 dpi så ut til å ha noe høyere uttrykk av *Dep5*, men årsaken kan være at det bare var to biologiske replikater fra denne prøven. Når det gjelder uttrykket av *Dep5* hos *F. langsethiae* sammen med *F. avenaceum*, så det ut til å være noe høyere, både ved 10 og 14 dpi, men det var betydelige variasjoner mellom de biologiske replikatene, spesielt ved 14 dpi. Hos *F. langsethiae* sammen med *F. culmorum* syntes uttrykket av *Dep5* å være noe høyere ved 10 dpi, men det var tross alt variasjoner mellom de biologiske replikatene. Ved 14 dpi så det ut til at uttrykket av *Dep5* var forholdsvis likt referanseprøven. Uttrykket av *Dep5* hos *F. langsethiae* sammen med *F. graminearum* var forskjellig mellom 10 og 14 dpi. Ved 10 dpi syntes uttrykket å være det samme som referanseprøven, men det var betydelig variasjoner mellom de biologiske replikatene. Ved 14 dpi så det ut til at det ikke var spesielt uttrykk av *Dep5*.

Relativ genekspressjon for *Tri1* og *Tri16* hos *F. langsethiae* for 10 og 14 dpi er vist i figur 28. Siden de hører til samme syntesvei (Desjardins 2006), er de vist i samme figur, da det er lettere å se sammenhengen mellom uttrykkene av disse der *F. langsethiae* er alene og sammen med de tre andre artene.





Figur 28: Relativ genekspresjon for *Tri1* og *Tri16* for *F. langsethiae* alene og sammen med andre arter.

Prøvene er relative til *F. langsethiae* halv dose, 10 dpi, som er brukt som referanse. Forkortelsene FA = *F. avenaceum*, FC = *F. culmorum*, FG = *F. graminearum*, FL = *F. langsethiae*, hd = halv dose, og fd = full dose. Feilfelt er minimums-/maksimums-verdier.

a) *Tri1* og *Tri16* 10 dpi. Alle prøvene er basert på tre biologiske replikater. Symbolet * markerer prøver som var signifikant forskjellige fra referanseprøve. Det gjelder prøvene *F. langsethiae* (full dose) 10 dpi for uttrykket av *Tri1*, med P -verdi = 0,047, samt prøven *F. langsethiae* (full dose) 10 dpi for uttrykket av *Tri16*, med P -verdi = 0,017.

b) *Tri1* og *Tri16* 14 dpi. Prøvene *F. langsethiae* (full dose) 14 dpi og *F. langsethiae* + *F. culmorum* 14 dpi er basert på bare to biologiske replikater ved beregning av relativ genekspresjon. De andre prøvene var basert på tre biologiske replikater. Symbolet * markerer prøver som er signifikant forskjellig fra *F. langsethiae* (full dose) 14 dpi for *Tri16*. Det gjelder prøvene *F. langsethiae* + *F. avenaceum* 14 dpi og *F. langsethiae* + *F. culmorum* 14 dpi med P -verdier på henholdsvis 0,024 og 0,031.

Alle prøvene ved genekspresjon av både *Tri1* og *Tri16* er beregnet relativt i forhold til den samme prøven, *F. langsethiae* (halv dose), 10 dpi. Uttrykket av *Tri1* og *Tri16* syntes å være signifikant forskjellig fra referanseprøven hos *F. langsethiae* (full dose) 10 dpi, og *P*-verdiene var henholdsvis 0,047 og 0,017. De andre prøvene for 10 og 14 dpi viste ingen signifikant forskjell i forhold til referanseprøven når det gjelder uttrykket av *Tri1*. Det var heller ingen signifikant forskjell mellom *F. langsethiae* (halv dose) 14 dpi og der *F. langsethiae* var sammen med hver av de andre artene (*P*-verdi > 0,05). Når det gjelder uttrykket av *Tri16*, var *F. langsethiae* + *F. avenaceum* 14 dpi og *F. langsethiae* + *F. culmorum* 14 dpi signifikant forskjellige fra *F. langsethiae* (halv dose) 14 dpi, med *P*-verdier på henholdsvis 0,024 og 0,031. Ifølge figur 28 var det ganske godt samsvar mellom uttrykkene for *Tri1* og *Tri16* for både 10 og 14 dpi. Hos *F. langsethiae* alene (full dose) 10 dpi syntes både *Tri1* og *Tri16* å være noe oppregulert. Uttrykket av *Tri1* hos *F. langsethiae* alene (full dose) syntes å være svakt oppregulert ved 14 dpi, men uttrykket av *Tri16* syntes å være omtrent det samme som referansen. Ved 14 dpi så det ut til at uttrykket av *Tri1* hos *F. langsethiae* (halv dose) var forholdsvis likt referanseprøven, og at uttrykket av *Tri16* hos *F. langsethiae* (halv dose) syntes å være noe lavere uttrykt ved 14 dpi. Når det gjelder uttrykkene av *Tri1* og *Tri16* hos *F. langsethiae* sammen med *F. avenaceum* ved 10 dpi, så de ut til å være oppregulert, hvorav en noe større oppregulering av *Tri16*. Ved 14 dpi hos *F. langsethiae* sammen med *F. avenaceum* så begge uttrykkene ut til å være omtrent det samme som når *F. langsethiae* var inokulert alene. Uttrykket til *Tri1* og *Tri16* hos *F. langsethiae* sammen med *F. culmorum* 10 dpi syntes ikke å være spesielt forskjellig fra referansen. Ved 14 dpi hos *F. langsethiae* sammen med *F. culmorum* så heller ikke uttrykket av *Tri1* eller *Tri16* å være særlig forskjellig fra referanseprøven. Når det gjelder *F. langsethiae* sammen med *F. graminearum* ved 10 dpi, så det ut til at uttrykkene av *Tri1* og *Tri16* var svakt oppregulert. Ved 14 dpi så ikke uttrykkene av *Tri1* og *Tri16* hos *F. langsethiae* sammen med *F. culmorum* ut til å være særlig forskjellig fra referanseprøven, men *Tri16* syntes å være noe nedregulert der *F. langsethiae* var sammen med *F. graminearum* 14 dpi. Det var ikke tilfellet for *Tri1* 14 dpi, der uttrykket hos *F. langsethiae* og *F. graminearum* så ut til å være forholdsvis likt referanseprøven.

Testing av *Dep5*-genet hos flere *F. langsethiae* isolater for å undersøke om depudecin-synteseveien er konservert

Fra Bioforsk Plantehelse sin soppkolleksjon ble fire isolater (1L, 4L, 88L og 90 L) av *F. langsethiae* testet på qPCR med primerparet DepPKSf1/DepPKSr1 (depudecin polyketid syntase, *Dep5*). Målet var å undersøke om *Dep5*-genet fantes hos flere *F. langsethiae*-isolater.

Resultatet viste at depudecin polyketid syntase-genet (*Dep5*) ble funnet hos alle de fire isolatene av *F. langsethiae*.

5.0 Diskusjon

5.1 Veksthusforsøk

Målet med studiene i denne masteroppgaven var å undersøke når genuttrykket til ulike mykotoksin-relaterte gener hos fire ulike *Fusarium*-arter er aktive, og om ulike arter av *Fusarium* påvirker toksinproduksjon av mykotoksiner hos hverandre. Havrekorn som var infisert med *Fusarium*, ble benyttet i genekspressjonsstudier. Siden havrerisler ble sprayinokulert, og de består av mange uavhengige og separate korn, er det svært usannsynlig at hvert korn ble infisert med eksakt samme mengde sporesuspensjon. Dette er faktorer som kan være med og påvirke forsøket. Det var tilfeldig hvilke korn som det ble ekstrahert RNA fra, men det ble konsekvent plukket korn fra ulike havrerisler som hver kom fra ulike planter fra ulike pletter, plassert tilfeldig i forhold til hverandre. Dette ble gjort for å gjøre forsøket mer representativt. Tre uavhengige biologiske replikater ble brukt med planter sådd på ulik tid. Det er svært viktig med mange biologiske replikater for å få et så representativt utvalg som mulig. I dette forsøket burde det vært enda flere biologiske replikater enn tre, men slike veksthusforsøk er kostbare, slik at dette er avhengig av økonomien. Et alternativ kunne vært å ekstrahere RNA fra flere korn eller eventuelt gjennomført flere parallelle RNA-ekstraksjoner fra hver behandling.

