

**PERUNAN VARSISTA ERISTETTYJEN *PECTOBACTERIUM*
CAROTOVORUM -KANTOJEN VAIKUTUS PERUNAN
TERVEYTEEN**

Jenna Aho
Maisterintutkielma
Helsingin yliopisto
Maataloustieteiden laitos
Kasvipatologia
Helmikuu 2017

HELSINGIN YLIOPISTO ¾ HELSINGFORS UNIVERSITET ¾ UNIVERSITY OF
HELSINKI

Tiedekunta/Osasto ¾ Fakultet/Sektion ¾ Faculty Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Laitos ¾ Institution ¾ Department Maataloustieteiden laitos	
Tekijä ¾ Författare ¾ Author Jenna Aho			
Työn nimi ¾ Arbetets titel ¾ Title Perunan varsista eristettyjen <i>Pectobacterium carotovorum</i> -kantojen vaikutus perunan terveyteen			
Oppiaine ¾ Läroämne ¾ Subject Kasvipatologia			
Työn laji ¾ Arbetets art ¾ Level Maisterintutkielma		Aika ¾ Datum ¾ Month and Year Helmikuu 2017	Sivumäärä ¾ Sidoantal ¾ Number of pages 52
<p>Tiivistelmä ¾ Referat ¾ Abstract</p> <p>Tämän maisterintyön pohjana ovat aikaisemmat tutkimukset, joissa mädäntyneistä perunan varsista ja mukuloista eristettiin <i>Pectobacterium</i>-kantoja. Kannat määritettiin <i>P. carotovorum</i> alalajiksi <i>carotovorum</i> biokemiallisten ominaisuuksien perusteella. Varsista eristetyt isolaatit poikkesivat kuitenkin <i>acnA</i>-geeniä koodavan alueen sekvensseiltään <i>P. carotovorum</i> alalajin <i>carotovorum</i> -tyyppikannasta sekä kannoista, joita oli eristetty mädäntyneistä perunan mukuloista samassa tutkimuksessa. Varsinäytteistä löydetty kannat eivät kuitenkaan jatkotutkimuksissa itse kyenneet aiheuttamaan tyvimätää, eli kasvin varsien tummumista ja mädäntymistä pellolla.</p> <p>Tässä tutkielmassa oli tavoitteena selvittää, ovatko tyvimätäisistä varsista eristetyt kannat itsessään patogeeneja, vai voisivatko ne olla ympäristöstä leviäviä sekundääri-infektoijia. Yksi työn päämäärinä oli myös selvittää pystyvätkö kannat tuottamaan yhdisteitä, jotka estävät muiden tyvimätäbakteerien kasvua, ja voisivatko ne tehdä tyvi- ja märkämätäbakteereilla saastuneesta perunasta tautivapaan pelto-olosuhteissa. Tätä selvitettiin <i>in vitro</i> -testeissä ja kenttäkokeessa kahdella perunalajikkeella.</p> <p>Varsista eristetyt kannat kykenivät tuottamaan toksisia yhdisteitä <i>in vitro</i> -testeissä ja estivät useiden muiden tyvi- ja märkämätäbakteerien kasvua, kun taas mukuloissa elävät kannat eivät juurikaan vaikuttaneet muiden kantojen kasvuun. Perunan varsista eristetyillä kannoilla on siten ominaisuuksia, joiden avulla ne voisivat levitä ympäristöstä ja kilpailla hyvin tyvimätäisessä solukossa tautia aiheuttavien tyvi- ja märkämätäbakteereiden kanssa. Kenttäkokeen aikana millään bakteerikannalla saastutetuissa kasveissa ei havaittu tyvimätäoireita, mutta joissakin tapauksissa ne aiheuttivat märkämätää, eli perunan mukuloiden mädäntymistä, sekä kasvien kitukasvuisuutta. Kenttäkokeessa käytettyjen perunalajikkeiden, Rikean ja Fontanen, vaste kokeessa eri bakteerikantoja vastaan oli erilainen eri lajikkeissa. Vaikka <i>in vitro</i> -tulokset antoivat olettaa, että varsista eristetyt kannat voisivat toimia biologisina torjuntaeliöinä, kenttäkokeen tuloksien perusteella osalla kannoista voi olla patogeenisia ominaisuuksia eivätkä ne kelpaa biologisiksi torjuntaeliöiksi.</p>			
Avainsanat ¾ Nyckelord ¾ Keywords Pektobakteerit, märkämätä, tyvimätä, peruna, <i>Pectobacterium</i> , bakteriosiini			
Säilytyspaikka ¾ Förvaringsställe ¾ Where deposited Maataloustieteiden laitos ja Viikin kampuskirjasto			
Muita tietoja ¾ Övriga uppgifter ¾ Further information Tutkielman ohjaajat Minna Pirhonen ja Miia Pasanen			

HELSINGIN YLIOPISTO ¾ HELSINGFORS UNIVERSITET ¾ UNIVERSITY OF
HELSINKI

Tiedekunta/Osasto ¾ Fakultet/Sektion ¾ Faculty Faculty of Agriculture and forestry		Laitos ¾ Institution ¾ Department Agricultural sciences	
Tekijä ¾ Författare ¾ Author Jenna Aho			
Työn nimi ¾ Arbetets titel ¾ Title Perunan varsista eristettyjen <i>Pectobacterium carotovorum</i> -kantojen vaikutus perunan terveyteen			
Oppiaine ¾ Läroämne ¾ Subject Plant pathology			
Työn laji ¾ Arbetets art ¾ Level Master's thesis		Aika ¾ Datum ¾ Month and year February 2017	Sivumäärä ¾ Sidoantal ¾ Number of pages 52
Tiivistelmä ¾ Referat ¾ Abstract <p>In a previous study, <i>Pectobacterium</i> strains were isolated from rotten potato tubers and stems. Strains were identified as <i>P. carotovorum</i> subspecies <i>carotovorum</i> by their biochemical properties. In <i>acnA</i> gene sequence analysis the strains isolated from diseased potato stems were different from <i>P. carotovorum</i> subspecies <i>carotovorum</i> type strain and also from strains isolated from rotten potato tubers. However, the strains isolated from rotten potato stems were not able to cause typical blackleg symptoms, like rotting of stems, when inoculated in potato plants.</p> <p>The focus of this master's thesis was to further study if the new strains are pathogenic in nature or whether they could have arrived to already rotten potato tissue as secondary infection. One goal was to find out if the strains can produce compounds that inhibit growth of known blackleg pathogens, and could they make already contaminated potatoes disease free in a field. This was tested <i>in vitro</i> as well as in a field trial with two potato varieties.</p> <p>As a result the strains isolated from stems were able to produce toxic compounds that inhibited the growth of several common soft rot and blackleg pathogens, whereas compounds produced by the strains isolated from tubers had no effect on the growth of the other bacteria. This suggests that the strains present in stems have properties that make it possible for them to spread from the environment to already infected stem lesions and compete with blackleg and soft rot bacteria already present in the tissue. Blackleg symptoms were absent during the field trial, but in some cases the inoculations caused soft rot of tubers and stunted growth of the inoculated plants. The two potato varieties used in the field trial, Rikea and Fontane, had a different response against the used strains. Although the <i>in vitro</i> results suggested that some of the strains that were originally isolated from stems could act as biological control agents, the results from the field trial contradicted this indicating that the strains might have pathogenic properties, which makes them unsuitable as biological control organisms.</p>			
Avainsanat ¾ Nyckelord ¾ Keywords Pectobacterium, soft rot, blackleg, potato, bacteriocin			
Säilytyspaikka ¾ Förvaringsställe ¾ Where deposited Department of Agricultural sciences and Viikki campus library			
Muita tietoja ¾ Övriga uppgifter ¾ Further information Supervisors Minna Pirhonen and Miia Pasanen			

SISÄLLYS

1 JOHDANTO	5
1.1 Pektolyttiset enterobakteerit	5
1.2 Perunan tyvi- ja märkämätä	6
1.2.1 Oireet ja infektio	6
1.2.2 Pectobacterium-lajien ja alalajien luokittelu	10
1.3 Pcc, Pa ja Dickeya-suvun lajit	10
1.4 Tyvi- ja märkämätäbakteereiden epidemiologia ja ekologia	12
1.4.1 Tyvi- ja märkämätäbakteereiden virulenssitekijät	12
1.4.2 Bakteereiden erityisreitit.....	13
1.4.3 Tyvi- ja märkämätää aiheuttavien bakteereiden erityisreitit ja niiden merkitys	15
1.4.4 Yhteistyöhön ja bakteereiden populaatiotiheyteen perustuva geenisääätely...	15
1.4.5 Bakteereiden välinen kilpailu elintilasta ja ravinteista.....	16
1.5 Pektobakteereiden tunnistus	17
1.6 Tutkimuksen tavoitteet	18
2 AINEISTO JA MENETELMÄT	19
2.1 Käytetyt kannat	19
2.2 Kasvatusalustat ja kasvuolosuhteet	20
2.3 DNA-sekvensointi	21
2.4 Bakteriosiinien tuotto	21
2.5 Kenttäkoe	22
2.6 Kenttäkokeen mukuloista eristettyjen kantojen lajinmääritys biokemiallisten ominaisuuksien ja sekvenssien perusteella	24
3 TULOKSET	24
3.1 Kantojen fylogeneettinen ryhmittely acnA-geenin sekvenssien avulla	24
3.2 Sekvensoinnin perusteella muodostetut ryhmät erosivat toksiinien tuoton suhteen	26
3.3 Kenttäkokeen tulokset	29
3.4 Kenttäkokeen mukuloista eristettyjen kantojen lajinmääritys	32
4 TULOSTEN TARKASTELU	32
4.1 Pcc-kannat voitiin jakaa kahteen ryhmään acnA-sekvenssien avulla	32
4.2 Kantojen toksiinintuottokyvyssä oli eroja	33
4.3 Kannat eivät vähentäneet tyvimätäoireita kenttäkokeessa	33
4.4 Kantojen ominaisuudet ja tunnistus	34
5 JOHTOPÄÄTÖKSET	35
6 KIITOKSET	38
7 VIITTEET	38
8 LIITTEET	49
LIITE 1. acnA –geenisekvenssien rinnastus	49
LIITE 2. Minimalusta	52

