



Perunantyyvi- ja märkämädän epidemiologia, diagnostiikka ja hallintakeinot

Asko Hannukkala ja Marjo Segerstedt (toim.)



Maa- ja elintarviketalous numero 41
58 s.

Perunantyyvi- ja märkämädän epidemiologia, diagnostiikka ja hallintakeinot

Asko Hannukkala ja Marjo Segerstedt (toim.)

ISBN 951-729-835-8 (Painettu)
ISBN 951-729- 836-6 (Verkkajulkaisu)
ISSN 1458-5073 (Painettu)
ISSN 1458-5081 (Verkkajulkaisu)
www.mtt.fi/met/pdf/met41.pdf

Copyright

MTT

Asko Hannukkala ja Marjo Segerstedt (toim.)

Julkaisija ja kustantaja

MTT, 31600 Jokioinen

Jakelu ja myynti

MTT, Tietopalvelut, 31600 Jokioinen

Puhelin (03) 4166 2327, telekopio (03) 4188 2339

Sähköposti julkaisut@mtt.fi

Julkaisuvuosi

2004

Kannen kuva

Asko Hannukkala

Painopaikka

Data Com Finland Oy

Perunantyyvi- ja märkämädän epidemiologia, diagnostiikka ja hallintakeinot

Asko Hannukkala ja Marjo Segerstedt (toim.)¹⁾

¹⁾MTT, (Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus), Kasvintuotannon tutkimus, Kasvinsuojelu, 31600 Jokioinen, asko.hannukkala@mtt.fi, marjo.segerstedt@mtt.fi

Tiivistelmä

Perunantyyvi- ja märkämädän hallintaan liittyy siemenperunantuotannossa yhä ratkaisemattomia ongelmia. Näitä bakteeritauteja aiheuttavat *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca) (*Pectobacterium atrosepticum*), *E. c.* subsp. *carotovora* (Ecc) (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*) ja *E. chrysanthemi* (Ech) (*Pectobacterium chrysanthemi*). Suomessa Eca ja Ecc aiheuttavat märkämätää, mutta tyypillisesti vain Eca-tartunta johtaa tyvien mätänemiseen. Tyvi- ja märkämätäbakteerit leviävät ensisijaisesti piilotartuntoina siemenperunassa. Kasvukaudella bakteerit voivat levitä monista erilaisista lähiympäristön tartuntalähteistä, esimerkiksi mädäntyneistä satojätteistä ja mukuloista istutuksen, noston ja varastoinnin aikana.

Tutkimushankkeessa kehitettiin eri tarkoituksiin soveltuvia PCR-menetelmiä, joilla tunnistetaan *E. carotovora*, Eca, ja Ecc. Osa menetelmistä on valmiita sovellettaviksi siemenperunan sertifiointissa rutiininomaisesti. Menetelmillä voidaan osoittaa piilevä Eca- ja Ecc-tartunta.

PCR-menetelmiä hyödyntäen seurattiin *E. carotovora*-saastunnan ilmaantamista ja lisääntymistä siemenperunan alkutuotannossa. Mikrolisäysaineistot olivat puhtaita taudeista. Piileviä Ecc-tartuntoja löytyi vähän jo kasvihuone-tuotannossa. Eca-tartunnat ja ensimmäiset tyvimätäoireet ilmaantuivat puolestaan toisen avomaalisäysvuoden aikana. Ecc-bakteeria oli yleisesti Tyrnävänjoessa, Ängeslevänjoessa ja Leppiojassa, mutta Eca-alalajia ei löydetty jokivesistä. Ecc-bakteeria löytyi myös tyvimätäisistä varsista, joissa ei havaittu Eca-alalajia. Viljelytekniikan vaikutuksia tyvi- ja märkämätään ei pystytty selvittämään, koska tauteja esiintyi liian vähän. Mukulat kuitenkin olivat vähemmän alttiita mätänemiselle, kun niiden kalsiumpitoisuutta lisättiin lan-noitteilla.

Tyvi- ja märkämädän torjuntastrategioiden kehittäminen siemenperunantuotannossa nykyistä paremmiksi edellyttää, että myös Ecc-bakteerin rooli taudinaiheuttajana selvitetään. Siemenperunan tuotantoketjussa tarvitaan monia muutoksia, jos luonnossa yleinen Ecc osoittautuu merkittäväksi tyvi- ja märkämädän aiheuttajaksi. Siemenperunan sertifiointissa olisi tärkeää osoittaa ja arvioida luotettavasti sadon piilevän bakteeritartunnan merkitys suhteellisen epäluotettavien kasvustohavaintojen sijaan.

Avainsanat: peruna, kasvinsuojelu, kasvitaudit, bakteeritaudit, tyvimätä, märkämätä, Erwinia carotovora, epidemiologia, diagnostiikka, viljelyksellinen torjunta

Epidemiology, diagnostics and control of blackleg and soft rot on potato

Asko Hannukkala and Marjo Segerstedt (eds.)¹⁾

¹⁾MTT, Agrifood Research Finland, Plant Production Research, Plant Protection, Fin-31600 Jokioinen, Finland, asko.hannukkala@mtt.fi, marjo.segerstedt@mtt.fi

Abstract

The management of blackleg and soft rot on potato caused by bacteria *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca) (*Pectobacterium atrosepticum*), *E. c.* subsp. *carotovora* (Ecc) (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*) and *E. chrysanthemi* (Ech) (*Pectobacterium chrysanthemi*) is an unsolved dilemma in seed potato production. Latent infections in seed tubers provide the most important source of inoculum for the potato production. In seed potato production several sources of primary inoculum can be found in the environment during the growth season. Infested plant residue and rotting tubers provide the most important source of secondary inoculum.

Several different PCR-methods to detect latent Eca and Ecc infections in plant material were developed during the project. The methods were implemented mainly for research purposes but some of them can be further developed as tools for routine health inspection in production of certified seed.

The infestation of potato by *Erwinia*-bacteria in early phases of seed production chain was investigated by PCR-diagnostics. In vitro material was free from *Erwinia*, while some latent Ecc infections were detected during seed multiplication in greenhouses. Eca infections exceeding statistical and DNA detection limit were found after the 2nd year of seed multiplication in open field.

Ecc was commonly found from river Tynävä and its surroundings while no Eca was detected from potential irrigation water. In a few stems showing blackleg symptoms only Ecc was found instead of Eca. In studies on the efficacy of crop management practices to control blackleg and soft rot the disease level was regularly too low to make conclusions on the effects. Increase in Ca content in tubers seemed to decrease rotting of the tubers.

Further studies are necessary to solve the relative importance of Eca and Ecc as causal agents of bacterial rots in potato production and to improve crop management practices. The seed health inspections during the seed certification process should be developed to detect latent Eca and Ecc infections in tubers instead of surveying visible symptoms in crop and during storage.

Key words: crop protection, plant diseases, potato, black leg, soft rot, Erwinia carotovora, epidemiology, diagnostics, crop management practices

Alkusanat

Siemenperunan tärkein laatukriteeri on terveys. Viime vuosina tyvimätää on löytenyt yksittäisten siemenerien jälkeläistöstä yllätyksellisen paljon. Kasvu-kausi 2000 oli erityisen vaikea, mutta kesällä 2003 tyvimätää oli hyvin vähän siementuotantoalueilla. Nyt päättyvässä tutkimushankkeessa 'Sertifioidun siemenperunan markkinoiden kasvattaminen tyvimätäriski hallitsemalla' pyrittiin kehittämään PCR-pohjaista piilotartunnan diagnostiikkaa, selvittämään siemenperunan alkutuotannon terveydentila ja löytämään viljelytekniisiä keinoja tyvimätäriskin vähentämiseksi perunantuotannossa.

Hanke toteutettiin vuosina 2001-2003 Maa- ja metsätalousministeriön myöntämän yhteistutkimusmäärärahan turvin. Lisäksi osapuolten oma rahoituspanos oli merkittävä. Viljelytekniset tutkimukset liittyivät kiinteästi MTT:n Pohjois-Pohjanmaan tutkimusaseman toteuttamiin kehittämishankkeisiin. Tutkimusyhteistyö toteutettiin MTT:n Kasvintuotannon tutkimuksen, MTT:n Pohjois-Pohjanmaan tutkimusaseman, Perunantutkimuslaitoksen ja Suomen Siemenperunakeskus Oy:n kanssa. Työpanoksellaan ja asiantuntemuksellaan hanketta ovat tukeneet lisäksi Pohjoisen Kantaperuna Oy, Ravintoraisio/ruokaperuna ja KTTK:n Siementarkastusosasto.

Tyvimätä osoittautui paljon vaikeammaksi tutkimuskohteeksi, kuin hanketta käynnistettäessä osattiin ennakoida. PCR-diagnostiikan kehittämisessä jouduttiin tekemään paljon arvioitua enemmän aivan perustyötä, koska mm. julkaistut alukkeet osoittautuivat liian epäherkiksi tunnistamaan suomalaisia *Erwinia*-kantoja. Taudin pieni esiintymistiheys tutkittavissa aineistoissa edellytti erittäin suurten siemenrä- ja koejäsenkohtaisten mukulamäärien analysointia. Resurssien puitteissa ei voitu toteuttaa läheskään kaikkia alkuperäisen hankesuunnitelman tutkimusaikeita.

Hankkeessa luotiin edellytykset PCR-diagnostiikan siirtämiseen osaksi siemenperunan sertifiointiprosessia, jolloin kasvukausien sääoloista riippuvainen kasvustotarkastusten tulos voidaan varmentaa mukulasadosta. Siemenperunan alkutuotannossa nykyinen hygieniataso todettiin riittäväksi tyvimädän hallinnassa. Märkämätää esiintyi lisäysaineistoissa ja tuotantoympäristössä ennakoitua enemmän, ja sen merkitys joudutaan arvioimaan uudelleen. Tutkimuksessa saatiin lisänäyttöä Ca-lannoituksen merkityksestä mallon rakenteen parantajana ja mukuloiden mätänemisherkkyyden vähentäjänä.

Jokioisissa maaliskuussa 2004

Asko Hannukkala

Tutkimuspäällikkö, tutkimushankkeen vastuullinen johtaja

Sisällysluettelo

Tyvi- ja märkämädän biologia, epidemiologia ja hallintakeinot <i>Lehtinen, A. & Hannukkala, A.</i>	7
Piilevän tyvimätätartunnan toteamiseen käytettävät PCR-menetelmät <i>Rantanen, T., Moisio, K. & Suokas, M.</i>	17
Tyvi- ja märkämätä siemenperunan alkutuotannossa <i>Hannukkala, A., Rantanen, T., Lehtinen, A., Moisio, K. & Palohuhta, J.P.</i> .	24
Tyvi- ja märkämädän esiintyminen perunan kenttäkokeissa <i>Rahkonen, A., Virtanen, E., Pulkkanen, M. & Forsman, K.</i>	32
<i>Erwinia carotovora</i> -bakteereita esiintyy ajoittain yleisesti jokivedessä <i>Lehtinen, A., Rantanen, T., Hannukkala, A., Moisio, K. & Virtanen, E.</i>	39
Varsistonhävityksen vaikutus perunan tyvimädän esiintymiseen kasvustossa ja sadossa <i>Virtanen, E., Pulkkanen, M., Forsman, K., Rantanen, T. & Hannukkala, A.</i> ..	45
Kalsiumlannoitus sekä perunatyvi- ja märkämätä <i>Forsman, K., Virtanen, E., Lehtonen, M. & Jauhiainen, L.</i>	50

Tyvi- ja märkämädän biologia, epidemiologia ja hallintakeinot

Ari Lehtinen¹⁾ ja Asko Hannukkala¹⁾,

¹⁾MTT (Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus), Kasvintuotannon tutkimus, Kasvinsuojelu, 31600 Jokioinen, ari.lehtinen@mtt.fi, asko.hannukkala@mtt.fi

Tiivistelmä

Perunalla tyvi- ja märkämätää aiheuttavat *E. carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca), *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) ja *E. chrysanthemi* (Ech). Tyvimädäksi kutsutaan emomukulasta alkavaa ja siitä perunan varsiin leviävää mätänemistä. Mukuloiden mätänemistä kutsutaan märkämädäksi. Kaikki mainitut bakteerit aiheuttavat märkämätää. Tavallisesti vain Eca ja Ech tuottavat tyvioireita. Tässä katsauksessa selvitetään, mitä perunan *Erwinia*-bakteerien biologiasta, epidemiologiasta ja hallintakeinoista tiedetään muualla tehtyjen tutkimusten perusteella.

Molemmat taudit ovat siemenlevintäisiä. Emomukuloista tytärmukuloihin leviävä bakteerilima voi aiheuttaa tartunnan kasvukaudella, samoin bakteerien saastuttama kasteluvesi. Satomukulat voivat saada tartunnan noston tai lajittelun yhteydessä joutuessaan kosketuksiin mädäntyvistä mukuloista ja varsiston jätteistä peräisin olevan bakteeriliman kanssa. Mukulan pinnan kastuminen on edellytys bakteeritartunnan kehittymiselle märkämätäoireeksi. Siemenmukulan mätäneminen on puolestaan edellytys tyvimätäoireen kehitykselle.

Tärkeimmät tyvi- ja märkämätää ehkäisevät torjuntatoimenpiteet ovat mahdollisimman terve siemenperuna, hygienia tuotannon joka vaiheessa, hyvä pellon kuivatus ja kohtuullinen kastelu, sadon nostaminen kuivissa olosuhteissa ja sen nopea kuivatus ennen varastointia, tarpeeksi viileät varasto-olot, sekä kondenssiveden muodostumisen estäminen varastoinnin aikana.

Asiasanat: kasvinsuojelu, kasvitaudit, peruna, tyvimätä, märkämätä, Erwinia carotovora, Erwinia chrysanthemi, Erwinia carotovora subsp. carotovora, Erwinia carotovora subsp. atroseptica, epidemiologia

Johdanto

Päättävän tutkimushankkeen yhtenä tavoitteena oli koota ja ylläpitää kattava kirjallisuusviitetietokanta tyvi- ja märkämätää aiheuttavista bakteereista julkaisuista tutkimuksista. Viime vuosina perunan *Erwinia*-bakteereita on tutkittu melko paljon molekyylibiologisista menetelmistä. Bakteerien taudinaiheuttamiskyvystä on tuotettu perustietoa. Perunan *Erwinia*-tutkimukseen keskittyneitä ryhmiä on maailmanlaajuisesti vähän, lähinnä Hollannissa, Skotlannissa ja Kanadassa. Suomessa korkeatasoista perustutkimusta tehdään Helsingin yliopiston Biokeskuksessa ja Soveltavan biologian laitoksella.

Tyvi- ja märkämädän hallintakeinojen kivijalka on taudinaiheuttajan epidemiologian hyvä perustuntemus. Se auttaa ymmärtämään, miksi oireet puhkeavat niin oikukkaasti ja miksi samakin piilotartuntaa kantava siemenrä voi toisissa oloissa tuottaa lähes terveeseen, toisissa hyvin tyvimätäisen kasvuston. Viime vuosina *Erwinia*-bakteerien epidemiologiaa selvittäviä tutkimustuloksia on julkaistu niukasti. Tämän pääosin ulkomailla julkaistuihin tutkimustuloksiin perustuvan katsauksen tavoitteena on saattaa suomenkielisten lukijoiden tietoon, mitä perunan *Erwinia*-bakteerien epidemiologiasta nyt tiedetään ja täydentää edellisessä tyvimätähankkeessa laaditun raportin (Heith & Karjalainen 1999) tiedot ajantasalle.

***Erwinia*-lajit ja -alalajit taudinaiheuttajina perunalla**

Erwinia-suvun bakteereista perunalla tyvi- ja märkämätää aiheuttavat *E. carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca), *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) ja *E. chrysanthemi* (Ech). Uusimman nimitysjärjestelmän mukaan bakteerit on siirretty *Pectobacterium*-sukuun, jossa Eca on *P. atrosepticum*, Ecc on *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* ja Ech on *P. chrysanthemi* (Gardan ym. 2003).

Tyvimädäksi kutsutaan emomukulasta alkavaa ja siitä perunan varsiin leviävää mätänemistä (Kuva 1), kun taas mukuloiden mätänemistä kutsutaan märkämädäksi (Kuvat 2 ja 3). Kaikki kolme *Erwinia*-bakteeria kykenevät aiheuttamaan märkämätää, mutta tyvimätää kirjallisuuden perusteella pystyvät aiheuttamaan yleensä vain Eca ja Ech (Pérombelon & Kelman 1987). Tässä tutkimushankkeessa Ecc:a löydettiin kuitenkin myös tyvimätäisistä varsista, joissa ei esiintynyt Eca:a (kts. s. 22). Hollannissa paljon suuremmalla aineistolla tehdyissä toistaiseksi julkaisemattomissa vuosina 2002 ja 2003 suoritetuissa tutkimuksissa Ecc on usein aiheuttanut lakastumisoireita ja joskus tyypillisiä tyvimätäioireita. Tutkimusryhmä arvelee, että poikkeuksellisen lämpimät kesät ovat yhtenä syynä Ecc-bakteerin aiheuttamiin tyvimätäioireisiin (Pérombelon & Wolf, henkilökohtainen tiedonvaihto lokakuussa 2003).

Tyvi- ja märkämädän lisäksi mekaanisesti vioittuneissa varsien yläosissa ja lehdissä voi esiintyä *Erwinia*-bakteerin aiheuttamaa mätänemistä, englanniksi 'aerial stem rot' (Kuva 4). Bakteerit kulkeutuvat haavaan ilman, kasteluveden tai hyönteisten mukana. Yleisin luonnossa esiintyvä *Erwinia*-bakteeri, Ecc on tavallisin haavaloinen myös perunalla (Pérombelon 2002). Tässäkin tutkimushankkeessa mätänevistä varsien yläosista löytyi Ecc-bakteereita (kts. s. 22). Ecc:n merkitys tyvioireiden aiheuttajana on Suomessa, kuten muuallakin yhä varmistamatta.

Erwinia-bakteereista Eca on pääasiallinen tyvimädän aiheuttaja alle 25°C:een lämpötiloissa (Pérombelon ym. 1987), mikä selittää Eca:n valta-aseman Suomessa (Harju & Kankila 1993). Korkeammissa lämpötiloissa Ech on vallitseva tyvimädän aiheuttaja. Ech:n merkitys perunan taudinaiheuttajana Suomessa lienee pieni, koska se kasvaa viileässä paljon hitaammin kuin Eca



Kuva 1. Tyypillinen tyvimätäoire perunan varren tyvellä, joka yleensä on Eca:n aiheuttama. Lämpimässä ilmastossa myös Ecc ja Ech voivat aiheuttaa samantyyppistä vointusta (Kuva: Asko Hannukkala)



Kuva 2. Tyypillinen mukulan tyvipäältä alkava mätäneminen, jota yleensä pidetään Eca:n aiheuttamana. (Kuva: Asko Hannukkala).



Kuva 3. Tyypillinen korkkihuokosista alkava mätäneminen, jota yleensä pidetään Ecc:n aiheuttamana. (Kuva: Asko Hannukkala)



Kuva 4. Tyvimätäoireita perunan varren yläosassa. Niitä pidetään yleensä Ecc:n aiheuttamina. (Kuva: Asko Hannukkala)

ja Ecc (Pérombelon & Kelman 1980). 1980-luvulla tehdyssä kartoituksessa Ech:a ei löydetty Suomesta (Harju & Kankila 1993). Sen jälkeen *Erwinia*-lajistoamme ei ole tutkittu. Toisaalta Ech on levinnyt viime vuosina huoletuttavan nopeasti Hollannissa, Tanskassa ja mahdollisesti myös Etelä-Ruotsissa (Nielsen, suullinen tiedonanto 2003). Bakteeriin tulisi suhtautua vakavasti, koska EU-lainsäädäntö velvoittaa tarkastamaan myös Ech-bakteerin esiintymisen korkeimmissa siemenluokissa (Euroopan Komission direktiivi 93/17/ETY). Suomessa ei nykyisin tehdä mitään Ech:iin liittyviä tarkastuksia, mikä voi tulevaisuudessa aiheuttaa ongelmia siemenperunan viennille.

Epidemian kulku

Taudin laukaisevat tekijät

Erwinia-bakteereille on tyypillistä, että siemenperunoissa voi olla paljon bakteereita, mutta ne eivät aiheuta näkyviä tyvimätäoireita. Piilotartuntojen aiheuttamista satotappioista on vähän tutkimustuloksia. Helias ym. (2000a) havaitsivat, että Eca:lla saastutettujen siemenperunoiden tuottama sato oli selvästi pienempi verrattuna terveiden siemenperunoiden tuottamaan satoon, vaikka kummassakaan kasvustossa ei ollut näkyviä tautioireita. Vastaavia kokeita ei Ecc-bakteerilla ole raportoitu. Nykyinen Suomen siementarkastuskäytäntö perustuu lähes pelkästään kasvustossa näkyvien tyvimätäoireiden runsauteen. Piilevänäkin Eca-tartunnat voivat alentaa sadon määrää ja laatua.

Piilevästi infektoituneiden mukuloiden mätäneminen riippuu mukulan bakteerimäärästä. Mätäneminen käynnistyy, kun bakteerisoluja on noin 10^7 kpl alkavassa mätäpesäkkeessä (Pérombelon ym. 1979). Kriittisen bakteerimäärän saavuttaminen on yleensä mahdollista vain, jos mukulat kastuvat riittävän pitkäksi aikaa. Hengittävä mukula kuluttaa käytettävissään olevan hapen pintasolukostaan muutamassa tunnissa, kun kastunut mukulan pinta hidastaa hapen liikkumista ilmasta mukulaan (Burton & Wigginton 1970). Samalla estyy hapestä riippuvien puolustusmekanismien toiminta. Hapettomuus lisää myös mukulan solukalvojen läpäisevyyttä, jolloin bakteerien käyttöön vapautuu ravinteita. Vesi sinänsä edistää bakteerien kasvua ja vesivirtausten mukana bakteerit leviävät kasvissa (Pérombelon 2002).

Siemenmukulan mätäneminen on edellytys tyvimätäoireen synnylle. Siksi mukulan mätänemistä edistävät tekijät edistävät myös tyvimätäoireen kehittymistä. Runsas sade tai kastelu, joka pitää maan pitkään märkänä, aiheuttaa siemenmukulassa hapettomat olosuhteet edistäen mukuloiden mätänemistä ja tyvioireiden puhkeamista. Siksi pellon kuivatuksesta huolehtiminen ja tarpeesta lähtevä kohtuullinen kastelu ehkäisevät tyvimädän leviämistä ja ilmaantumista pellolla (Pérombelon 2002).