5.2 Optimalisering av RNA-ekstraksjon og genekspresjonsanalyser

5.2.1 RNA-ekstraksjon

For å lage cDNA til genekspresjonsstudier, er det nødvendig at RNA er av høy kvalitet, noe som stiller krav til ekstraksjonsmetodene som benyttes. Havre inneholder polysakkarider (Aspinall & Carpenter 1984), stivelse (Zhou et al. 1998), fett (Banas et al. 2007) og fenolforbindelser (Naczka & Shahidi 2006). Slike forbindelser kan resultere i at RNA-kvaliteten blir dårlig eller at det eventuelt ikke blir noe RNA i det hele tatt som blir ekstrahert (Gehrig et al. 2000). Fenolforbindelser har evne til å binde nukleinsyrer, mens polysakkarider kan felles ut sammen med RNA i buffere med lav ionestyrke. I tillegg kan både polysakkarider og polyfenoler interagere med nukleinsyrer ved at de danner uløselige komplekser, noe som også vil påvirke kvaliteten og mengden av RNA som ekstraheres (Liu et al. 2005). RNA-ekstraksjon ble til å begynne med utført med to ekstraksjonsmetoder, Trizol Reagent (Invitrogen) og Fast RNA Pro Kit (QiBiogene), som viste seg å fungere på havrekorn høstet 6 dpi. Det ble besluttet å bruke Trizol Reagent videre. Etter å ha ekstrahert flere prøver fra et senere utviklingsstadium, det vil si på 10 og 14 dpi, viste resultatene at Trizol Reagent fungerte dårlig som ekstraksjonsmetode for dette materialet. Dette kan skyldes det høyere innholdet av fett og stivelse hos korn høstet 10 og 14 dpi, sammenlignet med 6 dpi. Det finnes ulike Trizol-kit, og hver av disse har sitt spesifikke bruksområde. Ifølge produktbeskrivelsen til Trizol Reagent skal denne fungere på vev og celler som inneholder mye fett og som kan være vanskelig å ekstrahere RNA fra. Andre har imidlertid funnet at dette fungerer dårlig på frø som er rike på stivelse (Li & Trick 2005).

Trizol Reagent er ifølge produktbeskrivelsen en blanding av fenol og guanidin isotiocyanat, og ved RNA-ekstraksjonen brukes også kloroform. Ved bruk av metoder som Trizol Reagent eller andre metoder hvor GITC-fenol-kloroform inngår, er det vist at stivelse kan felles ut sammen med RNA-pelleten, noe som kan føre til vanskeligheter med å løse RNA i vann (Li & Trick 2005). Dette ble observert ved de fleste prøvene som var ekstrahert med Trizol Reagent i denne oppgaven, der RNA-pelleten nærmest virket seig eller voksaktig uten å ville løse seg.

Det ble derfor i stedet forsøkt RNA-ekstraksjon med Spectrum™ Total RNA Kit (Sigma-Aldrich). I motsetning til Trizol Reagent, inngår ikke bruk av fenoler eller kloroform ved bruk av dette kittet. Den nye ekstraksjonsmetoden fungerte både på 6 og 14 dpi, med svært god kvalitet, da de fleste prøvene hadde RIN-verdi på 9-10.

Selv om ekstraksjonsmetoden til Sigma-Aldrich fungerte bra på dette materialet, var det noen vanskeligheter underveis, i forbindelse med bruk av filtreringskolonnene. Det måtte ofte flere sentrifugesteg til for å få filtrert igjennom lysatet. I tillegg måtte filtreringskolonnene i de fleste tilfeller byttes med en ny for å kunne få filtrert igjennom all væsken. Årsakene til slike filtreringsproblemer kan skyldes fettproblemer under lyseringen. Ifølge protokollen til Spectrum™ Total RNA Kit, kan plantemateriale som har et høyt innhold av lipider, påvirke filtreringen gjennom kolonnene, og havre har et høyere fettinnhold, sammenlignet med andre korn som hvete og bygg (Liu 2011).

Prøvene ble DNase-behandlet på kolonne, men ifølge qPCR var ikke denne behandlingen tilstrekkelig for å fjerne alt det kontaminerende DNA i RNA-prøvene. Det var ofte nødvendig med flere DNase-behandlinger for hver prøve. Dette stemmer med tidligere litteratur som beskriver at RNA ekstrahert ved bruk av kolonner, kan være betydelig kontaminert med genomisk DNA (Bustin 2002).

5.2.2 cDNA-syntese

For å få høye nok RNA-konsentrasjoner, måtte flere prøver bli ekstrahert på nytt. Spesielt var dette et problem for prøvene fra 14 dpi, som igjen kan skyldes innholdet av fett og stivelse. RNA-konsentrasjonene alt i alt varierte fra 97,0 ng/μl til 676,9 ng/μl, noe som også viser hvor store forskjellene kan være fra ekstraksjon til ekstraksjon.

cDNA-syntese-kittet som ble brukt, skal ifølge produktbeskrivelsen gi forbedret effektivitet av cDNA-syntese og kan brukes med veldig lave og veldig høye mengder av RNA. Resultatene fra agarosegelelektroforese viste at noen cDNA-prøver skilte seg ut i form av en oppsamling av lavmolekylært materiale som kunne tyde på dårlig cDNA-kvalitet ved at revers transkripsjon ikke hadde fungert optimalt (se figur 17 i resultatdel). Det var totalt fem ulike prøver hvor dette var tilfelle og fire av disse var fra 14 dpi, noe som igjen kan tyde på at disse prøvene er vanskelig å jobbe med. Prøvene ble forsøkt rensed med GenElute Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich), men ingen av de rensede prøvene fra 14 dpi ga uttrykk av husholdningsgenene *β-tubulin* og *UBC* etter analyse med qPCR (resultat ikke vist). I forbindelse med revers transkripsjon kan det oppstå

problemer, spesielt når reaksjonstemperaturen ligger mellom 40 og 50 °C som er de vanligste temperaturene ved en slik reaksjon (Bustin 2002; Raja et al. 2000). RNA-molekylene kan for eksempel danne sekundære strukturer. Dette kan gjøre at enzymet stopper opp, dissosierer fra templatet eller hopper over regioner av RNA, noe som kan gjøre det vanskelig å oppnå fullstendige produkter etter revers transkripsjon (Bustin 2002; Malboeuf et al. 2001). Slike sekundære strukturer kan ha vært problemet for noen prøver i denne oppgaven og forklarer hvorfor rensing med GenElute Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich) alene ikke var tilstrekkelig. Av den grunn ble det bestemt å denaturere RNA fra disse prøvene, før ny cDNA-syntese, for å bryte eventuelle hydrogenbindinger i de sekundære strukturene. Dette viste seg å gi funksjonelt cDNA. En slik denaturering er ikke beskrevet i manualen for cDNA-syntese fra SuperScript® VILO™ (Invitrogen). Basert på disse resultatene burde det vært beskrevet et forslag til et denatureringstrinn i protokollen til dette kittet dersom cDNA-prøver viser seg ikke å være optimale etter test på agarosegel.

5.2.3 Primerdesign, -spesifisitet og –effektivitet

Husholdningsgenene *β-tubulin* og *UBC* ble valgt som referansegener på bakgrunn av tidligere resultater fra Lysøe og samarbeidspartnere (2006). Husholdningsgener er essensielle for at celler skal overleve, og genekspressjon av disse er ofte konstante i de fleste celletyper (Thellin et al. 1999). Det var svært viktig at primerparene som skulle brukes videre til ekspresjonsanalyser av de mykotoksin-relaterte genene, ga spesifikk binding til ett bestemt gen fra den arten som skulle studeres. I noen tilfeller var det ”umulig” å lage unike primerpar, spesielt hos *F. culmorum* og *F. graminearum*. Disse artene er nært beslektet (Benyon et al. 2000). *F. culmorum* og *F. graminearum* inngikk ikke samtidig i denne masteroppgaven, men hver av artene bare i kombinasjon med *F. langsethiae*. Det hadde derfor ingen negativ betydning for resultatene i disse analysene at samme primerpar ble brukt for prøver der *F. culmorum* og *F. graminearum* inngikk. Disse artene er nært beslektet (Benyon et al. 2000).

Alle primerpar som ble valgt til videre ekspresjonsanalyser, hadde nødvendig spesifisitet og akseptable effektivitetsverdier i henhold til ”Quantification strategies in real-time PCR” (Pfaffl 2004).

5.3 Genekspresjonsanalyser

Før de endelige genekspresjonsanalysene fra de ulike behandlingene i havre, var det en rekke forberedelsestrinn som er omtalt til nå. Disse trinnene er kritiske og må være godt gjennomført for at de endelige genekspresjonsstudiene skal kunne gi et troverdig resultat.

Ifølge BestKeeper-beregningene for de to husholdningsgenene hos hver av de fire *Fusarium*-artene, var husholdningsgenene i alle tilfellene egnet for normalisering, siden samsvaret mellom de to genene var forholdsvis gode hos hver art (figur 23 i resultatdel).

For hvert gen ble én bestemt *Fusarium*-art alene og en kombinasjon av denne arten med en annen *Fusarium*-art benyttet for å studere om det er forskjeller når en *Fusarium*-art vokser alene og når den vokser sammen med en annen art. Av slike studier er det mulig å kunne tyde noe av samspillet mellom ulike arter, altså om to arter ”trigger” eller hemmer toksinproduksjonen hos hverandre.

I dette tilfellet ble alle prøvene utsatt for de samme miljømessige faktorene, som for eksempel temperatur og fuktighet. Det er derfor vanskelig å si noe om disse faktorene kan ha hatt innvirkning på en *Fusarium*-art alene og når den er i kombinasjon med en annen *Fusarium*-art. Høstetidspunktet syntes derimot å være av betydning for genreguleringen. Det som også eventuelt kan være av betydning, er om to ulike arter i kombinasjon har ulik optimumstemperatur og ulikt optimum for relativ luftfuktighet for vekst eller toksinsyntese.

Ifølge resultatene i denne oppgaven syntes uttrykkene av genene å være forskjellig når en art vokser alene og sammen med en annen. Det var også forskjeller mellom uttrykket av de ulike genene i havreprøvene høstet 10 og 14 dager etter smitting med disse *Fusarium*-artene. Hvert gen som var analysert i dette studiet, blir videre diskutert for seg.