1 JOHDANTO

1.1 Pektolyttiset enterobakteerit

Pektolyttiset enterobakteerit aiheuttavat taloudellisesti merkittäviä tauteja viljelykasveilla ympäri maailmaa (Gardan ym. 2003, Samson ym. 2005, Ma ym. 2007, Panda ym. 2012, Rafiei ym. 2015). Ryhmään kuuluvat *Pectobacterium*-suvun lajit ovat suurimpia perunantyvimädän ja -märkämädän aiheuttajia lauhkealla vyöhykkeellä. Niiden aiheuttamia tuhoja on raportoitu ruokakasvien lisäksi myös useilla koristekasveilla (Chao ym. 2006, Kim ym. 2007, Alippi ja Lopez 2009, Baghaee-Ravari ym. 2011). Taudin vaikutukset ovat kuitenkin erityisen merkittäviä perunalla (*Solanum tuberosum* L.), joka kuuluu maailman merkittävimpiin ruokakasveihin (FAO Crops statistics database).

Tässä tutkielmassa *Pectobacterium*-sukuisista bakteereista käytetään suomenkieleistä nimeä pektobakteerit. Ne kuuluvat proteobakteerien luokkaan ja enterobakteerien heimoon, johon kuuluu kasvi- ja eläinpatogeenia myös mm. suvuista *Dickeya*, *Brenneria*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Escherichia* ja *Salmonella*. Pektobakteereiden tiedetään hajottavan kasvin soluseinää erilaisten entsyymien, kuten proteaasien, pektinaasien ja sellulaasien, avulla. Kaikki tyvimätäbakteerit suosivat kosteita olosuhteita, mutta niiden optimilämpötiloissa on eroja. Ainoa tehokas torjuntakeino on puhtaan siemenperunan käyttäminen ja hyvä viljelyhygienia, sillä hyväksytyä ja tehokasta kemiallista torjuntaa ei ole eikä täysin taudinkestäviä lajikkeita ole tähän asti pystytty jalostamaan (Czajkowski ym. 2011).

Tämän maisterintutkielman pohjana ovat aikaisemmat tutkimukset, joissa pektobakteerikantoja eristettiin mädäntyneistä perunoiden varsista ja mukuloista (Laurila ym. 2008). Perunakasvustoissa oli havaittu kesän aikana mädäntyneitä varsia, mutta niistä kerätyistä näytteistä ei kuitenkaan löydetty aikaisemmin tunnettuja, tyvimätää aiheuttavia bakteereja. Mädäntyneistä varsista eristetyt kannat määritettiin biokemiallisten ominaisuuksien avulla kuuluvan *Pectobacterium carotovorum* alalaji *carotovorum* -lajiin (Pcc) (Pasanen ym. 2013). Pcc-bakteerin löytyminen perunoiden varsista yllätti tutkimusryhmän, sillä kyseisen bakteerin on todettu useimmiten aiheuttavan

mädäntymistä vain perunan mukuloissa. Sekä varsista että mukuloista eristetyt kannat olivat biokemiallisilta ominaisuuksiltaan Pcc-bakteerin tyyppikannan kaltaisia, mutta jakaantuivat useiden eri sekvenssien avulla rakennetuissa fylogeneettisissa puissa selkeästi kahteen eri ryhmään (Pasanen ym. 2013). Useimmat mukuloista eristetyistä kannoista olivat Pcc-tyyppikannan kaltaisia, kun taas useimmat varsista eristetyistä kannoista asettuivat erilleen muodostaen oman ryhmänsä. Varresta eristetyt kannat erosivat mukuloista eristetyistä mm. niiden III-tyypin erityisreitin toimintaan vaikuttavien geenien puuttumisen suhteen, mitä testattiin tutkimalla niiden kykyä tuottaa hypersensitiivisyys-vaste tupakalla. Sekä varsista että mukuloista eristettyjen pektobakteerikantojen kyky aiheuttaa tyvimätäoireet testattiin kenttäkokeessa saastutetuilla siemenmukuloilla, mutta kumpaankaan ryhmään kuuluvat kannat eivät kyenneet aiheuttamaan tyvimätäoireita kokeen aikana (Pasanen ym. 2013). Tässä tutkielmassa haluttiin selvittää perunan varsista eristettyjen Pcc-kantojen merkitystä perunan terveydelle sekä ymmärtää mikä niiden rooli kasvissa on.

1.2 Perunan tyvi- ja märkämätä

1.2.1 Oireet ja infektio

Tyvimädäksi kutsutaan perunan varsissa ja lehdissä näkyviä oireita, kun taas märkämädäksi kutsutaan perunan mukulan mädäntymistä (Agrios 2006). Infektio koostuu latenttivaiheesta sekä aktiivisen kasvun ja patogeenisen toiminnan vaiheesta. Latenttivaiheessa bakteerit elävät mukulan pinnalla eikä taudin oireita vielä havaita (Pérombelon 1992 ja 2002, Agrios 2006). Tämä vaihe kestää seuraavaan kasvukauteen, tai kunnes kosteustaso ja lämpötila ovat suotuisat infektion aktiivivaiheen alkamiseen. Aktiivivaihe voi alkaa jo varastoinnin aikana, kun mukuloissa tapahtuva soluhengitys vapauttaa ympäristöön vettä (Agrios 2006). Vesi muodostaa mukulan kuoren pinnalle kalvon, joka estää hapen kulkeutumisen solukoon. Mukulan puolustuskyky heikkenee hapenpuutteen takia, eikä esimerkiksi oksidatiiviseen puolustusreaktioon tarvittavia yhdisteitä pysty muodostumaan. Tauti voi myös levitä varastoinnin aikana, kun saastuneet mukulat ovat kosketuksissa terveiden kanssa. Märkämätää aiheuttavat bakteerit ovat yksi suurimmista perunan varastotappioiden aiheuttajista, ja suuri osa sadosta menetetäänkin juuri varastoinnin aikana (Pérombelon 1992).

Tyypillinen märkämätäoire on mukulan maltoon muodostuvat tummat ja vetiset laikut, sekä sen rakenteen hajoaminen (kuva 1). Malto muuttuu pehmeäksi ja on väriltään rusehtava. Sairaan ja terveen solukon välissä voi näkyä selkeä tumma raja. Malto alkaa taudin edetessä haista voimakkaasti solukossa kasvavien sekundaaristen bakteerien aineenvaihduntatuotteiden takia.



Kuva 1. Märkämätää perunanmukulassa. Kuvat Anne Rahkonen, Perunantutkimuslaitos



Kuva 2. Tyvimätää perunan varressa. Kuvat Anne Rahkonen, Perunantutkimuslaitos

Märkämädän näkyvät oireet eivät usein ehdi puhjeta mukuloissa varastoinnin aikana, jolloin tauti leviää pellolle piilotartuntaa kantavan siemenperunan mukana aiheuttaen perunassa tyvimätää eli kasvin varren mätänemistä. Aktiivivaiheen edetessä pellolla emomukula hajoaa ja bakteerit siirtyvät varsiin ja sivumukuloihin joko kasvin johtosolukon tai kostean maaperän kautta. Pelloilla seisova vesi edesauttaa taudin leviämistä, kun emomukulasta erittyvä bakteerilima voi levitä ympäröiviin kasveihin. Kosteissa oloissa tyvimätäioireet näkyvät kosteina laikkuina perunan varsissa ja tyvien mätänemisenä (kuva 2). Kuivissa oloissa kasvin johtosolukossa kasvavat bakteerit estävät veden ja ravinteiden kuljetuksen, jolloin varret kellastuvat ja kuihtuvat ja kasvi jää kitukasvuiseksi (kuva 3). Tyypillisiä tyvimätäioireita ovat pienikasvuisuus, kloroosi, lakastuminen, varsien mädäntyminen, versojen tyvien tummuminen, versojen kuivuminen ja lopulta kasvin kuolema (Toth ym. 2003, de Haan ym. 2008) (kuvat 2 ja 3).



Kuva 3. Vasen: Tyvimätäinen, kloroottinen ja kitukasvuinen kasvi. Oikea: Kuollutta solukkoa lehdessä ja mädäntyneitä perunan varsia. Kuvat Anne Rahkonen, Perunantutkimuslaitos

Pektobakteerit kuuluvat opportunistisiin patogeeneihin, mikä tarkoittaa että ne pystyvät infektoimaan isäntäkasvin vain kun sen vastustuskyky on jo valmiiksi alhainen. Bakteerien taudinaiheutuskyky ei riitä ohittamaan terveen isännän puolustusmekanismeja, vaan infektion aktiivivaiheen alkaminen on mahdollista ainoastaan mikäli kasvia stressaavat jo jotkin muut ympäristötekijät. Vähemmän virulentit bakteerikannat saattavat saapua kasvisolukkoon sekundaarisena taudinaiheuttajana kun jokin muu taudinaiheuttaja on ensin ohittanut kasvin puolustuksen ja aloittanut solukon hajottamisen (Pérombelon 2002). Bakteerien on helpompaa tunkeutua mukulan solukkoon kun sen pinta on jo valmiiksi vaurioitunut esimerkiksi kuivuudesta johtuvan halkeilun, kolhujen, hyönteisten aiheuttamien haavojen tai ensisijaisen bakteeri-infektion toimesta (Pérombelon 1992).