Oireiden puhkeaminen kasveissa

Mukulaman mätäneminen voi alkaa jo ennen taimettumista. Runsaiden sateiden ja viileyden vuoksi voimakkaan saastunnan saaneet emomukulat saattavat jäädä taimettumatta tai versot voivat lakastua ja kuolla jo taimivaiheessa (Pérombelon 1992). Nuorissa kasveissa, joissa varren tyven solukko ei ole lignifikoitunut puisevaksi, mätäneminen etenee mukulasta suoraan varren tyveen. Veden kuljetuksen häiriintyminen varressa bakteeri-infektion vaikutuksesta johtaa poutakausina alku- ja keskikesällä versojen kitukasvuisuuteen, kellastumiseen ja lakastumiseen (Pérombelon 2002).

Verson ikääntyessä varren tyveltä alkava lignifikoituminen tekee varren kestäväksi bakteerien hajotustoimintaa vastaan. Tällöin tyvimädän oire ilmaantuukin varren keskikorkeudelle tai jopa yläosaan, jonne bakteerit ovat kulkeutuneet mukulasta johtosolukoita pitkin. Poikkeuksellisen ylhäällä varressa esiintyneet mätäoireet aiheuttivat hämmennystä siemenperunan kasvustotarkastuksissa loppukesästä 2002 ja 2003. Oireilevista latvoista löytyi vain *Ecc* alalajia (kts. s. 22).

Sertifiointitarkastuksissa on tärkeä erottaa, onko varren yläosassa esiintyvä mätäoire peräisin siemenmukulasta vai haavoihin kulkeutuneista bakteereista. Muuten kasvustotarkastus voi johtaa erän turhaan hylkäämiseen. Jos emomukula on mätä, tartunta on lähtöisin siemenestä. Jos taas emomukula on terve, tartunta on peräisin haavoihin iskeytyneistä bakteereista (Pérombelon 1992).

Taudinaiheuttajan leviäminen ja säilyminen

Tärkein *Erwinia*-bakteerien levittäjä on saastunut siemenmukula. Siemenmukulaman mädäntyessä bakteerilima tartuttaa maassa virtaavan veden välityksellä tytär- ja emomukulat. Kun maa on kuivaa, tartunta on vähäistä tai sitä ei tapahdu lainkaan. Runsaiden sateiden kastelemassa maassa bakteerit voivat levitä helposti myös viereisten kasvien mukuloihin (Elphinstone & Pérombelon 1986b). Bakteerit voivat kulkeutua emomukulasta myös rönsoja pitkin tytär- ja emomukuloihin (Helias ym. 2000b). Näiden kahden leviämistien suhteellisesta merkityksestä tyvimätää tutkivilla ryhmillä on erilaisia näkemyksiä (De Boer 2002). Tyvimätäisen varsiston merkitys taudin levittäjänä on pieni mätäneviin emomukuloihin verrattuna (Pérombelon 1992).

Terve siemenmukulaerä saa yleensä tartunnan joutuessaan kosketuksiin bakteerimätää sisältävän materiaalin kuten mukuloiden, varsiston hävityksen jäljiltä mätänevän varsistomassan, saastuneen nostokoneen tai käsittelylinjan kanssa. Lisäksi *Erwinia*-bakteerit voivat levitä kasteluveden, hyönteisten ja sadetuksen tai sateen synnyttämien aerosolien välityksellä. Bakteeripitoisia aerosoleja syntyy myös tyvimätäisen varsiston mekaanisen hävityksen yhteydessä. Aerosoleissa bakteerit voivat levitä satoja metrejä (Pérombelon 1992).

Mukuloiden käsittelyssä noston ja varastoinnin aikana *Erwinia*-bakteerit voivat levitä erittäin tehokkaasti. Erityisesti mukuloiden pinnan vioittuminen

käsittelyn aikana lisää suuresti tartunnan riskiä (Elphinstone & Pérombelon 1986a).

Eca-alalaji ei säily maassa pitkään ilman sopivaa ravintoa. Skotlannin olosuhteissa on osoitettu, ettei Eca säily maassa seuraavaan kasvukauteen (Pérombelon & Hyman 1989). Eca:n säilymisestä talven yli maahan jääneissä mukuloissa ei ole julkaistu tutkimustuloksia. Ecc sitä vastoin on yleinen kasvien juuristossa ja luonnonvesissä esiintyvä bakteeri. Suomessakin Ecc:a löytyi vesinäytteistä, joita tutkittiin Tyrnävän seudun jokivesistä vuosina 2001-2003 (ks s. 42). Ecc leviää herkästi kasteluveden ja aerosolien mukana peltolohkolle, joten maasta tai ilmasta tapahtuva tartunta on mahdollista kasvukaudella ja noston yhteydessä (Pérombelon 1992). Erityisen haitallisia taudin lähteitä ovat vesistöjen äärellä sijaitsevat jäteperunakasat, jos vesistön vettä käytetään perunan kasteluun (Pérombelon & Hyman 1987).

Tyvi- ja märkämädän hallintakeinot

Perunan tyvi- ja märkämätä ovat ensisijaisesti siemenlevintäisiä tauteja. Siksi niiden torjunnan perusta on terveen siemenperunan käyttö ja tautivapaan siemenperunan saastunnan ennaltaehkäiseminen. Lisäksi bakteeritartuntaa ja oireiden puhkeamista voidaan vähentää viljelyteknisin keinoin.

Euroopan Komission direktiivi (93/17/ETY), laki kasvinterveyden suojelemisesta (MMML 18.7.2003), siemenkauppalaki (MMML 4.8.2000) ja Maa- ja metsätalousministeriön asetus siemenperunan kaupasta (MMMA 24.11.2000) asettavat rajat *Erwinia*-bakteerien esiintymiselle siemenperunassa. Kasvintuotannon tarkastuskeskuksen Siementarkastusosaston ohjeen (KTTK 29.3.2001) mukaan sertifioitavassa siemenperunassa saa esiintyä kasvukaudella A-luokassa enintään 1 % ja B-luokassa enintään 2 % tyvimätäisiä yksilöitä. Perussiemenessä E1-luokassa kasvustossa ei saa esiintyä tyvimätää, E2- ja E3-luokissa sallitaan tautia enintään 0,5 %. Varastotarkastuksissa näkyvää märkämätää sallitaan enintään 0,2 %. Piilevän tyvi- ja märkämädän esiintymiselle siemenperunassa ei ole asetettu raja-arvoja.

Siemenperunaerien saastumista voidaan ehkäistä monin keinoin sekä kasvukaudella että varastossa. Tärkeimmät keinot ovat mukuloiden mätänemisen ehkäiseminen ja korkea hygienia tuotannon joka vaiheessa. Mukuloiden mätänemisen käynnistää useimmiten perunan pinnalle muodostuva vesikalvo, joka jo muutamassa tunnissa johtaa perunan käytössä olevan hapen loppumiseen ja aktivoi tyvimätäbakteerien toiminnan. Siksi perunapellon ojituksen on oltava kunnossa, sadetuksessa on noudatettava kohtuullisuutta, sato pyrittävä nostamaan hyvissä olosuhteissa ja kuivattamaan heti noston jälkeen ennen varastoon siirtoa. Heti noston jälkeen tehdyn kuivatuksen on todettu vähentävän huomattavasti tyvimätäsaastuntaa, kuten useimpia muitakin mukulaa vioittavia tauteja (Bartz & Kelman 1985, Vuurde & Vries 1994).

Hygienian avulla pyritään estämään mädäntyvistä mukuloista ja versoista syntyvän bakteeriliman leviäminen terveisiin mukuloihin. Tyvimätäisten

kasvien perkaaminen tytärmukuloineen pois pellosto vähentää siemen­erän saastun­nan taso­a. Edellytyksenä on, ettei perkauksen yhteydessä levitetä bak­teerilimaa terveisiin kasveihin. Hygieniaan sisältyy muiden taudinaiheuttajien ja stressien ehkäiseminen, jotta ne eivät altistaisi mukuloita mätänemise­lle.

Perunannoston aikana syntyvät haavat helpottavat bakteerin pääsemistä mu­kulan sisään, minkä vuoksi kuoren rikkoutumista ja kolhiutumista tulee vält­­tää. Kasvuston tuleentuminen vähentää mukuloiden herkkyyttä haavojen muodostumiselle. Varastossa sadon­käsittelylinjojen desinfiointi märkämätäi­sen erän jäljiltä ehkäisee muiden siemen­erien saastumista. Skotlannissa teh­dyssä kokeessa yksi tyvimätäinen peruna lajittelulinjalla lajitteluprosessin alussa pystyi saastuttamaan 17 % sitä seuranneesta 600 kg:n perunaerästä lajittelijassa (Elphinstone & Pérombelon 1986a). Siemen­erän nopea jäähdyt­­täminen varastoinnin alussa ja tarpeeksi matala varastointilämpötila vähentä­vät tyvimädän puhkeamisriskiä. Varastossa on lisäksi estettävä kondenssi­ve­den muodostuminen mukuloiden pinnalle.

Johtopäätelmät

Perunan tyvi- ja märkämätää Suomessa aiheuttava *Erwinia*-lajisto tunnetaan huonosti, puhumattakaan bakteerikantojen muuntelusta perimässä ja taudin­aiheuttamiskyvyssä. Myös viitteet Ecc:n mahdollisesta osuudesta tyvimätäoi­reiden aiheuttajana vaativat lisätutkimusta. Tutkimustieto eri *Erwinia*-bakteerien keskinäisestä merkityksestä ratkaisee, millaisin keinoin tautia vastaan voidaan kamppailla tulevaisuudessa.

Tyvimädän epidemiologian perusteet on pääpiirtein selvitetty jo 1970-80 luvuilla. Kuitenkin syyt ja olosuhteet, jotka saavat piilevänä leviävän tyvimä­täbakteerin lopulta puhkeamaan taudiksi, tunnetaan puutteellisesti. Tieto olisi hyödyllistä, jotta piilevästi tyvimätäisen siemenperunan riski tuottaa tyvimä­­täinen kasvusto, voitaisiin nykyistä paremmin ennakoida.

Tyvimädästä puhdas siemenperuna on ainoa pysyvä ratkaisu ongelman hallit­semiseksi. Kasvustohavainnoiteihin perustuvan sertifiointin ongelmana on, että ennen kasvukautta tapahtunut voimakaskin saastunta jää paljastumatta, jos olosuhteet tyvimätäoireen kehittymiselle eivät ole olleet suotuisat sie­menperunakavustossa. Samoin kasvukauden aikana tapahtunut bakteerin leviäminen satomukuloihin jää huomaamatta. Siksi sertifiointin läpäisseillä siemen­erillä perustetuissa kasvustoissa on toisinaan esiintynyt runsaastikin tyvimätää. Oikeampi kuva siemen­erän tyvimätäsaastun­nan laajuudesta saa­­taisiin mukulakohtaisen bakteerimäärän määrittämiseen perustuvalla sertifi­oinnilla. Tällöin ongelmaksi muodostuvat korkeat analyysikustannukset, ellei analyysimenetelmien hintaa pystytä oleellisesti alentamaan.

Kirjallisuus

- Bartz, J.A. & Kelman, A. 1985. Effect of air-drying on soft rot potential of potato tubers inoculated by immersion in suspensions of *Erwinia carotovora*. Plant Disease 69:128-131.
- Burton, W.G. & Wigginton, M.J. 1970. The effect of a film of water upon the oxygen status of a potato tuber. Potato Research 13:150-186.
- De Boer, S.H. 2002. Relative incidence of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in stolon end and peridermal tissue of potato tubers in Canada. Plant Disease 86:960-964.
- Elphinstone, J.G. & Pérombelon, M.C.M. 1986 a. Contamination of potatoes by *Erwinia carotovora* during grading. Plant Pathology 35:25-33.
- Elphinstone, J.G. & Pérombelon, M.C.M. 1986 b. Contamination of progeny tubers of potato plants by seed- and leaf-borne *Erwinia carotovora*. Potato Research 29:77-93.
- Euroopan Komission direktiivi (EY) 93/17/ETY, 30.3.1993/31993L0017. Yhteisön perussiemenperunoiden luokittelusta sekä näihin luokkiin sovellettavista edellytyksistä ja nimityksistä. Annettu Brysselissä 30.3.1993 Virallinen lehti nro L 106, 30/04/1993 s. 0007-0010, Saatavissa internetistä: http://europa.eu.int/eur-lex/fin/lif/reg/fin_register_035020.html
- Gardan, L., Gouy, C., Christen, R. & Samson, R. 2003. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53:381-391.
- Harju, P. & Kankila, J. 1993. *Erwinia carotovora* contamination of Finnish seed potatoes and the prevalence of bacterial subspecies and serogroups. Agricultural Science in Finland 2:345-352.
- Heith, M. & Karjalainen, R. 1999. Perunan tyvimätä. Leviäminen ja hallinta perunantuotannossa. Maatalouden tutkimuskeskus, Kasvinsuojelu, Kuopion yliopisto, Helsingin yliopisto, Soveltavan eläintieteen laitos. Helsinki, Yliopistopaino, Pikapaino. 56 s.
- Helias, V., Andrivon, D. & Jouan, B. 2000 a. Development of symptoms caused by *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* under field conditions and their effects on the yield of individual potato plants. Plant Pathology 49:23-32.
- Helias, V., Andrivon, D. & Jouan, B. 2000 b. Internal colonization pathways of potato plants by *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*. Plant Pathology 49:33-42.
- KTTK 29.3.2001 No: 6/813/01. Tarkastetun siemenperunan tuottaminen tarkastuskaudella 2001-2002. Kasvintuotannon tarkastuskeskus, Siementarkastusosasto, 2002. Loimaa. 16 s. Ajantasaisin versio saatavissa internetistä: <http://www.KTTK.fi>.

- MMMA 24.11.2000 112/00 Maa- ja metsätalousministeriön asetus siemenpeunan kaupasta. Annettu Helsingissä 24.11.2000, Maa- ja metsätalousministeriö Dnr 4015/565/200 Määräyskokoelman numero 112/00 Saatavissa internetistä:
<http://www.mmm.fi/ministerio/lainsaadanto/siemenet/asetukset/112su00.pdf>
- MMML 4.8.2000 728/ 2000, Siemenkauppalaki. Annettu Helsingissä 4 päivänä elokuuta 2000. Suomen säädöskokoelma 100/2000:1899-1907. Saatavissa internetistä: <http://www.finlex.fi/pdf/sk/00/vihko100.pdf>
- MMML 18.7.2003 702/2003. Laki kasvinterveyden suojelemisesta. Annettu Naantalissa 18.7. 2003. Suomen säädöskokoelma 110/2003 2815-2826. Saatavissa internetistä: <http://www.finlex.fi/lains/index.html>.
- Pérombelon, M.C.M. 1992. Potato blackleg: epidemiology, host-pathogen interaction and control. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 98:135-146.
- Pérombelon, M.C.M. 2002. Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology* 51:1-12.
- Pérombelon, M.C.M., Gullings-Handley, J. & Kelman, A. 1979. Population dynamics of *Erwinia carotovora* and pectolytic *Clostridium* spp. in relation to decay of potatoes. *Phytopathology* 69:167-173.
- Pérombelon, M.C.M. & Hyman, L.J. 1987. Frequency of *Erwinia carotovora* in the Alyth Burn in eastern Scotland and the sources of the bacterium. *Journal of Applied Bacteriology* 63:281-291.
- Pérombelon, M.C.M. & Hyman, L.J. 1989. Survival of soft rot coliforms, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *E. carotovora* subsp. *atroseptica* in soil in Scotland. *Journal of Applied Bacteriology* 66:95-106.
- Pérombelon, M.C.M. & Kelman, A. 1980. Ecology of the soft rot *Erwinias*. *Annual Review of Microbiology* 18:361-387.
- Pérombelon, M.C.M. & Kelman, A. 1987. Blackleg and other potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: proposal for revision of terminology. *Plant Disease* 71:283-285.
- Pérombelon, M.C.M., Lumb, V.M. & Zutra, D. 1987. Pathogenicity of soft rot *Erwinias* to potato plants in Scotland and Israel. *Journal of Applied Bacteriology* 63:73-84.
- Vuurde, J.W.L. van & Vries, M. De. 1994. Population dynamics of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on the surface of intact and wounded seed potatoes during storage. *Journal of Applied Bacteriology* 76:568-575.

Piilevän tyvimätätartunnan toteamiseen käytettävät PCR-menetelmät

Terhi Rantanen¹⁾, Katja Moisio²⁾ ja Maaret Suokas³⁾

¹⁾TR BioTech Consulting, Kiekerötie 6 A 10, 96440 Rovaniemi,

terhi.rantanen@trbiotech.inet.fi

²⁾MTT (Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus), Kasvintuotannon tutkimus, Kasvinsuojelu, 31600 Jokioinen, katja.moisio@mtt.fi

³⁾Helsingin yliopisto, Soveltavan biologian laitos, Pl 28, 00014 Helsingin yliopisto, msuokas@helsinki.fi

Tiivistelmä

Tutkimuksessa kehitettiin kvantitatiivinen PCR-menetelmä perunan tyvi- ja märkämätää aiheuttavan bakteerin *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*:n (Eca) piilevän tartunnan toteamiseen. Koska kvantitatiivinen PCR-menetelmä on kallis, kehitettiin näyteaineiston rajaamiseen BioPCR:ksi nimetty menetelmä. Se tunnistaa *Erwinia*-bakteerien kaksi alalajia, Eca:n ja *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*:n (Ecc). Tutkimuksen edetessä havaittiin Ecc-bakteerien yleisyys perunanäytteissä, ja kehitettiin molemmat *Erwinia*-alalajit samanaikaisesti tunnistava reaaliaikainen PCR-menetelmä. PCR-menetelmien kehittämiseen liittyi myös erilaisten näytteiden esikäsittelymenetelmien testaaminen ja vertailu.

Menetelmät ovat osoittautuneet toimiviksi perunan tyvimätätutkimuksen työkaluiksi. Ne voivat tulevaisuudessa helpottaa tyvimätäongelman ratkaisemista, jos niitä sovelletaan rutiinimenetelminä siemenperunan sertifiointitarkastuksissa.

Asiasanat: kasvinsuojelu, kasvitaudit, peruna, Erwinia carotovora subsp. atroseptica, Erwinia carotovora subsp. carotovora, tyvimätä, märkämätä, diagnostiikka, PCR-tekniikka

Johdanto

Sertifioitua siemenperunaa koskevien säädösten mukaan A-luokan siemenellä perustetusta kasbustosta saa löytyä tyvimätäisiä kasveja korkeintaan 1%. Siemenperunoiden luokitus ratkaistaan kasvukaudella tehtävän viljelystarkastuksen ja kevättalvella tehtävän varastotarkastuksen perusteella (MMMA 24.11.2000, KTTK 29.3.2001). Siemenperunaerän riskistä sairastua tyvimätään ei kuitenkaan voida tehdä tarkkaa arviota pelkästään silmämääräiseen tarkasteluun perustuen, sillä piilevän tartunnan puhkeamiseen näkyväksi taudiksi vaikuttavat monet tekijät (Palohuhta 2001, Pérombelon 2002).

Tyvimädän näkyvät oireet puhkeavat vasta, kun bakteerisoluja on riittävästi aloittamaan kasvin soluseiniä hajottavien entsyymien tuottamisen. Kun siemenmukuloiden bakteerimäärä on alun perin 10^2 - 10^3 bakteerisolua millilitrassa siemenperunasta puristettua kuorimehua, on mahdollista että bakteerimäärä ylittää kasvukauden aikana kynnsarvon 10^7 , jolloin mätäneminen voi

alkaa. Tätä pienempi bakteerimäärien lähtötaso ei taudille suotuisissakaan oloissa saa aikaan näkyviä oireita (Bain ym. 1990).

Piilevän Eca-bakteeritartunnan osoittamiseen parhaiksi menetelmiksi Suomessa on todettu polymeraasiketjureaktio- eli PCR-menetelmät, joiden avulla monistetaan osa bakteerin perimästä. Eca-bakteerien seroryhmäjakauma on Suomessa erilainen kuin monessa muussa maassa ja tästä syystä seroryhmä I:n antiseerumiin perustuvat ELISA-tunnistusmenetelmät eivät meillä sovellu luotettavaan käyttöön (Harju & Kankila 1993).

PCR-menetelmillä pystytään oikein suunniteltuina toteamaan bakteerin eri kannat ja seroryhmät. Eca:n osoittamiseen kehitettyjen PCR-menetelmien ongelmana on usein ollut epäherkkyys. Tutkimuksissa on kuitenkin huomattu, että herkkyyttä pystytään parantamaan sekä polymeraasiketjureaktiota edeltävällä selektiivisellä CVP-maljaviljelyllä että DNA-eristyksellä (Smid ym. 1995, Hyman ym. 1997).

Perinteisellä PCR-menetelmällä pystytään lähinnä osoittamaan onko näytteessä bakteeria vai ei. Tyvimädän tapauksessa tämä tulos ei kuitenkaan riitä, sillä siemenmukuloissa sallitaan luokituksen mukaan aina hieman tautia. Tyvimätäbakteerien määrän selvittämistä varten on kehitetty perinteiseen PCR:ään sovellus, jolla näitä määriä pystytään karkeasti arvioimaan (Hyman ym. 2000). Taqman-kemiaan perustuvassa kvantitatiivisessa PCR-menetelmässä mitataan fluoresenssisignaalia, joka on peräisin mallijuosteen spesifisen oligonukleotidikoettimen reporterileimasta. Signaali syntyy, kun reporterileima irtoaa koettimesta uuden DNA-juosteen monistuessa mallijuosteen rinnalle. Signaali voimistuu samassa suhteessa kuin PCR-tuotteen määrä reaktiossa kasvaa. Kvantitatiivinen tulos saadaan standardisuoran perusteella (Heid ym. 1996).

Tutkimuksen tarkoituksena oli kehittää Eca-bakteerin tunnistava ja määrän selvittävä tehokas kvantitatiivinen PCR-menetelmä työkaluksi siemenperunatuotannon ja viljelytekniikan tutkimuksiin. Projektin kuluessa kiinnostuttiin tutkimaan tarkemmin myös *Erwinia*-bakteerien toista alalajia Ecc:tä, jota esiintyi näytteissä. Sitä ei ole pidetty merkittävänä tyvimädän aiheuttajana. Real-time PCR-laitteella pystytään toteamaan samasta näytteestä kaksi eri bakteeria samanaikaisesti, kun molemmille bakteereille on suunniteltu omat spesifiset alukkeet ja erilaiset fluoresenssileimat sisältävät koettimet. Toinen kvantitatiivinen PCR-menetelmä kehitettiin, jotta Eca- ja Ecc-bakteerit voitaisiin osoittaa samanaikaisesti samasta näytteestä.

