

## Mansikan mustalaikun aiheuttaja *Colletotrichum acutatum* säilyy kasvinjätteissä

Päivi Parikka, Eila Pääskynkivi, ja Anne Lemmetty.

MTT kasvinsuojelu, 31600 Jokioinen

paivi.parikka@mtt.fi, anne.lemmetty@mtt.fi

Mansikan mustalaikku (*Colletotrichum acutatum*) löytyi ensimmäisen kerran Suomesta vuonna 2000 Hollannista tuoduista mansikan taimista. Koska kyseessä on karanteenituhooja, sen leviämisen estämiseksi viranomaiset asettivat mansikan avomaaviljelyyn kolmen vuoden karanteenin saastuneille lohkoille. Taudinaiheuttajan säilymisestä Suomen ilmasto-oloissa ei silloin ollut vielä tutkittua tietoa.

Mustalaikun aiheuttajan säilymistä mansikan kasvinjätteissä selvitettiin 2002-2003 MTT kasvinsuojelun tutkimuksen tiloissa Jokioisilla. Mansikan lehtiä, tyviä ja marjoja tartutettiin keinotekoisesti kasvihuoneessa *C. acutatum* –sienellä ja saastutettua kasviainesta säilytettiin muovisangoissa hiekamaahan peitettynä ja maan pinnalla yli talven. Koe tehtiin sekä ulkona että kylmillään olevassa muovihuoneessa, jossa lämpötila laski tammikuun alussa alle  $-30^{\circ}\text{C}$  useaksi vuorokaudeksi. Saastutettu kasvinjäte oli pakattu pieniin verkkopusseihin ja pusseja otettiin säilytyspaikoista keväällä ja kesällä kasvihuonetestejä varten. Taudinaiheuttajan säilyminen tartutuskykyisenä testattiin kasvihuoneessa Jonsok- ja Rita-lajikkeiden taimilla.

Mustalaikku saatiin tarttumaan testitaimiin keskikesään asti säilytetyistä, tartutetuista kasvinosista. Kasveissa todettiin mustalaikkuoireita sekä rönsyissä että lehtiruodeissa. Taudinaiheuttaja voitiin saada kasvamaan oireellisista kasvinosista ravintoalustalla ja oireettomistakin osista se todettiin PCR-diagnostiikalla. Heinäkuun lopulle asti maassa säilytetyistä kasvinosista tauti ei enää aiheuttanut mansikantaimiin näkyviä oireita. Taudinaiheuttaja voitiin kuitenkin todeta molekyylibiologisesti testikasveista otetuista lehtiruodin tyvi- ja juurakonäytteistä.

Mustalaikun säilymistä maassa ilman kasvinjätettä testattiin myös saastuneelta peltolohkolta otetuista maanäytteistä istuttamalla niihin kasvihuoneessa mansikan taimia. Maanäytteet otettiin Piikkiöstä MTT puutarhatuotannon tutkimuksen koekentältä, jossa vuonna 2002 todettiin mustalaikkua ja kasvusto hävitettiin polttamalla. Mustalaikun aiheuttaja todettiin PCR-testillä kasveista, jotka olivat kasvaneet maassa, josta sairaut kasvit oli hävitetty yli vuosi aikaisemmin polttamalla.

Tehdyn säilytyskokeen johtopäätöksenä on, että *Colletotrichum acutatum* pystyy säilymään maassa tai maan pinnalla kasvinjätteissä elinkykyisenä ainakin seuraavaan kevääseen, jopa kesään asti. Tauti voi säilyä piilevänä tartunnan saaneissa elävissä kasveissa, myös rikkakasveissa. Siksi kolmen vuoden karanteeni on tarpeen taudin leviämisen ehkäisemiseksi.