Tyvimätäbakteeri-infektio voi aktivoida kasvin puolustusjärjestelmän, mikä saattaa johtaa ohjelmoituun solukuolemaan. Solukuolemaan päättyvää ketjureaktiota kutsutaan yliherkkyys- eli hypersensitiivisyysvasteeksi (engl. hypersensitive response, HR). Kasvi pystyy sen avulla estämään infektion leviämisen tappamalla tartunnan saaneen alueen ja sitä ympäröivät solut. Tyvimätäbakteerit elävät kuitenkin kuolleessa solukossa ja hyödyntävät kasvien HR-vastetta mädättääkseen kasvisolukon (Hogan ym. 2013). Puolustusvasteen aiheuttama solukuolema havaitaan nekroottisina laikkuina lehdisissä ja varsissa (kuva 3).

Tyvi- ja märkämätää aiheuttavat bakteerit leviävät saastuneen siemenperunan, veden, ilman ja hyönteisten välityksellä (Pérombelon ja Kelman 1980). Tärkein torjuntakeino on terveen siemenperunan käyttäminen ja hyvä viljelyhygienia, sillä bakteerit leviävät saastuneiden koneiden, mullan ja kasvinosien mukana palstalta toiselle ja terveisiin mukuloihin, jotka voivat pilaantua varastoinnin aikana. Tautia voi myös yrittää estää käyttämällä viljelykiertoa, eli vuorottelemalla peltolohkon viljelykasvilajia peräkkäisinä vuosina. Kasvien riittävän ravinteiden saannin uskotaan olevan myös tärkeä osa niiden luonnollista vastustuskykyä, sillä hyväkuntoisen ja terveen kasvin puolustusvaste on ravinteiden puutteesta kärsivää kasvia parempi (Czajkowski ym. 2011). Pektobakteerien aiheuttaman tyvimädän torjunnassa on vuosikymmenien varrella kokeiltu tuloksetta mm. siemenperunan kuumavesikäsitteilyä (Robinson ja Foster 1987) sekä antibioottien (Czajkowski ym. 2011) ja kupariyhdisteiden käyttöä (Aysan ym. 2003). Biologinen torjunta olisi sekä luonnonmukainen että kustannustehokas vaihtoehto, mutta toistaiseksi tehokasta biologista torjuntakeinoa ei ole löytynyt. Joidenkin bakteerien, kuten

esimerkiksi *Serratia plymuthica* -lajin, on kuitenkin havaittu erittävän pektobakteerien kasvua estäviä yhdisteitä *in vitro* -kokeissa (Czajkowski ym. 2011).

1.2.2 *Pectobacterium*-lajien ja alalajien luokittelu

Pektobakteerit on aikaisemmin luokiteltu kuuluvaksi *Erwinia*-sukuun. Lähempi taksonominen tarkastelu kuitenkin osoitti niiden olevan oma sukunsa, joka johti *Pectobacterium*-suvun perustamiseen (Hauben ym. 1998, Gardan ym. 2003). Suku pitää nykyään sisällään lajit *P. atrosepticum* (lyhenne Pa), *P. betavasculorum* (Nabhan ym. 2012), *P. wasabiae* (Pw) (Pitman ym. 2008), *P. aroidearum* (Nabhan ym. 2013), *P. cacticida* ja *P. carotovorum*, joista jälkimmäinen on jaoteltu alalajeihin *P. c.* alalaji *actinidiae*, *P. c.* alalaji *carotovorum* (Pcc), *P. c.* alalaji *odoriferum* (Gardan ym. 2003) ja *P. c.* alalaji *brasiliense* (Pcb) (Duarte ym. 2004, Nabhan ym. 2012). Aikaisemmin *P. chrysanthemi* -nimellä tunnettua lajia varten perustettiin uusi suku nimeltä *Dickeya*, johon kuuluu nykyään seitsemän eri lajia (Samson ym. 2005, Toth ym. 2011, van der Wolf ym. 2013, Parkinson ym. 2014). *Pectobacterium* ja *Dickeya* -sukujen taksonominen määrittely on kuitenkin edelleen tarkastelun kohteena kun uusia, kokogenomisekvenssejä hyödyntäviä menetelmiä käytetään lajinmääritykseen (Zhang ym. 2016).

Useat pektobakteerit pystyvät infektoimaan monia eri koriste- ja viljelykasvilajeja. Poikkeuksia ovat *P. betavasculorum*, jota tavataan sokerijuurikkaalla (*Beta vulgaris* L.), auringonkukalla (*Helianthus annuus* L.), artisokalla (*Helianthus tuberosus* L.) ja perunalla (Thomson ym. 1981, Gardan ym. 2003), Pa, joka infektoi pääasiassa vain perunaa (Pérombelon 2002, Gardan ym. 2003, Ma ym. 2007), sekä Pw, jonka on todettu aiheuttavan tautia perunan lisäksi vain japanilaisella piparjuurella (*A Armoracia rusticana* P.G. Gaertn., B. Mey & Scherb.) (Goto ja Matsumoto 1987, Pitman ym. 2008, Pitman ym. 2010). Monet lajit on eristetty alun perin jostain muusta kasvista kuin perunasta, kuten esimerkiksi *P. c.* alalaji *odoriferum*, joka eristettiin ensimmäisenä sikurista (*Cichorium intybus* L.) (Gallois ym. 1992).

1.3 Pcc, Pa ja *Dickeya*-suvun lajit

Pcc-lajilla on pektobakteereista laajin isäntaskaala. Siihen kuuluu perunan lisäksi useita merkittäviä viljelykasveja (Toth ym. 2003), kuten esimerkiksi kassava (*Manihot*

esculenta Crantz), sipuli (*Allium* L. spp.), kaali (*Brassica oleracea* L.), porkkana (*Daucus carota* L.), tomaatti (*Solanum lycopersicum* L.), pavut (*Fabaceae* Lindley), maissi (*Zea mays* L.), puuvilla (*Gossypium* L. spp.), kahvipensas (*Coffea* L. ssp.) ja banaani (*Musa* L. ssp.) (Avrova ym. 2002, Ma ym. 2007).

Pcc-kantojen lajinsisäinen vaihtelu on suurta, ja ne voidaan usein jakaa fylogeneettisesti selkeisiin ryhmiin (Yap ym. 2004, Kim ym. 2009). Pcc-bakteerin aiheuttama märkämätä havaitaan aukkoina perunakasvustossa, kun infektoitunut mukula ei taimetu. Mukuloissa ilmenee usein märkämätää vasta sadonkorjuun jälkeen, ja merkittävimmät satotappiot tapahtuvatkin juuri varastoinnin aikana. Pcc on aikaisemmin luokiteltu märkämätää aiheuttavaksi bakteeriksi, mutta eri puolilta maailmaa on viime vuosina löydetty kantoja, jotka aiheuttavat myös tyvimätäoireita perunalla (de Haan ym. 2008, van der Merwe ym. 2010). Näistä osa on kuitenkin todettu jälkeempään väärin tunnistetuiksi, ja mm. Hollanissa virulenteiksi Pcc-kannoiksi kutsutut kannat todettiin myöhemmin Pw-lajiin kuuluviksi (Pasanen ym. 2013). Pw-lajin bakteereita onkin löydetty perunoista ympäri maailmaa. Osa havainnoista raportoi lajin uutena taudinaiheuttajana, mutta tutkijat ovat myös löytäneet lajia alunperin väärin tunnistettuna jo vuosia sitten perunoista kerättyjen kantojen joukosta (Pitman ym. 2010, Moleleki ym. 2013, Nykyri ym. 2012, Waleron ym. 2013, Khayi ym. 2015). Myös Pcb-kantoja on hiljattain tavattu Euroopasta ja myös Suomesta perunoista (Yeshitila Degefu, suullinen tiedonanto).

Pa on pääasiassa perunaan erikoistunut bakteeri (Pérombelon 2002). Se elää lauhkealla vyöhykkeellä ja viihtyy muita pektobakteereja alhaisemmissa lämpötiloissa (Perombelon ja Hyman 1989, Lanham ym. 1991). Pa voi aiheuttaa märkämätää mukuloissa varastoinnin aikana, jolloin lämpötilat ovat usein pelto-olosuhteita alhaisemmat.

Dickeya-suvun lajeja on löydetty lukuisilta eri kasveilta ympäri maailmaa, viimeisimpänä aivan uusi laji *Dickeya solani* (Samson ym. 2005, Ma ym. 2007, Laurila ym. 2008, Slawiak ym. 2009, Toth ym. 2011, van der Wolf 2013). Ne ovat taudinaiheuttajina pektobakteereja tehokkaampia. *Dickeya*-suvun lajien optimilämpötila on myös muita pektobakteereja korkeampi. Kantoja on löydetty mm. suomalaisesta jokivedestä, josta ne voivat päätyä pellolle, kun puhdistamatonta vettä käytetään kastelussa (Laurila ym. 2008). *Dickeya*-suvun merkitys eurooppalaisessa perunantuotannossa kasvoi nopeasti 2000-luvun alussa, jonka vuoksi esimerkiksi Skotlanti otti käyttöön nollatoleranssin

kantojen esiintymisen suhteen (Toth ym. 2011). Erilaisten karanteenitoimenpiteiden ansiosta tautia on havaittu lähivuosina Euroopassa aikaisempaa vähemmän. *Dickeya*-sukuisten bakteereiden hallintaa biologisen torjunnan avulla on myös tutkittu (Czajkowski ym. 2012), mutta tehokkaita kaupallisia torjuntakeinoja ei ole vielä saatu kehitettyä (Czajkowski ym. 2011).

