

Maan kuorirokkopaineen määrittämisestä apua taudinhallintaan

Minna Haapalainen & Lea Hiltunen

Kuorirokko on perunan tauti, joka laatuviotusten lisäksi voi aiheuttaa myös satotappioita. Taudin epidemiologia Suomen oloissa on huonosti tunnettu eikä sille ole tehokkaita torjuntakeinoja. Tautia aiheuttava maalevintäinen *Spongospora*-mikrobi säilyy maassa jopa kymmeniä vuosia. Mikrobin määrän eli tautipaineen määrittäminen maasta on tärkeää taudin ennakoinnin ja hallinnan kannalta. Kuorirokko kuriin -hankkeessa selvitettiin erilaisia menetelmiä, joita on käytetty kuorirokkopaineen määrittämiseen sekä vertailtiin uusien DNA-pohjaisten menetelmien soveltuvuutta maanäytteen tutkimiseen.

Maalevintäinen tauti

Perunan kuorirokkoa aiheuttaa *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*, joka on alkueliöihin kuuluva kasvipatogeeni. Sen tartuttamissa perunoissa voi esiintyä kolmenlaisia oireita: mukuloiden kuorirokkoa (Kuva 1), juuriäkämiä ja sadon alenemiseen johtavaa

juurten toiminnan häiriintymistä. Lisäksi *Spongospora* levittää itiöidensä mukana perunan maltokaarivirusta. *Spongospora* lisääntyy kasvien juurissa tai mukuloissa ja muodostaa itiöpalloja, jotka sisältävät satoja paksuseinäisiä kestoitiöitä. Nämä itiöpallot voivat säilyä maassa jopa vuosikymmenen ajan, ja jo viisi itiöpalloa grammassa maata voi johtaa vakaviin kuorirokko-oireisiin perunalla. Maaperän märkyys ja korkea vedenpidätyskyky suosivat parveilutiöiden leviämistä ja lisäävät kuorirokon esiintymistä. Tautioireita lisäävät erityisesti runsaat sateet kasvukauden alkupuolella, kun mukuloiden kehitys on vasta alkuvaiheessa. Kestoitiöiden runsastumista saastuneissa perunapelloissa voidaan hillitä usean vuoden viljelykierrolla. Taudinaiheuttajaa ei kuitenkaan pystytä poistamaan maasta viljelykierron avulla, joten kestoitiöiden leviäminen peltolohkolle voi johtaa pitkälliseen kampaaluun taudin oireita vastaan.

Luonnonvarakeskus, Helsingin yliopisto ja Perunantutkimuslaitos toteuttivat vuosina 2019–2021 Maa- ja metsätalousministeriön rahoittaman Kuorirokko kuriin -hankkeen, jossa



Kuva 1. Kuorirokkolaikkuja perunan mukuloissa. Kuva: Lea Hiltunen

selvitettiin kuorirokon esiintymiseen vaikuttavia tekijöitä Suomen oloissa ja etsittiin keinoja taudinhallintaan (Hiltunen ym. 2019, 2021). Yhtenä tavoitteena oli selvittää, millaisia menetelmiä on käytettävissä *Spongospora*-mikrobin määrän eli tautipaineen määrittämiseen maasta. Taudinaiheuttajan luotettava määrittäminen maasta on tärkeää, koska sen avulla on mahdollista saada lisätietoa taudin esiintymisestä ja siihen vaikuttavista tekijöistä, mikä puolestaan on edellytys uusien taudinhallintakeinojen kehittämiseksi.

Biologiset ja immunologiset määrittämenetelmät

Spongospora-mikrobin määrittämiseen maasta on kehitetty useita erilaisia menetelmiä. Mikrobin kestoitiöt aktivoituvat isäntäkasvin juurieritteiden vaikutuksesta, ja uintisiimalliset parveiluitiöt löytävät juuriin niistä erittyvien yhdisteiden houkuttelemisella. Tähän ilmiöön perustuu kestoitiöiden testaaminen maanäytteistä syöttikasvien, yleensä tomaatin taimien, avulla. Syöttikasvien juurista määritetään *Spongosporan* määrä joko mikroskoipoimalla tai DNA-

pohjaisella menetelmällä. Syöttikasvien juuri-infektioiden perusteella voidaan arvioida maan tautipainetta. Vaikka syöttikasvimenetelmä on hidas ja työläs, se antaa melko hyvän kuvan elinkykyisten kestoitiöiden määrästä maassa. Tartunnan saaneiden taimien juuriin voi kehittyä myöhemmin myös äkämia. Testikasvien juuritartuntojen ja äkämien määrä, samoin kuin perunoiden juuriäkämien määrä, kuitenkin korreloivat huonosti mukuloiden kuorirokko-oireiden kanssa.