Asiasanat: *Fragaria x ananassa*, *Colletotrichum acutatum*, maa, kasvinjäte, tartunta, PCR

## Johdanto

*Colletotrichum acutatum* aiheuttaa mansikan mustalaikkutaudin oireita marjoissa, lehtiruodeissa, juurakoissa ja rönkyissä (Howard ym, 1992). Taudinaiheuttaja todettiin Suomessa ensimmäisen kerran vuonna 2000 maahantuoduissa mansikantaimissa (Parikka ja Kokkola, 2001). *C. acutatum* on määritelty karanteenituhoojaksi Euroopan Unionin alueella (Anon., 1997). Suomessa *C. acutatum*-sienen tartuttamat mansikkakasvustot hävitetään taudin leviämisen estämiseksi. Taudinaiheuttajaa ei ollut tavattu Suomessa ennen vuotta 2000, eikä sen säilymisestä talven yli suomalaisissa oloissa ollut aikaisempaa tietoa. Sienen säilymistä maassa ja kasvinjätteessä on tutkittu etelämpänä: Kaliforniassa rönkyypaloissa (Eastburn ja Gubler, 1990) ja Israelissa muumioituneissa marjoissa (Freeman ym, 2002). Pohjoisissa oloissa sienen on Ohiossa tehdyssä tutkimuksessa todettu talvehtivan muumioituneissa marjoissa (Wilson ym, 1992). *C. acutatum* voi säilyä kasveissa epifyyttisenä ja endofyyttisinä tartuntoina (Freeman ym, 2001; Leandro ym, 2001) ja useat rikkakasvilajit voivat olla taudinaiheuttajan isäntiä (Berrie ym., 2003). Sieni on eristetty selektiivialustalla vähän aikaisemmin kesannoidusta taimistomaasta, jossa on kasvanut tartunnan saaneita kasveja (Eastburn ja Gubler, 1990). Suomessa *C. acutatum* on todettu PCR menetelmällä luonnollisesti saastuneista, oireettomista kasveista (Parikka ja Lemmetty, 2004). Määrittämisessä käytettiin aikaisemmin julkaistuja (Sreenivasaprasad ym, 1996) alukkeita CaInt2 ja ITS4.

Suomessa saastuneen mansikkakasvuston hävityksen jälkeen lohkolle on määrätty kolmen vuoden karanteeniaika. Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää, kuinka kauan *C. acutatum* voi säilyä kasvinjätteessä ja maassa suomalaisissa oloissa. Tietoa tarvitaan taudin aiheuttaman riskin määrittämiseksi.

## Aineisto ja menetelmät

### *Saastutetun kasvinjätteen valmistus ja talven sääolot*

*Colletotrichum acutatum*-sienen säilymistä saastuneessa kasvinjätteessä tutkittiin talven 2002-2003 aikana keinotekoisesti saastutetuilla mansikan kasvinosilla: lehdillä, lehtiruodeilla, juurakoilla ja marjoilla. Ne oli tartutettu kasvihuoneessa ruiskuttamalla *C. acutatum*- itiösuspensiolla ja antamalla kasvinosien kuivua. Tartutettu kasviainekasvinaes jaettiin pieniin nylonverkkopusseihin, 3,5 g /pussi. Pussit asetettiin muovisankoihin, joissa oli hiekkamaata: maan pinnalle sekä peitettynä 9 ja 15 cm syvyyteen. Kuusi sangoista asetettiin ulos 25.10. 2002 ja toiset kuusi lämmittämättömään muovihuoneeseen 24.10. 2002. Ulkona sangot kaivettiin maahan, kasvihuoneessa ne jätettiin maan pinnalle.

Sää oli kylmä lokakuussa 2002 ja maa alkoi jäätyä marraskuun alussa. Ulos asetetut sangot kasvinjätteineen jäätyivät pian ja olivat talvella lumen peittämiä. Lämpötila maan pinnalla vaihteli 0°C ja -20°C välillä ennen lumen tuloa. Lämpötila nousi keväällä yli 5°C toukokuun alussa ja yli 10°C 20.5. Kasvihuoneessa lämpötilat vaihtelivat -31 - +25°C talven aikana ja keväällä ja peittämätön maa kuivui voimakkaasti.