Aineisto ja menetelmät

PCR-menetelmien kehittämiseen käytetty näyteaineisto oli peräisin erilaisista yhteistyöhankkeista Siemenperunakeskuksen, MTT:n Pohjois-Pohjanmaan tutkimusaseman ja Kasvintuotannon tarkastuskeskuksen kanssa. Näissä yhteistyöhankkeissa on tutkittu muun muassa tyvimädän ilmaantumista siemenperunan tuotantoketjuun sekä viljelytekniikan vaikutuksia tyvimädän puhkeamiseen. Eca:n ja Ecc:n DNA-sekvenssien selvityksessä sekä menetelmän

kehityksessä käytettiin Jyri Kankilan eristämiä ja määrittämiä Eca- ja Ecc-kantoja, jotka saatiin Helsingin yliopiston soveltavan biologian laitoksen kokoelmista. Menetelmien luotettavuuden varmentamiseksi tutkittiin oireiden perusteella tyvimätäisiksi epäiltyjä kasveja, joista eristettiin myös *Erwinia*-bakteereita puhdasviljelmiksi.

PCR-menetelmien kehitys aloitettiin sekvensoimalla osa *Erwinia*-bakteereiden perimää. Sekvenssitiedon pohjalta suunniteltiin Eca-bakteerille alukkeet ja spesifinen koetin Taqman-kemiaan perustuvaa TYVII kvantitatiivista PCR-menetelmää varten. Reaktio ja analysointi toteutettiin tutkimuksen alussa ABI PRISM Sequence Detector 7700-laitteella, ja tutkimuksen lopussa ABI PRISM Sequence Detector 7000-laitteella (PE Biosystems). Reagenssien pitoisuudet optimoitiin ja menetelmän toimivuus testattiin Jyri Kankilan Eca ja Ecc-kannoilla. Menetelmän kvantitointia varten valmistettiin standardiliuokset, joiden bakteerimäärät tunnettiin.

Eca- ja Ecc-bakteerien samanaikaiseen osoittamiseen kehitettyä Multiplex PCR-menetelmää varten suunniteltiin molemmille alalajeille omat alukkeensa ja koettimensa. Reagenssipitoisuuksien optimoinnit tehtiin kummallekin reagenssiryhmälle erikseen ennen analyysien yhdistämistä. Menetelmän toimivuutta testattiin Jyri Kankilan *Erwinia*-bakteerikannoilla sekä vertaamalla tuloksia aikaisemman kvantitatiiviseen TYVII-menetelmän antamiin tuloksiin.

Kvantitatiivinen PCR-menetelmä on käyttökustannuksiltaan suhteellisen kallis, koska se vaatii DNA-eristykseen ennen DNA-pitoisuuden määrittystä. Lisäksi sekä reagenssit että laite ovat hintavia perinteiseen PCR-menetelmään verrattuna. Tästä syystä otettiin käyttöön sekä Eca- että Ecc-bakteerit tunnistava perinteinen PCR-menetelmä TYVI3, jonka avulla seulottiin *Erwinia*-positiiviset näytteet kvantitatiivista määrittystä varten. Alukkeet TYVI3 PCR-menetelmään suunniteltiin ennestään tunnetun sekvenssin perusteella ja reagenssipitoisuudet sekä reaktio-olosuhteet optimoitiin. Menetelmän toimivuus varmistettiin Jyri Kankilan Eca- ja Ecc-bakteerikannoilla sekä yhteistyöhankeista saaduilla perunanäytteillä.

Menetelmässä perunamehunäytteissä elävä bakteeri rikastetaan selektiivisellä CVP-alustalla. Tämän jälkeen kasvusto pestään ja laimennetaan analysointia varten. DNA-eristystä ei menetelmässä tehdä (Hyman ym. 1997). Menetelmä nimettiin TYVI3 BioPCR-menetelmäksi. Tutkimuksen aikana suunniteltujen *Erwinia*-spesifisten alukkeiden lisäksi käytettiin vain Eca-bakteerin tunnistavia ECA1f ja ECA2r sekä ERWFOR ja ATROREV alukeyhdistelmiä (De Boer & Ward 1995, Smid ym. 1995). Näillä menetelmillä positiivisiksi osoittautuneet näytteet tutkittiin edelleen kvantitatiivisilla PCR-menetelmillä.

Erilaisia kasvinäytteiden esikäsittelymenetelmiä verrattiin toisiinsa tavoitteena kehittää tarpeeksi luotettava menetelmä bakteeripitoisuuksien määrittämiseen perunasta. Perunamehunäyte valmistettiin joko puristamalla mehu muovipussissa mukulan napapäästä leikatusta palasta tai itupuristimella mukulan

kuorisuikaleesta. PCR-menetelmän herkkyyden parantamiseksi kokeiltiin erilaisia DNA:n eristystapoja valmiilla kaupallisilla kiteillä sekä peruskemikaaleilla (Taulukko 1). Lisäksi tutkittiin eri maljakasvatusolosuhteita sekä yksittäisten bakteeripesäkkeiden kasvatusta PCR-analyysejä varten (Pérombelon & Wolf 1998).

Tulokset ja tulosten tarkastelu

Projektin aikana kehitetty Eca-bakteerin tunnistava kvantitatiivinen TYVII PCR-menetelmä osoittautui hyvin toimivaksi ja herkäksi. Sen detektoriraja oli noin 15 bakteeria millilitrassa perunamehua ABI PRISM 7700 Sequence Detector-laitteella ja hiukan korkeampi ABI PRISM Sequence Detector 7000-laitteella. Kummankin laitteen detektoriraja todettiin riittäväksi, koska raja-arvoksi tavoiteltiin 100-1000 bakteeria millilitrassa perunamehua. Tältä bakteeripitoisuuden alkuarvosta bakteeri pystyy lisääntymään tasolle, joka johtaa taudin puhkeamiseen (Bain ym. 1990).

Eca- ja Ecc-bakteerien samanaikaiseen toteamiseen kehitetyn multiplex PCR-menetelmän käyttöä kvantitoinnissa ei saatu projektin aikana toimimaan vielä parhaalla mahdollisella tavalla, vaan se jäi Ecc-bakteerin osalta liian epäherkäksi. Kahden koettimen samanaikainen toiminta optimaalisesti samassa reaktiossa vaatii huomattavasti enemmän panostusta PCR-olosuhteiden optimointiin kuin mihin käytettävissä oleva aika riitti. Menetelmää pystytään kuitenkin jo nyt käyttämään kvantitatiivisen TYVII-menetelmän rinnalla menetelmänä, jolla pystytään selvittämään näytteiden Eca- ja Ecc-bakteeripitoisuuksien suhteita toisiinsa ja standardeihin.

BioPCR:ssä käytetyistä menetelmistä TYVI3 BioPCR-menetelmä toimi hyvin *Erwinia*-positiivisten näytteiden seulonnassa tarkempiin tutkimuksiin. Kahdesta julkaistuista Eca-spesifisistä alukepareista ECA1f ja ECA2r todettiin luotettavammaksi kuin ERWFOR ja ATROREV alukepari ja pelkästään sitä käytettiin ensimmäisten koesarjojen jälkeen. Näillä menetelmillä tutkittiin, missä siemenperunan tuotantoketjun vaiheessa Eca ja Ecc ilmaantuvat perunaan ja miten viljelytekniikalla voitaisiin vaikuttaa bakteerien esiintymiseen.

Erilaisilla perunanäytteiden esikäsittelytavoilla sekä eri PCR-menetelmillä oli suuri merkitys analyysituloksen kannalta. Neljällä oireellisella mukulalla tehdyssä vertailussa olivat mukana DNeasy Plant DNA extraction-kitti ja DNA-eristys perusreagensseilla (De Boer & Ward 1995), CVP-maljakasvatus 27°C:ssa kahden vuorokauden ajan ja CVP-maljakasvatus 15°C:ssa kolmen vuorokauden ajan, perunamehun puristus mukulan napapään palasta muovipussissa ja perunamehun puristus itupuristimella mukulan kuoriviipaleesta (Taulukko 1).

Taulukko 1. Näytteenottokohdan, puristenesteen esikäsitteilyn- ja PCR-menetelmien sekä alukkeiden spesifisyyden vaikutus neljästä eri mukulasta saatuun analyysitulokseen (+ = positiivinen tulos, - = negatiivinen tulos).

PCR-menetelmä/ näytteenotto-kohta/ DNA-eristys tai bakteeriviljely	Alukkeiden spesifisyys	Mukula 1	Mukula 2	Mukula 3	Mukula 4
TYVI3, kuori, kitti DNA-eristys	<i>Erwinia</i>	+	+	+	-
TYVI3, napapää, kitti DNA-eristys	<i>Erwinia</i>	+	+	+	+
TYVI3, kuori, Boer DNA-eristys	<i>Erwinia</i>	-	-	+	+
TYVI3, napapää, Boer DNA-eristys	<i>Erwinia</i>	-	-	+	-
TYVI3, kuori, 27° kasvatus	<i>Erwinia</i>	+	+	+	+
TYVI3, napapää, 27° kasvatus	<i>Erwinia</i>	+	+	+	+
TYVI3, kuori, 15° kasvatus	<i>Erwinia</i>	+	+	+	+
TYVI3, napapää, 15° kasvatus	<i>Erwinia</i>	+	+	+	+
ECA ¹⁾ , kuori, kitti DNA-eristys	<i>atroseptica</i>	+	+	+	+
ECA, napapää, kitti DNA-eristys	<i>atroseptica</i>	+	+	+	+
ECA, kuori, Boer DNA-eristys	<i>atroseptica</i>	-	-	-	+
ECA, napapää, Boer DNA-eristys	<i>atroseptica</i>	-	-	+	+
multiplex, kuori, kitti DNA-eristys	<i>atroseptica</i>	+	+	+	+
multiplex, napapää, kitti DNA-eristys	<i>atroseptica</i>	+	+	+	+
multiplex, kuori, Boer DNA-eristys	<i>atroseptica</i>	-	+	+	+
multiplex, napapää, Boer DNA-eristys	<i>atroseptica</i>	+	-	+	-
ECA, kuori, 27° kasvatus	<i>atroseptica</i>	+	-	+	+
ECA, napapää, 27° kasvatus	<i>atroseptica</i>	+	-	+	+
ECA, kuori, 15° kasvatus	<i>atroseptica</i>	-	-	-	+
ECA, napapää, 15° kasvatus	<i>atroseptica</i>	-	-	-	+
multiplex, kuori, kitti DNA-eristys	<i>carotovora</i>	-	-	-	-
multiplex, napapää, kitti DNA-eristys	<i>carotovora</i>	-	-	-	-
multiplex, kuori, Boer DNA-eristys	<i>carotovora</i>	-	-	-	+
multiplex, napapää, Boer DNA-eristys	<i>carotovora</i>	-	-	-	+

ECA¹⁾: PCR -menetelmä, De Boer & Ward 1995

Näiden kokeilujen perusteella päädyttiin käyttämään kasvatusolosuhteina 27°C:een lämpötilaa kahden vuorokauden ajan ennen BioPCR-menetelmiä, sillä näin saatiin parhaiten positiiviset näytteet esille. Näytteistä saadut tulokset olivat lisäksi helpoimmin luettavissa agarosigeeliltä. Kokeilujen perusteella päädyttiin myös käyttämään DNA:n eristyksessä DNeasy Plant DNA extraction-kittiä ennen kvantitatiivista PCR:ää. Näin positiiviset näytteet saatiin parhaiten esiin ja menetelmä on mahdollisimman herkkä.

Multiplex PCR-menetelmä osoittautui toimivan hyvin Eca:n tunnistamisessa. Sen sijaan mukula 4:n (Taulukko 1) perunamehusta Ecc:n tunnistus onnistui yllättäen paremmin De Boerin ja Wardin (1995) artikkelissaan kuvaaman DNA-eristuksen, kuin kitillä tehdyn DNA-eristuksen jälkeen. Tutkittu mukula oli sekä Eca:n että Ecc:n saastuttama. Multiplex PCR soveltuu analyysimenetelmäksi, kun huomioidaan sen epäherkkyys Ecc-bakteerin toteamisessa. Kokeilun perusteella analyysituloksissa ei ollut eroa sillä, puristettiinkö mehunäyte mukulan kuoresta vai napapäästä. Molempia menetelmiä onkin

käytetty eri tutkimusten yhteydessä. Kuitenkin De Boerin tutkimuksessa (2002) osa tutkimuksen mukuloista todettiin positiivisiksi ainoastaan napa-päästä tehdyistä näytteistä kuorinäytteen antaessa negatiivisen tuloksen ja päinvastoin. Tämä on syytä ottaa huomioon virhelähteenä tuloksia tulkittaessa.

Kesällä 2002 tutkittiin oireiden perusteella selvästi tyvimätäisiksi luokiteltuja ja perunaseitin vioittamiksi epäiltyjä varsia. Lisäksi tutkittiin varsia, joissa oireet olivat kuivan kesän takia vaikeasti tunnistettavia. Varsinäytteistä kuudessa TYVI3 BioPCR-menetelmä antoi positiivisen ja Eca-spesifinen menetelmä (De Boer & Ward 1995) negatiivisen tuloksen. Tämän perusteella on todennäköistä, että vioituksissa oli vain Ecc-alalajia, jota ei normaalisti pidetä tyvioireiden aiheuttajana. Bakterieristuksen jälkeen tehdyn Eca-spesifisen (De Boer & Ward 1995) PCR-analyysin mukaan myös perunaseitin vioittamaksi epäillyissä näytteissä oli Eca-alalajia (Pérombelon & Wolf 1998) (Taulukko 2).

Taulukko 2. *Erwinia*-bakteerien esiintyminen silmävaraisesti tyvimädän tai perunaseitin vioittamiksi määritetyissä kasveissa osoitettuna *E. carotovora*- ja Eca-spesifisillä alukkeilla (+ = positiivinen, - = negatiivinen analyysitulokset).

Tyvimädäksi epäilty näyte	Tulos TYVI3	Tulos ECA2r	ECA1f ja alukkeilla	Perunaseitiksi epäilty näyte	Tulos ECA1f ja ECA2r alukkeilla
AsI a, varsi	+	-		AsII a, varsi	+
AsII a, varsi	+	-		AsIV a, varsi	-
RjI a, varsi	+	-		AsV a, varsi	+
RjII a, varsi	+	-		AsVI a, varsi	+
RjIII a, varsi	+	-			
RjI IV a, varsi	-	-			

Tutkimuksen aikana kehitetyt kvantitatiiviset PCR-menetelmät, sekä TYVI3 BioPCR-menetelmä kahden *E. carotovora*-alalajin osoittamiseen ovat olleet toimivia ja käyttökelpoisia perunan tyvimädän tutkimuksessa. Tulevaisuudessa nämä menetelmät saattavat mahdollistaa siemenperunoiden riskiindeksin käyttöönoton siemenperunan käyttökelpoisuuden arvioinnissa. Testin lopullisen luotettavuuden toteamiseksi vaadittaisiin vielä lisätutkimuksia suuremmilla näytemäärillä ja laajemmalla bakteeripopulaatiolla.

Kirjallisuus

- Bain, R.A., Pérombelon, M.C.M., Tsrer, L. & Nachmias, A. 1990. Blackleg development and tuber yield in relation to numbers of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on seed potatoes. *Plant Pathology* 39:125-133.
- De Boer, S.H. 2002. Relative incidence of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in stolon end and peridermal tissue of potato tubers in Canada. *Plant Disease* 86:960-964.

- De Boer, S.H. & Ward, L.J. 1995. PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. *Phytopathology* 85:854-858.
- Harju, P. & Kankila, J. 1993. *Erwinia carotovora* contamination of Finnish seed potatoes and the prevalence of bacterial subspecies and serogroups. *Agricultural Science in Finland* 2:345-352.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. & Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6:986-994.
- Hyman, L.J., Birch, P.R.J., Dellagi, A.O., Avrova, A.O. & Toth, I.K. 2000. A competitive PCR-based method for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potato tubers. *Letters in Applied Microbiology* 30:330-335.
- Hyman, L.J., Dewasmes, V., Toth, I.K. & Pérombelon, M.C.M. 1997. Improved PCR detection sensitivity of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in potato tuber peel extract by prior enrichment on a selective medium. *Letters in Applied Microbiology* 25:143-147
- KTTK 29.3.2001 No: 6/813/01. Tarkastetun siemenperunan tuottaminen tarkastuskaudella 2001-2002. Kasvintuotannon tarkastuskeskus, Siementarkastusosasto, 2002. Loimaa. 16 s. Ajantasaisin versio saatavissa internetistä: <http://www.KTTK.fi> .
- MMMA 24.11.2000 112/00 Maa- ja metsätalousministeriön asetus siemenperunan kaupasta. Annettu Helsingissä 24.11.2000, Maa- ja metsätalousministeriö Dnr 4015/565/200 Määräyskokoelman numero 112/00 Saatavissa internetistä:
<http://www.mmm.fi/ministerio/lainsaadanto/siemenet/asetukset/112su00.pdf>
- Palohuhta, J.P. 2001. Perunan tyvimätä on ongelmallinen siementuotannon laatuvaatimusten kannalta. *Kasvinsuojelulehti* 2:46-47.
- Pérombelon, M.C.M. 2002. Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology* 51:1-12
- Pérombelon, M.C.M. & Wolf, J.M. van der. 1998. Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potatoes: laboratory manual. Scottish Crop Research Institute, Dundee (GB).76 s.
- Smid, E.J., Jansen, A.H.J. & Gorris, L.G.M. 1995. Detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Erwinia chrysanthemi* in potato tubers using polymerase chain reaction. *Plant Pathology* 44:1058-1069.

Tyvi- ja märkämätä siemenperunan alkutuotannossa

Asko Hannukkala¹⁾, Terhi Rantanen²⁾, Ari Lehtinen¹⁾, Katja Moisio¹⁾ ja Jukka Pekka Palohuhta³⁾,

¹⁾MTT (Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus), Kasvintuotannon tutkimus, Kasvinsuojelu, 31600 Jokioinen, asko.hannukkala.mtt.fi, ari.lehtinen@mtt.fi, katja.moisio@mtt.fi

²⁾TR BioTech Consulting, Kiekerötie 6 A 10, 96440 Rovaniemi, terhi.rantanen@trbiotech.inet.fi

³⁾Suomen siemenperunakeskus Oy, Leppiojantie 31, 91800 Tyrnävä, jp.palohuhta@spk.fi

Tiivistelmä

Tutkimuksen aikana seurattiin *E. carotovora*-bakteerin alalajien *atroseptica* (Eca) ja *carotovora* (Ecc) ilmaantumista ja lisääntymistä siemenperunaan Suomen siemenperunakeskuksen (SPK) lisäysaineistossa. Seuranta aloitettiin SPK:n mikrolisätyistä taimista. Tämän jälkeen analysoitiin kasvihuoneissa tuotettuja kasvustoja ja mukulasatoja sekä ensimmäisen ja toisen vuoden avomaalisäyksen mukulasadot. Analyysit tehtiin useilla erilaisilla DNA-monomistumiseen perustuvilla PCR-tekniikoilla, koska PCR-menetelmiä kehitettiin samanaikaisesti entistä herkemiksi ja luotettavimmiksi.

Mikrolisätyistä kasveista ei löydetty *E. carotovora*-bakteereita lainkaan. Sen sijaan kasvihuoneessa kasvaneiden perunoiden lehdistä ja mukuloista löydettiin Ecc-bakteereja. Ensimmäisen avomaalisäyksen mukuloista ei löydetty Eca:a ja 90 %:n todennäköisyydellä infektoituneiden mukuloiden osuus oli alle 0,34 %. Sen sijaan Ecc:a esiintyi 4,2 %:ssa mukuloista. Mukuloista löydettiin ensimmäisen kerran Eca:a toisen avomaalisäyksen sadosta. Eca:a esiintyi 0,6 %:ssa ja Ecc:a 2,8 %:ssa tutkituista mukuloista. Pellosta löydettiin myös muutama tyvimätäinen kasvi.

Tutkimuksessa todettiin, ettei SPK:n mikrolisäys- ja kasvihuoneaineistoissa ole Eca:aa. Toisen avomaalisäyksen satomukuloista mukulasadosta keskimäärin 0,6 % kantoi piilevää Eca-tartuntaa. Seuraavana kesänä näillä mukuloilla tuotetussa kasvustossa oli keskimäärin 0,03 % tyvimätäoireisiä kasveja. Sen sijaan yllätys oli Ecc:n runsaus kasvihuonelisätyissä mukuloissa ja ensimmäisen avomaalisäyksen sadossa. Ecc-bakteerin todellinen merkitys tulisi selvittää ja arvioida, onko siemenperunan tuotantoketjua tarvetta muuttaa Ecc-riskin minimoimiseksi. Eca-bakteerien hallintaan nykyinen tuotantoketjun hygienia riittää.

Asiasanat: kasvinsuojelu, kasvitaudit, peruna, siemenperuna, tyvimätä, märkämätä, Erwinia carotovora, PCR-tekniikka, diagnostiikka, viljelyksellinen kasvinsuojelu

Johdanto

Terve siemenperuna on laadukkaan perunantuotannon edellytys. Määrätietoisella työllä suuri joukko kasvitauteja, kuten useimmat virustaudit ja rengasmädät on saatu kitkettyä lähes kokonaan perunan siementuotannosta. Sen sijaan *Erwinia carotovora*-bakteerin alalajien *atroseptican* (Eca) ja *carotovoran* (Ecc) aiheuttaman tyvi- ja märkämädän runsas esiintyminen on edelleen ongelma yksittäisissä siemenerissä. *Erwinia chrysanthemi*-bakteeria (Ech), joka myös aiheuttaa tyvi- ja märkämätää, ei ole Suomesta todettu (Harju & Kankila 1993), mutta sen esiintymistä ei viime vuosina ole liioin kartoitettu.

Erwinia-bakteerit ovat ongelmallisia, koska ne voivat levitä siemenperunassa oireettomina. Kasvustossa havaittavan tyvimädän runsaus ei aina anna luotettavaa kuvaa piilotartunnan määrästä satomukuloissa, koska epäsuotuisissa olosuhteissa oireettomista kasvustoista korjatut sadot voivat olla pahoin saastuneita (Pérombelon & Kelman 1980).