Immunologiset määrittämenetelmät perustuvat taudinaiheuttajan molekyyliarakenteiden tunnistamiseen vasta-aineiden avulla. Ensin immunologinen ELISA-menetelmä kehitettiin *Spongosporan* kestoitiöiden toteamiseksi perunan mukuloiden pinnalta ja sen pohjalta kehitettiin menetelmä myös maanäytteiden tutkimiseen. ELISA-menetelmillä voidaan todeta itiöpallomäärät, jotka ovat vähintään 100 kpl grammassa maata. Immunologinen määrittämenetelmä on kvantitatiivinen, mutta koska se antaa positiivisen tuloksen myös kuolleilla itiöpalloilla, tulos voi jonkin verran liioitella maan tautipainetta. Määrittäseen tarvittavat *Spongospora*-vasta-aineet ovat kaupallisesti saatavilla.

PCR:n käyttö kuorirokon määrittäksessä

Ensimmäiset *Spongosporan* määrittäykseen kehitetyt polymerase chain reaction eli PCR-menetelmät julkaistiin 1990-luvun lopulla. Nämä menetelmät perustuvat *Spongospora*-mikrobille spesifisen DNA:n monistamiseen. PCR on herkkyydeltään immunologisia menetelmiä parempi ja positiivisen tuloksen saamiseen riittää maaperänäytteissä n. 5 itiöpalloa grammassa maata.

Uudempaa reaaliaikaista kvantitatiivista PCR:ää (qPCR) hyödyntävissä diagnostiikkamenetelmissä käytetään fluoresoivalla merkkiaineella leimattua koetinta, joka sitoutuu kohde-DNA:han. PCR-reaktion aikana koetin hajoaa, ja vapautuneen merkkiaineen emittoima fluoresenssi mitataan. Koettimen käytöllä varmistetaan, että mahdolliset epäspesifiset monistustuotteet eivät anna vääriä positiivisia tuloksia. Reaaliaikaisen qPCR:n etuna tavalliseen PCR:ään verrattuna on määrittäksen kvantitatiivisuus sekä usein myös alempi detektoraja ja vähäisempi häiriöherkkyys. Toisaalta määrittä vaatii qPCR-laitteen, jota ei kaikissa laboratorioissa ole, ja tarvikkeet ja reagenssit ovat myös jonkin verran hintavampia kuin tavalliseen PCR:ään tarvittavat. Ensimmäinen reaaliaikaista qPCR:ää hyödyntävä kuorirokon

määritysmenetelmä julkaistiin 2003 ja se soveltuu määrytyksiin sekä maa- että kasvinäytteistä. Menetelmällä voitiin luotettavasti määrittää positiivisiksi näytteet, joihin oli lisätty vain yksi itiöpallogrammaan maata.

Kaikkien PCR:ään perustuvien määritysmenetelmien toimivuus edellyttää riittävän puhtaiden ja tasalaatuisten DNA-näytteiden valmistamista tutkittavasta materiaalista. Maanäytteet täytyy ensin homogenoida tarkoitukseen sopivalla laitteella, minkä jälkeen DNA eristetään ja puhdistetaan joko perinteisin uutto- ja saostusmenetelmin tai tarkoitukseen kehitettyjen reagenssipakkausten ohjeiden mukaisesti.

Määritysmenetelmien testaus

Uusimpien kuorirokon määrytykseen kehitettyjen reaaliaikaisten kvantitatiivisten PCR-menetelmien (Maldonado ym., 2013; Qu ym., 2011) soveltuvuutta pelto- maanäytteille tutkittiin kokeellisesti. *Spongosporan* itiöpalloista eristetyn DNA:n pitoisuus määritettiin spektrofotometrisesti ja DNA:sta valmistettiin laimennosarja, jota käytettiin PCR-menetelmien testaukseen ja vertailuun. Molemmilla menetelmillä saavutettiin hyvä määrytysherkkyys, ja vasteen lineaarisuus puhtaan

Spongospora-DNA:n eri laimennoksilla oli erittäin hyvä.