### *Pyydyskasvitestit kasvihuoneessa*

Nylonverkkopussit poistettiin sangoista kolmessa erässä: toukokuussa, kesäkuussa ja heinäkuussa. Pusseissa talven yli ollut kasviainekasvinaes käytettiin tartuttamaan nuoria mansikantaimia kasvihuonekokeissa, jotka aloitettiin 23.5., 30.6. ja 5.8. 2003. Jonsok- ja Rita-lajikkeiden juurrutetut, 3- 4- lehtiset rönkytaimet istutettiin 0,5 l ruukkuihin turveseokseen. Talven yli säilytetty kasviainekasvinaes asetettiin kasvien vierelle turpeen pinnalle ruukkuihin. Ruutu muodostui kolmesta taimesta/ruutu, kerranteita oli kolme. Ruudut erotettiin toisistaan muoviverhoilla. Tartutuksen jälkeen ilmankosteus pidettiin 100% tasolla 24 tuntia ja sen jälkeen yökosteus oli 100% viikon verran. Lämpötila oli kokeiden aikana päivällä 24°C ja yöllä 20°C, päivänpituus 16 tuntia. Kasvit tarkastettiin mustalaikun oireiden havaitsemiseksi koejakson (5 viikkoa) kuluessa ja näyttöä lehdistä, lehtiruodeista, kukista, rönkyistä ja marjoista otettiin ravintoalustalla viljelyyn ja PCR-määrittäksiin (Parikka ja Lemmetty, 2004)

### *Colletotrichum acutatum*-sienen eristys kasveista ja PCR-määrittäminen

Koejakson lopussa oireellisia marjoja, lehtiruoteja ja rönsyjä viljeltiin perunadekstroosialustalla (20g/l, Difco Laboratories, Ranska), johon ei lisätty antibiootteja. PCR-määrittämiseen otettiin näytteitä (100 mg) lehtiruotien tyviltä ja juurakoista. Näytteet säilytettiin -20°C mikroputkissa. DNA eristys ja PCR-määrittäminen tehtiin aikaisemman kuvauksen mukaan (Parikka ja Lemmetty, 2004). PCR-määrittämistä käytettiin piilevien *C. acutatum* tartuntojen havaitsemiseen, koska niitä on vaikea todeta PDA-kasvatuksissa muiden sienten ja bakteerien takia.

### *Pyydyskasvitesti luonnollisesti saastuneesta peltomaasta*

Maanäytteitä otettiin kesäkuussa ja syyskuussa 2003 pellolta, jolta tartunnan saanut mansikkakasvusto oli hävitetty polttamalla heinäkuussa 2002. Peltolohko (hietamaa) oli kynnetty ja kylvetty apilaimoteiseoksella. Kymmenen maanäytettä kerättiin lohkolta maan pinnalta ja toiset kymmenen samoilta paikoilta 5 cm syvyydeltä. Maanäytteet sekoitettiin höyrytettyyn turpeeseen (1/1) ja seokseen istutettiin Jonsok-lajikkeen rönsyitä 0,5 l ruukkuihin 3 tainta/näyte. Kasvatusolosuhteet kasvihuoneessa olivat samat kuin kasvinjätetestauksessa. Koeaika oli 8 viikkoa. Kasveista tarkastettiin tautioireet koejakson jälkeen ja niistä otettiin näytteitä sekä PDA-viljelyyn että PCR-määrittämiseen.

## Tulokset ja tulosten tarkastelu

### *Säilyminen kasvinjätteessä*

*Colletotrichum acutatum* säilyi talven yli kasvinjätteessä sekä maan pinnalla että maalla peitettynä. Jätteestä käsin sieni pystyi tartuttamaan ja aiheuttamaan oireita mansikan taimille, kun säilytys maassa kesti toukokuuhun ja kesäkuuhun asti. *C. acutatum* pystyttiin eristämään PDA-alustalla kasvinjäteteellä saastutettujen pyydyskasvien lehtiruodeista ja rönsyistä. Sieni oli säilynyt elossa sekä lämmittämättömässä kasvihuoneessa että ulkona, sekä peittämättömänä maan pinnalla että maalla peitettynä 9 ja 15 cm syvyydessä. Sieni ei ollut enää eristettävissä PDA-alustalla, kun syöttikasvit tartutettiin heinäkuun lopulle asti säilytyllä kasvinjätteellä.