5.3.1 *Esyn* – *F. avenaceum*

Det multifunksjonelle enzymet enniatin syntetase katalyserer biosyntesen av enniatiner (Glinski et al. 2002). Uttrykket av *Esyn* der *F. avenaceum* vokste sammen med *F. langsethiae* 10 dpi, var signifikant nedregulert fra referanseprøven ($P = 0,005$), og det kan faktisk se ut som at genet ikke var uttrykt ved dette tidspunktet. Ved 14 dpi var uttrykket av *Esyn* høyere uttrykt enn ved 10 dpi, både når *F. avenaceum* vokste alene og i kombinasjon med *F. langsethiae*. Det var ingen signifikant forskjell mellom uttrykket av *Esyn* når *F. avenaceum* var alene og når *F. avenaceum* vokste sammen med *F. langsethiae*, 14 dpi. Det er viktig å være klar over at det var betydelige

variasjoner mellom de biologiske replikatene for begge prøvene ved 14 dpi. Ut i fra resultatene kan det tyde på at *F. langsethiae* påvirker toksinproduksjonen til *F. avenaceum* negativt, spesielt ved 10 dpi. *F. langsethiae* kan muligens ha hemmet toksinproduksjonen hos *F. avenaceum* 10 dpi ved selv å produsere T-2/HT-2, slik at disse toksinene kan ha fungert som en slags forsvarsmekanisme mot *F. avenaceum*. Tilsvarende er antatt å ha inntruffet i studiene til Velluti et al. (2001) ved at toksinproduksjon hos én *Fusarium*-art har fungert som soppens forsvarsmekanisme mot andre konkurrerende sopper og hemmet deres toksinproduksjon. Imidlertid synes produksjonen av enniatiner å inntre på et nokså tidlig utviklingsstadium, siden det var uttrykk av *Esyn* når *F. avenaceum* vokste alene ved 10 dpi, selv om genet omtrent ikke var uttrykt på samme tidspunkt i kombinasjon med *F. langsethiae*. Generelt var uttrykket av *Esyn* høyere ved 14 dpi enn ved 10 dpi, noe som kan innebære at *Esyn* er høyere uttrykt på et seinere utviklingsstadium i havre.

Studier gjort av Kokkonen et al (2010) viste at ulike stammer av *F. avenaceum* produserte mest enniatiner ved tre ulike kombinasjoner av temperaturer og vannaktiviteter. Alt i alt syntes mengden av toksiner produsert av *F. avenaceum* å være nokså tilsvarende under alle forholdene som ble testet i dette studiet. Toksinproduksjon hos denne *Fusarium*-arten synes derfor ikke å være betydelig avhengig av bestemte temperaturer og vannaktiviteter, men kan antakeligvis forekomme over et bredt spekter av ulike miljøforhold (Kokkonen et al. 2010). I denne masteroppgaven ble ikke ulike vannaktiviteter og temperaturer testet, men dagtemperaturen var 25 °C, og ifølge resultatene så det ikke ut til at dette var uheldig forhold for enniatinproduksjonen hos *F. avenaceum*. Videre tyder det på at heller ikke vannaktiviteten var et problem for toksinproduksjonen i denne oppgaven, men det kan ha vært en konkurranse mellom næringsstoffer, spesielt ved 10 dpi.

5.3.2 *TriI* – *F. culmorum* og *F. graminearum*

Ifølge oversiktsartikkelen til Alexander et al. (2009) er *TriI* et gen som koder for et bestemt enzym blant annet i biosynteseveien til trichothecenet DON. I denne oppgaven er uttrykket av *TriI*-genet undersøkt hos *F. culmorum* og *F. graminearum*, på prøver der *F. culmorum* og *F. graminearum* vokste alene (hver for seg), og når hver av dem var i kombinasjon med *F. langsethiae*. Hensikten var å se om *TriI*-genet var uttrykt på disse tidspunktene, og om uttrykket

av *Tri1* var forskjellig når *F. culmorum* og *F. graminearum* vokste alene, sammenlignet med når hver av dem var i kombinasjon med *F. langsethiae*.

Til tross for at 10 og 14 dpi anses som tidlige utviklingsstadier, var *Tri1* uttrykt både hos *F. culmorum* og *F. graminearum* ved begge tidspunktene, noe som kan bety at DON-produksjon kan skje på et tidlig stadium etter infeksjon av havre.

Ifølge genekspressjonsanalysene for *Tri1* hos *F. culmorum* var det ingen signifikante forskjeller mellom uttrykket av *Tri1* når *F. culmorum* vokste alene eller sammen med *F. langsethiae*, hverken ved 10 eller 14 dpi. I motsetning til *Esyn* var det heller ingen særlig forskjell mellom 10 og 14 dpi. Uttrykket av *Tri1* var forholdsvis stabilt der *F. culmorum* vokste alene, både ved 10 og 14 dpi. Det kan allikevel se ut som at *Tri1* var noe lavere uttrykt ved 14 dpi når *F. culmorum* var sammen med *F. langsethiae*. Når det gjelder uttrykket av *Tri1* hos *F. culmorum* sammen med *F. langsethiae* 10 dpi, var uttrykket høyere bare hos den ene biologiske replikaten, noe som tyder på betydelige variasjoner mellom de biologiske replikatene av samme prøve. Dette er viktig å være klar over, siden antallet biologiske replikater vil påvirke den totale relative genekspressjonen, i den grad at jo flere biologiske replikater det er av en prøve, desto mer representativt er utvalget som brukes i genekspressjonsanalysene. Siden uttrykket av *Tri1* muligens var noe lavere der *F. culmorum* vokste i kombinasjon med *F. langsethiae* 14 dpi, kan det hende at *F. langsethiae* har hemmet DON-produksjonen hos *F. culmorum* noe ved dette tidspunktet, og muligens benyttet T-2/HT-2 som en forsvarsmekanisme mot *F. culmorum*. Dette er i så fall i tråd med tilsvarende funn beskrevet av Velluti et al. (2001).

Heller ikke hos *F. graminearum* var det noen signifikant forskjell i *Tri1*-ekspressjon mellom *F. graminearum* som vokste alene og der *F. graminearum* vokste i kombinasjon med *F. langsethiae*. Dette gjaldt både for 10 og 14 dpi. Allikevel så det ut som at uttrykket av *Tri1* hos *F. graminearum* var noe forskjellig mellom de to tidspunktene, der 14 dpi ga generelt lavere uttrykk hos både *F. graminearum* alene og sammen med *F. langsethiae*, sammenlignet med 10 dpi. Det var også i dette tilfellet betydelige variasjoner mellom de biologiske replikatene.

Uttrykket av *Tri1* syntes altså å ha noenlunde samme mønster, både hos *F. culmorum* og *F. graminearum*, men forskjellene mellom 10 og 14 dpi var litt mer tydelig hos *F. graminearum*. Ifølge studier utført av Klemsdal et al. (2009) i moden havre, er det funnet at DON-produksjonen hos *F. graminearum* er større når denne arten vokser alene enn når den vokser i kombinasjon med andre arter, men det er ikke funnet tilsvarende hos *F. culmorum*. Hos *F. culmorum* så det ut til at det også var noe lavere uttrykk av dette genet ved 14 dpi, men da bare når *F. culmorum* var i kombinasjon med *F. langsethiae*. Til tross for små forskjeller i mønstrene av uttrykket av *Tri1* hos de to artene, så det ut som at disse artene oppførte seg til en viss grad på samme måte, noe

som muligens kan skyldes deres nære slektskap. Ifølge genekspressjonsstudiene for *Tri1* hos de to artene, syntes det å være interaksjoner både mellom *F. culmorum* og *F. langsethiae* og mellom *F. graminearum* og *F. langsethiae*. Slike interaksjoner kan ha vært avhengig av ulike faktorer, som for eksempel tid, siden det var noen variasjoner mellom 10 og 14 dpi. Som følge av at det ikke var noen nedregulering av *Tri1* når *F. culmorum* var alene ved 14 dpi, men at det syntes å være en mulig nedregulering av genet når *F. graminearum* var alene ved samme tidspunkt, kan dette bety at de to tidspunktene muligens kan ha påvirket genreguleringen hos *F. culmorum* og *F. graminearum* noe forskjellig selv om de er nært beslektet. Det ble i studiene til Hope et al. (2005) observert noen forskjeller mellom *F. culmorum* og *F. graminearum* ved at *F. graminearum* vokste fortere enn *F. culmorum*, i tillegg til at den var i stand til å produsere mer DON over et noe bredere spekter for vannaktivitet. I samme studier viste derimot *F. culmorum* å produsere mer DON, spesielt ved 25 °C, enn *F. graminearum*. Likevel har det blitt observert at *F. graminearum* kan være mer konkurransedyktig enn *F. culmorum* på hvete, uavhengig av temperatur og fuktighet (Hope et al. 2005; Magan et al. 2003). I moden havre er det derimot vist at *F. culmorum* kan være noe mer konkurransedyktig enn *F. graminearum* ifølge studier gjort ved Bioforsk Plantehelset (Klemsdal et al. 2009). Ifølge interaksjonsstudier gjort av Xu et al. (2007a) med fire *Fusarium*-arter; *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* og *F. poae* i hvete, viste det seg også at *F. graminearum* var mest konkurransedyktig. Interaksjonsstudier gjort av Wagacha et al. (2012) med ulike *Fusarium*-arter på modelloverflater viste at *F. culmorum* og *F. graminearum* generelt utkonkurrerte tre andre *Fusarium*-arter, *F. avenaceum*, *F. poae* og *F. tricinctum*. Både *F. culmorum* og *F. graminearum* viste seg å være like konkurransedyktige, men førstnevnte viste å ha en enda større fordel knyttet til konkurranse, uavhengig av temperatur og substrat. *F. culmorum* og *F. graminearum* syntes allikevel i studiene i denne oppgaven å opptre nokså likt når det gjelder interaksjoner med *F. langsethiae*, slik at hvilken art som er mest konkurransedyktig av *F. culmorum* og *F. graminearum* er vanskelig å si ut i fra genekspressjonsstudiet med *Tri1* i dette tilfellet.