1.4 Tyvi- ja märkämätäbakteereiden epidemiologia ja ekologia

1.4.1 Tyvi- ja märkämätäbakteereiden virulenssitekijät

Virulenssilla tarkoitetaan bakteerin taudinaiheutuskyvyn voimakkuutta. Sen voimakkuus vaihtelee niin eri lajien kuin kantojenkin välillä (Casadevall ja Pirofski 1999). Virulenssiin vaikuttaa suuri joukko geenejä, jotka koodaavat mm. kasvisolukon hajottamiseen, toksiinien tuottamiseen sekä isännän puolustuksen alentamiseen osallistuvia proteiineja (Wassenaar ja Gaastra 2001).

Tyvi- ja märkämätäbakteerien tärkeimpiä virulenssitekijöitä ovat kasvin soluseinää hajottavien entsyymien tuotto. Pektobakteerit hajottavat nimensä mukaisesti tehokkaasti juuri kasvien soluseinän pektiiniä. Suurin ja merkittävin eritettävien entsyymisen ryhmä onkin pektinaasit, joihin lukeutuvat mm. pektaattilyaasit ja pektiinilyaasit (Chuang ym. 2007). Pektobakteerit erittävät myös muita kudosta hajottavia entsyymejä, kuten sellulaaseja ja proteaaseja, mutta niiden eritettävät määrät sekä sen kautta merkitys virulenssille on pektinaaseja vähäisempi. Bakteerit käyttävät tuottamiaan yhdisteitä tunkeutuakseen isäntäsoluun sekä hajottaakseen polysakkaridit ja proteiinit pienimolekyylisiksi yhdisteiksi, jotka ne voivat käyttää ravinnoksi (Toth ym. 2003).

Soluseinää hajottavat yhdisteet ovat erilaisia eri bakteerilajeilla ja ne vaikuttavat lajien isäntäkasvilajistoon (Toth ym. 2003). Bakteerien tuottamat entsyymit osallistuvat myös isäntäkasvin puolustusvasteelle tärkeiden proteiinien tuhoamiseen (Marits ym. 1999). Pektobakteerien taudinaiheutuskyvyn on aikaisemmin oletettu perustuvan pääasiassa kasvin soluseinää hajottavien entsyymien tuottoon (Pérombelon 2002), mutta esimerkiksi Pa-kannan SCRI1043 genomien sekvensoinnin yhteydessä havaittiin useita uusia potentiaalisia virulenssigeenejä. Tämä osoittaa, että pektobakteerien virulenssimekanismit ovat todennäköisesti monimutkaisempia, kuin aikaisemmin on

luultu (de Boer 2003, Toth ym. 2003, Bell ym. 2004).

Toksiinit ovat patogeenisten bakteerien tuottamia isäntäsoluille vahingollisia yhdisteitä. Näihin kuuluvat mm. syringomysiini ja koronatiinitoksiini (Bell ym. 2004). Koronatiinitoksiini estää kasvisolun signaalinvälityksen aiheuttaen kloroosia, kun taas syringomysiini saa kasvisolun vuotamaan elektrolyyttejä solun ulkopuolelle (Bender ym. 1999). Tämä aiheuttaa solussa energiavajeen, sillä se estää elektronigradiettiin perustuvan molekyylien kuljetukseen soluseinän läpi. Pa-lajin genomisen sekvenssi osoitti sillä olevan koronatiinitoksiinia muistuttavan molekyylin tuottoon tarvittava geeni (Bell ym. 2004).

Bakteerit voivat säädellä virulenssinsa voimakkuutta, kun kasvuympäristön olosuhteet muuttuvat. Kasvuolosuhteisiin vaikuttavat ympäristön happi-, typpi- ja rautapitoisuus, lämpötila, kasvisolukon hajoamistuotteiden konsentraatio ja bakteerien oma populaatiotiheys (Toth ym. 2003).

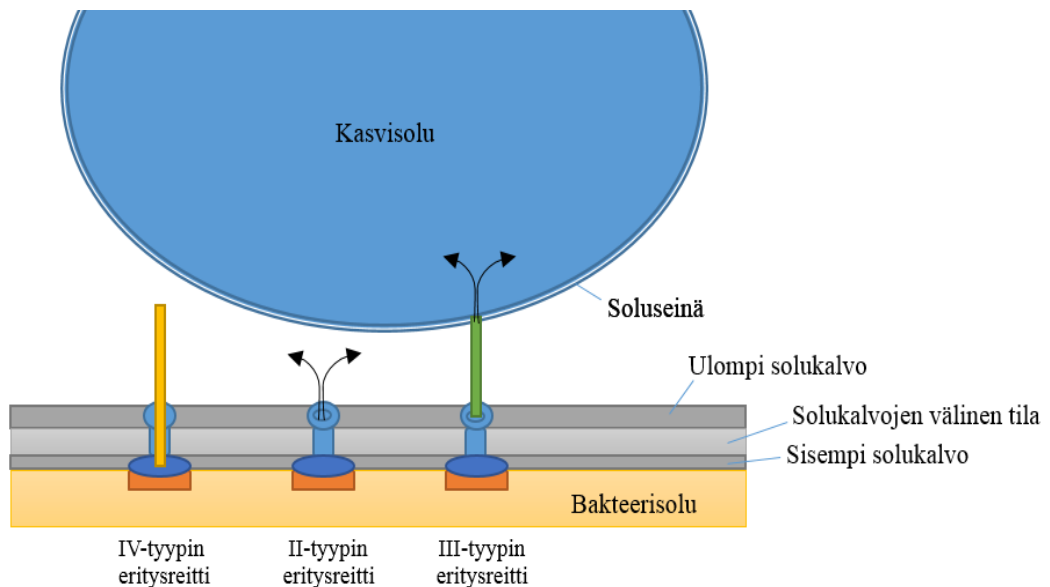
Pektobakteerit ovat sauvamaisia ja niillä on aktiivisen liikkumisen mahdollistavat siimamaiset rakenteet eli flagellat (Hauben ym. 1998). Liikkumiskykyiset bakteerit pystyvät hakeutumaan kohti isäntäsolun pintaa sekä kulkemaan soluseinän läpi. Flagellat ovatkin merkittävä pektobakteerien virulenssiin vaikuttava tekijä (Pirhonen ym. 1991). Liikkumiskyky on tärkeässä osassa myös ympäristötekijöiltä suojaavan bakteerikasvuston, biofilmin muodostuksessa (Hossain ja Tsuyumu 2006). Biofilmi voi koostua useista eri bakteerilajeista, ja se sekä suojaa soluja että helpottaa kiinnittymistä pinnoille.

1.4.2 Bakteereiden erityisreitit

Bakteerien tuottamia entsyymejä kuljetetaan isäntäkasvin soluihin erilaisten erityisreittien kautta (Toth ym. 2006). Erityisreitiksi kutsutaan solukalvon pinnalla sijaitsevaa putkilomaista proteiinikompleksia, jonka kautta kuljetetaan entsyymien lisäksi virulenssiproteiineja ja DNA:ta.

Eri entsyymiryhmät kuljetetaan erilaisten erityisreittien kautta (Toth ym. 2006). Kuljetettava proteiini tunnistetaan sen signaalisekvenssin perusteella. Erityisreitit eroavat

sekä rakenteen että kuljetusmekanismien suhteen (kuva 4). I-tyyppin erityysreitti vastaa useimpien proteiinien kuljetuksesta bakteerisolun ulkopuolelle. II- ja jotkin V-tyyppin erityysreitit kuljettavat proteiinit ensin solukalvojen väliseen tilaan, josta ne kuljetetaan solun ulkopuolelle. III- ja IV- tyyppin erityysreitit vastaavat molekyylien kuljettamisesta suoraan kasvisoluun, ja ne vaativatkin kontaktin kasvisolun kanssa toimiakseen (kuva 4). IV-tyyppin erityysreitit kautta kuljetetaan virulenssiin vaikuttavia proteiineja ja DNA:ta (Preston ym. 2005) Kaikkein viimeisimpänä on löydetty VI-tyyppin erityysreitti (Das ja Chaudhuri 2003), joka muistuttaa rakenteeltaan monelta bakteriofaagilta löydettyä bakteerin soluseinän puhkaisevaa pistinmäistä rakennetta. Useat bakteerit, joilla on VI-tyyppin erityysreitti, ovat ihmispatogeenia (Yen ym. 2008, McIntyre ym. 2010).



Kuva 4. IV-, II- ja III-tyyppin erityysreitit eroavat rakenteeltaan ja toimintatavaltaan

III-tyyppin erityysreitti on varsin yleinen monilla gram-negatiivisilla bakteereilla (Tseng ym. 2009). Se on tärkeässä roolissa monen kasvipatogeenin virulenssissa, sillä se vastaa efektorien kuljettamisesta suoraan isäntäsoluun. Efektoreiksi kutsutaan proteiineja, joilla on suora vaikutus infektion etenemiseen isäntäsolussa. Joitain III-tyyppin erityysreitit kautta eritettäviä efektoreita kutsutaan Avr- eli avirulenssiproteiineiksi. Ne saattavat vaikuttaa suoraan isäntäkasvin signaalinvälitykseen ja esimerkiksi estää HR:n ja sitä kautta kasvisolujen ohjelmoidun solukuoleman (Grant ym. 2006). Mikäli kasvilla kuitenkin on bakteerin Avr-proteiinia vastaava resistenssigeeni, tunnistaa isäntäsolu bakteerihyökkäyksen geeni geeniä vastaan-periaatteella, ja puolustusvaste aktivoituu. Tällä mekanismilla on ilmeisesti kuitenkin hyvin vähän merkitystä kasvien

puolustautumisessa pektobakteereiden aiheuttamia infektioita vastaan, sillä pektobakteereilta ei ole raportoitu Avr-proteiineja.