Ulkona maa oli talvikauden jäässä, mutta lämmittämättömässä kasvihuoneessa hietamaa oli hyvin kuivaa keväällä ja lämpötilojen vaihtelu oli suurta. Wilson ym (1992) ovat todenneet, että pelkästään lämpötilojen vaihtelulla ei ollut ilmeistä vaikutusta *C. acutatum*-sienen säilymiseen elossa 6 kuukauden talvikauden ajan pelto-oloissa muumioituneissa tai muumioitumattomissa marjoissa. Tutkimuksen mukaan Ohion oloissa sieni voi olla eristettävissä kuuden kuukauden jälkeen, kun se on ollut maan pinnalla tai 5-8 cm syvyydessä. Eastburn ja Gubler (1992) ovat todenneet että lämpötilalla ja maan kosteudella on selvä vaikutus *C. acutatum*-sienen säilymiseen. Sieni säilyy parhaiten viileässä ja kuivassa, missä kilpailevien sienten kasvu on vähäistä ja *C. acutatum* itse käyttää hitaasti kasvinjätettä. Lämpimissä oloissa Kaliforniassa on myös todettu *C. acutatum*-sienen säilyvän 5-7 cm syvyyteen peitetyissä kasvinjätteissä 9 kuukautta. Israelissa on toisaalta todettu, että sieni ei ollut enää eristettävissä luonnollisesti saastuneista mansikan juurakoista, kun ne olivat olleet 10-20 cm syvyydessä maassa viiden kuukauden ajan, mutta keinotekoisesti saastutetuissa, muumioituneista marjoista sieni säilyi paremmin (Freeman ym, 2002).

Meidän kokeissamme *C. acutatum* ei aiheuttanut enää oireita, eikä sieni ollut eristettävissä PDA-alustalle, kun pyydyskasvit tartutettiin elokuun heinäkuun lopulle asti maassa säilytyllä kasvinjätteellä. Heinäkuun aikana maa oli ollut hyvin märkää jonkin aikaa ja nousivat lämpötilat kesä- ja heinäkuun aikana aiheuttivat ilmeisesti sienen elävän rihmaston nopean häviämisen, kuten Eastburn ja Gubler (1992) ovat aikaisemmin todenneet.

*Colletotrichum acutatum*-sienelle spesifinen 490bp tuote monistui syöttikasveista, jotka oli tartutettu talven yli maan pinnalla ja eri syvyydellä säilytetyllä kasvinjätteellä. PCR-tulokset olivat verrattavissa sieniviljelyjen tuloksiin PDA-alustalla. PCR osoitti positiivisia tuloksia useista näytteistä, joista pystyttiin myös eristämään *C. acutatum*. Toisaalta selvästi positiivisia tuloksia saatiin myös näytteistä, joista ei pystytty eristämään sientä PDA-alustalla. Runsaammin ei-spesifisiä reaktiotuotteita monistui oikean tuotteen lisäksi juurakosta kuin lehtiruodeista otetuista näytteistä. Lisäksi ei-spesifisten tuotteiden määrä oli suurempi myöhempään kesällä tehdyssä kokeessa, johon käytetty kasvinjäte oli säily-

tetty pisimpään. Oletettavasti silloin pyydyskasveissa oli eniten *C. acutatum*-sienen kanssa kasvinjätteisessä kilpailevien sienten aiheuttamia infektoita. Tämä voi olla myös syynä heikkoihin *C. acutatum*-spesifisiin tuotteisiin. Kasvinjätteen koostumus näyttää myös vaikuttavan säilymiseen ja PCR-määrityksen tulokseen.

### **Säilyminen maassa**

Heikkoja positiivisia reaktiotuotteita todettiin PCR määrityksessä pyydyskasveista, jotka oli istutettu sekä heinäkuussa että syyskuussa kerättyihin maanäytteisiin. Sekä maan pinnalta että 5 cm syvyydestä otetut näytteet tuottivat positiivisia tuloksia. Aikaisemmin tehtyjen tutkimusten mukaan elävä sienipulaatio maassa vähenee vähitellen 11 kuukauden kuluessa (Eastburn ja Gubler, 1992). Meidän ensimmäiset näytteemme otettiin tutkittavaksi 12 kuukautta ja toiset lähes 14 kuukautta saastuneiden kasvien hävittämisen ja maan kesannoinnin jälkeen.