I studiene til Hope et al. (2005) ble det observert at både veksten av *F. culmorum* og *F. graminearum* isolert fra hvetekorn, samt DON-produksjonen fra disse *Fusarium*-artene, påvirkes betydelig av endringer i vannaktivitet, temperatur og tid. I studiet i denne masteroppgaven ble det ikke gjort direkte analyser på utvikling og vekst av de ulike artene. Velluti et al. (2001) observerte i sine studier at DON-produksjonen hos *F. graminearum* var betydelig stimulert ved tilstedeværelse av to andre *Fusarium*-arter; *F. moniliforme* og *F. proliferatum*. En temperatur på 25 °C så ut til ifølge studiene til både Hope et al. (2005) og Velluti et al. (2001) å gi bedre vekst og DON-produksjon hos både *F. culmorum* og *F. graminearum*, enn ved 15 °C. Dette er samme

dagtemperatur som prøvene i denne oppgaven var eksponert for. Det var uttrykk av *Tri1* i alle prøvene der *F. culmorum* og *F. graminearum* inngikk og dermed også sannsynligvis DON-produksjon i dette tilfellet.

Studier gjort av Cooney et al. (2001) indikerte at produksjonen av trichothecener kan påvirkes hos *F. graminearum* dersom en annen potensiell konkurransedyktig sopp er til stede, men hvorvidt produksjonen av mykotoksiner øker eller minker, avhenger av den andre soppen. Hemming av DON-produksjon kan også forekomme dersom det foregår en nedbrytning av tilgjengelige næringsstoffer (Cooney et al. 2001). I studiene gjort i denne masteroppgaven var ikke forskjellene betydelige mellom *F. graminearum* alene og *F. graminearum* sammen med *F. langsethiae*. Av den grunn er det usikkert om det kan ha oppstått konkurranse mellom *F. graminearum* og *F. langsethiae*. En mulig nedregulering ved 14 dpi kan skyldes interaksjoner mellom havre og *Fusarium* og ha sammenheng med at *F. graminearum* trenger inn i selve havrekornet mellom 6 og 10 dpi. I hvete er det vist at DON produseres på dette trinnet i infeksjonen, men ikke verken før eller etter (Boenisch & Schafer 2011). Ut i fra resultatene funnet i denne oppgaven kan det derfor være interessant å undersøke om tilsvarende også er tilfelle i havre.

5.3.3 *Tri1* og *Tri16* – *F. langsethiae*

I denne masteroppgaven ble det også utført genekspressjonsstudier for flere *Tri*-gener; *Tri1* og *Tri16* hos *F. langsethiae*, som inngår i synteseveien til T-2/HT-2 (Alexander et al. 2009; Meek et al. 2003). Ved genekspressjonsstudiene med *Tri1* og *Tri16* hos *F. langsethiae* ble uttrykket av disse genene undersøkt i infiserte havrekorn, der *F. langsethiae* var alene og der *F. langsethiae* vokste i kombinasjon med de tre artene *F. avenaceum*, *F. culmorum* og *F. graminearum*, både ved 10 og 14 dpi. Dette var for å se om disse genene var uttrykt på dette tidspunktet, og om uttrykket av de to genene var forskjellig når *F. langsethiae* var alene, sammenlignet med når *F. langsethiae* vokste i kombinasjon med de andre artene. Siden *Tri1* og *Tri16* inngår i samme syntesevei for T-2/HT-2, vil disse genene bli diskutert sammen.

Uttrykkene av både *Tri1* og *Tri16* var altså mer eller mindre uttrykt i alle prøvene på begge tidspunktene, noe som viser at toksinproduksjonen hos *F. langsethiae* allerede er i gang ved et tidlig utviklingsstadium. I tillegg er dette en indikasjon på at det har vært tilstrekkelig med næringsstoffer tilstede for at *F. langsethiae* kunne vokse og produsere toksiner.

Ifølge Whiskers plottene til *Tri1* og *Tri16* syntes uttrykket av de to genene å ha et tilsvarende mønster, både ved 10 og 14 dpi noe som står i samsvar med at begge genene inngår i samme syntesevei. Det var muligens noe bedre samsvar i mønsteret mellom de to genene ved 10 dpi, og det så generelt ut til at *Tri16* var noe høyere uttrykt enn *Tri1* ved 10 dpi, mens ved 14 dpi var det innimellom antydning til noe høyere uttrykk av *Tri1* enn *Tri16*. Generell genekspressjon for selve *Tri1*-genet var uansett høyere ved 10 dpi enn 14 dpi, og det samme gjaldt for *Tri16*. Uttrykket av de to genene hos *F. langsethiae* (full dose) ved 10 dpi viste seg å være signifikant oppregulert i forhold til referanseprøven. *P*-verdiene for *Tri1* og *Tri16* var henholdsvis 0,047 og 0,017. Det var ingen signifikante forskjeller mellom uttrykket av *Tri1* ved 14 dpi i de ulike prøvene, sammenlignet med prøven der *F. langsethiae* var alene (halv dose) 14 dpi. Uttrykket av *Tri1* hos *F. langsethiae* (full dose) 14 dpi (to biologiske replikater) så allikevel ut til å være noe høyere enn hos *F. langsethiae* (halv dose) ved samme tidspunkt, men det var også her variasjoner mellom de to biologiske replikatene. *Tri16* syntes også å være noe høyere uttrykt ved full dose av *F. langsethiae* (to biologiske replikater) 14 dpi, sammenlignet med halv dose ved samme tidspunkt, men forskjellen var ikke signifikant.

Der *F. langsethiae* var inokulert i kombinasjon med *F. avenaceum* 10 dpi, var ikke uttrykkene av de to genene signifikant forskjellig fra referanseprøven. Det så likevel ut til at uttrykkene av genene var noe høyere uttrykt enn referanseprøven, men det var også i dette tilfellet variasjoner mellom de biologiske replikatene. Hos *F. langsethiae* sammen med *F. avenaceum* syntes for eksempel uttrykket av *Tri16* å være oppregulert hos to av tre biologiske replikater. Ved 14 dpi var uttrykket av *Tri1* hos *F. langsethiae* sammen med *F. avenaceum* ikke signifikant forskjellig fra *F. langsethiae* (halv dose). Uttrykket av dette genet så likevel ut til å være noe høyere, men det er av betydning å nevne at det også her var noen variasjoner mellom de biologiske replikatene. Uttrykket av *Tri16* hos *F. langsethiae* i kombinasjon med *F. avenaceum* 14 dpi, var derimot signifikant oppregulert ($P = 0,024$) i forhold til prøven der *F. langsethiae* var alene (halv dose) ved samme tidspunkt. På bakgrunn av disse resultatene så det ut til at *F. avenaceum* ”trigger” uttrykket av *Tri16* ved 14 dpi og dermed toksinproduksjon hos *F. langsethiae*. Tidligere studier ved Bioforsk Plantehelse (Aamot et al. 2010) viste også en økning i type A trichothecener ved tilstedeværelse av *F. avenaceum*. Selv om resultatene for *Tri1* og *Tri16* ikke ga signifikante forskjeller ved 10 dpi, var det likevel en svak antydning til at *F. avenaceum* ”trigger” uttrykket av de to genene.

I kombinasjon med *F. culmorum* ved 10 dpi var uttrykkene av de to genene hos *F. langsethiae* ikke signifikant forskjellige fra referanseprøven. Når *F. langsethiae* var sammen med *F. graminearum* ved samme tidspunkt, var det heller ingen signifikante forskjeller fra

referanseprøven, men det var noe mer variasjoner mellom de biologiske replikatene. Det syntes likevel å være noe høyere uttrykk av *Tri1*, der *F. langsethiae* var i kombinasjon med *F. graminearum*, 10 dpi, i forhold til referanseprøven. Også ved 14 dpi syntes uttrykket av *Tri1* der *F. langsethiae* var i kombinasjon med *F. culmorum* og *F. graminearum* å være forholdsvis likt som der *F. langsethiae* var alene (halv dose) og dermed ikke signifikant forskjellig fra denne. Det samme gjaldt uttrykket av *Tri16* når *F. langsethiae* var i kombinasjon med *F. graminearum*. Dette kan tyde på at toksinproduksjonen ikke ble særlig påvirket når *F. langsethiae* var i kombinasjon med *F. culmorum* og *F. graminearum* ved 10 dpi, og heller ikke i kombinasjon med *F. graminearum* ved 14 dpi. *F. culmorum* og *F. graminearum* er vanligvis ganske konkurransedyktige arter, sammenlignet med *F. langsethiae* som er en forholdsvis svak patogen (Divon et al. 2012; Yli-Mattila 2010a). Uttrykket av *Tri16* skilte seg derimot noe ut ved 14 dpi, der *F. langsethiae* var i kombinasjon med *F. culmorum*. Det var signifikant forskjellig fra *F. langsethiae* alene (halv dose), med en *P*-verdi på 0,031. Her var det en svak oppregulering av uttrykket av *Tri16* i forhold til der *F. langsethiae* vokste alene (halv dose). På grunn av mulig konkurranse mellom de to artene, kan det antas at *F. culmorum* har hatt en positiv effekt på uttrykket av *Tri16*, i den grad at *F. langsethiae* kan ha latt seg stresse og dermed begynt å produsere mer mykotoksiner.