Piilotartuntojen osoittamisessa siemenperunan alkutuotannossa on vaikeutena tartunnan saaneiden mukuloiden pieni esiintymistiheys. Mukuloita on testattava valtava määrä, kun halutaan luotettava arvio siemenerän tartuntatasosta. Jos esimerkiksi halutaan osoittaa, että alle 0,2 % mukuloista on tyvimätäisiä 90 % todennäköisyydellä, binomijakaumaan perustuvan otantamallin mukaan on tutkittava 1054 yksittäistä mukulaa. Tilastomatematiikka mahdollistaa erilaiset ryväsotannot, joilla tutkittavia analyysimääriä voidaan oleellisesti pienentää (Hughes ym. 1996).

Sertifioidun siemenperunan tuotannon terveyttä valvovat KTTK:n valtuuttamat kasvintarkastajat. *Erwinia*-bakteereihin liittyen viljelytarkastuksissa havainnoidaan tyvimätäisten kasvien määrä kasvustossa ja märkämätäisten mukuloiden määrä varastossa. Siemenmukuloissa piilevinä esiintyviä *Erwinia*-bakteereita ei toistaiseksi käytetä siemenperunan laatuksena, koska massatestaukseen sopivia määritysmenetelmiä ei ole kustannussyistä voitu ottaa käyttöön (MMMA 24.11. 2000, KTTK 29.3.2001).

SPK:n ydinkasvi- ja kloonaineisto on aikaisemmissa tutkimuksissa todettu vapaaksi *Erwinia*-bakteereista bakteeriviljelymenetelmällä. Harjun ja Kankilan (1993) tutkimuksissa SPK:n kasvihuonelisäysaineistosta löytyi yhdestä tutkitusta satomukulasta Ecc-bakteeria. Ensimmäisen vuoden avomaalisäyksessä bakteereita ei käytetyllä otannalla löytynyt. Toisen vuoden avomaalisäyksen jälkeen satomukuloista löytyi jo kumpaakin alalajia. Ensimmäiset tyvimätäioireiset kasvit löydettiin kolmannen vuoden avomaalisäyksestä. SPK:n tuotantokäytäntöjä on noista ajoista muutettu ja *Erwinia*-diagnostiikka on valtavasti parantunut PCR-menetelmien kehittämisen myötä (Pérombelon 2000).

Koko tutkimushankkeen yhtenä päätavoitteena oli vähentää tyvimädän aiheuttamia ongelmia siemenperunantuotannossa. Tämän pääasiassa Siemenperunakeskuksen (nykyisin Suomen Siemenperunakeskus Oy) kanssa toteutetun

osatutkimuksen tavoitteena oli varmistaa siemenen alkutuotannon terveydentila *E. carotovora*-bakteerin osalta, sekä selvittää ja tarpeen mukaan vähentää tyvi- ja märkämädän leviämrisiä siemenperunan tuotantoketjussa.

Aineisto ja menetelmät

Mikrolisäysaineisto

SPK:n perunakloonien ensimmäinen lisäys tehdään mikrolisäämällä koeputkissa kasvatettuja taimia. SPK:n mikrolisäysaineistosta valittiin Eca- ja Eccpuhtausmäärityksiin 9 lajiketta, joiden tautiriski oli edellisten vuosien kokemusten perusteella suurin: Asterix, Bintje, Fambo, Gloria, Idole, Nicola, Saturna, Suvi ja Van Gogh. *Erwinia*-bakteerien mahdollinen esiintyminen analysoitiin kahdesta yksilöstä 5-6 kloonista jokaisesta lajikkeesta.

Mikrolisätyt taimet poistettiin koeputkista juurineen, sekä puhdistettiin kasvualustan jäänteistä ennen kasvien puristamista mehuksi itupuristimella. CVP-maljoille levitettiin näytemehusta 98 µl, johon oli lisätty 2,5 µl DTT reagenssia. Maljoja kasvatettiin 27°C:een lämpötilassa vuorokauden ajan, jonka jälkeen bakteerikasvusto kerättiin maljalta näytteeksi ja siitä tehtiin BioPCR *E. carotovora*-spesifisillä alukkeilla.

Kasvihuoneaineisto

Koeputkikasvit siirretään juurrutuksen jälkeen kasvihuoneeseen, jossa niistä tuotetaan ensimmäinen mukulasato. Kasvatus tapahtuu yhdessä tai kahdessa lasisessa kasvihuoneessa, kevytrakenteisemmissä muovihuoneissa sekä pienessä mittakaavassa myös avomaalle rakennetuissa ulkoaltaissa. Lasihuoneessa tuotetaan yleensä kaksi satoa, joista ensimmäisen sato nostetaan keskikesällä ja toinen syksyllä avomaan sadonkorjuun jälkeen. Tässä tutkimuksessa määritettiin *E. carotovora*-saastunnan taso kaikissa koeputkitaimista lisätyissä kasvustoissa vuonna 2002 lukuun ottamatta ensimmäistä lasihuoneessa tuotettua kasvustoa.

Kasvihuoneesta kerättiin 8. elokuuta 2001 systemaattisesti 20 lehden yhdistelmänäytteet, joista määritettiin *E. carotovoran* esiintyminen TYVI3 BioPCR-menetelmällä. Kaikista positiivisista näytteistä tehtiin Eca-spesifinen kvantitatiivinen TYVII PCR-määritys (kts. s. 20-22).

Sadonkorjuun yhteydessä jokaisesta kasvatusaltaasta kerättiin yhdeksän mukulan yhdistelmänäyte (ulkoallas: 8.-9.8., muovihuone I: 26.9.-1.10., muovihuone II: 20.-24.9, lasikasvihuone: 2.-3.10.). Ulkoaltaasta ja kahdesta muovikasvihuoneesta kerätyt näytteet analysoitiin Eca-spesifisellä BioPCR-menetelmällä ERWFOR ja ATROREV alukkeilla (Smid ym. 1995, kts. s. 20-22). Lasikasvihuoneesta kerätyt näytteet puolestaan analysoitiin *E. carotovora*-spesifisellä TYVI3 BioPCR-menetelmällä (kts. s. 20-22). Positiivisiksi osoittautuneita näytteitä analysoitiin Eca-spesifisellä kvantitatiivisella TYVII PCR-menetelmällä (kts. s. 20-22), sekä Eca-spesifisillä ECA1f ja ECA2r

alukkeilla (De Boer & Ward 1995). Analysoinneissa käytettiin näin monia erilaisia PCR-menetelmiä, koska MTT:n omien PCR-menetelmien kehittäminen oli vielä osittain kesken.

Ensimmäisen vuoden avomaalisäys

Näytteet kerättiin ositettua satunnaisotantaa noudattaen, jossa ositteena oli lajike. Jokaisen lajikkeen mukulanäytteen koko määritettiin sen perusteella, mikä oli lajikkeen viljelypinta-ala suhteessa 1. vuoden avomaalisäyksen kokonaispinta-alaan. Yhteensä analysoitiin 671 mukulaa 79 yhdistelmänäytteenä. Yhdessä yhdistelmänäytteessä oli aina 4-12 mukulaa, ja yhdistelmänäytteen keskimääräinen koko oli koko aineistossa 8,5 mukulaa.

Yhdistelmänäytteet analysoitiin *E. carotovora*-spesifisellä TYVI3 BioPCR-menetelmällä (kts. s. 20-22). Positiiviset tulokset antaneet yhdistelmänäytteet analysoitiin *Eca*-spesifisillä ECA1f- ja ECA2r-alukkeilla (De Boer & Ward 1995).

Yhdistelmänäytteiden antama tulos muunnettiin saastuneiden mukuloiden esiintymisfrekvenssiksi olettamalla, että mukulan *E. carotovora*-tartunta ei riipu minkään muun näytteeseen tulevan mukulan terveydestä. Tällä oletuksella terveiden ja infektoituneiden mukuloiden osuus aineistossa noudattaa binomijakaumaa. Laskuissa yhdistelmänäytteessä oletettiin olleen 8,5 mukulaa.

Toisen vuoden avomaalisäys

Toisen vuoden avomaalisäyksessä SPK:n tuottaman sadon määrä nousi niin suureksi, että kaikkien lajikkeiden terveydentilan tutkiminen ei enää ollut mahdollista. Sen vuoksi tutkittaviksi valittiin 5 lajiketta; Asterix, Bellona, Bintje, Lady Claire ja Venla. Jokaisesta lajikkeesta otettiin 450 mukulan näyte, josta analysoitiin 400 mukulaa. Mukulat analysoitiin 10 mukulan yhdistelmänäytteinä.

PCR-analyysihin näyte otettiin leikkaamalla jokaisen mukulan napapäästä n. 0,5 gramman kokoinen pala. Kymmenen mukulan napapääät kerättiin samaan muovipussiin yhdistelmänäytteeksi. Pussiin lisättiin 5 ml:aa steriiliä vettä, napapääät murskattiin kumivasaralla ja näytteitä seisotettiin n. 5 minuuttia, jonka jälkeen vapautunut puristemehu käytettiin bakteerien rikastamiseen.

Puristemehuun lisättiin 2,5µl 1M DTT-reagenssia, ja se pipetoitiin CVP-S2-maljoille, joita inkuboitiin kahden vuorokauden ajan 27°C lämpötilassa (Hyman ym. 2001). Inkuboinnin aikana tuotettu bakteerimassa laimennettiin suhteissa 1:10 ja 1:100. Laimennetut bakteerisuspensiot analysoitiin *E. carotovora*-spesifisellä TYVI3 BioPCR-menetelmällä. *E. carotovora*-positiivisen tuloksen antaneiden näytteiden puristemehusta käytettiin 50 µl DNA-eristykseen Dneasy Plant-kitillä (Qiagen, Germany), jonka jälkeen DNA-näytteet analysoitiin reaaliaikaisella multiplex PCR-menetelmällä *E. carotovora*-alalajien määrittämiseksi (kts. s. 20-22).

Tulokset

Yhdestäkään koeputkikasvista ei löydetty *E. carotovora*-bakteereita. Siemenperunan kasvihuonelisäyksestä tutkituista lehtinäytteistä vain yhdestä yhdistelmänäytteestä löytyi varmuudella Ecc:a. Laskennallisesti noin 0,1 % lehdistä kantoi piilevää Ecc-tartuntaa. Sen sijaan keskimäärin 3,9 % kasvihuoneessa tuotetuista mukuloista oli Ecc:n saastuttamia. Vastoin oletuksia Ecc:a esiintyi eniten hygieniantasoltaan parhaaksi oletetussa lasihuoneessa tuotetussa sadossa, jossa 7,6 % mukuloista oli piilevän bakteeritartunnan kantajia.

Ensimmäisen vuoden avomaalisäyksessä ei esiintynyt niin paljon piilevää tyvimätää, että se olisi voitu osoittaa käytetyllä otantamenetelmällä. Jos Eca:n saastuttamia mukuloita oli, niiden osuus 90 % todennäköisyydellä oli alle 0,34 %. Sitä vastoin ensimmäisen vuoden avomaalisäyksen 79 yhdistelmänäytteestä 24 oli piilevästi Ecc:n saastuttamia (Taulukko 1). Toisessa avomaalisäyksessä tyvimätäoireita löytyi 14 kasviyksilöstä 22,7 ha:n loholla. Laskennallisesti $1,2 \cdot 10^{-5}$ % kasveista oli oireilevia. Toisen avomaalisäyksen sadossa havaittiin myös Eca:n saastuttamia mukuloita (Taulukko 1).

Taulukko 1. Piilevän *Erwinia*-tartunnan saaneiden mukuloiden osuus sadossa siementuotantoketjun eri vaiheissa 2001-02 ja tyvimätäoireiden puhkeamistiheys näillä siemenerillä tuotetuissa kasvustoissa kesällä 2003.

Lisäsvaihe	Lajike	Infektoituneita mukuloita %			Tyvimätäoireita
		<i>E. carotovora</i>	Ecc	Eca	kasvustossa %
Mikrolisätyt taimet	Useita ^{*1}	0	0	0	0
Kasvihuonelisäys	Lehdet	0,1	0,1	0	0
	Mukulat	3,9	3,9	0	0
1. avomaalisäys	Useita ^{*2}	4,2	4,2	< 0,34	0
2. avomaalisäys	Asterix	8,2	0,3	0,5	0,074
	Bellona	1	0	0	0
	Bintje	0	0	0	0,016
	Lady Claire	2,8	0,3	1,3	0,012
	Venla	3,9	1	1,3	0,051
2. avomaalisäys	Keskiarvo	2,8	0,3	0,6	0,031

^{*1}) Mikrolisätyistä taimista analysoitiin vain tyvimädän suhteen ongelmallisiksi osoittautuneet lajikkeet; Asterix, Bintje, Fambo, Gloria, Idole, Nicola, Saturna, Suvi ja Van Gogh.

^{*2}) 1. avomaalisäyksestä analysoitiin kaikki lisäyksessä olleet lajikkeet (35 kpl)

Tulosten tarkastelu

Tutkimuksissa seurattujen siemenperunaerien havaittiin saavan Eca-tartunnan yleensä toisena avomaalisäysvuonna. Tämä on havaittu myös aikaisemmissa tutkimuksissa (Harju & Kankila 1993, Pérombelon ym. 1980).

Mikrolisäysaineisto todettiin puhtaaksi *E. carotovora*-bakteereista, kuten aikaisemmissakin tutkimuksissa (Harju & Kankila 1993). Kuitenkin jo kasvi-huonelisäyksissä sekä lehdistä että mukuloista löydettiin Ecc-alalajia. Ensimmäinen lasihuoneessa tehtävä lisäys jätettiin tutkimatta. Sen saastumisriski oletettiin pieneksi, koska saastuntalähteitä kasvukauden alussa on hyvin vähän. Siksi kasvihuonelisäyksen todellinen saastuntataso lienee havaittua matalampi.

Aineiston perusteella on mahdoton tietää, mistä kasvihuonelisäysten bakteeritartunta on lähtöisin. Eniten Ecc:a löytyi lasikasvihuoneesta. Todennäköisimmin tartunta on tapahtunut aerosolien välityksellä sadonkorjuun yhteydessä tai ilmastoinnin kautta. Skotlannissa tehtyjen tutkimusten perusteella tiedetään, että *E. carotovora*-bakteerin määrä pelloilla lisääntyy kasvukauden loppua kohti (Pérombelon & Kelman 1980). Ulkoaltaaseen istutettujen mikrolisäyttyjen kasvien sato oli suhteessa vähemmän saastunut kuin lasihuoneen sato, joka nostettiin lähes kaksi kuukautta myöhemmin. Lasikasvihuoneessa tuotettu sato saattoi siten altistua odotettua pahemmin ilman kautta mahdollisesti levinneille *E. carotovora*-bakteereille. Hyönteiset tuskin ovat päässeet bakteeria levittämään, koska niiden pääsy kasvihuoneeseen on pyritty estämään tuuletusaukoissa olevien hyönteisverkkojen avulla.

Ensimmäisen kerran Eca:a havaittiin siementuotannossa 2. avomaalisäyksen varsissa esiintyvänä tyvimätänä. Tartunnan määrä oli niin pieni, että sen havaitseminen tutkitun mukulamäärän perusteella oli erittäin epätodennäköistä. Eca-tartunta oli tapahtunut edellisellä kasvukaudella tai viimeistään ennen istutusta, koska tyvimätäoire voi kehittyä vain, jos maahan istutettu emomukula on infektoitunut. Tutkimuksessa saatiin tosin viitteitä siitä, että Ecc saattaa myös pystyä aiheuttamaan tyvimätäoireita (kts. s. 22).

Tyvimätää esiintyi erittäin vähän 3. vuoden avomaalisäyksessä kesällä 2003, jolloin sääolot eivät olleet otolliset tyvimätäoireen ilmaantumiselle. Siemenmukuloista piilevästi saastuneita oli n. 20–100-kertainen lukumäärä pellolla oireiksi puhjenneen tyvimädän määrään verrattuna.

Havaittuja tyvimätä- ja Eca-määriä eräkohtaisesti vertailtaessa, voidaan selvästi nähdä, että PCR on riittävän herkkä paljastamaan tartunnan. Sen sijaan PCR-tuloksen avulla ei voida ennustaa, kuinka paljon tyvimätää seuraavan vuoden kasvustossa esiintyy, koska tyvimädän ilmenemiseen vaikuttavat kasvukauden sää- ja muut olosuhteet erittäin paljon (Pérombelon & Kelman 1987).

Ensimmäisen vuoden avomaalisäyksen sadossa ei todettu Eca-alajia. Sitä vastoin Ecc:n esiintymistiheys mukulasadossa oli edelleen korkea. Toisen

vuoden avomaalisäyksessä esiintyi kuitenkin muutamia tyvimätäoireisia kasveja, joten tartunnan on täytynyt tapahtua jo ensimmäisen lisäysvuoden aikana. Tartunnan määrä oli niin pieni, ettei sitä otannan reunaehtojen puitteissa olisi voitu osoittaa ensimmäisen vuoden mukulanäytteistä. Tyvimädän ilmaantumisen kasvustoon toisena lisäysvuotena osoittaa hyvin, että täysin aukotonta tyvimädän osoittamisjärjestelmää on mahdoton luoda.

Eca-tartunnan alkuperää ei tässä tutkimuksessa pystytty selvittämään. Tartunta ei ollut peräisin kasteluvedestä, koska kasvihuonelisäyksen ja ensimmäisen avomaalisäyksen tihkukastelussa käytettiin vesijohtovettä. Toisen vuoden avomaalisäystä ei kasteltu. Tartunta on tapahtunut ilman kautta lohkolle levinneiden bakteerien välityksellä kasvukaudella, sadonkorjuun yhteydessä, satoa varastossa käsiteltäessä tai istutuksen yhteydessä.

Tyvimätää aiheuttavan Eca-bakteerin osalta siemenperunan alkutuotannon hygienian taso on moitteeton. Koska Ecc-alalajia löytyi melko yleisesti jo tuotannon alkuvaiheissa, olisi välttämätöntä selvittää, onko Ecc:lla todellista merkitystä siemenperunantuotannossa ja onko mitään käytännön mahdollisuuksia pitää kasvustot puhtaana luonnossa yleisestä bakteerista.

Kirjallisuus

- De Boer, S.H. & Ward, L.J. 1995. PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. *Phytopathology* 85:854-858.
- Harju, P. & Kankila, J. 1993. *Erwinia carotovora* contamination of Finnish seed potatoes and the prevalence of bacterial subspecies and serogroups. *Agricultural Science in Finland* 2:345-352.
- Hughes, G., Madden, L.V. & Munkvold, G.P. 1996. Cluster sampling for disease incidence data. *Phytopathology* 86:132-137.
- Hyman, L.J., Sullivan, L., Toth, I.K. & Pérombelon, M.C.M. 2001. Modified crystal violet pectate medium (CVP) based on a new polypectate source (Slendid) for the detection and isolation of soft rot *Erwinias*. *Potato Research* 44:265-270.
- KTTK 29.3.2001 No: 6/813/01. Tarkastetun siemenperunan tuottaminen tarkastuskaudella 2001-2002. Kasvintuotannon tarkastuskeskus, Siementarkastusosasto, 2002. Loimaa. 16 s. Ajantasaisin versio saatavissa internetistä: <http://www.KTTK.fi> .
- MMMA 24.11.2000 112/00 Maa- ja metsätalousministeriön asetus siemenperunan kaupasta. Annettu Helsingissä 24.11.2000, Maa- ja metsätalousministeriö Dnr 4015/565/200 Määräyskokoelman numero 112/00 Saatavissa internetistä: <http://www.mmm.fi/ministerio/lainsaadanto/siemenet/asetukset/112su00.pdf>
- Pérombelon, M.C.M. 1992. Potato blackleg: epidemiology, host-pathogen interaction and control. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 98:135-146.

- Pérombelon, M.C.M. 2000. Blackleg risk potential of seed potatoes determined by quantification of tuber contamination by the causal agent and *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*: a critical review*. Bulletin OEPP/EPPO 30:413-420.
- Pérombelon, M.C.M. & Kelman, A. 1980. Ecology of the soft rot *Erwinias*. Annual Review of Microbiology 18:361-387.
- Pérombelon M.C.M. & Kelman, A. 1987. Blackleg and other potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: proposal for revision of terminology. Plant Disease 71:283-285.
- Pérombelon, M.C.M., Lowe, R., Quinn, C.E. & Sells, I. 1980. Contamination of pathogen-free seed potato stocks by *Erwinia carotovora* during multiplication. Potato Research 23:413-425.
- Smid, E.J., Jansen, A.H.J. & Gorris, L.G.M. 1995. Detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Erwinia chrysanthemi* in potato tubers using polymerase chain reaction. Plant Pathology 44:1058-1069.

Tyvi- ja märkämädän esiintyminen perunan kenttäkokeissa

Anne Rahkonen¹⁾, Elina Virtanen²⁾, Merja Pulkkanen²⁾ ja Kristian Forsman²⁾

¹⁾Perunantutkimuslaitos, Ruusuontie 156, 16900 Lammi, anne.rahkonen@petla.fi

²⁾MTT (Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus), Pohjois-Pohjanmaan tutkimusasema, Tutkimusasemantie 15, 92400 Ruukki elina.virtanen@mtt.fi, merja.pulkkanen@mtt.fi, kristian.forsman@mtt.fi

Tiivistelmä

Tyvimädän esiintyminen perunakasvustoissa ja mukulasadoissa vaihtelee kasvukausittain. Perunantutkimuslaitoksella ja MTT:n Pohjois-Pohjanmaan tutkimusasemalla koottiin perunan kenttäkokeista vuosien 1997-2003 kasvustohavainnoista ja mukuloiden ulkoisen laadun määrittystuloksista tyvimädän esiintymistiheys. Tavoitteena oli selvittää tyvi- ja märkämätäoireiden ilmenemisen riippuvuutta kasvukausien sääoloista.

Kasvuston tyvimätäisyys vaihteli vuosikeskiarvona 0,4 – 1,4 % ja sadon bakteerimätäisyys 0,2 – 1,9 %. Keskikesän sateisuus ja edeltävän siemenviljelyvuoden märkyys näyttivät lisäävän tyvimädän puhkeamisriskiä kasvustossa. Kasvuston tyvimätäisyys oli selvä riski märkämädän puhkeamiselle satomukuloissa. Mukuloissa bakteerimätää esiintyi yleisimmin sateisten kesien jälkeen.