Suomessa maan lämpötila on alhainen, mikä voi parantaa *C. acutatum*-sienen säilymistä jopa ilman kasvinjätettä. Eastburn ja Gubler (1992) testasivat sienen esiintymistä maassa ruiskuttamalla mansikkaa maasuspensiolla ja tarkastelemalla lehtiruoteihin kukkiin kehittyneitä oireita. Meillä ei pyydyskasveihin kehittynyt näkyviä oireita, vain vähäistä ruskettumista oli havaittavissa juurakon sisällä. *C. acutatum*-sientä ei myöskään pystytty eristämään kasveista PDA-alustalle. Tulokset kuitenkin osoittavat, että sieni voi säilyä tartutuskykyisenä maassa seuraavaan kasvukauteen. Toisaalta *C. acutatum* voi tartuttaa muita isäntäkasveja, kuten mansikkaviljelmän rikkakasveja, mm rönsyleinikkiä (Berrie ym, 2003). Kunnollinen kesannointi ja rikkakasvien torjunta on tärkeää karanteenin aikana, jotta varmistetaan, ettei viljelmällä esiinny tartutuskykyistä *C. acutatum*-sientä.

### **Johtopäätökset**

*Colletotrichum acutatum* on vaarallinen mansikan taudinaiheuttaja, jota esiintyy Keski-Euroopasta tuotavissa taimissa. Taudin asettuminen pysyvästi suomeen pyritään torjumaan hävittämällä sairaat kasvit. Kun taudinaiheuttaja tulosten mukaan voi säilyä sairaassa kasvinjätteisessä ainakin seuraavaan kasvukauteen, on huolellisuus torjuntatoimissa tarpeen. *C. acutatum* säilyy talven yli hyvin myös ilman suojaavaa lumipeitettä kylmässä kasvihuonetilassa. Lyhyt karanteeniaika voi aiheuttaa näissä tiloissa seuraavan kasvuston sairastumisen. Taudinaiheuttajan torjunnassa on otettava huomioon kasveissa olevan piilevän tartunnan mahdollisuus taudin säilyttäjänä ja levittäjänä.

### **Kirjallisuus**

- Anon.** 1997. *Colletotrichum acutatum*. Quarantine Pests for Europe. Second Edition. Data sheets on quarantine pests for the European Union and for the European and Mediterranean Plant Protection Organization. pp 692-697 (eds. Smith IM, McNamara DG., Scott PR., Holderness M and Burger B). University Press, Cambridge. 1425 p.
- Berrie, A.M., and Burgess, C.M.** 2003. A review of research on epidemiology and control of blackspot of strawberry (*Colletotrichum acutatum*) with special reference to weeds as alternative hosts. Proceedings of the IOBC-WPRS Working Group 'Integrated Plant Protection In Orchards subgroup 'Soft Fruits', Dundee, Scotland 18.-21. September 2001. (eds. Gordon, S.C. and Cross, J.V) Bulletin-OILB-STROP 26:163-168.
- Eastburn, D.M. and Gubler, W.D.**1990. Strawberry anthracnose; detection and survival of *Colletotrichum acutatum* in soil. Plant Disease 74: 161-163.
- Eastburn, D.M. and Gubler W.D.**1992. Effects of soil Moisture and temperature on the survival of *Colletotrichum acutatum*. Plant Disease 76: 841-842.
- Freeman, S., Horowitz, S. and Sharon, A.** 2001. Pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from strawberry and other plants. Phytopathology 91: 986-992.
- Freeman, S., Shalev, Z. and Katan, J.** 2002. Survival in soil of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* pathogenic on strawberry. Plant Disease 86: 965-970.
- Howard, C.M., Maas, J.L., Chandler, C.K. and Albregts, E.E.** 1992. Anthracnose of strawberry caused by the *Colletotrichum* complex in Florida. Plant Disease 76: 976-981.
- Leandro, L.F.S., Gleason, M.L., Nutter, F.W. Jr., Wegulo, S.N. and Dixon, P.M.** 2001. Germination and sporulation of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. Phytopathology 91: 659-664.

- Parikka P. and Kokkola, M.** 2001. First report of *Colletotrichum acutatum* on strawberry in Finland. Plant Disease **85**: 923
- Parikka. P. and Lemmetty, A.** 2004. Tracing latent infection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry by PCR . European J. Plant Pathology 110: 393-398.
- Sreenivasaprasad ,S., Sharada, K., Brown, A.E. and Mills, P.R.** 1996. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. Plant Pathology 45: 650-655
- Wilson, L.L., Madden, L.V. and Ellis, M.A.** 1992. Overwinter Survival of *Colletotrichum acutatum* in infected Fruit in Ohio. Plant Disease 76: 948-950.