Ifølge studier gjort av Velluti et al. (2001) kan det tyde på at DON-produksjon hos *F. graminearum* fungerer som en forsvarsmekanisme hos denne *Fusarium*-arten når det er andre sopper tilstede, ettersom *F. graminearum* hemmet toksinproduksjon hos to andre *Fusarium*-arter, *F. moniliforme* og *F. proliferatum*, under bestemte forhold i disse studiene. Uttrykkene av *Tri1* og *Tri16* der *F. langsethiae* var i kombinasjon med *F. graminearum* syntes ikke å være lavere uttrykt enn referanseprøvene, noe som indikerer at toksinproduksjonen hos *F. langsethiae* ikke har blitt særlig hemmet. Av den grunn er det usikkert hvorvidt en slik forsvarsmekanisme hos *F. graminearum* har inntruffet i dette tilfellet.

F. langsethiae er én av flere arter som det ikke har vært mye fokus på når det gjelder toksinproduksjon under ulike forhold (Kokkonen et al. 2010). Det er av betydning å forstå økologien til *F. langsethiae*, og om det forekommer forskjeller både innad og mellom ulike stammer av denne *Fusarium*-arten. Kokkonen et al. (2010), Medina og Magan (2010) og Medina og Magan (2011) har gjort studier med *F. langsethiae* med tanke på ulike miljøfaktorer som temperatur og vannaktivitet og deres effekt på vekst og toksinproduksjon. Ut i fra ulike studier synes biosynteseveien til toksiner, produsert av blant annet *F. langsethiae*, for eksempel T-2/HT-2, ikke å være så entydig som forholdet mellom metabolittene tilsier (Kokkonen et al. 2010). Det er foreløpig ikke gjort noen studier spesifikt på biosynteseveien til HT-2 hos *F. langsethiae*, men

det er derimot gjort studier på biosynteseveiene til T-2 og HT-2 hos *F. sporotrichioides* som er nært beslektet med *F. langsethiae* (Meek et al. 2003).

In vitro-studiene til Medina og Magan (2010) på havrebasert medie viste at *F. langsethiae* vokste best når vannaktiviteten var høy (> 0,98) og når temperaturen samtidig var rundt 25 °C. Både temperatur og vannaktivitet viste seg å være statistisk signifikante miljøfaktorer. Dette ble bekreftet i *in situ*-studiene til Mylona og Magan (2011) på havre. Generelt sett syntes produksjonen av disse toksinene i dette studiet maksimalt å forekomme når mycel-veksten var utsatt for stress som følge av vannaktivitet eller temperatur (Medina & Magan 2011).

Som nevnt tidligere, ble prøvene i denne masteroppgaven utsatt for en dagtemperatur på 25 °C. Siden det var uttrykk av både *Tri1* og *Tri16* hos alle prøvene ved både 10 og 14 dpi ifølge studiene i denne masteroppgaven, er det ikke grunn til å tro at en temperatur på 25 °C er uheldig for toksinproduksjon hos *F. langsethiae*. Videre må vannaktiviteten ha vært tilstrekkelig, siden det er uttrykk av genene, men vannaktiviteten ble uansett ikke testet i analysene i denne masteroppgaven.

5.3.4 *Dep5* – *F. langsethiae*

Dep5 er et gen som koder for et polyketid syntase-enzym. *Dep5*-enzymet er det sentrale enzymet i biosyntesen av depudecin (Wight et al. 2009). I denne masteroppgaven ble flere isolater av *F. langsethiae* testet for å undersøke om *Dep5* og dermed synteseveien av depudecin polyketid syntase var tilstede hos alle disse. Dette genet viste seg å være uttrykt hos alle de fire isolatene som ble testet. Videre i masteroppgaven ble også genekspressjonen av *Dep5* hos *F. langsethiae* undersøkt, både når denne *Fusarium*-arten var alene og i kombinasjon med *F. avenaceum*, *F. culmorum* og *F. graminearum*. Genekspressjonen ble undersøkt både ved 10 og 14 dpi. Hensikten var å se om uttrykket var forskjellig når *F. langsethiae* var alene og sammen med de andre artene.

Det var ingen signifikante forskjeller av *Dep5*, hverken ved 10 eller 14 dpi. Ved 10 dpi så det ut til at uttrykket av *Dep5* ikke var særlig forskjellig mellom halv og full dose av *F. langsethiae* når denne arten vokste alene. Derimot ved 14 dpi syntes uttrykket av dette genet å være noe høyere når det var full dose av *F. langsethiae*, sammenlignet med halv dose på samme tidspunkt, men det er viktig å legge til at det bare var to biologiske replikater for full dose av *F. langsethiae*.

Uttrykket av *Dep5* syntes derimot å være noe høyere der *F. langsethiae* var i kombinasjon med *F. avenaceum* ved 14 dpi, sammenlignet med der *F. langsethiae* var alene (halv dose) ved samme tidspunkt. Uansett var det stor variasjon mellom de biologiske replikatene. Ved 10 dpi så ikke uttrykket av dette genet ut til å være særlig forskjellig når *F. langsethiae* var i kombinasjon med *F. avenaceum*, sammenlignet fra referanseprøven. Når *F. langsethiae* var i kombinasjon med *F. culmorum*, så ikke uttrykket av *Dep5* ved 14 dpi ut til å være særlig forskjellig fra referanseprøven. Ved 10 dpi var det betydelige variasjoner mellom de biologiske replikatene når *F. langsethiae* var i kombinasjon med *F. culmorum*, der det både var noe høyere og lavere uttrykk av *Dep5*. Der *F. langsethiae* vokste sammen med *F. graminearum* ved 10 dpi var det også både høyere og lavere uttrykk av *Dep5*, som følge av enda mer variasjoner mellom de biologiske replikatene. Derimot ved 14 dpi så det ikke ut til at *Dep5* var spesielt uttrykt.

Det var altså noen variasjoner mellom 10 og 14 dpi, spesielt når *F. langsethiae* var i kombinasjon med de andre artene. *F. avenaceum* kan ha ”trigget” uttrykket av *Dep5* noe hos *F. langsethiae* ved 14 dpi, på samme måte som ved uttrykkene av *Tri1* og *Tri16*. Der *F. langsethiae* vokste i kombinasjon med *F. culmorum* og *F. graminearum* kan disse artene muligens ha ”trigget” uttrykket av *Dep5* ved 10 dpi, men det er vanskelig å si, siden det var vesentlige forskjeller mellom de biologiske replikatene. Siden *Dep5* så ut til å være mer eller mindre uttrykt hos alle prøvene ved 10 dpi, indikerer det at genet allerede er uttrykt på et tidlig utviklingsstadium. Videre kan det tyde på at det har vært tilstrekkelige næringsstoffer til stede ved dette tidspunktet. I tillegg kan det antas at dyrkningsbetingelsene ikke har vært uheldig for uttrykket av dette genet. Siden uttrykket av genet så ut til å være generelt lavere ved 14 dpi, kan ikke dette skyldes dyrkningsbetingelsene, men det kan ha sammenheng med eventuelle tilgjengelige næringsstoffer på dette utviklingsstadiet. Det kan ha inntruffet mer konkurranse om næring mellom *F. langsethiae* og de andre artene som synes å være mer konkurransedyktige enn *F. langsethiae*.

Ut i fra litteratursøk er det hittil ikke utført spesifikke studier på *Dep5* hos *F. langsethiae*. Det er dermed viktig med videre forskning med tanke på genekspressjonen av dette genet hos *Fusarium langsethiae* for å kunne få innblikk i synteseveien av depudecin polyketid syntase hos denne *Fusarium*-arten, og kanskje også forstå betydningen av denne sekundære metabolitten for *F. langsethiae*.

5.4 Konklusjon

Studiene i denne masteroppgaven indikerer at ekspresjonen av genene som er undersøkt og som inngår i toksinproduksjon generelt varierer når en *Fusarium*-art vokser alene og i kombinasjon med en annen *Fusarium*-art. Det var også variasjoner mellom de to tidspunktene 10 og 14 dpi. Videre er det viktig å bemerke at det er betydelige variasjoner mellom de biologiske replikatene.