Asiasanat: kasvinsuojelu, kasvitaudit, peruna, tyvimätä, märkämätä, Erwinia carotovora, sadanta, sadon laatu

Johdanto

Erwinia-bakteerien aiheuttama tyvi- ja märkämätä on osoittautunut yllätykselliseksi ja vaikeasti hallittavaksi taudiksi. Sen esiintyminen vaihtelee vuosittain ja oireiden puhkeamista on vaikea ennustaa, koska monet tekijät vaikuttavat taudin kehittymiseen. Esimerkiksi viljelyolot, viljeltävä lajike ja satokauden sää vaikuttavat merkittävästi tyvimädän esiintymiseen (Pérombelon 2002).

Kasvukauden pituus vaihtelee Suomessa 120-200 vuorokauteen, ja vaihtelut tehoisan lämpötilan summan kertymissä saattavat olla Etelä- ja Pohjois-Suomen välillä suuria. Kasvuoloilla on merkittävä vaikutus kasvitauteja estävinä tai edistävinä tekijöinä (Pérombelon 2002). Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää, miten perunantyyvi- ja märkämädän runsaus on vaihdellut Perunantutkimuslaitoksen ja MTT:n Pohjois-Pohjanmaan tutkimusaseman kenttäkokeissa, ja miten paljon sääoloilla voidaan selittää taudin vuotuista vaihtelua.

Aineisto ja menetelmät

Tyvimätäkartoitukseen käytettiin Perunantutkimuslaitoksen kenttäkokeista vuosina 1998-2003 ja MTT Pohjois-Pohjanmaan tutkimusasemalla ruokape-runan virallisissa lajikekokeissa 1997 – 2003 tehtyjä kasvuston tyvimätähavaintoja ja sadon ulkoisen laadun määrittämisessä punnittuja märkämätäpitoisuuksia.

Aineistoon sisällytettiin Perunantutkimuslaitoksen toteuttamia lajikekokeita ja soveltuvin osin myös viljelytekniisiä kokeita, joista oli saatavissa kasvuston tyvimätähavainnot sekä sadon laatutiedot. MTT Pohjois-Pohjanmaan tutkimusasemalla kartoitus rajattiin käsittämään virallisten lajikekokeiden normaalityypitason ruutujen kasvustohavaintojen ja sadon ulkoisen laadun määrittämisen tulokset vuosilta 1997-2003.

Perunantutkimuslaitoksen aineisto koostui noin tuhannesta koejäsentason havainnosta pääosin Lammilla ja MTT Pohjois-Pohjanmaan tutkimusaseman lajikekoeaineisto 69 koejäsenen havainnosta. Yksi koejäsen sisälsi noin 200 perunayksilöä. Lajikekokeiden sekä soveltuvin osin myös muiden kokeiden viljelyssä, havainnoinnissa ja määrittämisessä noudatettiin virallista lajikekoeohjetta (Mäkelä 2002).

Perunantutkimuslaitoksen aineiston jatkokäsittelyyn sisällytettiin kokeet, joiden tyvimätähavainnot oli tehty heinäkuun lopussa tai elokuun alkupuolella. Ruukissa tyvimätäisten kasvien esiintyminen havainnoitiin vuosittain viikoilla 31.-32. Tyvimätäoireiset yksilöt laskettiin kasvustosta ja suhteutettiin ruudun yksilömäärään. Ruukissa sadon ulkoinen laatu määritettiin välittömästi ja Lammilla noin kuukausi sadonkorjuun jälkeen. Ulkoisen laadun määrittämisessä bakteerimätäisten mukuloiden osuus punnittiin painoprosentteina.

MTT:n Pohjois-Pohjanmaan tutkimusasemalla koottiin vuosilta 1997-2003 kasvukausien sademäärät (mm), keskilämpötilat (°C) ja lämpösummakertymät (°C) tutkimusasemalla sijaitsevan Ilmatieteen laitoksen säähavaintoaseman mittaustiedoista. Perunantutkimuslaitoksella Lammilla käytettiin laitoksen oman sääaseman vastaavia tietoja.

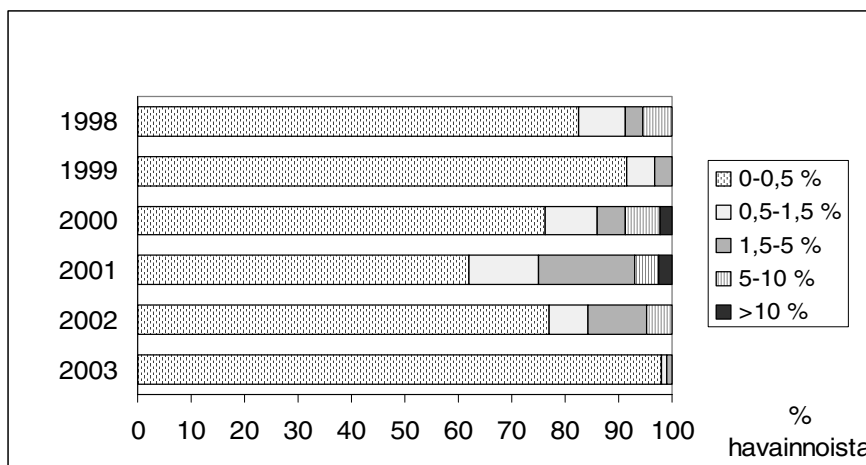
Ruukin tyvimätätarkastelussa käytetyt säähavaintoarvot laskettiin kasvustohavaintojen osalta istutuspäivästä havaintojen tekopäivää edeltäneeseen päivään ja satotietojen osalta istutuksesta nostoon. Perunantutkimuslaitoksen aineistoon sisältyi vuosittain useita eri aikaan istutettuja ja nostettuja kokeita, minkä vuoksi säähavaintoarvojen laskentajaksot sovittiin keskimäärin havainnointi- ja nostoaikoihin sopiviksi.

Kokeissa käytetty siemenperuna oli Perunantutkimuslaitoksen viljelemää tai muualta hankittua virallisesti tarkastettua siemenperunaa.

Tulokset ja tulosten tarkastelu

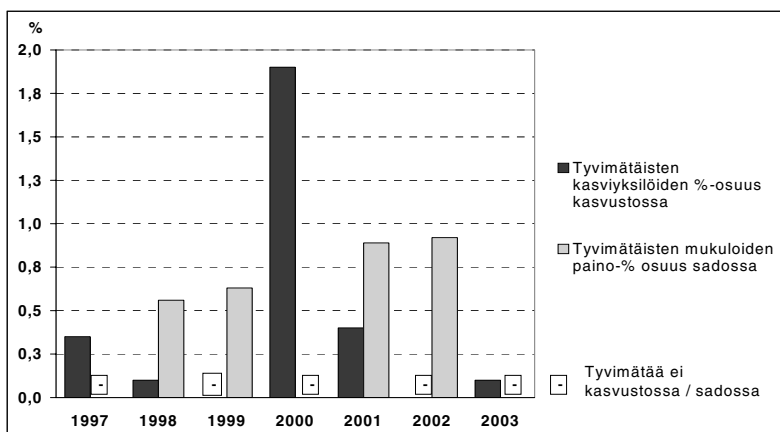
Vuosina 1997-2003 sateisin ja keskilämpötilaltaan alhaisin kesä oli 1998. Lisäksi vuosina 2000 ja 2001 kesä- ja heinäkuu olivat normaalia sateisempia. Suurimmat lämpösummakertymät olivat vuosina 2002 ja 2003.

Vuosina 1999 ja 2003 kenttäkokeiden kasvustot olivat lähes kauttaaltaan terveitä. Eniten tyvimätäisiä perunayksilöitä esiintyi vuonna 2001. Silloinkin kaksi kolmasosaa havainnoitujen koejäsenien kasvustoista oli terveitä. Lopuissa kolmasosassa tyvimätäisyys vaihteli alle prosentista jopa yli 10 prosenttiin yksilöistä (Kuva 1). Mukulasadon bakteerimätäisyyden jakauma oli samantyyppinen.

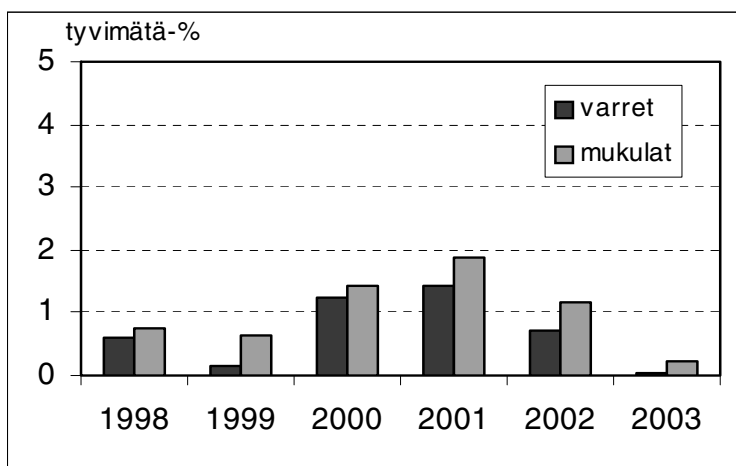


Kuva 1. Tyvimädän voiotusten ankaruus Perunantutkimuslaitoksen kenttäkokeissa vuosina 1998-2003.

Ruukissa 1997-2003 tyvimädän esiintyminen ruokaperunan virallisten lajikekokeiden kasvustoissa oli vähäistä vaihdellen yli vuosien tarkastelussa 0 – 1,9 % (kuva 2). Mukulasadon bakteerimätäisyys vaihteli vuosikeskiarvoina koko aineistossa 0,2 – 1,9 % (kuva 3.) ja Ruukissa 0 – 0,9 % (Kuva 2.). Koko aineistossa perunanvarsiston tyvimätäisyys vaihteli vuosikeskiarvoina 0,04 – 1,4 % vuosina 1998 – 2003 (kuva 3.).



Kuva 2. Tyvimädän esiintyminen kasvustoissa ja sadoissa Ruukin ruokaperunan virallisissa lajikekokeissa 1997-2003.

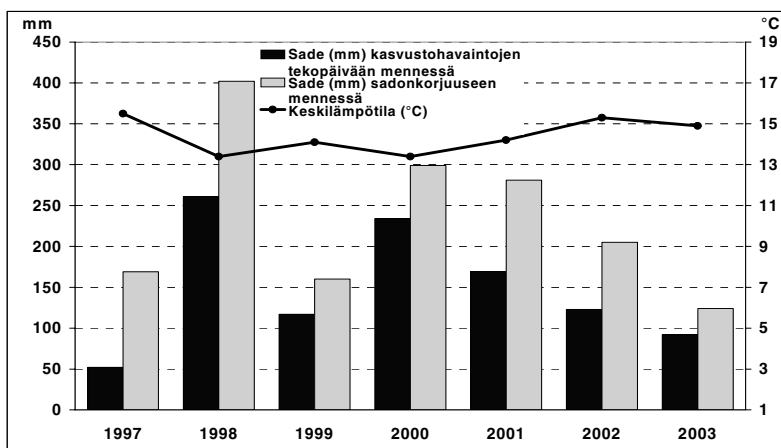


Kuva 3. Kasvuston tyvi- ja mukulasadon märkämätäisyys koko aineistossa.

Vettä pidetään Pérombelonin (2002) mukaan minimitekijänä tyvimädän latenssivaiheen kehitykselle näkyviksi tautioireisiksi. Kun mukulat joutuvat hapettomaan tilaan penkissä, hapestä riippuvaisten puolustusmekanismien toiminta estyy ja tyvimätäbakteeri fakultatiivisena anaerobina tunkeutuu syvemmälle solukkoon, lisääntyy ja tuottaa lopulta soluseiniä tuhoavia entsyymejä (Pérombelon 2002).

Tästä lienee pääteltävissä esimerkiksi voimakkaiden kuurosateiden vaikutus tyvimädän esiintymiseen perunantuotantolohkoilla hyvinkin paikallisesti. Kasvukauden aikana suhteellisen tasaisesti kertyneet sademäärät eivät peruskunnoltaan hyvillä tuotantolohkoilla aiheuta perunapenkkiin veden kertymisen seurauksena hapetonta tilaa.

Tässä kartoituksessa tyvimädän suhteellisen vähäinen esiintyminen vaikeutti tyvimädän ja säätekijöiden riippuvuustarkastelua. Muutamia selviä yhteyksiä

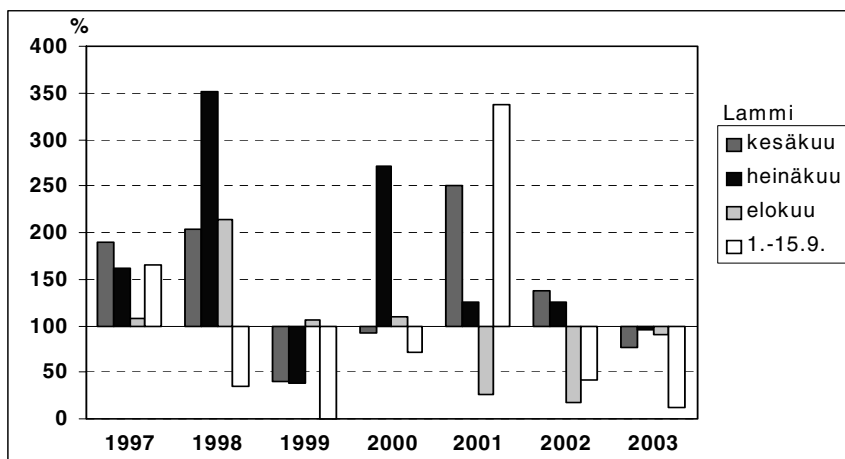


Kuva 4. Vuosien 1997-2003 sade ja keskilämpötila MTT Pohjois-Pohjanmaan tutkimusasemalla Ruukissa.

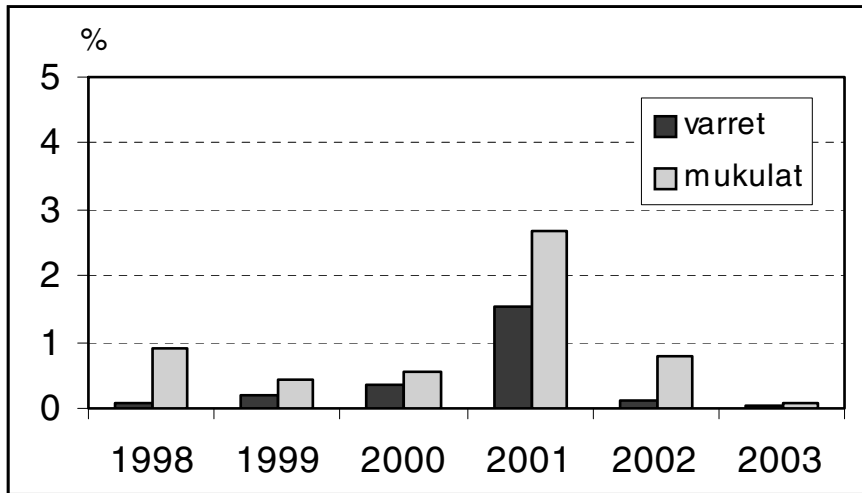
aineistosta onnistuttiin kuitenkin seulomaan esiin. Muun muassa kesä-heinäkuun sateisuus viljelyvuonna sekä edeltävän siementuotantovuoden märkyys näyttivät lisäävän tyvimädän puhkeamisriskiä kasvustossa.

Kesä 1998 oli elokuun lopulle saakka hyvin sateinen, ja lajikekokeiden siemenviljelys kärsi silloin märkydestä. Lajikekoevuonna 1999 kuiva kesä ilmeisesti esti pääosin tyvimädän puhkeamisen, sillä kasvustot olivat varsin terveet (kuvat 4 ja 5).

Lammilla sekä Ruukissa vuonna 2001 lajikekokeiden kasvustoissa oli tyvimätää selvästi enemmän kuin muina vuosina. Edeltävänä syksynä lajikekokeisiin käytetty siemenperuna jouduttiin nostamaan hyvin märissä oloissa, ja siemensadossa esiintyi märkämätää jo nostovaiheessa (Kuva 6)



Kuva 5. Kuukausittaiset sadepoikkeamat prosentteina normaaliarvosta Lamilla.



Kuva 6. Kasvuston tyvi- ja mukulasadon märkämätäisyys Perunantutkimuslaitoksen ja MTT:n Pohjois-Pohjanmaan tutkimusaseman toteuttamissa viralisissa lajikekoeksissa

Lajikekoevuonna 2001 kesäkuun sademäärä oli kaksinkertainen normaaliin nähden ja heinäkuunkin sademäärä yli normaalin, joten kosteusolot piilevän tartunnan puhkeamiselle olivat suotuisat (Kuvat 4 ja 5).

Kesä 2003 oli toinen peräkkäinen kosteusoloiltaan normaali kesä, ja silloin tyvimätää esiintyi kasvustoissa kaikkein vähiten.

Kasvuston tyvimätäisyys oli selvä riski ($r^2 = 0,20$; $p = 0,01$) taudin puhkeamiselle mukuloissa. Märkyys edistää emomukuloiden mätänemistä ja bakteerien leviämistä tytärmukuloihin (Elphinstone & Perombelon 1986).

Tässäkin aineistossa sateisten kesien 2000 ja 2001 jälkeen mukulasadossa esiintyi bakteerimätää enemmän kuin kuivina vuosina. Vuosi 2002 oli kosteusoloiltaan normaali, mutta nähtävästi edellisen mären siementuotantovuoden olot heijastuivat vielä vuoden 2002 satoon. Vuonna 1988 sateisesta kesästä huolimatta märkämätäisyys oli keskimääräistä tasoa.

Lajikkeista erottui muutamia, joissa tyvi- ja märkämätää oli keskimääräistä runsaammin. Bintjessä, Bellonassa, Fambossa ja Belitassa esiintyi kasvustossa keskimääräistä useammin tyvimätää sekä mukuloissa märkämätää. Myös Blue Congon sadossa esiintyi märkämätää keskimääräistä enemmän.

Oikukkaana kasvitautina tyvimätää on usein tulkittu lajikeheikkoudeksi. Bartz ja Kelman (1986) pitävät tyvimätääalttiuteen vaikuttavina tekijöinä muun muassa Eca-bakteerien määrää mukulassa, lajikkeen geneettisiä ominaisuuksia ja mukulan solukon vesipotentiaalia. Cotherin ja Cullisin (1992) mukaan erot sadon tyvimätäherkkyydessä saattavat vaihdella jopa saman kasvin tuottamisen mukuloiden välillä. Taudinkestävyys on lajikejalostuksessa Bradshaw'n

(1998) mukaan yksi tärkeimmistä tavoitteista ja geneettiset taudinkestävyysominaisuudet testataan lopulta viljely-ympäristössä.

Tutkitussa aineistossa ilmeni yhteys tyvi- ja märkämädän oireiden ja sääolojen välillä. Myös lajikkeiden välillä ilmeni eroja, ja viitteitä saatiin käytetyn siemenen terveyden merkityksestä. Nämä tiedot eivät silti riittäneet selittämään sitä, miksi tyvimätä puhkesi juuri tietyissä erissä ja toisissa ei. Hankaluutensa tyvimädän hallintaan tuo sen mahdollinen leviäminen tai esiintymisen ilman oireita (Stead 1999). Tässäkään kartoituksessa ei ollut tiedossa käytetyn siemenperunan mahdollinen piilevä *Erwinia*-saastunta. Sama yllätyksiä tuottava pulma koskee myös perunanviljelyä käytännössä.

Kirjallisuus

- Bartz, J.A. & Kelman, A. 1986. Reducing the potential for bacterial soft rot in potato tubers by chemical treatments and drying. *American Potato Journal* 63:481-493.
- Bradshaw, J.E. 1998. Applied potato genetics and breeding: the way ahead for potato breeding. The Scottish Crop Research Institute, Invergowrie, Dundee, DD2 5DA, Scotland, UK. <http://www.scri.sari.ac.uk>. Potato Genetics. CAB International, Wallingford, UK. s. 467-497.
- Cother, E.J. & Cullis, B.R. 1992. The influence of tuber position on periderm calcium content and its relationship to soft rot susceptibility. *Potato Research* 35:271-277.
- Elphinstone, J.G. & Pérombelon, M.C.M. 1986. Contamination of progeny tubers of potato plants by seed- and leaf-borne *Erwinia carotovora*. *Potato Research* 29:77-93
- Mäkelä, L. 2001. Virallisten lajikekokeiden suoritusohjeet. Peruna.. (<http://www.mtt.fi/atu/epo/lajikekoe/koeohje.html>).
- Pérombelon, M.C.M. 2000. Blackleg risk potential of seed potatoes determined by quantification of tuber contamination by the causal agent and *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*: a critical review. *Bulletin OEPP/EPPO* 30:413-420.
- Pérombelon, M.C.M. 2002. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology* 51:1-12.
- Stead, D. 1999. Bacterial diseases of potato: relevance to in vitro potato seed production. *Potato Research* 42:449-456.

***Erwinia carotovora*-bakteereita esiintyy ajoittain yleisesti jokivedessä**

Ari Lehtinen¹⁾, Terhi Rantanen²⁾ Asko Hannukkala¹⁾, Katja Moision¹⁾ ja Elina Virtanen³⁾

¹⁾MTT (Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus), Kasvintuotannon tutkimus, Kasvinsuojelu, 31600 Jokioinen, ari.lehtinen@mtt.fi, asko.hannukkala@mtt.fi, katja.moision@mtt.fi

²⁾TR BioTech Consulting, Kiekerötie 6 A 10, 96440 Rovaniemi,

³⁾MTT (Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus), Pohjois-Pohjanmaan tutkimusasema, 92400 Ruukki, elina.virtanen@mtt.fi

Tiivistelmä

Tyvi- ja märkämätä, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca) ja -subsp. *carotovora* (Ecc) ovat ensisijaisesti siemenperunassa leviäviä bakteeritauteja. Kuitenkin siemenperunan alkutuotannossa, jossa emomukulat ovat puhtaita tai lähes puhtaita *Erwinia*-bakteereista, tartuntalähteinä voivat toimia mm. saastuneet koneet ja kasteluvesi. Skotlannissa, USA:ssa ja Ruotsissa Eca- ja Ecc-bakteereita on löydetty yleisesti perunan kasteluun käytetyistä vesistä. Tutkimuksessa kartoitettiin, esiintyykö Tyrnävän seudulla virtaavien jokien vesissä Eca- ja Ecc-bakteereita. Bakteerien esiintyminen tutkittiin tarkoitukseen kehitetyllä PCR-menetelmällä noin 5 litran vesinäytteistä, joita kerättiin vuosina 2002-2003 kesäkuun puolivälistä elokuun loppuun noin 2-3 viikon välein 11 näytteenottopisteestä.