1.4.3 Tyvi- ja märkämätää aiheuttavien bakteereiden erityisreitit ja niiden merkitys

Tyvi- ja märkämätää aiheuttavilla enterobakteereilla erityisreittejä tunnetaan kuusi (I-VI) (Bell ym. 2004, Preston ym. 2005). I-tyyppin erityisreitti vastaa mm. virulenssiin vaikuttavien, soluseinää hajottavien proteaasien erityksestä (Marits ym. 1999, Palacios ym. 2001). II-tyyppin erityisreitin kautta taas eritetään kasvisolukkoa hajottavat pektinaasit, sellulaasit ja Nip-toksiini (Lindeberg ym. 1996). II-tyyppin erityisreitin toiminnan voidaankin todeta olevan pektobakteerien virulenssin kannalta tärkein ominaisuus (Pirhonen ym. 1991). III-tyyppin erityisreitti on löydetty monilta *Pectobacterium*- ja *Dickeya*- lajeilta (Holeva ym. 2004, Pitman ym. 2008). Pcc-lajin III-tyyppin erityisreitin on todettu erittävän ainoastaan DspE-efektoria, joka osallistuu bakteerien infektion alkuvaiheeseen aiheuttaen kasvisolujen kuolemaa (Bogdanove ym. 1998, Kim ym. 2011, Hogan ym. 2013). Pektobakteereilta on löydetty lisäksi myös IV-, V-, ja VI-tyyppin erityisreitit, mutta niiden merkitys virulenssiin on toistaiseksi vielä tuntematon (Bell ym. 2004, Glasner ym. 2008, Liu ym. 2008, Mattinen ym. 2008)

1.4.4 Yhteistyöhön ja bakteereiden populaatiotiheyteen perustuva geenisäätely

Yhteistyö on monille bakteereille tärkeä ominaisuus. Joidenkin ryhmien, kuten esimerkiksi myksobakteerien ja aktinomykeettien ruokailu ja itiöiden tuottaminen tapahtuvat vain suuressa populaatiotiheydessä (Fuqua ym. 1994). Useilla eri bakteerilajeilla on havaittu solujenvälistä kommunikaatiota (Kaiser ym. 1993), joka voidaan havaita esimerkiksi parveilevana liikkumisena (Kearns 2010). Monet gram-negatiiviset bakteerit säätelevät biomolekyylien tuotantoa käyttämällä populaatiotiheydestä riippuvaista säätelymekanismia nimeltä *quorum sensing* (QS) (Whitehead ym. 2001). QS on tärkeässä roolissa monen eläin- ja kasvipatogeenin taudinaiheutuskyvyssä. Se säätelee mm. optimaalista populaatiotiheyttä ja virulenssia. Bakteerit erittävät soluseinän läpi liukenevia biomolekyyliä, esimerkiksi AHL-molekyyliä (asyylihomoseriinilaktoni), jotka ympäröivät solut havaitsevat. Kasvualustan AHL-konsentraation nousu vaikuttaa geenien ilmenemiseen ja sen kautta muutokseen yksittäisissä bakteerisoluihin ja koko populaatiossa (Engebrecht ja

Silverman 1984). Pektobakteerit käyttävät AHL-molekyyleihin perustuvaa säätelyä esimerkiksi IV-tyypin ja II-tyypin eritysureittien toiminnan ja kasvisolukkoa hajottavien entsyymien ja antibioottien tuoton säätelyyn (Jones ym. 1993, Pirhonen ym. 1993, Gardan ym. 2003, Liu ym. 2008). Tällä tavoin populaatio voi annostella tuottamiensa entsyymien, antibioottien ja toksiinien määriä tarpeen mukaan. On esitetty, että pektobakteerien QS-mekanismi viivyyttää soluseinää hajottavien entsyymien tuotannon aloittamista, kunnes bakterikonsentraatio on tarpeeksi suuri, jotta bakteerit pystyvät varmasti estämään kasvin puolustuksen (Salmond ym. 1995, Mae ym. 2001).

Pektobakteerien QS-mekanismin tuntemus on perustunut aikaisemmin bakterisolujen muodostamien, soluseinää hajottavien entsyymien ja muiden virulenssitekijöiden *in vitro* -tutkimuksiin (Pirhonen ym. 1993, Liu ym. 2008). Sen oletetaan olevan tärkeässä osassa bakteerin aiheuttaessa nekroosia kasvissa. Pektobakteerit ovatkin hyvin tehokkaita kasvisolukon tuhoajia, ja ne voivat tuhota solukkoa yhdessä osassa kasvia ja samaan aikaan manipuloida kasvin puolustusjärjestelmää toisaalla.

1.4.5 Bakteereiden välinen kilpailu elintilasta ja ravinteista

Bakteerit joutuvat usein kilpailemaan elintilasta ja ravinteista muiden mikrobien kanssa. Yksittäiset bakterisolut voivat jossain olosuhteissa kilpailla keskenään, mutta kilpailu on yleisempää eri populaatioiden välillä. Yksi kilpailustrategia on muuttaa kasvuympäristöä toiselle bakterikannalle epäsuotuisaksi säätelemällä ympäristön pH:ta (Kwan ym. 2013). Bakteerit voivat myös erittää kasvualustaan vieraan kannan soluja tuhoavia antimikrobisia yhdisteitä, bakteriosiinejä ja antibiootteja (Haas ym. 2003, Hibbing ym. 2010, Kazemi-Zaromi ym. 2016). Yhdisteet voivat tappaa kilpailevat solut joko rikkomalla soluseinää, hajottamalla DNA:ta ja RNA:ta tai estämällä peptidoglykaanisynteesin ja sitä kautta soluseinän tärkeiden rakenteiden muodostuksen (Riley 1998). Bakteriosiineiksi kutsutaan bakteerien tuottamia proteiineja ja peptidejä, jotka tuhoavat lähisukuisen bakteerilajin soluja tai estävät niitä lisääntymästä, mutta eivät vaikuta oman kannan soluihin, kun taas antibiootit vaikuttavat myös bakteerilajeihin, jotka eivät ole sukua tuottajakannalle (Hibbing ym. 2010, Yang ym. 2014). Bakteriosiinien tuotto voi indusoida kun kasvuympäristön ravinteista on pulaa. Jopa 99% prosenttia bakteereista on arveltu tuottavan ainakin yhtä bakteriosiiniä (Klaenhammer 1988, viitattu artikkelissa Chuang ym. 2007). Pektobakteerien erittämiä bakteriosiinejä

ovat mm. eriaiset karosiinit ja karotosiinit (Nguyen ym. 2001, Roh ym. 2010, Chan ym. 2011, Kazemi-Zaromi ym. 2016). Bakteriosiinit toimivat yleensä parhaiten tai jopa ainoastaan läheistä sukua olevia kantoja vastaan (Grinter ym. 2012). Läheistä sukua olevat bakteerilajit elävät yleensä samoissa kasvinosissa ja kilpailevat elintilasta ja ravinteista keskenään. Ne ovat todennäköisesti lajiutuneet eri lajeiksi vasta lyhyen ajan sisällä, jonka vuoksi niiden luontainen elinympäristö on samanlainen. Bakteerien ei kuitenkaan kannata erittää bakteriosiineja ympäristöön jatkuvasti, sillä kilpailevat kannat voivat kehittyä nopeasti vastustuskykyisiksi. Useat kannat säätelevätkin toksisten yhdisteiden tuottoa QS:n avulla ja käyttävät esimerkiksi juuri antimikrobihyökkäystä vasta kun oma populaatiotiheys on tarpeeksi suuri (Pessi ja Haas 2000, Horinouchi 2002, Barnard ym. 2007, Duerkop ym. 2009). Liikkumiskykyiset bakteerit voivat myös hakeutua toisen kannan bakteerisolujen lähelle ja vahingoittaa niiden solukalvoja (Mashburn ym. 2005). Tämä tuhoaa solun ja vapauttaa sen ravinteita kasvualustaan, jossa ne ovat jälleen vapaasti käytettävissä. Bakteerit voivat myös vältellä epäsuotuisaa kilpailua siirtymällä muualle.

Yksi passiivisista kilpailustrategioista on myös asuttaa uusia elinlokeroita esimerkiksi tuottamalla biomolekyylejä jotka mahdollistavat kiinnittymisen pinnoille. Esimerkiksi *Pseudomonas fluorescens* pystyy elämään nestemäisen kasvualustan rajapinnalla muodostamalla polysakkaridien avulla kelluvan biofilmin, joka mahdollistaa kasvuston hapen saannin (Rainey ja Travisano 1998). Polysakkaridien tuottoa säädellään QS:n avulla, sillä liian suuri bakteerikasvusto vajoaa pohjaan ja hapensaanti estyy. Uutta elintilaa saadaan myös syrjäyttämällä jokin samasta tilasta kamppaileva laji: esimerkiksi *P. aeruginosa* erittää rasvahappoja, jotka estävät muiden kantojen kasvun samassa biofilmissä (Irie ym. 2005, Davies ja Marques 2009). Pektobakteerien vastaavia ominaisuuksia ei kuitenkaan tunneta vielä kovin hyvin.

1.5 Pektobakteereiden tunnistus

Perunalla tavattavien pektobakteerien tunnistus on perustunut lähes yksinomaan kantojen biokemiallisten ja geneettisten erojen vertailuun (Toth ym. 2001). Pektobakteerien lajinsisäinen variaatio on kuitenkin suurta, ja tutkimuksissa on tavattu kantoja, joiden lajinmääritys näillä menetelmillä on ollut mahdotonta (Oliveira ym. 2003, Yahiaoui-Zaidi ym. 2003). Pitman tutkijoineen (2008) löysivät Pcc-kantoja, joiden PCR-tunnistus ei

onnistunut lajille suunnitelluilla alukkeilla, ja 16S rRNA -sekvenssin mukaan piirrettyssä fylogeneettisessä puussa kanta sijoittui samaan joukkoon *P. wasabiaen* kanssa. Sama on havaittu myös Suomessa, sillä *P. wasabiae* -bakteeriksi hiljattain tunnistettu kanta on eristetty jo 80-luvulla Viikin pelloilla kasvaneesta perunan varresta (Nykyri ym. 2012).