Uttrykket av *Esn* der *F. avenaceum* vokste sammen med *F. langsethiae*, 10 dpi, var signifikant nedregulert fra referanseprøven (der *F. avenaceum* vokste alene ved samme tidspunkt). Uttrykket av dette genet syntes å være noe høyere ved 14 dpi, noe som tyder på høyere enniatin-produksjon ved dette tidspunktet. *Tri1* hos *F. culmorum* og *F. graminearum* ga ingen signifikante forskjeller i forhold til spesifikke referanseprøver, og det var ingen særlig forskjeller i uttrykket av *Tri1* hos *F. culmorum* mellom de to tidspunktene, men en antydning til noe lavere uttrykk av genet hos *F. graminearum* ved 14 dpi. Produksjon av DON synes altså å være til stede hos begge artene ved begge tidspunktene, både når de er alene og i kombinasjon med *F. langsethiae*. Det ser ut som at DON-produksjon ikke blir påvirket i samspill med *F. langsethiae*. Uttrykket av *Tri1* og *Tri16* hos *F. langsethiae* alene (full dose), 10 dpi, viste seg å være signifikant oppregulert i forhold til referanseprøven (*F. langsethiae* (halv dose) 10 dpi). I tillegg var *Tri16* signifikant oppregulert ved 14 dpi der *F. langsethiae* vokste sammen med *F. avenaceum* og sammen med *F. culmorum*, i forhold til *F. langsethiae* alene (halv dose) 10 dpi. *F. avenaceum* og *F. culmorum* kan se ut til å trigge uttrykket av *Tri16* og dermed toksinproduksjon av T-2/HT-2. *Tri1* og *Tri16* syntes generelt å følge samme mønster, noe som er i samsvar med at de begge inngår i samme syntesevei. Genekspresjonen av *Dep5* ga ingen signifikante forskjeller i forhold til referanseprøven, og uttrykket synes å variere noe mellom de ulike kombinasjonene av *Fusarium*-arter. *Dep5* ble også funnet i alle *F. langsethiae*-isolatene som ble testet.

Siden det bare ble brukt tre biologiske replikater (i noen få tilfeller to), og det i flere tilfeller var betydelige variasjoner mellom disse, er det vanskelig å få et helt riktig bilde av hvordan genekspresjonen blant bestemte arter virkelig endrer seg når andre *Fusarium*-arter er tilstede. Av den grunn burde flere biologiske replikater vært med i disse ekspresjonsanalysene for å få et enda mer representativt innblikk i hvordan genreguleringen av disse genene endrer seg og dermed indirekte hvordan toksinproduksjonen varierer under ulike samspillsbetingelser.

5.5 Framtidige aspekter

Ut i fra litteratursøk er det ikke gjort mye forskning på hvordan genene som er studert i denne oppgaven, påvirkes i forhold til om en *Fusarium*-art vokser alene og i kombinasjon med en annen art i havre ved ulike tidspunkt etter inokulering. Det er heller ikke gjort noe særlig forskning på *Dep5* hos *Fusarium*.

Som resultatene i denne oppgaven indikerer, er det generelt forskjell i uttrykket av genene når tilhørende *Fusarium*-art vokser alene og i kombinasjon med andre arter, samt tidspunkt etter inokulering, men eksakt hvordan hele dette samspillet fungerer i detalj er vanskelig å si ut i fra disse studiene, men det er bestemte gener som skiller seg ut med signifikante forskjeller. Hvorvidt disse toksinene stimuleres eller hemmes av en annen sopp tilstede er aktuelt å forske videre på, samtidig som ulike faktorer i kornet/planten også virker inn. Det som er spesielt interessant å studere nærmere og vie tid på, er hvordan *F. langsethiae* oppfører seg i samspill med andre arter og hvordan genuttrykkene av *Tri1* og *Tri16* varierer som følge av dette. Det vil gi mye indirekte informasjon om hvordan toksinproduksjonen hos denne *Fusarium*-arten reguleres under ulike forhold. Det er vesentlig å fa et klart og tydelig innblikk i reguleringen av HT-2 og T-2 som er svært giftige mykotoksiner, i de kommende årene. Det er gjort mye forskning på DON-produksjon, men det kan også her være av interesse å undersøke synteseveien enda mer i detalj i forhold til faktorer nevnt ovenfor. Med andre ord kunne det være svært interessant å finne eksakt hvor i synteseveien av trichothecener det skjer størst påvirkninger som følge av miljøforandringer. Dette vil gi en mye mer spesifikk forklaring i genreguleringen under ulike forhold.

Videre bør *Dep5* blir forsket på i *Fusarium*, og enda flere isolater av *F. langsethiae* bør testes for om de har dette genet. I tillegg er det nødvendig med mer forskning på *Esyn* hos *F. avenaceum* og hvordan genespresjonen av dette genet endrer seg når *F. avenaceum* er alene og i kombinasjon med andre arter.

Alle disse punktene kan åpne for nye muligheter i forhold til hvordan toksinproduksjonen av bestemte *Fusarium*-arter kan forebygges. Dette er viktig for havreproduksjonen, både i Norge og havreproduksjon generelt for å kunne produsere mykotoksinfri havre av god kvalitet til fôr og mat. Dessuten vil dette ha stor økonomisk betydning for bønder, fôr- og matprodusenter.

6.0 Referanser

Aamot, H. U., Elen, O., Razzaghian, J., Lysøe, E. & Klemsdal, S. S. (2010). *Fusarium-Fusarium interaction during infection of oats*. Nordic Baltic Fusarium Seminar (NBFS), Ski, Norway. Kursiv Media AS. s. 27 s.

Alexander, N. J., Proctor, R. H. & McCormick, S. P. (2009). Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. *Toxin Reviews*, 28 (2-3): 198-215.

Anaissie, E., Kantarjian, H., Jones, P., Barlogie, B., Luna, M., Lopezberestein, G. & Bodey, G. P. (1986). *Fusarium* - a Newly Recognized Fungal Pathogen in Immunosuppressed Patients. *Cancer*, 57 (11): 2141-2145.

Aspinall, G. O. & Carpenter, R. C. (1984). Structural investigations on the non-starchy polysaccharides of oat bran. *Carbohydrate Polymers*, 4 (4): 271-282.

Banas, A., Debski, H., Banas, W., Heneen, W. K., Dahlqvist, A., Bafor, M., Gummesson, P. O., Marttila, S., Ekman, A., Carlsson, A. S. & Stymne, S. (2007). Lipids in grain tissues of oat (*Avena sativa*): differences in content, time of deposition, and fatty acid composition. *Journal of Experimental Botany*, 58 (10): 2463-2470.

Bennett, J. W. & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16 (3): 497-516.

Benyon, F. H. L., Burgess, L. W. & Sharp, P. J. (2000). Molecular genetic investigations and reclassification of *Fusarium* species in sections *Fusarium* and *Roseum*. *Mycol Res*, 104: 1164-1174.

Bernhoft, A., Torp, M., Clasen, P.-E., Løes, A.-K. & Kristoffersen, A. B. (2010). *Factors influencing Fusarium and mycotoxin concentrations in Norwegian cereals*. Nordic Baltic Fusarium Seminar (NBFS), Ski, Norway. Kursiv Media AS. S. 18 s.

Beyer, M., Röding, S., Ludewig, A. & Verreet, J. A. (2004). Germination and Survival of *Fusarium graminearum* Macroconidia as Affected by Environmental Factors. *Journal of Phytopathology*, 152 (2): 92-97.

Bjørnstad, Å. & Skinnes, H. (2008). Resistance to *Fusarium* infection in oats (*Avena sativa* L.). *Cereal Research Communications*, 36 (0): 57-62.

Bjørnstad, Å., Skinnes, H., Klemsdal, S., Lysoe, E., Dill-Macky, R., Steffenson, B., Dong, Y. & Anderson, J. (2011). *Mycotoxin Prevention in Cereal Crops by Enhanced Host Plant Resistance*. Norwegian University of Life Sciences, Ås, Norway.

Boenisch, M. & Schafer, W. (2011). *Fusarium graminearum* forms mycotoxin producing infection structures on wheat. *BMC Plant Biology*, 11 (1): 110.

Bottalico, A. & Perrone, G. (2002). Toxigenic *Fusarium* species and Mycotoxins Associated with Head Blight in Small-Grain Cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 108 (7): 611-624.

Brown, D. W., McCormick, S. P., Alexander, N. J., Proctor, R. H. & Desjardins, A. E. (2001). A genetic and biochemical approach to study trichothecene diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology*, 32 (2): 121-133.

Brown, D. W., McCormick, S. P., Alexander, N. J., Proctor, R. H. & Desjardins, A. E. (2002). Inactivation of a cytochrome P-450 is a determinant of trichothecene diversity in *Fusarium* species. *Fungal Genetics and Biology*, 36 (3): 224-233.

Brown, D. W., Proctor, R. H., Dyer, R. B. & Plattner, R. D. (2003). Characterization of a *Fusarium* 2-gene cluster involved in trichothecene C-8 modification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (27): 7936-7944.

Bryden, W. L. (2007). Mycotoxins in the food chain: human health implications. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16: 95-101.

Burmeister, H. R. & Plattner, R. D. (1987). Enniatin production by *Fusarium tricinctum* and its effect on germinating wheat seeds. *Phytopathology*, 77 (10): 1483-1487.

Bustin, S. A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29 (1).

Canady, R. A., Coker, R. D., Egan, S. K., Krska, R., Olsen, M., Resnik, S. & Schlatter, J. (2001). T-2 and HT-2 toxins. Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food, FAO Food and Nutrition Paper 74. I: WHO (red.). *WHO Food Additives Series 47*. Geneva, Switzerland. s. 557-680 s.