Yhdestäkään tutkitusta vesinäytteestä ei löytynyt Eca-bakteeria. Vuonna 2002 Ecc-bakteeria löytyi useimmilta näytteenottopaikoilta koko kesän ajan. Vuonna 2003 Ecc-bakteeria löytyi vain muutamasta näytteestä. Tutkimuksessa ei selvitetty tarkemmin, mistä vesistöön kulkeutunut Ecc oli peräisin. Vuonna 2002 bakteeria löytyi yleisesti Tyrnävänjoen yläjuoksulta, missä perunaa ei ainakaan laajamittaisesti viljellä.

Ecc-bakteerin yleisyys jokivesissä tulisi ottaa huomioon yhtenä riskitekijänä siemenperunan tuotannossa.

Asiasanat: kasvinsuojelu, kasvitaudit, peruna, tyvimätä, märkämätä, Erwinia carotovora, Erwinia carotovora subsp. carotovora, Erwinia carotovora subsp. atroseptica, epidemiologia, kasvitautien leviäminen, kastelu, kastelumenetelmät

Johdanto

Erwinia carotovora subsp. *atroseptica*-bakteeri (Eca) aiheuttaa perunalla tyvimätää, joka näkyy tyypillisesti varren tyviosassa limaisena mätäoireena. Tyvimädän lisäksi Eca yhdessä *E. c.* subsp. *carotovoran* (Ecc) kanssa mädättää perunan mukuloita, jolloin tautia sanotaan märkämädäksi. Perunantuotannossa *E. carotovora* leviää pääasiassa siemenperunan välityksellä. Tartuntaa kantaneiden emomukuloiden mätänemisen seurauksena syntyvä bakteerilima saastuttaa tytärmukulat. Bakteerivapaa siemen on tehokkain taudin ehkäisykeino (Pérombelon 1992).

Siemenperunan alkutuotannossa pyritään tuotettava sato pitämään puhtaana *E. carotovora*-bakteereista mahdollisimman pitkään. *E. carotovora*-bakteereita löytyy jo ensimmäisinä siemenperunan avomaalisäysvuosina, jolloin ne eivät ole peräisin emomukulasta vaan muista saastuntalähteistä (kts. s. 12-14). Näitä voivat olla saastuneet sadonkäsittelykoneet ja -laitteet, sekä kasteluvesi (Pérombelon 1992). Bakteeri voi levitä useita satoja metrejä myös aerosoleissa, joita muodostuu rankkasateiden aikana ja tyvimätäistä varsistoa mekaanisesti hävitettäessä (Pérombelon & Kelman 1980).

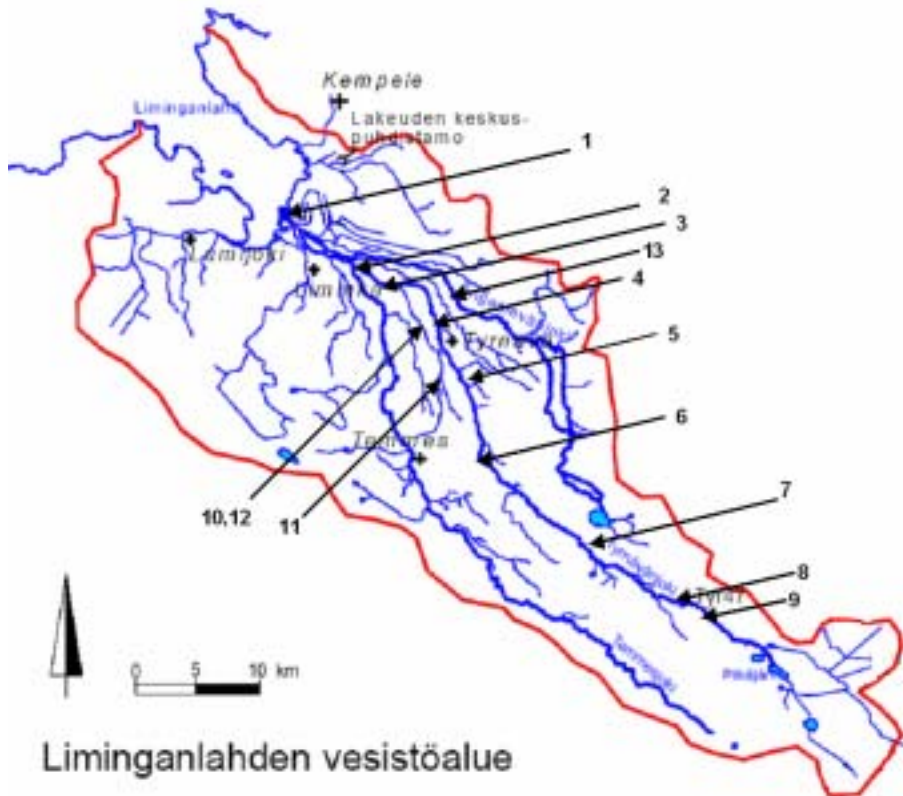
Muiden muassa Cappaert ym. (1988), Pérombelon ja Hyman (1987) ja Persson (1988) ovat selvittäneet *E. carotovora*-bakteerien esiintymistä vesistöistä. Yleensä vesistöistä on löydetty Ecc-alalajia, mutta Eca-alalajia on löydetty 2-20 %:sta tutkituista vesinäytteistä. Kaikkia tartuntalähteitä, joista *E. carotovora*-bakteeri voi päätyä vesistöihin, ei tunneta hyvin. Tärkeimpinä jokivesien saastumislähteinä pidetään perunapellolla mätäneviä emomukuloita ja jokien läheisyyteen ajettua perunan lajittelujätettä (Pérombelon & Hyman 1987). Bakteereja on löydetty myös vesistöjen yläjuoksuilta, joilla ei harjoiteta maataloustuotantoa. Ilmeisesti Ecc-alalaji voikin säilyä ja lisääntyä luonnossa muuallakin kuin maatalousympäristössä (McCarter-Zorner ym. 1984).

E. carotovora-bakteerien esiintymistä luonnossa ei ole aikaisemmin tutkittu Pohjois-Pohjanmaan korkeudella, jonne korkeimpien siemenluokkien tuotanto Suomessa on keskittynyt. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, esiintyykö Eca- ja Ecc-bakteereita Tyrnävän seudulla virtaavissa joissa, joista voidaan ottaa vettä perunan kasteluun. Samalla pyrittiin arvioimaan jokiveden aiheuttamaa riskiä tyvi- ja märkämädän primaaritartunnan lähteenä ja selvittämään veden saastumiseen vaikuttavia tekijöitä. Tutkimus toteutettiin osana MTT, PPO:n johtamaa ja Argopolis Oy:n hallinnoimaa 'Perunan kastelumenetelmien vertailu' -kehittämishanketta.

Aineisto ja menetelmät

Vesinäytteitä otettiin pääasiassa Tyrnävänjoesta ja Leppiojasta. Näytteet otettiin mahdollisuuksien mukaan 2-4 viikon välein kesäkuun puolivälistä syyskuun loppuun. Vuonna 2002 ja 2003 vesinäytteitä kerättiin myös Ängeslevänjoesta sekä kerran vuonna 2002 Lammilta Perunantutkimuslaitoksen viljelysten läpi virtaavasta purosta (Kuva 1, Taulukko 1).

Vesinäyte pyrittiin ottamaan joen päävirtauksesta noin 10 cm:ä veden pinnan alapuolelta. Näyte otettiin työntämällä n. 1,5 metrin pituinen lauta 5 litran kanisterin kahvan läpi ja painaen kanisterin suu veden pinnan alle laudasta kiinni pitäen. Kanisteri nostettiin ylös, kun se oli täyttynyt. Vesinäytteet kuljetettiin samana päivänä Jokioisille, jossa ne säilytettiin yön yli +6-8°C:n kylmiössä. Bakteerianalyysit aloitettiin mahdollisimman nopeasti seuraavana aamuna.



Kuva 1. Liminganlahden vesistöalue ja vesinäytteiden ottoapaikat: 1-9 Tyrnävänjoki, 10-11 Leppioja, 12 Siemenperunakeskuksen kasteluvesiallas ja 13 Ängeslevänjoki (Karttopohja: Lapin vesitutkimus Oy).

Vuonna 2001 5 litran vesimäärästä otettiin analysointia varten 100 ml näyte, joka suodatettiin 0,2 µm Sartorius bakteerisuodattimen läpi. Bakteerisuodatin siirrettiin CVP-maljalle, jota inkuboitii 27°C:ssa kaksi vuorokautta. Yhden vuorokauden inkuboinnin jälkeen suodatin poistettiin maljalta. Kasvatuksen jälkeen maljalle lisättiin 500 µl steriiliä vettä ja kasvusto kaavittiin talteen. Talteen kerätty bakteerimassa laimennettiin suhteessa 1:10 niin, että kokonaistilavuudeksi tuli 100µl.

Bakteeriliuos pestiin sentrifugoimalla kaksi minuuttia 13 000 rpm. Veden poistamisen jälkeen sentrifugiputken pohjalle jäänyt bakteerimassa liuotettiin uudelleen 100 µl:aan steriiliä vettä. Näin saadusta bakteerisuspensiosta tehtiin lisäksi laimennos suhteessa 1:10, jonka kokonaistilavuudeksi tuli 100 µl. Bakteerisuspensioista käytettiin 2,5 µl näytteeksi *E. carotovora*-spesifisessä TYVI3 PCR-menetelmässä. TYVI3 PCR-menetelmässä positiivisiksi osoittautuneet näytteet analysoitiin lisäksi Eca-spesifisellä kvantitatiivisella TY-VII PCR-menetelmällä (kts. s. 20-22).

Kesän 2001 kokemusten perusteella osoittautui välttämättömäksi parantaa jokivesinäytteiden suodatus- ja maljakasvatusvaiheita. Kehitystyön jälkeen

päädettiin menetelmään, jossa 150 ml jokivettä suodatettiin ensin W 91 paperisuodattimen läpi isoimpien partikkelien poistamiseksi. Suodatettu vesi sentrifugoitiin 9000 rpm 30 minuutin ajan, jonka jälkeen suurin osa vedestä pipetoitiin pois. Jäljelle jäävään osuuteen vedestä, eli noin 500 µl:aan, lisättiin 2,5 µl DTT:tä ja liuos levitettiin CVP-maljoille. Maljoja inkuboitiin 27°C:ssa kaksi vuorokautta (Hyman ym. 2001). Vesinäytteiden käsittely tästä eteenpäin jatkui kuten aikaisempanakin vuonna. TYVI3 ja TYVII menetelmien lisäksi näytteistä tehtiin Eca-spesifinen PCR-analyysi alukkeilla ECA1f ja ECA2r (De Boer & Ward 1995).

Tulokset

Yhdestäkään vuosina 2001-2003 tutkitusta vesinäytteestä ei löydetty Eca-alalajia. Vuonna 2001 ensimmäisellä näytteenotokerralla löydettiin Ecc:a Tyrnävänjoesta, muutama sata metriä Leppiojan suulta ylävirtaan (Taulukko 1). Myös Leppiojasta löydettiin Ecc:a Suomen siemenperunakeskus Oy:n (SPK) varaston sekä kasvihuoneiden kohdalta. Seuraavilla näytteenotokerroilla *E. carotovora*-bakteereita ei enää löydetty. Loppukesälle suunnitelluista näytteenotoista luovuttiin, koska bakteerien eristysmenetelmä ei ollut tarpeeksi hyvä. Menetelmä kehitettiin luotettavaksi kesää 2002 varten.

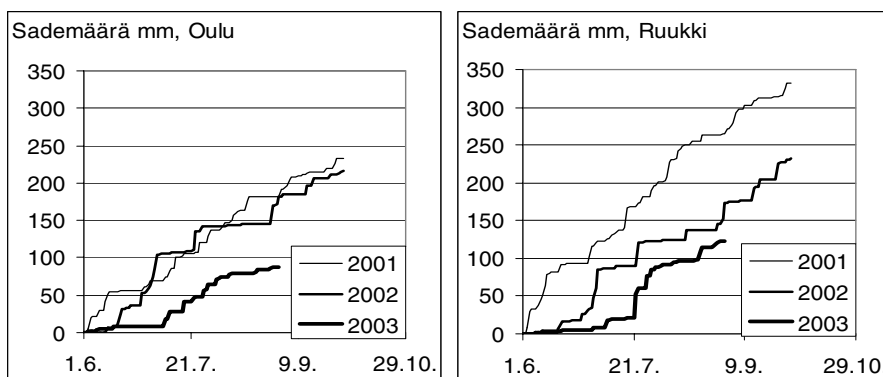
Taulukko 1. Näytteenottoaikat ja -päivämäärät, sekä näytteistä saatu tulos. Eca-bakteeria ei löydetty yhdestäkään näytteestä. Ecc:n esiintyminen: + bakteeria esiintyi, - bakteeria ei löydetty.

Näytteenottoaikat														
Näytteenotto-päivä	Tyrnävänjoki									Leppioja		SPK:n	Ängesleväjoki	Perunantutkimuslaitos
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
19.6.01	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-		
4.6.02		+	+	+				+			+	-	+	
25.6.02		+	+	+					+		+	-	+	
11.7.02		+	+	+				+			+	-	+	
23.7.02		-	-	+		+	+				+	+	+	+
13.8.02		-	-	+				-			+	-	+	
23.9.02		+	+	+		+	-				+	+	-	+
17.6.03		+	-	+							-			-
15.7.03		-	-	-							-			-
3.8.03		-	-	-							-	-		+
22.8.03		-	-	-							-			-

Vuonna 2002 Ecc:a löytyi Tyrnävänjoesta, Ängeslevänjoesta ja Leppiojasta koko kesän ajan (Taulukko 1). Heinäkuussa ja varsinkin elokuussa saastuneii-

den näytteiden määrä väheni selvästi. SPK:n kasvihuoneen takana sijaitsevas-
ta vesijohtovedellä täytetystä kastelualtaasta *Ecc*-bakteeria löytyi vain 23.
heinäkuuta otetusta näytteestä. Bakteerin on täytynyt kulkeutua kastelualtaa-
seen hyönteisten tai aerosolien mukana.

Vuonna 2003 *Ecc*:a löydettiin vain kahdesta näytteestä: 17.6. Tyrnävänjoesta
näytteenottoapaikoilta 2 ja 4, sekä 3.8. Ängeslevänjoesta.



Kuva 2. Kasvukausien 2001-2003 sademäärät Oulussa ja Ruukissa.

Eroja *Ecc*:n esiintymisessä eri näytteenottoajankohtien välillä pyrittiin selvit-
tämään haastattelemalla satunnaisesti tavattuja paikallisia viljelijöitä saastun-
talähteiden selvittämiseksi ja tarkastelemalla säässä tapahtuneita muutoksia
Ilmatieteen laitoksen Oulun ja Ruukin havaintoasemien säätietojen perusteel-
la. Sääaineistosta näkyi erittäin selvästi suuret erot kasvukausien sateisuudes-
sa (Kuva 2). Vuosi 2003 oli selvästi vähäsateisempi molemmilla havainto-
asemilla. Erityisen kuivaa oli istutuksesta heinäkuun toiselle viikolle.

Tulosten tarkastelu

Tutkimuksessa osoitettiin *E. carotovora*-bakteereita esiintyvän ajoittain ylei-
sesti tärkeimmällä suomalaisella siemenperunan tuotantoalueella. Myös
Lammilta kerätty vesinäyte sisälsi *E. carotovora*-bakteereita. Ei ole syytä
epäillä, etteikö bakteereita esiintyisi myös muissa perunapelloja halkovissa
vesistöissä, koska niitä on muissa eteläisemmissä maissa tehdyissä tutkimuk-
sissa myös yleisesti havaittu (Cappaert ym. 1988, Pérombelon & Hyman
1987, Persson 1988). Tuotannon kannalta on huolestuttavaa, että kasvukau-
della 2002 Tyrnävänjoki oli *Ecc*:n saastuttama lähes koko kasvukauden ajan.
Tosin *Eca*:a ei havaittu missään näytteessä. Näytteitä tutkittiin melko vähän
ja yksittäinen näyte oli sängen pieni suhteessa vesistön virtaamaan, joten
Eca:a on silti voinut esiintyä jokivedessä yhtä paljon (2-20 %:ssa näytteistä)
kuin ulkomailla tehdyissä aikaisemmissa tutkimuksissa.

E. carotovora-bakteereita ei juuri havaittu jokivesinäytteissä kuivana kasvu-
kautena 2003. Bakteereja ei päässyt jokiveteen, koska perunapenkeistä ja
jättekasoista bakteereja vesistöihin huuhtovia sateita ei esiintynyt.

E. carotovora-bakteereita esiintyi Tyrnävänjoessa vuosina 2001-2003 jo ke-säkuun ensimmäisessä näytteessä, joka otettiin viimeistään perunan taimettu-essa. Näin aikainen saastunta ei ole voinut olla peräisin samana vuonna istu-tettujen siemenperunoiden mätänemisestä, vaan edellisvuotisista mukuloista tai varsista. Osa alkukesän Ecc-positiivisista näytteistä oli peräisin läheltä perunavarastoja, joissa parhaillaan pestiin laatikoita. Jos perunalaatikoita pestään suuria määriä kasvukaudella ennen kasteluveden ottoa, saattavat niis-tä huuhtoutuvat bakteerit saastuttaa merkittävästi tuotettavaa mukulasatoa.

Jokiveden saastumisen välttäminen on erityisen tärkeää Tyrnävänjoen kaltai-sissa pienissä vesistöissä, joissa yksikin tartuntalähde saattaa saastuttaa joen alajuoksun koko kasvukauden ajaksi. Skotlantilaisten tutkimusten mukaan jokeen kipattu jätteperunakuorma saastutti joen alajuoksun usean kilometrin matkalta (Pérombelon & Hyman 1987). Saastunut kasteluvesi on Suomessa-kin varteenotettava riski siemenperunan alkutuotannossa tyvi- ja märkämä-dän tartuntalähteenä.

Kirjallisuus

- Cappaert, M.R., Powelson, M.L., Franc, G.D. & Harrison, M.D. 1988. Irrigation water as a source of inoculum of soft rot *Erwinias* for aerial stem rot of potatoes. *Phytopathology (USA)* 78:1668-1672.
- De Boer, S.H. & Ward, L.J. 1995. PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. *Phytopathology* 85:854-858.
- Hyman, L.J., Sullivan, L., Toth, I.K. & Pérombelon, M.C.M. 2001. Modified crystal violet pectate medium (CVP) based on a new polypectate source (Slendid) for the detection and isolation of soft rot *Erwinias*. *Potato Research* 44:265-270.
- McCarter-Zorner N.J., Franc G.D., Harrison M.D., Michaud J.E., Quinn C.E., Sells, I.A. & Graham, D.C. 1984. Soft rot *Erwinia* bacteria in surface and underground waters in southern Scotland and in Colorado, United States. *Journal of Applied Bacteriology* 57:95-105.
- Pérombelon, M.C.M. 1992. Potato blackleg: epidemiology, host-pathogen interaction and control. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 98:135-146.
- Pérombelon, M.C.M. & Hyman, L.J. 1987. Frequency of *Erwinia carotovora* in the Alyth Burn in eastern Scotland and the sources of the bacterium. *Journal of Applied Bacteriology* 63:281-291.
- Pérombelon, M.C.M. & Kelman, A. 1980. Ecology of the soft rot *Erwinias*. *Annual Review of Microbiology* 18:361-387.
- Persson, P. 1988. Blackleg and stem rot of potatoes in Sweden. *Acta Agriculturae Scandinavica (Sweden)* 38:177-182.

Varsistonhävityksen vaikutus perunan tyvimädän esiintymiseen kasvustossa ja sadossa

Elina Virtanen¹⁾, Merja Pulkkanen¹⁾, Kristian Forsman¹⁾, Terhi Rantanen²⁾ ja Asko Hannukkala³⁾

¹⁾MTT (Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus), Pohjois-Pohjanmaan tutkimusasema, Tutkimusasemantie 15, 92400 Ruukki, elina.virtanen@mtt.fi, merja.pulkkanen@mtt.fi, kristian.forsman@mtt.fi

²⁾TR BioTech Consulting, Kiekerötie 6 A 10, 96440 Rovaniemi,

³⁾MTT (Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus), Kasvintuotannon tutkimus, Kasvinsuojelu, 31600 Jokioinen, asko.hannukkala@mtt.fi

Tiivistelmä

Varsistonhävityksen päätehtävä on helpottaa sadonkorjuuta ja nopeuttaa kuoren kiinnittymistä ennen nostoa. Mukulakokoa säädellään istutustiheydellä ja lannoituksella. Vasta toissijaisesti siihen käytetään varsistonhävitystä. Vuosina 2001-2003 toteutettiin varsistonhävitystutkimusta siementuotantotilalla eri varsistonhävitysmenetelmillä. Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää varsistonhävitysmenetelmien vaikutusta tyvimätäsaastunnan ilmaantumiseen ja leviämiseen kasvustossa ja sadossa. Piilevän tyvi- ja märkämädän esiintymistä tutkittiin erilaisilla PCR-menetelmillä kasvukauden aikana ja sadonkorjuun yhteydessä kerätyistä verso- ja mukulanäytteistä. Myös näkyvät tyvimätäoireet ja sadossa esiintyneiden bakteerimätien määrät havainnoitiin. Piilevää tyvi- ja märkämätää esiintyi tuotanto-olosuhteissa tutkimusvuosina niin vähän, ettei varsistonhävitysmenetelmien vaikutuksista tyvimätäsaastuntaan tai sen leviämiseen voitu tehdä luotettavia johtopäätöksiä. Viljelyteknisenä toimenpiteenä varsistonhävityksellä pystytään helpottamaan sadonkorjuuta, nopeuttamaan kuoren kiinnittymistä ja säätelemään sadon mukulakokoja-kaumaa.

Asiasanat: kasvinsuojelu, kasvitaudit, peruna, siemenperuna, varsisto, tyvimätä, sadon laatu, tärkkelys, pitoisuus

Johdanto

Suomessa perunantuotannossa käytetään yleensä mukulakooltaan 30-50 mm siemenperunaa. Jotta siemensaanto olisi mahdollisimman suuri, mukulakoon säätelykeinona käytetään istutustiheyden ja lannoituksen ohella osittain myös varsistonhävitystä. Viljelyteknisesti varsistonhävitys tehdään siemenperunantuotannossa aikaisilla ja suurimukulaisilla lajikkeilla usein täysin tuleentumattomaan, jopa kukintavaiheessa olevaan kasvustoon, ja myöhäisilläkin lajikkeilla ennen kasvuston luontaista tuleentumista.