Tyvimätää aiheuttavat bakteerit ovat fakultatiivisia anaerobeja, gram-negatiivisia sauvoja, joilla on flagellat (Perombelon ym. 1980). Niiden biokemiallisista ominaisuuksista tiedetään melko paljon. Ne ovat yleensä katalaasipositiivisia, oksidaasinegatiivisia, fermentoivat glukoosia, pelkistävät nitraattia, tuottavat β -galaktosidaasia ja H_2S :ää sekä pystyvät hyödyntämään L-arabinoosia, D-galaktoosia, D-glukoosia, glyserolia, D-mannoosia, D-riboosia ja sukroosia, mutta eivät kykene tuottamaan happoa adonitolista (Perombelon ym. 1980, Schaad ym. 2001).

16S-ribosomi-RNA (16S-rRNA) kuuluu esitumallisilla tavattavaan 30S-ryhmään, joka on ribosomi-70S:n alaryhmä. Se on 1542 emäsparin pituinen ja sitä koodaavia geenejä eli 16S-DNA:ta käytetään eri bakteereiden sukulaisuussuhteita tutkittaessa (Case ym. 2007). Yhdellä bakteerilla voi olla useita eri 16S-rRNA-sekvenssejä. 16S-23S rDNA sekvenssien avulla tehtävä määrittely on aikaisemmissa tutkimuksissa osoittautunut käytännölliseksi märkämätää aiheuttavien enterobakteerien tunnistamisessa (Fessehaie ym. 2002). 16S-23S rDNA -sekvensoinnin lisäksi malaattidehydrogenaasigeenin (*mdh*) ja agonitaasigeenin (*acnA*) sekvensointia on käytetty avuksi *Pectobacterium*- ja *Dickeya*-lajien sukulaisuussuhteita selvitettäessä (Pitman ym. 2010, Baghaee-Ravari ym. 2011).

1.6 Tutkimuksen tavoitteet

Tässä maisterintutkielmassa haluttiin tutkia vuonna 2004-2005 eristettyjen (Laurila ym. 2008) ja muista tunnetuista Pcc-kannoista poikkeavien Pcc-kantojen merkitystä perunansolukossa. Tyvi- ja märkämätäisistä perunan solukoista eristetyt Pcc-kannat voitiin jakaa kahteen ryhmään fylogeneettisessä analyysissä: yhdessä ryhmässä oli pääosin varresta eristettyjä Pcc-kantoja ja toisessa pääosin mukuloista eristettyjä kantoja (Pasanen ym. 2013). Tässä tutkimuksessa kantojen jakaantuminen fylogeneettisesti kahteen ryhmään haluttiin ensin varmistaa sekvensoimalla *acnA*-geeniä koodaava alue.

Samoista varsinäytteistä, joissa Pcc-kantoja esiintyi, ei voitu eristää tunnettuja tyvimätää aiheuttavia pektobakteereita, joten tuntui ilmeiseltä että eristetyt kannat olivat

aiheuttaneet tyvimädän. Aiemmassa kenttäkokeessa varsista eristetyillä Pcc-kannoilla ei kuitenkaan saatu aikaan tyvimätäoireita, minkä vuoksi niiden mahdollista taudinaiheutuskykyä haluttiin vielä selvittää tässä tutkimuksessa lisäkokein. Tutkielmassa haluttiin lisäksi pohtia sitä mahdollisuutta, että kannat olisivat saapuneet jo valmiiksi tyvimätäiseen varsisolukkoon infektion jo ollessa käynnissä, minkä jälkeen ne olisivat syrjäyttäneet infektion aiheuttaneen bakteerin. Tämä saattaisi olla mahdollista jos kantojen voitaisiin todeta tuottavan toksisia molekyyylejä joilla ne kykenisivät valtaamaan alaa muilta tyvi- ja märkämätäbakteereilta. Yksi tutkimushypoteeseista oli, että aikaisemmissa tutkimuksissa pääosin perunanvarsista eristetyt kannat tuottavat toksisia yhdisteitä, jotka estävät muita tunnettuja tyvimätäbakteereja kasvamasta.

Kantojen mahdollista merkitystä tyvimädän torjunnassa tutkittiin kenttäkokeessa, jossa haluttiin selvittää, edistävätkö kannat perunan terveyttä kentällä estämällä tyvimätää aiheuttavien kantojen kasvua, ja olisiko niistä näin ollen hyötyä taudin biologisessa torjunnassa. Toinen tutkimushypoteesi oli, että kantojen käyttö tyvimätäbakteereilla saastuneella perunalla kenttäkokeessa tuottaa vesikontrollia terveemmän sadon. Kokeeseen valittiin kaksi huonokuntoista perunaerää, joissa oletettiin olevan jo valmiiksi tyvi- ja märkämätäoireita aiheuttavia bakteereita.

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Käytetyt kannat

Tutkittavat bakteerikannat eristettiin alun perin mädäntyneistä perunoiden mukuloista ja varsista Jokioisissa (Laurila ym. 2008). Kantojen on todettu jakautuvan fylogeneettisesti kahteen ryhmään: ensimmäiseen ryhmään sijoittuvat pääosin varsissa tavattavat Pcc-kannat, joita tässä tutkimuksessa edustavat isolaatit s0416, s0417 ja s0421, ja toista ryhmää edustaa yksi varresta eristetty mutta ominaisuuksiltaan mukulakantojen kaltainen kanta s0427 sekä mukulasta eristetyt kannat t0437 ja t0438. Vertailussa käytettiin muita tunnettuja *Pectobacterium*- ja *D. solani*-kantoja, jotka oli tilattu kansainvälisistä kantakokoelmista ja Viikin Hambi-kokoelmasta (taulukko 1).

2.2 Kasvatusalustat ja kasvuolosuhteet

Kantoja kasvatettiin Nutrient Agar (NA) maljoilla +28°C:ssa ja LB-maljoilla (Luria Broth 25 g (Sigma, St. Louis, MO, USA) ja agar 15 g / 1000 ml tai 7.5 g / 1000 ml), sekä nestemäisessä LB-alustassa 200 rpm:n ravistelussa. Antibioottiresistenttien kantojen kasvatusalustaan lisättiin ampicilliinia (konsentraatio 150 µg/ml (Sigma, St. Louis, MO, USA)). Bakterisidien tuottoa testattiin minimialustalla (liite 2). Kaikkia maljoja ja putkia kasvatettiin +28°C:ssa 1-2 vuorokautta. Pektolyyttisten bakteerien tunnistamisessa käytettiin kristallivioletti-peptaattimaljoja (CVP) (Pérombelon ja Hyman 1986). Kaikki tutkimuksessa käytetyt isolaatit säilytettiin 23% glyseroliliuoksessa -80°C:ssa. Biokemiallisten testien reseptit löytyvät teoksesta Schaad ym. 2001.

Taulukko 1. Tutkimuksessa käytetyt bakteerikannat ja niiden lajit. Kantanumeron edellä oleva s = eristetty perunanvarresta, t = eristetty mukulasta. Kannan perässä oleva T = tyyppikanta.

LAJI	KANTA
Ryhmä 1	
<i>Pectobacterium carotovorum</i> alalaji <i>carotovorum</i>	s0416
<i>Pectobacterium carotovorum</i> alalaji <i>carotovorum</i>	s0417
<i>Pectobacterium carotovorum</i> alalaji <i>carotovorum</i>	s0421
Ryhmä 2	
<i>Pectobacterium carotovorum</i> alalaji <i>carotovorum</i>	s0427
<i>Pectobacterium carotovorum</i> alalaji <i>carotovorum</i>	t0437
<i>Pectobacterium carotovorum</i> alalaji <i>carotovorum</i>	t0438
<i>Pectobacterium carotovorum</i> alalaji <i>carotovorum</i>	SCC1
<i>Pectobacterium carotovorum</i> alalaji <i>carotovorum</i>	CFBP 2046T
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	Eca1039
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	SCRI1043
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	s0409
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	Hambi 1429T, synonyymi ICMP 1526
<i>Pectobacterium wasabiae</i>	SCC3193
<i>Pectobacterium wasabiae</i>	s0429-6
<i>Pectobacterium wasabiae</i>	CFBP 3304T, synonyymi ICMP 9121
<i>Pectobacterium carotovorum</i> alalaji <i>odoriferum</i>	ICMP 11533
<i>Pectobacterium carotovorum</i> alalaji <i>brasiliense</i>	CFBP 6617T
<i>Pectobacterium betavascularum</i>	ICMP 4226T

<i>Dickeya solani</i>	s0432-1
<i>Dickeya solani</i>	PRI 2019
<i>Dickeya solani</i>	IPO 2222T
<i>Salmonella enterica</i>	SeeLT2

2.3 DNA-sekvensointi

Kenttäkokeessa käytetyistä *Pcc*-kannoista haluttiin sekvensoida osa *acnA*-geenin koodaavasta sekvenssistä, jotta voitiin vahvistaa kantojen jakaantuminen fylogeneettisesti kahteen ryhmään. Genominen DNA eristettiin yön yli kasvaneista kannoista käyttämällä DNEasy® Blood and Tissue Kit -pakkausta (Qiagen). PCR-reaktio 25 µl: 10 µl monistettavaa DNA:ta, 0.2 U *Taq*-polymeraasia (Roche Diagnostics), 2.5 µl 10- kertaista DNA-puskuria, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP-sekoitusta ja 0.2 µmol kutakin aluketta. PCR-ohjelma suoritettiin Mastercycler-merkkisellä PCR-laitteella (Eppendorf). Käytetty PCR-ohjelma: denaturaatiolämpötila +95 °C 5 minuutin ajan, 35 monistussykliä, joissa +94 °C 30 s, +53 °C 30 s, +72 °C 60 s, jonka jälkeen terminaalinen pidennysvaihe +72 °C 7 min ajan. Kontrollina käytettiin kantaa SCC3193. Alukkeet olivat *acnA1* (Sigma, 5'-3' GCCTCGCCGCCGCTGGTGGT) ja *acnA2* (Sigma, 5'-3' CCGCGCATCATCACTTCATG). PCR- tuote ajettiin elektroforeesilla ja eristettiin geelistä käyttäen E.Z.N.A™ Gel extraction kitia (Omega bio-tek, Inc) ja lähetettiin Helsingin Yliopiston sekvensointiyksikköön. Osittaisia geenisekvenssejä vertailtiin käyttämällä Clustal Omega -ohjelmaa (liite 2). Tyypikannat tilattiin CFBP-kantakokoelmasta ja niiden sekvenssit NCBI:n tietokannasta (taulukko 3). Kannoista muodostettiin fylogeneettinen puu *acnA*-sekvenssien avulla. Saaduilla sekvensseillä etsittiin yhteneväisyyksiä tyypikantojen sekvensseistä NCBI:n BLAST-tietokantahaun avulla (Agostino 2012).