Commission, E. (2006). Commission regulation (CE) NO 1881/2006 Setting maximum levels of certain contaminants in foodstuff. 5-24 s.

Cooney, J. M., Lauren, D. R. & di Menna, M. E. (2001). Impact of competitive fungi on trichothecene production by *Fusarium graminearum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (1): 522-526.

Dersjant-Li, Y., Verstegen, M. W. & Gerrits, W. J. (2003). The impact of low concentrations of aflatoxin, deoxynivalenol or fumonisin in diets on growing pigs and poultry. *Nutr Res Rev*, 16 (2): 223-39.

Desjardins, A. E. (2006). *Fusarium mycotoxins: chemistry, genetics, and biology*. St. Paul, Minn., APS Press. IX,260 s. s.

Dheda, K., Huggett, J. F., Bustin, S. A., Johnson, M. A., Rook, G. & Zumla, A. (2004). Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques*, 37 (1): 112-+.

Divon, H. H., Razzaghian, J., Udnes-Aamot, H. & Klemsdal, S. S. (2012). *Fusarium langsethiae* (Torp and Nirenberg), investigation of alternative infection routes in oats. *European Journal of Plant Pathology*, 132 (1): 147-161.

-
- Dorak, M. T. (2006). *Real-time PCR*. New York, Taylor & Francis. XXVI, 333 s. s.
- Edwards, S. (2007). Investigation of Fusarium mycotoxins in UK barley and oat production. *HGCA Project Report No. 415*. London: HGCA.
- Felleskjøpet. (2012). *Kornguiden Sesongen 2012/13. Leveringsbetingelser produsentkorn*.
- Fernández-Ortuño, D., Atkins, S. L. & Fraaije, B. A. (2011). The use of a CYP51C gene based PCR-RFLP assay for simultaneous detection and identification of Fusarium avenaceum and F. tricinctum in wheat. *Int J Food Microbiol*, 145 (1): 370-374.
- Fleige, S. & Pfaffl, M. W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, 27 (2-3): 126-139.
- Foroud, N. & Eudes, F. (2009). Trichothecenes in Cereal Grains. *International Journal of Molecular Sciences*, 10 (1): 147-173.
- Fung, F. & Clark, R. F. (2004). Health effects of mycotoxins: A toxicological overview. *Journal of Toxicology-Clinical Toxicology*, 42 (2): 217-234.
- Gehrig, H. H., Winter, K., Cushman, J., Borland, A. & Taybi, T. (2000). An improved RNA isolation method for succulent plant species rich in polyphenols and polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter*, 18 (4): 369-376.
- Glinski, M., Urbanke, C., Hornbogen, T. & Zocher, R. (2002). Enniatin synthetase is a monomer with extended structure: evidence for an intramolecular reaction mechanism. *Archives of Microbiology*, 178 (4): 267-273.
- Goswami, R. S. & Kistler, H. C. (2004). Heading for disaster: Fusarium graminearum on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, 5 (6): 515-525.
- Halstensen, A., Nordby, K.-C., Klemsdal, S., Elen, O., Clasen, P.-E. & Eduard, W. (2006). Toxicogenic Fusarium spp. as Determinants of Trichothecene Mycotoxins in Settled Grain Dust. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 3 (12): 651-659.
- Hermann, M., Zocher, R. & Haese, A. (1996). Effect of disruption of the enniatin synthetase gene on the virulence of Fusarium avenaceum. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9 (4): 226-232.
- Hofgaard, I. S., Aamot, H. U., Klemsdal, S. S., Elen, O., Jestoy, M. & Brodal, G. (2010). Occurrence of Fusarium spp. and mycotoxins in Norwegian wheat and oats. Nordic Baltic Fusarium Seminar (NBFS), Ski, Norway. Kursiv Media AS. s. 9 s.
- Hope, R., Aldred, D. & Magan, N. (2005). Comparison of environmental profiles for growth and deoxynivalenol production by Fusarium culmorum and F. graminearum on wheat grain. *Letters in Applied Microbiology*, 40 (4): 295-300.
- Jestoi, M. (2008). Emerging Fusarium-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin - A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48 (1): 21-49.

Kang, Z., Zingen-Sell, I. & Buchenauer, H. (2005). Infection of wheat spikes by <i>Fusarium avenaceum</i> and alterations of cell wall components in the infected tissue. *European Journal of Plant Pathology*, 111 (1): 19-28.

Klemsdal, S. S., Aamot, H. U., Elen, O., Hofgaard, I. S. & Brodal, G. (2009). *Samspill mellom ulike Fusarium-arter - betydning for soppens vekst og mykotoksinproduksjon*. Bioforsk-konferansen 2009, Rica Park Hotell Sandefjord. Kursiv Media. 202-203 s.

Kokkonen, M., Ojala, L., Parikka, P. & Jestoi, M. (2010). Mycotoxin production of selected *Fusarium* species at different culture conditions. *Int J Food Microbiol*, 143 (1–2): 17-25.

Kosiak, B., Torp, M., Skjerve, E. & Thrane, U. (2003). The prevalence and distribution of *Fusarium* species in Norwegian cereals: a survey. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science*, 53 (4): 168-176.

Langeland, Å. (2010). *Plantesykdommer-35.jpg* (red.).

Lee, T., Han, Y. K., Kim, K. H., Yun, S. H. & Lee, Y. W. (2002). Tri13 and Tri7 determine deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (5): 2148-2154.

Li, Y. S., Wang, Z. H., Beier, R. C., Shen, J. Z., De Smet, D., De Saeger, S. & Zhang, S. X. (2011). T-2 Toxin, a Trichothecene Mycotoxin: Review of Toxicity, Metabolism, and Analytical Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (8): 3441-3453.

Li, Z. W. & Trick, H. N. (2005). Rapid method for high-quality RNA isolation from seed endosperm containing high levels of starch. *Biotechniques*, 38 (6): 872-+.

Liu, K. S. (2011). Comparison of Lipid Content and Fatty Acid Composition and Their Distribution within Seeds of 5 Small Grain Species. *Journal of Food Science*, 76 (2): C334-C342.

Liu, W. Q., Wang, B. C., Duan, C. R. & Li, B. (2005). A method for isolating functional RNA from callus of *Dendrobium candidum* contented rich polysaccharides. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 42 (3-4): 259-262.

Lysoe, E., Klemsdal, S. S., Bone, K. R., Frandsen, R. J. N., Johansen, T., Thrane, U. & Giese, H. (2006). The PKS4 gene of *Fusarium graminearum* is essential for zearalenone production. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (6): 3924-3932.

Magan, N., Hope, R., Cairns, V. & Aldred, D. (2003). Post-Harvest Fungal Ecology: Impact of Fungal Growth and Mycotoxin Accumulation in Stored Grain. *European Journal of Plant Pathology*, 109 (7): 723-730.

Magan, N. & Olsen, M. (2004). *Mycotoxins in Food: Detection and Control*. Boca Raton, CRC. 471 s.

-
- Magan, N. & Aldred, D. (2007). Why do fungi produce mycotoxins? I: Dijksterhuis, J. (red.) *Mycology, Food Mycology - A Multifaceted Approach to Fungi and Food*, s. 121-133, CRC Press.
- Malboeuf, C. M., Isaacs, S. J., Tran, N. H. & Kim, B. (2001). Thermal effects on reverse transcription: Improvement of accuracy and processivity in cDNA synthesis. *Biotechniques*, 30 (5): 1074-+.
- McCormick, S. P., Alexander, N. J., Trapp, S. E. & Hohn, T. M. (1999). Disruption of TRI101, the gene encoding trichothecene 3-O-acetyltransferase, from *Fusarium sporotrichioides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (12): 5252-5256.
- McCormick, S. P., Alexander, N. J. & Proctor, R. H. (2006). Heterologous expression of two trichothecene P450 genes in *Fusarium verticillioides*. *Canadian Journal of Microbiology*, 52 (3): 220-226.
- McMullen, M., Jones, R. & Gallenberg, D. (1997). Scab of wheat and barley: A re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease*, 81 (12): 1340-1348.
- Medina, A. & Magan, N. (2010). Comparisons of water activity and temperature impacts on growth of *Fusarium langsethiae* strains from northern Europe on oat-based media. *Int J Food Microbiol*, 142 (3): 365-369.
- Medina, A. & Magan, N. (2011). Temperature and water activity effects on production of T-2 and HT-2 by *Fusarium langsethiae* strains from north European countries. *Food Microbiology*, 28 (3): 392-398.
- Meek, I. B., Peplow, A. W., Ake, C., Phillips, T. D. & Beremand, M. N. (2003). Tri1 encodes the cytochrome P450 monooxygenase for C-8 hydroxylation during trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides* and resides upstream of another new Tri gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (3): 1607-1613.
- Miller, J. D., Greenhalgh, R., Wang, Y. Z. & Lu, M. (1991). Trichothecene chemotypes of three *Fusarium* species. *Mycologia*, 83 (2): 121-130.
- Mylona, K. & Magan, N. (2011). *Fusarium langsethiae*: Storage environment influences dry matter losses and T2 and HT-2 toxin contamination of oats. *Journal of Stored Products Research*, 47 (4): 321-327.
- Naczek, M. & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41 (5): 1523-1542.
- Nelson, P. E., Dignani, M. C. & Anaissie, E. J. (1994). Taxonomy, Biology, and Clinical Aspects of *Fusarium* Species. *Clinical Microbiology Reviews*, 7 (4): 479.
- Nielsen, G., Jensen, J. & Spliid, H. (2010). *Monitoring of Fusarium toxins in cereal crops in Denmark*. Nordic Baltic *Fusarium* Seminar (NBFS), Ski, Norway. Kursiv Media AS. s.13 s.