Varsistonhävitysvaiheessa ei voida ennakoida kehittyvien, myöhemmin siemenperunoiksi käytettävien mukuloiden mahdollista tyvimätä (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca) ja *E. c.* subsp. *carotovora* (Ecc))-saastuntaa. Varsistonhävittäminen voi olla yksi tyvimätäbakteerin leviämisreitti siemen-

perunatuotannossa (Pérombelon 1992), sillä bakteereita on myös varren johdosolukossa ilma- tai hyönteissaastuntana (Pérombelon 2002), vaikka näkyviä oireita, kloroosia tai mädäntymistä, ei kasvustossa olisikaan.

Tutkimus varsistonhävityksen vaikutuksesta tyvimädän esiintymiseen kasvustossa ja sadoissa liittyy MTT:n Pohjois-Pohjanmaan tutkimusaseman siemenperunantuotantoalueella ja -tilalla toteuttamaan kehittämishankkeeseen. Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää erilaisten varsistonhävitysmenetelmien vaikutusta piilevän tyvi- ja märkämädän leviämiseen sekä lisääntymiseen mukulasadossa.

Aineisto ja menetelmät

Taustatiedot

Varsistonhävitysmenetelmien vaikutusta tyvi- ja märkämädän leviämiseen mukulasadossa tutkittiin kenttäkokeessa, jota toteutettiin siemenperunan tuotantotilalla vuosina 2001-2003. Koemallina oli lohkoittain satunnaistettu koe, jossa oli neljä kerrannetta. Ruutukoko oli 32 m².

Tutkittavat varsistonhävittämiskeinot, joiden vaikutusta verrattiin luontaisesti tuleentuneeseen kasvustoon olivat:

1. Reglone (tehoaine: dikvatti 200 g/l), 2x 2 l/ha:lle 400 l:aan vettä
2. AIV2-liuos (tehoaine muurahaishappo 80 %), 60 l/ha:lle 250 l:aan vettä
3. Varsiston mekaaninen murskaus ja 1x Reglone, kuten menetelmässä 1.

Varsistonhävitysjankkohta määräytyi tuotantolohkolla tehdyn kasvunoston perusteella, kun sadosta enintään 5 % oli mukulakooltaan yli 50 mm:stä. Varsistot hävitettiin 21.8. (2001), 28.8. (2002) ja 18.8. (2003). Työteknisesti varsiston murskaus oli tehtävä viikatteella. Varsiston mekaanisen hävityksen ja kemikaaliruiskutuksen välinen aika oli 2 vrk.

Kokeiden viljelytoimenpiteet toteutti Pohjois-Pohjanmaan tutkimusaseman henkilökunta tilan viljelykäytännön ja aikataulun mukaisesti. Lajikkeina olivat Asterix (2001-2002) ja Lady Christl (2003), joissa on usein havaittu enemmän tyvimätää kuin muissa lajikkeissa. Kenttäkokeet perustettiin 25.5.-2.6. ja nostettiin 1.9.-14.9. välisenä aikana.

Tyvimätäsaastunnan jäljittämiseksi ja mahdollisen leviämisen todentamiseksi kasvustosta otettiin piilevän tyvimädän näytteitä ennen varsistonhävittämistä, varsistonhävittämisen jälkeen sekä mukulanäytteitä sadosta. MTT:n Kasvin suojele analysoi sekä kasvusto- että mukulanäytteet PCR-menetelmillä (kts. s. 20-22). Lisäksi kasvustosta havainnoitiin kasvustotaudit ja kehitysasteet sekä sadosta analysoitiin määrän ja mukulakokojakauman lisäksi sadon ulkoinen laatu.

Havainnot, näytteenotot ja analyysit

Kenttäkokeiden kasvustokehitystä seurattiin tekemällä havainnot taimettumisesta, alkukehityksestä, peittävydestä ja myöhäisyydestä MTT:n virallisten

lajikekokeiden suoritusohjeiden mukaisesti (Mäkelä 2002). Kasvustotaudit havainnoitiin laskemalla sairaiden kasviyksilöiden lukumäärä koeruuduittain.

Piilevän tyvi- ja märkämädän alkutason määrittämiseksi kenttäkokeiden siemenperunasta otettiin 200 mukulan yhdistelmänäyte. Bakteritartunnan alkuperän ja tartuntariskin selvittämiseksi otettiin juuri ennen varsistonhävittämistä kasvuston ylä-, keski- ja alaosista ruuduittain 20 lehdykän kasvustonäyte. Bakteritartunnan etenemistä mukuloihin varsistonhävityksen jälkeen seurattiin mukulanäytteistä, jotka otettiin 4, 8, ja 11 vuorokautta varsiston hävittämisen jälkeen. Ennen sadonkorjuuta otettiin vielä näytteet kasvustosta tai murskatusta kasvimassasta. Mukuloiden lopullinen tartunta-aste määritettiin ennen sadonkorjuuta otetusta mukulanäytteestä, joka koostui 20 perunayksilön satomukuloista.

Piilevien *E. carotovora*-tartuntojen esiintyminen osoitettiin vuonna 2001 ensin TYVI3 BioPCR-menetelmällä. Positiivisiksi todetut näytteet analysoitiin edelleen kvantitatiivisella TYVI1 PCR-menetelmällä, joka osoittaa Eca-alalajin olemassaolon ja määrän näytteissä (kts. s. 20-22). Vuosina 2002 ja 2003 bakteerien osoittamiseen käytettiin TYVI3 BioPCR-menetelmän lisäksi Eca-spesifistä ECA1f- ja ECA2r-alukkeilla (De Boer & Ward 1995) tehtävää BioPCR-menetelmää. Kvantitatiivinen TYVI1 PCR-analyysi tehtiin vain Eca-positiivisista näytteistä.

Mukulasadot korjattiin 14-18 vuorokauden kuluttua varsistonhävityksestä ja sadot lajiteltiin kokoluokkiin <35, 35-55, 55-70 ja >70 mm. Satopunnitusten jälkeen määritettiin sadon tärkkelyspitoisuus ominaispainomenetelmällä ja sadon ulkoinen laatu MTT:n virallisen lajikekoeohjeistuksen mukaan. Sato ja kasvustohavaintojen tulokset on analysoitu tilastollisesti SAS:n GLM- ja MIXED-proseduurin Tukey-Kramerin testillä.

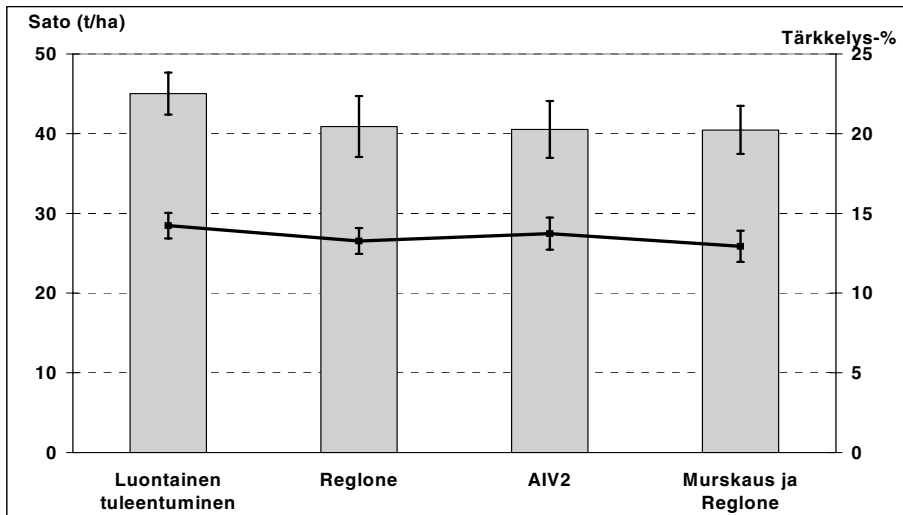
Bakteerien esiintymistiheys tutkimusaineistossa oli niin pieni ja sattumanvarainen, ettei varsistonhävitysmenetelmien vaikutusten osoittamiseen voitu soveltaa mitään tunnettua tilastomatemaattista mallia.

Tulokset ja tulosten tarkastelu

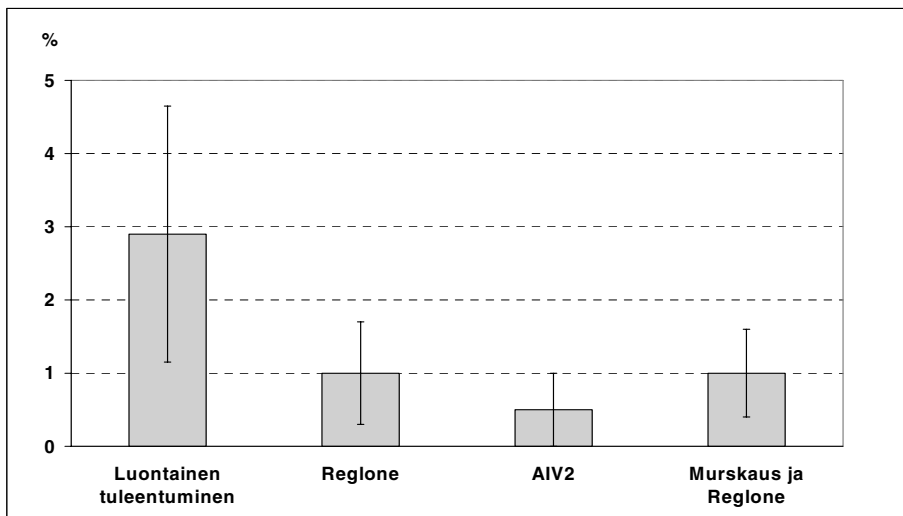
Vuosina 2001 ja 2003 kenttäkokeissa ei havaittu tyvimätäisiä kasveja. Vuonna 2002 kahdella havaintokerralla (22.7. ja 9.8.) havaittiin koko koekentällä satunnaisesti 2-4 tyvimätäistä yksilöä. Tyvimätäiset kasviyksilöt kuvasivat siemenen tyvimätäsaastunutta. Piilevän tyvi- ja märkämädän esiintyminen PCR-analyyseissä oli niin vähäistä, ettei tilastollisesti luotettavia johtopäätöksiä varsistonhävityksen vaikutuksesta tyvimätäsaastuntaan tai sen leviämiseen ole analysitulosten perusteella tehtävissä.

Varsistonhävityksellä 35-55 mm kokoisten mukuloiden osuus oli keskimäärin 75% kokonaissadosta ja luontaisesti tuleentuneessa kasvustossa 5% pienempi. Kokonaissadot vaihtelivat eri vuosina 32-46 t/ha välillä koejäsenissä, joissa varsisto oli hävitetty ja luontaisesti tuleentuneissa koejäsenissä 41-51 t/ha välillä. Varsistonhävitettyjen kasvustojen sadoissa oli keskimäärin

0,9 %-yksikköä alhaisempi tärkkelyspitoisuus kuin luontaisesti tuleentuneen kasvuston sadoissa (Kuva 1), ja ero oli tilastollisesti merkitsevä.



Kuva 1. Varsistonhävityksen vaikutus satoon ja tärkkelysprosenttiin vuosina 2001-2003.



Kuva 2. Bakteerimätäisten mukuloiden %-osuudet sadossa vuonna 2002.

Mukulasadon ulkoisen laadun analyyseissä bakteerimätäisiä mukuloita ei esiintynyt lainkaan vuosina 2001 ja 2003. Vuoden 2002 laatuanalyyseissä oli bakteerimätäisiä 0,5-2,9 paino-% sadosta. Luontaisesti tuleentuneen kasvuston sadossa bakteerimätäisiä oli eniten (2,9 paino-%) ja vähiten (0,5 paino-%) AIV2-luoksella hävitetyn kasvuston sadossa (Kuva 2). Käsittelyjen väliset erot mukuloiden bakteerimätäisyydessä eivät olleet tilastollisesti merkitseviä.

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää eri varsistonhävitysmenetelmien vaikutusta tyvimätäsaastunnan määrään sadossa. Tavoitteena oli myös selvittää lisääntyvätkö tyvimätäbakteerit varsistossa hävittämättömään varsistoon (luontaiseen tuleentumiseen) verrattuna. Koska kenttätutkimukset toteutettiin tuotanto-olosuhteissa, tyvimätäsaastunnan lähtötaso ja kasvukauden aikainen esiintyminen on vuosittain vaihtelevaa ja mahdotonta ennakoita. Vuosina 2001 ja 2003 tyvimätää ei esiintynyt kasvustossa tai sadoissa lainkaan, ja vuoden 2002 tyvi- ja märkämädän esiintyminen oli niin vähäistä, ettei luotettavia johtopäätöksiä varsistonhävityksen vaikutuksesta tyvimätäsaastuntaan tai sen leviämiseen voida tehdä. Varsistonhävityskenttätutkimuksiin olisi tullut sisällyttää koetekijäksi myös saastutettujen (Eca) siemenmukuloiden vaikutusten todentaminen. Tämä on kuitenkin vaikea toteuttaa käytännön siementuotantotilalla lisääntyvän tautiriskin takia.

Mukulakoon säätelykeinona varsistonhävitys on helppo toteuttaa, ja vuosina 2001-2003 mukulasadoista 70-80 % saatiin haluttuun 35-55 mm kokojakamaan. Varsistonhävitettyjen kasvustojen alhaisempi sadon määrä ja tärkkelyspitoisuus verrattuna luontaisesti tuleentuneen kasvuston satoihiin on Struikin ja Wierseman (1999) mukaan luonnollinen seuraus varhaisessa vaiheessa tehdystä varsistonhävityksestä. Vaikka varsistonhävitystä pidetäänkin yhtenä tyvimädän leviämisreittinä, Holmes ja Cray (1972) sekä Struik ja Wiersema (1999) toteavat varsistonhävitysajankohdan oikean valinnan kuitenkin estävän kasvipatogeenien leviämistä. Heidän mukaansa hävitysajankohdan määrittäminen riippuu paljolti viljeltävästä lajikkeesta, sadon tuleentumisvaiheesta ja perunapellon infektiopaineesta. Jotta tyvimädän tuntemus ja kehittymisen tuotanto-olosuhteissa saataisiin hallintaan, ja käytetylle varsistonhävitykselle määritettyä sopiva ajankohta, tarvitaan sekä kasvihuone- että kenttätutkimuksia.

Kirjallisuus

- De Boer, S.H. & Ward, L.J. 1995. PCR Detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with Potato Tissue. *Phytopathology* 85:854-858.
- Holmes, J.C. & Gray, D. 1972. Carry-over effects of sprouting and haulm destruction in the potato crop. *Potato Research* 15:220-235.
- Mäkelä, L. 2001. Virallisten lajikekokeiden suoritusohjeet. Peruna. Saatavissa internetistä: (<http://www.mtt.fi/atu/epo/lajikekoe/koeohje.html>).
- Pérombelon, M.C.M. 1992. Potato blackleg: epidemiology, host-pathogen interaction and control. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 98:135-146.
- Pérombelon, M.C.M. 2002. Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology* 51:1-12.
- Struik, P.C. & Wiersema, S.G. 1999. Seed potato technology 383 pp. Wageningen Pers, Wageningen. The Netherlands.

Kalsiumlannoitus sekä perunantyyvi- ja märkämätä

Kristian Forsman¹⁾, Elina Virtanen¹⁾, Mari J. Lehtonen¹⁾ ja Lauri Jauhiainen²⁾

1)MTT (Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus), Pohjois-Pohjanmaan tutkimusasema, 92400 Ruukki, kristian.forsman@mtt.fi, elina.virtanen@mtt.fi, mari.lehtonen@mtt.fi

2)MTT (Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus), Tietopalvelut, 31600 Jokioinen, lauri.jauhiainen@mtt.fi

Tiivistelmä

Kalsiumin avulla on kyetty parantamaan perunan mukulan vastustuskykyä *Erwinia*-bakteereiden aiheuttamaa mätänemistä vastaan. Tässä selvityksessä on tarkasteltu kalsiumsulfaatin (CaSO₄) vaikutusta perunan *Erwinia*-saastuntaan MTT:n Pohjois-Pohjanmaan tutkimusaseman kenttäkokeisiin perustuen. Aineisto koostuu yhdestätoista vuosina 1998-2000 suoritetusta perunan kalsiumlannoituskokeesta sekä kahdeksalla lajikkeella toteutetuista jälkivaikutuskokeista vuosilta 1999-2001.

Eri lajikkeilla ja eri koepaikoilla järjestetyissä lannoituskokeissa keskimääräisellä 140 kilon kalsiumlisällä hehtaarille saatiin mukulan kalsiumpitoisuus nousemaan keskimäärin 23 % (p<0,001). Bakterimätäisen sadon osuus pieni samalla 0,8 %-yksiköllä siten, että sekä bakterimätäisyyden esiintymistiheys että esiintymisen voimakkuus osuutena kokonaissadosta pienenevät. Vähennys ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkitsevä (p=0,12). Jälkivaikutuskokeissa ei merkittävää eroa ollut bakterimätäisyyden suhteen, vaikka kalsiumlannoitetuissa koejäsenissä mukuloiden kalsiumpitoisuus nousikin lannoittamattomia korkeammaksi.

Avainsanat: kasvinsuojelu, kasvitaudit, peruna, mukula, ravinnepitoisuus, kalsium, kalsiumsulfaatti, tyvimätä, märkämätä

Johdanto

Kalsiumin kyky lisätä perunanmukuloiden vastustuskykyä *Erwinia*-bakteereiden aiheuttamaa mätänemistä vastaan on ollut merkittävä eri lajikkeiden luontaisesti erilaista märkämädän kestävyyttä selittävä tekijä (Lowe & Pérombelon 1983, Pagel & Heitefuss 1987, 1989, Tzeng ym. 1990, Mehta ym. 1997). Kestävyys on lisääntynyt myös kun mukulan kalsiumpitoisuutta on keinotekoisesti nostettu (McGuire & Kelman 1984, 1986, Bain & Pérombelon 1985, Kelman ym. 1989, Lambert & Manzer 1991, Bartz ym. 1992, Bain ym. 1996). Perunalla lieneekin kalsiumvälitteisiä puolustusmekanismeja *Erwinia*-bakteereita vastaan. Perunan taudin- ja varastointikestävyys pystytään vaikuttamaan mikäli viljelytekniisin tai muilla menetelmillä pystytään nostamaan mukulan Ca-pitoisuutta.

Kalsiumpitoisuuden ja taudinkestävyysriippuvuus ei ole ollut tutkimuksissa aina johdonmukaista. Kenttäkokeiden vaihtelevat tulokset voidaan usein selittää mukulan vajavaisella kyvyllä kerryttää itseensä kalsiumia (Palta

1996), mutta on selvää, että tyvi- ja märkämädän puhkeamiseen vaikuttaa myös muita, kalsiumia merkittävämpiä tekijöitä (Pérombelon 1992, 2002).

Kalsiumin spesifinen vaikutus *Erwinia*-bakteereita vastaan liittyy sen rooliin solunseinän vahvistajana. Solukossa kalsium linkittää erityisesti soluseinien keskilamelleissa olevia pektiinin polygalakturonihappoketjuja. Soluseinien korkea kalsiumpeptaattipitoisuus hidastaa *Erwinia*-bakteereiden entsymaattista solukonhajotusta ja etenkin peptaattilyaasien toimintaa (McGuire & Kelman 1986, Kelman ym. 1989). Liukoinen kalsium puolestaan ehkäisee polygalakturonaasin toimintaa, mutta lisää peptaattilyaasiaktiivisuutta (Pagel & Heitefuss 1990, Flego ym. 1997). Entsyymeistä polygalakturonaasilla on infektion alkuvaiheessa määräävä rooli mädätyksessä, joten Ca^{2+} :n aikaansaama viive antaa isäntäkasville aikaa aloittaa puolustusreaktiot (Pagel & Heitefuss 1990). Mahdollisesti myös kalsiumin kyky vakauttaa solukalvojen rakennetta tekee kudoksista vahvempia *Erwinia*-bakteereiden hajotustoimintaa vastaan (McGuire & Kelman 1986).

Lowen ja Pérombelonin (1983) lajikevertailussa 19 lajikkeella kahdessa ei havaittu selvää mukulan kalsiumpitoisuuden yhteyttä märkämätkestävyyteen. Myöhemmässä kokeessa (Bain & Pérombelon 1985) 31 lajikkeella korkea Ca-pitoisuus ei vähentänyt Eca-bakteerin aiheuttamia mätänemisoireita. Mehta ym. (1997) havaitsivat 18 lajikkeen kokeessa mätänemisen olevan vähäisempää ($r=-0,47$) mukulan kuoren Ca-pitoisuuden ollessa keskimääräistä korkeampi. Sama ilmiö oli nähtävissä myös mallon Ca-pitoisuuden kanssa ($r=-0,31$), muttei enää tilastollisesti merkitsevä. Kalsiumin lisäksi myös muut kuiva-aineen ominaisuudet vaikuttavat mätänemisherkkyyteen.

Pagelin ja Heitefussin (1987, 1989) tutkimuksessa lajikkeet (14 kpl) voitiin Ca-pitoisuuden avulla jaotella Eca-bakteerin mädätyskykyä kuvaaviin ryhmiin, mutta mm. soluseinän määrä osoittautui paremmaksi mätänemiskestävyyttä kuvaavaksi tunnusluvuksi. Tzengin ym. (1990) tulosten mukaan 14 lajikkeen mukuloiden Ca-pitoisuus, samoin kuin kuiva-ainepitoisuus, osoittivat vain karkeasti märkämätkestävyyttä Eca-bakteeria vastaan. Vasta näiden yhdistelmä, kalsiumpitoisuus tuorepainossa, antoi oikeansuuntaisen kuvan lajike-eroista. Myös muissa tutkimuksissa on todettu kuiva-ainepitoisuuden merkitys kestävyyttä aikaansaavana tekijänä (Biehn ym. 1972, Sellam ym. 1980).