Näiden PCR-menetelmien toimivuutta maanäytteiden testaamisessa tutkittiin lisäämällä puhtaisiin hietamaanäytteisiin eri määriä (1–104) *Spongosporan* itiöpalloja. DNA:n eristyksessä kokeiltiin rinnakkain kahta erilaista kaupallista reagenssipakkausta (NucleoSpin Soil kit ja E.Z.N.A. Soil DNA kit). Näytteet homogenisoitiin, minkä jälkeen DNA:n eristys suoritettiin kunkin reagenssipakkauksen ohjeiden mukaisesti. Saadun DNA:n pitoisuus ja puhtaus määritettiin spektrofotometrisesti. Eri menetelmillä eristettyjen DNA-näytteiden välillä ei ollut merkitsevää eroa puhtautta ilmaisevassa absorbanssisuhteessa (A260/A280), mutta DNA:n pitoisuudessa oli merkitsevä ero E.Z.N.A.-menetelmän hyväksi.

Kuhunkin PCR-reaktioon lisättiin sama määrä (25 ng) näyte-DNA:ta. Sen maanäytteen, johon oli lisätty yksi itiöpallo, DNA-näytettä vielä laimennettiin puhtaan maanäytteen DNA:lla suhteessa 1/10 ja 1/100. Testatuilla menetelmillä saavutettiin herkkyys, jolla voitiin todeta positiiviseksi laimennos, joka vastasi n. 0,2 itiöpalloa grammassa maanäytettä.

Tämän vertailun perusteella suositeltavin menetelmien yhdistelmä, käytetyn työajan

huomioon ottaen, oli DNA:n eristäminen NucleoSpin Soil -kitillä ja reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR Maldonadon ym. (2013) mukaan. Ero qPCR-menetelmien välillä ei kuitenkaan ollut suuri, joten jos *Spongospora*-DNA:n pitoisuus ei ole aivan havaitsemisrajan tuntumassa, niin molemmat testatut menetelmät ovat määrittämiseen sopivia.

Kvantitatiivisen määrittämenetelmän hyödyntäminen

Testatut kvantitatiiviset PCR-menetelmät soveltuvat sellaisenaan erinomaisesti tutkimuksen työkaluiksi. Niiden avulla voidaan luotettavasti vertailla esimerkiksi erilaisten torjuntamenetelmien tai perunalajikkeiden vaikutuksia maan tautipaineeseen.

Käytännössä menetelmiä voisi hyödyntää peltomaiden *Spongospora*-DNA:n pitoisuuden määrittämiseen ja sen perusteella peltolohkon kuorirokkoriskin arvioimiseen. Lisäksi tarvittaisiin kuitenkin tutkimusta siitä, millaiset taudinaiheuttajan määrät maassa johtavat taudin kehittymiseen Suomen oloissa. Viljelijän päätöksentekoa edesauttaisi, jos peltolohkot pystyttäisiin tautipaineen perusteella luokittelemaan eri riskitasoihin. Tällöin

peltolohkelle voitaisiin kohdentaa riskitason mukaisia toimenpiteitä, esimerkiksi viljelyyn voitaisiin valita kuorirokon kestävyydeltään sopiva lajike tai vaikeassa tapauksessa perunan viljelystä kyseisellä peltolohkolla voitaisiin luopua kokonaan.

Minna Haapalainen työskentelee tutkijana Helsingin yliopistossa ja Lea Hiltunen erikoistutkijana Luonnonvarakeskuksessa Oulussa.

Lisätietoa aiheesta

Hiltunen L., Hokka M., Holappa O. 2021. Rikkakasvit perunan kuorirokon väli-isäntinä. Tuottava Peruna 3/2021, 4–6.

Hiltunen L., Istolahti H., Valkonen J. 2019. Kuorirokko kuriin. Tuottava Peruna 2/2019, 12–13.

Maldonado M. L. H., Falloon R. E., Butler R. C., Conner A. J., and Bulman S. R. 2013. *Spongospora subterranea* root infection assessed in two potato cultivars differing in susceptibility to tuber powdery scab. *Plant Pathology* 62, 1089–1096. <https://doi.org/10.1111/ppa.12015>

Qu X. S., Wanner L. A., and Christ B. J. 2011. Multiplex real-time PCR (TaqMan) assay for the simultaneous detection and discrimination of potato powdery and common scab diseases and pathogens. *Journal of Applied Microbiology* 110, 769–777.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04930.x>