2.4 Bakteriosiinien tuotto

Tutkimuksessa haluttiin testata mukuloista ja varsista eristettyjen *Pcc*-kantojen kykyä estää virulenttien kantojen kasvua erittämällä alustaan antimikrobisia yhdisteitä, sekä selvittää eroavatko ryhmät 1 ja 2 toisistaan toksiinien tuoton suhteen. Bakteerikannat inokuloitiin maljalta koeputkiin, joissa oli 5 ml LB-kasvulaustaa, ja niitä kasvatettiin + 28 °C yön yli. Tämän jälkeen kasvatusliemien OD₆₀₀-arvo säädettiin arvoon 0,1 steriiliin

LB-liemen avulla. Kannat yhdistettiin uuteen koepukeen 5 ml:aan LB-lientä, 50 µl kumpaakin testattavaa kantaa. Kummankin bakteerin määrä sekaviljelmässä määritettiin maljaamalla 10^{-3} , 10^{-4} ja 10^{-5} -laimennokset erillispesäkkeiksi kokeen alussa ja uudelleen 3-4 tunnin päästä. *D. solani* s0432-1 -kannan pesäkkeet pystyy selkeästi erottamaan Pcc-kantojen pesäkkeistä, joten ne laskettiin suoraan LB-maljoilta. Kokeissa, joissa kantoja kasvatettiin Pcc SCC1 -kannan kanssa, kaikki pesäkkeet siirrostettiin kasvamaan ampisilliini- ja LB-maljoille, sillä kaikki testattavat kannat kasvavat LB-maljalla, mutta ainoastaan SCC1-kanta kykenee kasvamaan ampisilliinimaljalla koska se on luontaisesti resistentti.

Antimikrobisten yhdisteiden tuottoa testattiin myös minimimaljoilla, joille bakteerisoluja maljattiin pehmytagariin sekoitettuna. Testattavat kannat inokuloitiin pisteinokulaationa pehmytagariin siirrostetun vertailukannan päälle. Vertailukantoja oli kasvatettu ensin koeputkissa yön yli, jonka jälkeen 50 µl kasvuliuosta sekoitettiin 5ml:aan puolijähmeää minimalustaa. Seos levitettiin minimimaljalle, sen annettiin jähmettyä ja testattavat kannat siirrostettiin alustaan hammastikulla kevyesti painamalla. Maljoja kasvatettiin 2 vuorokautta ja estorenkaiden koko ja tyyppi kirjattiin ylös. Estorengaat jaettiin kuuteen tyyppiin niiden koon ja selkeyden mukaan: 0 = ei estorengasta; 1 = pieni ja heikosti havaittava, samea estorengas; 2 = keskikokoinen, samea estorengas; 3 = suuri, samea estorengas; 4 = suuri, kirkas rengas epäselvällä diffuusioreunalla; 5 = suuri/selkeä ja kirkas estorengas selkeällä reunalla.

2.5 Kenttäkoe

Kenttäkokeessa haluttiin tutkia Pcc-kantojen roolia perunansolukossa, sekä testata voisivatko bakteerikannat vähentää perunassa ja maaperässä luontaisesti tavattavista muista bakteereista johtuvia tyvimätäoireita pellolla. Koe järjestettiin Jokioisissa kesällä 2010. Käytössä oli kaksi erityyppistä perunalajiketta, Rikea ja Fontane (Shafique ym. 2010), joiden epäiltiin olevan saastuneita muilla taudinaiheuttajilla. Mukulat inokuloitiin käänteisessä autoklavoinnissa alipaineen avulla (bakteeriliemien $OD_{600} = 0,2$) ja istutettiin toukokuun lopulla. Käsittelyksi valittiin kolme kantaa kummastakin sekvenssien avulla muodostetusta kantaryhmästä, ja kontrollina käytettiin tislattua vettä. Yksittäisiin ruutuihin istutettiin kuudella bakteerikannalla saastutettuja mukuloita sekä vesikontrollikäsittelyn mukuloita 7 riviin, 20 mukulaa / rivi. Koemalli oli lohkoittain satunnaistettu koe, jossa oli neljä kerrannetta. Jokaisella kannalla käsiteltiin yhteensä 80

mukulaa ja yhteensä kokeessa istutettiin 560 mukulaa. Palstojen leveys oli 5 m ja palstojen väliin sekä reunoille oli jätetty metrin levyinen kulkutie.

Perunoiden oireita tarkkailtiin kesän aikana. Kokeen lopulla ruutujen taimien keskipituus mitattiin ja lopullinen taimimäärä kirjattiin ylös. Kokeen lopuksi mukulat kerättiin, jokaisen kerranteen kokonaissato punnittiin ja mädäntyneiden mukuloiden osuus kirjattiin ylös.



Kuva 5. Kenttäkokeen koeruutuja Jokioisissa

Kenttäkokeen jälkeen kokeessa käytetyt Pcc-kannat haluttiin eristää perunansolukosta Kochin postulaattien mukaisesti. Kenttäkokeen aikana ei havaittu tyvimätäisiä versoja, joten kantoja yritettiin eristää kenttäkokeen jälkeen kerätyistä mukuloista. Mukuloiden kuorikerrosta rikottiin veitsellä ja niitä inkuboitiin kosteissa oloissa muutaman päivän ajan, kunnes bakteerien entsyymit alkoivat hajottaa solukkoa. Solukkoa maljattiin selektiiviselle CVP-alustalle, jotta pektolyttiset bakteerit saataisiin eroteltua muista bakteereista, minkä jälkeen kuoppia muodostavat bakteerit siirrostettiin puhtasviljelmiksi

2.6 Kenttäkokeen mukuloista eristettyjen kantojen lajinmääritys biokemiallisten ominaisuuksien ja sekvenssien perusteella

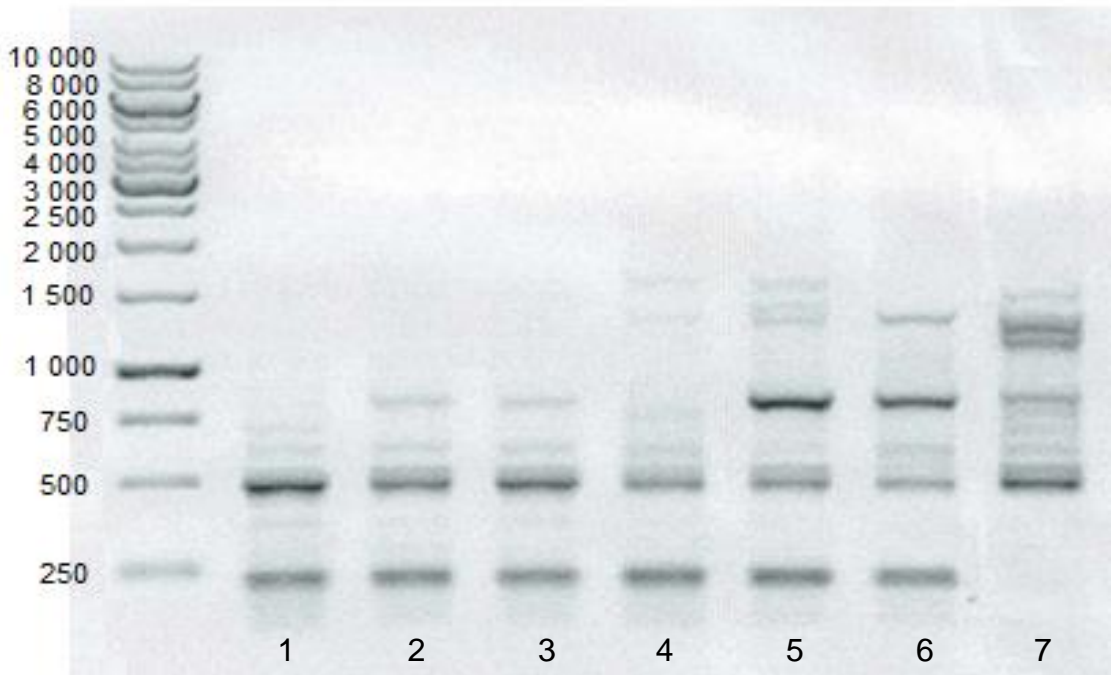
Osa kenttäkokeessa eristetyistä kannoista muodosti kuoppapesäkkeitä CVP-maljoilla. Näiden kantojen biokemiallisista ominaisuuksista testattiin gram-reaktio, oksidaasi- ja katalyyysiaktiivisuus, sukroosinpelkistyskyky, fakultatiivinen anaerobisuus, indolin tuottaminen tryptofaanista, ketometyyliklukosidin tuotto sekä kasvuston väri YDC-alustalla (Schaad ym. 2001, Perombelon ja Van Der Wolf 2002).