Selkeimmät tulokset kalsiumpitoisuuden ja *Erwinia*-mädän riippuvuudesta ovat saavuttaneet McGuire ja Kelman (1984, 1986). Heidän kokeissaan korkeakalsiumiset mukulat ovat olleet johdonmukaisesti kestävämpiä märkämättä (Eca, Ecc) vastaan kuin alhaisemman Ca-pitoisuuden omaavat mukulat. He käsitelivät perunanmukuloita eri vahvuisissa kalsiumnitraattiliuoksissa ja aikaansivat laajan skaalan erilaisia mukulan Ca-pitoisuuksia. Mädätystesteissä näiden mukuloiden Ca-pitoisuuden ja märkämädän ankaruuden väliseksi korrelaatioksi muodostui peräti $r=-0,988$. Kenttäkokeissa eri kalsiumlannoitustasoilla heidän onnistui aikaansaada mallon Ca-pitoisuudet, joissa vaihtelu oli 0,11-0,62 grammaa kilossa kuiva-ainetta ensimmäisenä vuonna ja

0,20-0,46 g kg⁻¹ toisena vuonna. Märkämädän ankaruus pieneni kalsiumpitoisuuden nousun myötä noin puoleen kumpanakin vuonna. Ca-pitoisuuden ja märkämätäkkestävyyden korrelaatio oli 0,95 ensimmäisenä ja 0,88 toisena vuonna. Lähes yhtä hyvään korrelaatioon (r=0,80) pääsivät Lambert ja Manzer (1991), jotka onnistuivat nostamaan mukulan Ca-pitoisuutta lähtötasosta (0,07 g kg⁻¹ ka) 0,13 grammaan kilossa. Ecc-vioitus väheni tällöin 23 %.

Muissa kokeissa riippuvuussuhde on ollut huonompi. Bartz ym. (1992) ja Locascio ym. (1992) onnistuivat nostamaan mukulan Ca-pitoisuutta kalsiumsulfaattilla vain yhtenä vuonna kolmesta. Tällöin märkämätäkkestävyys Ecc-bakteeria vastaan lisääntyi, mutta vaikutus vioituksen ankaruuden pienemisenä oli vain 8 %. Muina vuosina Ca-lannoitus saattoi lisätä vioituksia. Cotter ja Cullis (1992) puolestaan saivat kipsilannoituksella mukulan Ca-pitoisuudet nousemaan, mutta kalsiumpitoisuuden ja *E. chrysanthemin* aiheuttaman märkämätäkkestävyyden välillä ei todettu yhteyttä, vaikka Ca-lannoitus kokonaisuudessaan lisäsi kestävyyttä. Bainin ym. (1996) tutkimuksessa peruna lannoitettiin erittäin suurella kipsimäärällä (noin 27 t ha⁻¹), vaikka koekentällä maan Ca-pitoisuuden lähtötaso oli korkea (2800 mg l⁻¹). He seurasivat lannoituksen vaikutusta siemenmukulan mätänemiseen, *Erwinia*-bakteereiden etenemistä tytärmukuloihin sekä tyvimätäoireiden kehittymistä varsissa. Ensimmäisenä vuonna Ca-lannoitus hidasti siemenmukulan mädäntymistä ja tyvimädän esiintymistä varsissa noin 100 päivän ajan istutuksesta. Toisena vuonna ero lannoittamattomaan oli pienempi, mutta havaittavissa kasvukauden loppuun asti. Varsiston ja tytärmukuloiden Ca-pitoisuus yleensä nousi lannoituksen vuoksi, mutta tytärmukuloiden märkämätäkkestävyys ei aina ollut yhteydessä nousun kanssa.

Aineisto ja menetelmät

MTT:n Pohjois-Pohjanmaan tutkimusasemalla on tutkittu kalsiumsulfaatin (CaSO₄) käyttöä perunan kalsiumlannoitteena vuodesta 1998. Tämän tutkimuksen tarkoituksena on selvittää lannoituksen ja *Erwinia*-saastunnan yhteyttä näissä kenttäkokeissa. Tähän selvitykseen on koottu tulokset 11:sta vuosina 1998-2000 toteutetusta kokeesta, joissa lannoitteena käytettiin hajalevitettyä kalsiumsulfaattia (tuotenimi Kalsiumravinne, markkinointi Kemira GrowHow Oy). Lisäksi kolmessa kokeessa vuosina 1999-2001 seurattiin Ca-lannoituksen jälkivaikutusta.

Vuonna 1998 perustettiin kolme kenttäkoetta kukin eri lajikkeella (Taulukko 1). Koeasetelmana oli osaruutukoe kolmella toistolla, jossa kalsiumsulfaattilannoitus oli pääruututekijänä. Osaruututekijöinä oli kahdella koepaikalla viisi ja yhdellä koepaikalla kuusi erilaista lannoitusvaihtoehtoa. Vuonna 1999 samantyyppiset kokeet perustettiin neljälle koepaikalle (Adora, Matilda, Bintje, Tanu) osaruututekijöiden määrän ollessa seitsemän, ja vuonna 2000 kokeita oli yksi kappale (Tanu) neljällä osaruututekijällä. Fambo-kokeessa 1999 tutkittiin penkin tiivistämisen vaikutusta perunan kalsiumottoon. Vuo-

den 2000 kokeista Adora-kokeessa tutkittiin Mg-lisää kalsiumin kanssa ja Victoria-kokeessa tutkittiin tiikkukastelun ja Ca-lannoituksen yhdistämistä.

Ca-lannoituksen jälkivaikutuksen selvittämiseksi säästettiin pääruututason kontrolliruutujen sato seuraavan kasvukauden siemenperunaksi. Vuoden 1999 jälkivaikutuskokeessa mukana olivat kaikki vuoden 1998 lajikkeet. Vuonna 2000 lajikkeina olivat Adora, Matilda, Bintje ja Tanu, ja vuonna 2001 Tanu. Jälkivaikutuskokeissa oli kolme toistoa, mutta vuoden 2001 tulokset sisältävät vain kaksi toistoa tulvavahingon vuoksi.

Kokeet hoidettiin ja havainnoitiin virallisen lajikekoeohjeistuksen mukaisesti (Mäkelä 2002). Ulkoisen laadun arvostelussa otetaan noin viiden kilon näyte 35-70 mm sadosta, jonka jälkeen terveet ja vioittuneet mukulat erotellaan vioitustyypeittäin. Vioittuneet mukulat punnitaan ja vioitustyyppin määrä (mm. bakteerimädät) ilmoitetaan painoprosenttina näytteen kokonaispainosta. Ulkoisen laadun havainnointi on koejäsenkohtainen. Lannoituskokeiden havaintomäärä oli yhteensä 116 kpl ja jälkivaikutuskokeiden 16 kpl. Mukulan ravinnepitoisuudet määritettiin myös kokoomänäytteinä, mutta vuodesta 2000 lähtien ruutukohtaisista näytteistä.

Tilastolliset analyysit tehtiin pääasiassa SAS/MIXED-ohjelmalla käyttäen koeasetelman mukaista varianssianalyysimallia. Yksittäinen koe sisälsi osasta tutkittavista ominaisuuksista, kuten bakteerimädästä, niin vähän informaatiota, että ne analysoitiin koesarjakohtaisesti. Koesarjat analysoitiin huomioimalla myös koetekijä, jolloin malli otti huomioon mm. kokeiden väliset tasoerot ja havaintojen väliset riippuvuudet (Littell ym. 1996). Kun analysoitava ominaisuus (mm. mukulan Ca-pitoisuus) ei ollut varianssianalyysin edellyttämällä tavalla normaalisti jakautunut, tehtiin aineistoon normalisoiva muutos. Kun koesarjan kokeissa oli eri käsittelyt, laskettiin koekohtaisesti Ca-vaikutus, ja näitä vaikutuksia testattiin yhden otoksen t-testillä tai merkkitestillä riippuen siitä oliko tutkittava ominaisuus normaalijakautunut vai ei.

Tulokset

Keskimäärin sadon kalsiumpitoisuus nousi lannoituksen ansiosta joka kokeessa (Taulukko 1). Yhdessäkään yksittäisessä kokeessa vuoden 2000 Tanua lukuunottamatta nousu ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkitsevä. Kaikkien kokeiden keskiarvona mukulan Ca-pitoisuus nousi 23 % ja nousu oli myös tilastollisesti merkitsevä ($p < 0,001$).

Bakteerivioitusten määrä sadossa oli suurimmillaan vuonna 1998 ja pienimmillään vuonna 2000 (Taulukko 1). Vioituksen määrä oli enemmän suhteessa muihin tekijöihin kuin mukulan kuiva-aineen Ca-pitoisuuteen, sillä vuonna 2000 Ca-pitoisuudet olivat pienimmät. Yleisesti Ca-lannoitetuissa satomukuloissa oli vähemmän märkämätää kuin lannoittamattomissa, mutta täysin johdonmukainen ilmiö ei ollut, sillä joskus suhde oli päinvastainen. Useimmiten havaintonäytteissä ei ollut bakteerimätäisiä mukuloita. Lannoittamattomissa havaintonäytteissä noin joka kolmas sisälsi mädäntyneitä mukuloita,

kun niitä Ca-lannoitetuissa havaintonäytteissä esiintyi vajaalla viidenneksellä (= saastunnan esiintymistiheys, Taulukko 1). Lannoituksen ansiosta myös bakteerimätävioitusten osuus kokonaissadosta pieneni. Kun havaintonäyte

Taulukko 1. Kalsiumsulfaattilannoituksen vaikutus mukulan kalsiumpitoisuuteen ja ja sadon bakteerimätäisyyteen eri koepaikoilla.

Vuosi	Lajike / Koepaikka	Lannoitus kg Ca ha ⁻¹	Ca-pitoisuus g kg ⁻¹ ka		Bakteerim. % sadosta		
			Ca+	Ca-	Ca+	Ca-	
1998	Matilda	126	0,32	0,30	0,8	1,7	
	Vital	126	0,38	0,33	0,7	3,7	
	Tanu	126	0,25	0,18	0,6	0,5	
1999	Adora	168	0,30	0,27	0,1	1,0	
	Matilda	168	0,51	0,46	0,5	0	
	Bintje	168	0,31	0,25	0,4	0,2	
	Tanu	168	0,28	0,24	0,2	0,3	
	Fambo	105	0,35	0,23	0	3,2	
2000	Tanu	126	0,28	0,16	0	0	
	Adora	126	0,27	0,24	0	0,6	Ero
	Victoria	126	0,22	0,16	0	0,6	Ca+/Ca-
Keskim.		140	0,31	0,26	0,3	1,1	-73 %
Saastunnan esiintymistiheys (% havainnoista)					17	31	-44 %
Saastunnan voimakkuus (% kokonaissadosta)					1,9	3,0	-38 %

Taulukko 2. Kalsiumsulfaattilannoituksen jälkivaikutus eri vuosina mukulan kalsiumpitoisuuteen ja sadon bakteerimätäisyyteen.

Vuosi	Koejäsen	Ca-pitoisuus g kg ⁻¹ ka		Bakteerim. % sadosta			
		Ca+	Ca-	Ca+	Ca-		
1999	Tanu	0,20	0,10	0	0		
	Matilda	0,21	0,15	0	0		
	Vital	0,18	0,14	0	5,7		
2000	Adora	0,31	0,23	0	6,4		
	Bintje	0,21	0,18	2,2	3,3		
	Tanu	0,17	0,14	2,1	1,8		
	Matilda	0,31	0,26	1,7	0	Ero	
2001	Tanu	0,22	0,21	3,0	0	Ca+/Ca-	
keskim.		0,22	0,18	1,1	2,1	-48 %	
Saastunnan esiintymistiheys (% havainnoista)					50	50	±0 %
Saastunnan voimakkuus (% kokonaissadosta)					2,2	4,3	-48 %

sisälsi bakteerimädän vioittamia mukuloita, oli vioittuneiden mukuloiden osuus kokonaisnäytteen painosta keskimäärin 3,0 % kun sama lannoitetuissa havaintonäytteissä oli 1,9 % (= saastunnan voimakkuus, Taulukko 1). Kun sekä taudin esiintymistiheys että voimakkuus pienenevät, bakteerimätäisten osuus kokonaissadosta laskee keskimäärin 1,1 prosentista 0,3 prosenttiin. Ero ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkitsevä ($p=0,12$).

Jälkivaikutuskokeiden perusteella siemenperunan lannoittaminen kalsiumsulfaattilla nostaa vielä seuraavankin vuoden sadon kalsiumpitoisuutta (Taulukko 2). Ero oli tilastollisesti merkitsevä vuonna 2000 (+23 %). Keskimäärin kalsiumlannoitetun taustan omaavasta siemenestä kasvatettu sato sisälsi vähemmän bakteerimätäisiä mukuloita kuin lannoittamattoman taustan omaavista siemenmukuloista kasvatetut koejäsenet (Taulukko 2). Tämä on seurausta saastunnan voimakkuutena laskettavan bakteerimätäisyyden vähenemisestä. Bakteerimätäisen sato-osuuden pieneneminen jälkivaikutuskokeissa ei kuitenkaan koejäsenittäin ole kovin johdonmukaista. Lisäksi otos perustuu huomattavan pieneen havaintomäärään, joten johtopäätösten teko näiden kokeiden pohjalta on mahdotonta.

Tulosten tarkastelu

Kalsiumsulfaattilannoituksella, jonka avulla saatiin mukulan kalsiumpitoisuutta nostettua keskimäärin 23 %, pystyttiin vähentämään bakteerimätäisen sadon osuutta peräti 73 %. Vähennysprosentti nousi suureksi siksi, että sekä saastunnan esiintymistiheys että saastunnan voimakkuus laskivat kumpikin noin 40 %. Ero ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkitsevä ($p=0,12$), eikä aina johdonmukainenkaan. Tuloksia voidaan kuitenkin pitää suuntaantavina, sillä niitä vahvistavat kirjallisuudesta saadut tiedot.

Kalsiumlannoituksen vaikutus tyvimätään on huomattavasti monitahoisempi kysymys kuin mitä bakteerimätäisen sadon osuudesta voi päätellä. Periaatteessa ei ole edes varmaa, onko kyseessä Eca-vioitus, sillä myös muut bakteerit, kuten *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Pseudomonas* spp., mädättävät mukuloita. Pérombelonin (2002) mukaan kuitenkin *Erwinioiden* rooli on mukulan mätänemisprosessissa ratkaiseva. Mukulan mätänemisherkyydestä ei myöskään voi välttämättä tehdä suoraan johtopäätöksiä tyvimädän esiintymiseen tai herkkyyteen sen vuoksi, että kaikilla lajikkeilla mukula- ja veroskestävyyden välillä ei ole yhteyttä (Pérombelon 2002).

Tyvimätä on piilevä tauti, jonka puhkeaminen oireiksi on toisaalta riippuvainen siemenmukulassa olevien patogeenien määrästä ja toisaalta sääoloista (Pérombelon 1992, 2002). Vaikka kalsiumlannoitus näyttääkin parantavan perunan puolustusmekanismeja, mikä tarkoittanee bakteeripopulaation monistumisen hidastumista kasvisolukossa, viime kädessä ulkoiset olosuhteet määräävät kuinka suureksi taudin esiintymistiheys muodostuu. Mitä vähemmän siemenmukulassa on tautibakteereita, sitä todennäköisemmin seurauksena on lievempi saastuminen (Bain ym. 1990). Ca-lannoituksella pystyttäneen siten vähentämään tyvimädän esiintymistä niin seuraavan vuoden sadossa

kuin Bainin ym. (1996) mukaan myös jo jossain määrin lannoitusvuonna. Kummastakaan ilmiöstä ei tosin ollut tässä koesarjassa muita merkkejä kuin jälkivaikutusvuoden saastunnan voimakkuuden väheneminen. Jälkivaikutusvuoden tulokset ovat kuitenkin niin ristiriitaiset ja perustuvat niin pieneen havaintomäärään, ettei niiden perusteella voi tehdä johtopäätöksiä.

Tulosten perusteella kalsiumlannoituksesta on hyötyä. Sadon bakteerimätäisyyden väheneminen parantaa sadon käyttölaatua, käsiteltävyyttä ja varastointikestävyyttä. Tunnuslukuna sadon bakteerimätäisyys ei kuitenkaan anna vastausta siemenperunantuottajan kannalta merkityksellisimpään kysymykseen: Kuinka paljon siemenperunan käyttöarvo nousee parantuneena tyvimätäkestävyytenä kalsiumlannoituksen ansiosta? Sen selvittäminen vaatii kokeita, joissa ei ainoastaan seurata mädän ilmenemistä, vaan otetaan huomioon myös mukulassa piilevänä oleva tyvimätä.

Kirjallisuus

- Bain, R.A., Millard, P. & Pérombelon, M.C.M. 1996. The resistance of potato plants to *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in relation to their calcium and magnesium content. *Potato Research* 39:185-193.
- Bain, R.A. & Pérombelon, M.C.M. 1985. The relationship between tuber calcium level and resistance to *Erwinia carotovora*. *Scottish Crop Research Institute. Annual report 1984.* s. 112-113.
- Bain, R.A., Pérombelon, M.C.M., Tsrer, L. & Nachmias, A. 1990. Blackleg development and tuber yield in relation to numbers of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on seed potatoes. *Plant Pathology* 39:125-133.
- Bartz, J.A., Locascio, S.J. & Weingartner, D.P. 1992. Calcium and potassium fertilization of potatoes grown in North Florida. II. Effect on the bacterial soft rot potential in the tubers. *American Potato Journal* 69:39-50.
- Biehn, W.L., Sands, D.C. & Hankin, L. 1972. Relationship between percent dry matter content on potato tubers and susceptibility to bacterial soft rot. *Phytopathology* 62:747.
- Cother, E.J. & Cullis, B.R. 1992. The influence of tuber position on periderm calcium content and its relationship to soft rot susceptibility. *Potato Research* 35:271-277.
- Flego, D., Pirhonen, M., Saarilahti, H., Palva, T.K. & Palva, T. 1997. Control of virulence gene expression by plant calcium in the phytopathogen *Erwinia carotovora*. *Molecular Microbiology* 25:831-838.
- Kelman, A., McGuire, R.G. & Tzeng, K.-C. 1989. Reducing the severity of bacterial soft rot by increasing the concentration of calcium in potato tubers. Teoksessa: Engelhard, A.W. (toim.). *Soilborne plant pathogens: Management of diseases with micro- and macroelements.* The American Phytopathological Society. s. 102-123.
- Lambert, D.H. & Manzer, F.E. 1991. Relationship of calcium to potato scab. *Phytopathology* 81:632-636.

- Littell, R., Milliken, G., Stroup, W. & Wolfinger, R. 1996. SAS System for Mixed Models, Cary, NC: SAS Institute Inc. 633 s.
- Locascio, S.J., Bartz, J.A. & Weingartner, D.P. 1992. Calcium and potassium fertilization of potatoes grown in North Florida. I. Effects on potato yield and tissue Ca and K concentrations. *American Potato Journal* 69:95-104.
- Lowe, R. & Pérombelon, M.C.M. 1983. Diseases of potato tubers. Susceptibility of tubers to infection by *E. carotovora*. Scottish Crop Research Institute. Annual report 1982. s. 112.
- McGuire, R.G. & Kelman, A. 1984. Reduced severity of *Erwinia* soft rot in potato tubers with calcium content. *Phytopathology* 74:1250-1256.
- McGuire, R.G. & Kelman, A. 1986. Calcium in potato tuber cell walls in relation to tissue maceration by *Erwinia carotovora* pv. *atroseptica*. *Phytopathology* 76:401-406.
- Mehta, A., Trehan, S.P. & Kaul, H.N. 1997. Calcium content in potato tuber in relation to keeping quality. *Agricultural Science Digest* 17:165-168.
- Mäkelä, L. 2001. Virallisten lajikekokeiden suoritusohjeet. Peruna. Saatavissa internetistä: <http://www.mtt.fi/atu/epo/lajikekoe/koeohje.html>.
- Pagel, W. & Heitefuss, R. 1987. Investigations on the role of calcium and some cell wall properties for the susceptibility of potato cultivars against *Erwinia carotovora*. Abstracts of conference papers and posters of the 10th triennial conference of the EAPR, Aalborg, Denmark, 26-31 July. s. 144-145.
- Pagel, W. & Heitefuss, R. 1989. Calcium content and cell wall polygalacturonans in potato tubers of cultivars with different susceptibilities to *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 35:11-21.
- Pagel, W. & Heitefuss, R. 1990. Enzyme activities in soft rot pathogenesis of potato tubers: Effects of calcium, pH, and degree of pectin esterification on the activities of polygalacturonase and pectate lyase. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 37:9-25.
- Palta, J.P. 1996. Role of calcium in plant responses to stresses: Linking basic research to the solution of practical problems. *HortScience* 31:51-57.
- Pérombelon, M.C.M. 1992. Potato blackleg: Epidemiology, host-pathogen interaction and control. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 98:135-146.
- Pérombelon, M.C.M. 2002. Potato diseases caused by soft rot *erwinias*: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology* 51:1-12.
- Sellam, M.A., Rushdi, M.H. & Abd-el-Aal, S.A. 1980. Relation of chemical composition of certain potato varieties to their susceptibility to bacterial soft rot. *Egyptian Journal of Phytopathology* 12:137-143.
- Tzeng, K.-C., McGuire, R.G. & Kelman, A. 1990. Resistance of tubers from different potato cultivars to soft rot caused by *E. carotovora* subsp. *atroseptica*. *American Potato Journal* 67:287-305.

Maa- ja elintarviketalous –sarjan kasvintuotantoteemassa ilmestyneitä julkaisuja

- 41 Perunantyyvi- ja märkämädän epidemiologia, diagnostiikka ja hallintakeinot. *Hannukkala, A. & Segerstedt, M. (toim.)*. 58 s. Hinta 20 euroa.
- 37 Adaptogeenikasvien viljelytutkimus ja käyttö Suomessa. Ruusujuuri-seminaari, Mikkeli, 18.6.2002. *Galambosi, B. (toim.)*. 106 s. Hinta 25 euroa.
- 26 Luomumansikan viljelytekniikka ja kasvinsuojelu. Kirjallisuusselvitys. *Prokkola ym.* 160 s. (verkkojulkaisu osoitteessa: www.mtt.fi/met/pdf/met26.pdf).
- 17 Uhanalaisten lääkekasvien markkinat ja viljely: Kirjallisuusselvitys. *Galambosi, B. & Jokela, K.* 88 s. (verkkojulkaisu osoitteessa: <http://www.mtt.fi/met/pdf/met17.pdf>).
- 15 Lietelannan käyttö nurmikierrossa. *Mattila, P. (toim.)*. 80 s. Hinta 20 euroa.
- 9 Kestorikkakasvit kevätiljantuotannon uhkana. *Lötjönen, T. ym.* 115 s. Hinta 25 euroa.
- 3 Uuden perunaruton epidemiologia ja kemiallinen torjunta. *Kurppa, A. & Segerstedt, M. (toim.)*. 66 s. Hinta 20 euroa.
- 1 Ruokohelven viljely ja korjuu energian tuotantoa varten. *Pahkala, K. ym.* 20 s. Hinta 15 euroa.

Julkaisuviitteet löytyvät sarjojen internetsivuilta
www.mtt.fi/julkaisut/sarjathaku.html.