-
- Nielsen, L., Jensen, J., Jørgensen, L. & Justesen, A. (2010). *Occurrence and control of Fusarium in cereals in Denmark*. Nordic Baltic Fusarium Seminar (NBFS), Ski, Norway. Kursiv Media AS. s.14 s.
- Parry, D. W., Jenkinson, P. & McLeod, L. (1995). Fusarium ear blight (scab) in small-grain cereals - a review. *Plant Pathology*, 44 (2): 207-238.
- Peplow, A. W., Meek, I. B., Wiles, M. C., Phillips, T. D. & Beremand, M. N. (2003a). Tri16 is required for esterification of position C-8 during trichothecene mycotoxin production by *Fusarium sporotrichioides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (10): 5935-5940.
- Peplow, A. W., Tag, A. G., Garifullina, G. F. & Beremand, M. N. (2003b). Identification of new genes positively regulated by Tri10 and a regulatory network for trichothecene mycotoxin production. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (5): 2731-2736.
- Pestka, J. (2010). Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Archives of Toxicology*, 84 (9): 663-679.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29 (9).
- Pfaffl, M. W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. I: Bustin, S. A. (red.) *A-Z of quantitative PCR* s. 87-112.
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C. & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26 (6): 509-515.
- Placinta, C. M., D'Mello, J. P. F. & Macdonald, A. M. C. (1999). A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 78 (1-2): 21-37.
- Proctor, R. H., Hohn, T. M. & McCormick, S. P. (1995a). Reduced Virulence of *Gibberella-Zeae* Caused by Disruption of a Trichothecene Toxin Biosynthetic Gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8 (4): 593-601.
- Proctor, R. H., Hohn, T. M., McCormick, S. P. & Desjardins, A. E. (1995b). TRI6 Encodes an Unusual Zinc Finger Protein Involved in Regulation of Trichothecene Biosynthesis in *Fusarium Sporotrichioides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (5): 1923-1930.
- Raja, S., Luketich, J. D., Kelly, L. A., Ruff, D. W. & Godfrey, T. E. (2000). Increased sensitivity of one-tube, quantitative RT-PCR. *Biotechniques*, 29 (4): 702-+.
- Richard, J. L., Payne, G. A., Desjardins, A. E., Maragos, C., Norred, W. P., Pestka, J. J., Philips, T. D., van Egmond, H. P., Vardon, P. J., Whitaker, T. B. & Wood, G. (2003). *Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems*. Ames, Iowa, Council for Agricultural Science and Technology. XVI, 199 s. s.

Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M. & Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *Bmc Molecular Biology*, 7.

Sweeney, M. J. & Dobson, A. D. W. (1999). Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *Fems Microbiology Letters*, 175 (2): 149-163.

Tag, A. G., Garifullina, G. F., Peplow, A. W., Ake, C., Phillips, T. D., Hohn, T. M. & Beremand, M. N. (2001). A novel regulatory gene, Tri10, controls trichothecene toxin production and gene expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (11): 5294-5302.

Tamburic-Ilincic, L. (2010). Fusarium species and mycotoxins associated with oat in southwestern Ontario, Canada. *Canadian Journal of Plant Science*, 90 (2): 211-216.

Tekle, S., Dill-Macky, R., Skinnies, H., Tronsmo, A. & Bjørnstad, Å. (2012). Infection process of Fusarium graminearum in oats (*Avena sativa* L.). *European Journal of Plant Pathology*, 132 (3): 431-442.

Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A. & Heinen, E. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol*, 75 (2-3): 291-295.

Thrane, U., Adler, A., Clasen, P. E., Galvano, F., Langseth, W., 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 (3): 257-266.

Tomoda, H., Huang, X. H., Cao, J., Nishida, H., Nagao, R., Okuda, S., Tanaka, H., Omura, S., Arai, H. & Inoue, K. (1992). Inhibition of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase activity by cyclodepsipeptide antibiotics. *The Journal of antibiotics*, 45 (10): 1626-1632.

Torp, M. & Langseth, W. (1999). Production of T-2 toxin by a Fusarium resembling Fusarium poae. *Mycopathologia*, 147 (2): 89-96.

Torp, M. & Nirenberg, H. I. (2004). Fusarium langsethiae sp. nov. on cereals in Europe. *Int J Food Microbiol*, 95 (3): 247-256.

Velluti, A., Marín, S., Gonzalez, R., J Ramos, A. & Sanchis, V. (2001). Fumonisin B1, zearalenone and deoxynivalenol production by Fusarium moniliforme, F proliferatum and F graminearum in mixed cultures on irradiated maize kernels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81 (1): 88-94.

Von der Ohe, C. & Miedaner, T. (2011). Competitive Aggressiveness in Binary Mixtures of Fusarium graminearum and F. culmorum Isolates Inoculated on Spring Wheat with Highly Effective Resistance QTL. *Journal of Phytopathology*, 159 (6): 401-410.

Wagacha, J. M. & Muthomi, J. W. (2007). Fusarium culmorum: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop Protection*, 26 (7): 877-885.

-
- Wagacha, J. M. & Muthomi, J. W. (2008). Mycotoxin problem in Africa: Current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *Int J Food Microbiol*, 124 (1): 1-12.
- Wagacha, J. M., Oerke, E.-C., Dehne, H.-W. & Steiner, U. (2012). Interactions of *Fusarium* species during prepenetration development. *Fungal Biol*, 116 (7): 836-847.
- Watanabe, M., Yonezawa, T., Lee, K., Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y., Goto, K. & Hara-Kudo, Y. (2011). Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. *Bmc Evolutionary Biology*, 11.
- Wight, W. D., Kim, K. H., Lawrence, C. B. & Walton, J. D. (2009). Biosynthesis and Role in Virulence of the Histone Deacetylase Inhibitor Depudecin from *Alternaria brassicicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22 (10): 1258-1267.
- Xu, X. M., Parry, D. W., Nicholson, P., Thomsett, M. A., Simpson, D., Edwards, S. G., Cooke, B. M., Doohan, F. M., Brennan, J. M., Moretti, A., Tocco, G., Mule, G., Hornok, L., Giczey, G. & Tatnell, J. (2005). Predominance and association of pathogenic fungi causing *Fusarium* ear blight in wheat in four European countries. *European Journal of Plant Pathology*, 112 (2): 143-154.
- Xu, X. M., Monger, W., Ritieni, A. & Nicholson, P. (2007a). Effect of temperature and duration of wetness during initial infection periods on disease development, fungal biomass and mycotoxin concentrations on wheat inoculated with single, or combinations of, *Fusarium* species. *Plant Pathology*, 56 (6): 943-956.
- Xu, X. M., Nicholson, P. & Ritieni, A. (2007b). Effects of fungal interactions among *Fusarium* head blight pathogens on disease development and mycotoxin accumulation. *Int J Food Microbiol*, 119 (1-2): 67-71.
- Yli-Mattila, T., Mach, R. L., Alekhina, I. A., Bulat, S. A., Koskinen, S., Kullnig-Gradinger, C. M., Kubicek, C. P. & Klemsdal, S. S. (2004). Phylogenetic relationship of *Fusarium langsethiae* to *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* as inferred by IGS, ITS, β -tubulin sequences and UP-PCR hybridization analysis. *Int J Food Microbiol*, 95 (3): 267-285.
- Yli-Mattila, T. (2010a). Ecology and evolution of toxigenic *Fusarium* species in cereals in Northern Europe and Asia. *Journal of Plant Pathology*, 92 (1): 7-18.
- Yli-Mattila, T. (2010b). *Problems in cereal resistance to toxigenic Fusarium species*. Nordic Baltic *Fusarium* Seminar (NBFS), Ski, Norway. Kursiv Media AS. s. 35 s.
- Zhou, M. X., Robards, K., Glennie-Holmes, M. & Helliwell, S. (1998). Structure and pasting properties of oat starch. *Cereal Chemistry*, 75 (3): 273-281.

Andre referanser

Agilent Technologies, 2001, 2003-2006

(tilgjengelig på: <http://icob.sinica.edu.tw/pubweb/Core%20Facilities/Data/R401-core/RNA6000Nanomanual.pdf>)

Produktbeskrivelse Trizol® Reagent (Invitrogen):
http://tools.invitrogen.com/content/sfs/productnotes/F_Trizol%20and%20Trizol%20LS-041018-RD-TL-HL0506021.pdf

Produktbeskrivelse Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich):
<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Bulletin/strn250bul.Par.0001.File.tmp/strn250bul.pdf>

Produktbeskrivelser Turbo DNA-free™ Kit (Ambion) og DNA-free™ Kit (Ambion):
http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms_055740.pdf
http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms_055739.pdf

Produktbeskrivelse SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen):
http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/vilo_cdna_synthesis_man.pdf