Kenttäkokeen jälkeen mukuloista eristettyjen kantojen ITS-alue haluttiin sekvensoida. PCR:ssä käytettiin alukkeita 114fja L1r, entsyyminä DyNAzyme™ (Finzymes Oy) ja PCR-ohjelmaa +94 °C 2 min, + 94 °C 1 min, +60 °C 1 min, +72 °C 1 min 30 s, tämä toistetaan 32 kertaa, +72 °C 10 min (Fessehaie ym. 2002). Tuote lähetettiin sekvensointiin alukkeilla L1r ja 1491f.

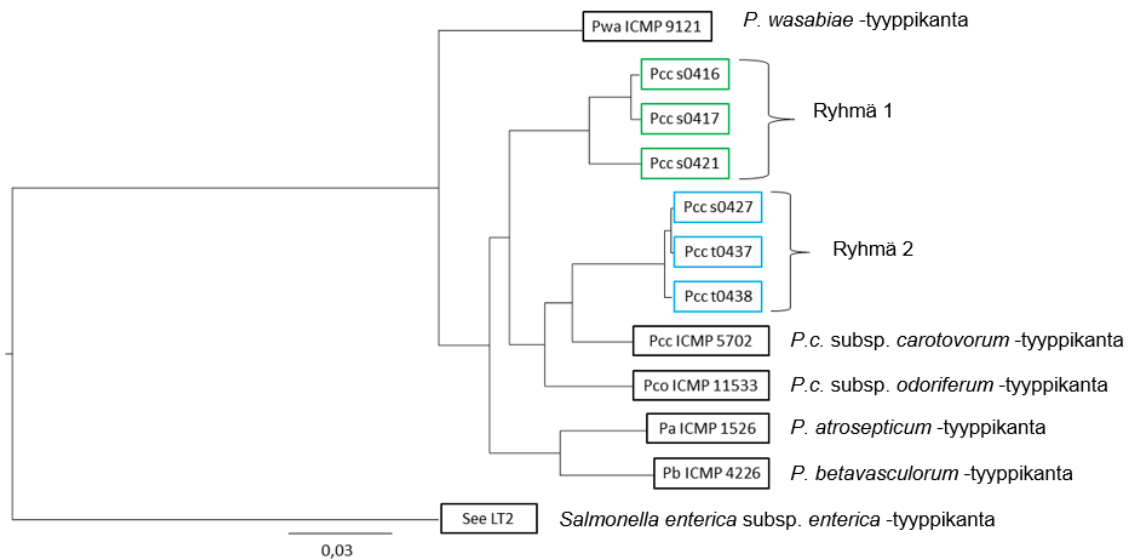
3 TULOKSET

3.1 Kantojen fylogeneettinen ryhmittely *acnA*-geenin sekvenssien avulla

Kokeessa käytettyjen Pcc-kantojen fylogeneettinen sijoittuminen kahteen ryhmään haluttiin varmistaa *acnA*-geenin sekvenssin perusteella. Geelikuva osoitti PCR-reaktion onnistuneen, vaikka geelissä näkyikin paljon epäspesifistä monistumista (kuva 6). Kannoista muodostettiin fylogeneettinen puu *acnA*-sekvenssien avulla (kuva 7).



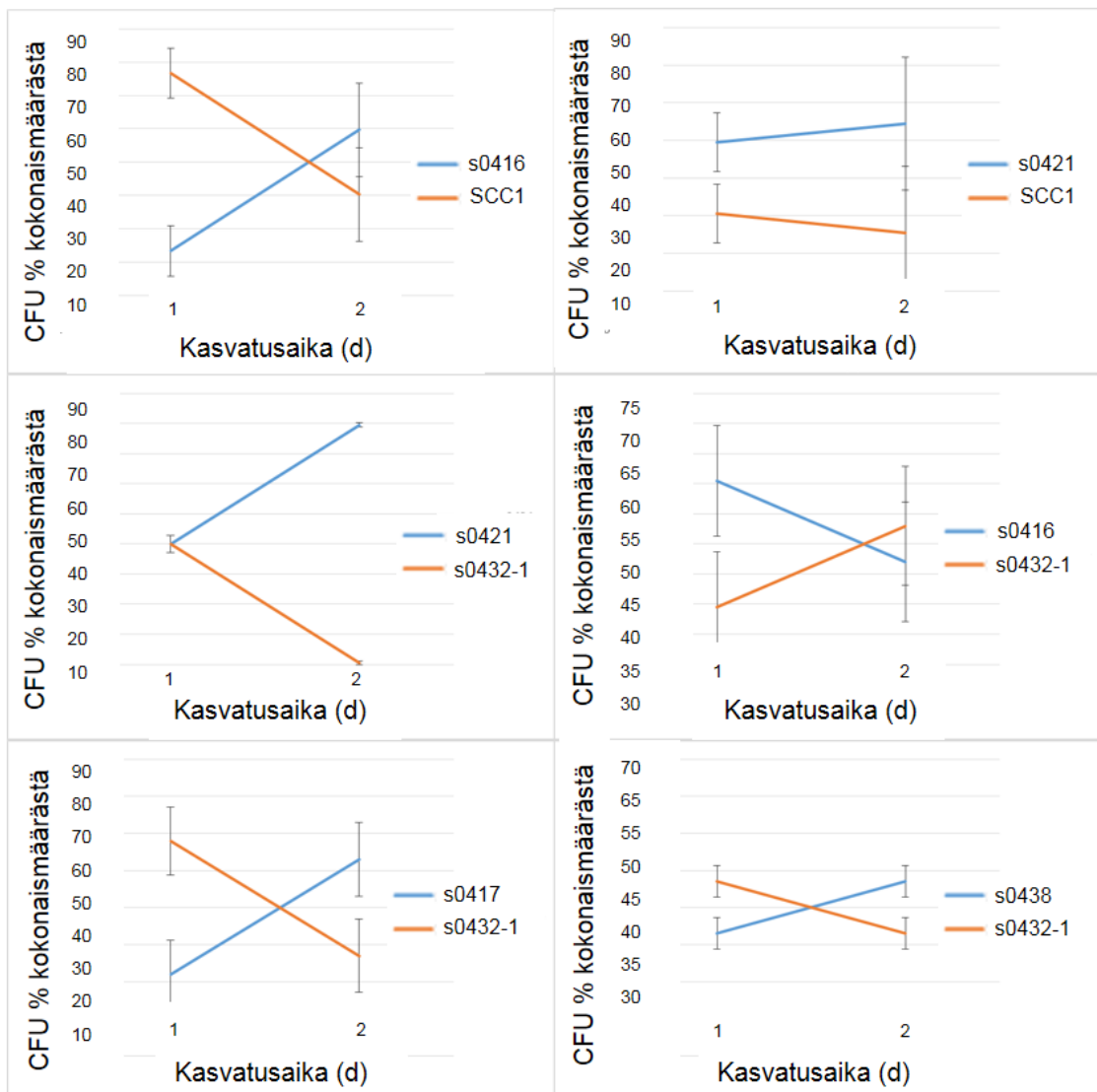
Kuva 6. Pcc-kannat geelissä *acnA*-geenin PCR:n jälkeen. Kannat 1-7 numerojärjestyksessä: s0416 s0417, s0421, s0427, t0437, t0438 ja SCC3193. Vasemmassa reunassa olevan kokostandardin avulla valittiin oikeanpituisen, noin 500 emäsparia pitkä fragmentti, jonka sisältämä DNA eristettiin geelistä ja sekvensoitiin.



Kuva 7. Tutkimuksessa käytettyjen Pcc-kantojen ja eri tyypikantojen sijoittuminen *acnA*-geenin sekvensoinnin perusteella fylogeneettiseen puuhun, jossa tutkittavat kannat muodostivat kaksi erillistä ryhmää. Ryhmä 2 sijoittui puussa lähemmäksi Pcc-lajin tyypikantaa.

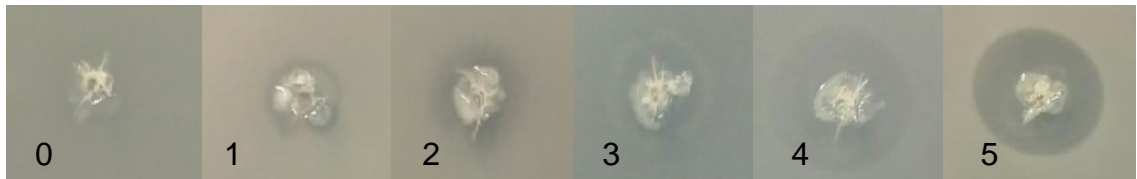
3.2 Sekvensoinnin perusteella muodostetut ryhmät erosivat toksiinien tuoton suhteen

Muista Pcc-kannoista poikkeavien kantojen kykyä kilpailla Pcc SCC1-kannan ja *D. solani* s0432-1 -kannan kanssa testattiin nestemäisessä kasvualustassa. Alustavat tulokset osoittavat, että ryhmän 1 kannat pystyivät useimmiten lisäämään konsentraatiotaan kun niitä kasvatettiin liemiviljelmässä yhdessä muiden kantojen kanssa. Varsista eristetyt kannat s0417 ja s0421 lisääntyivät voimakkaasti kasvaessaan samassa alustassa *D. solani*-kannan kanssa, kun taas kannan s0416 osuus viljelmästä jäi vähäiseksi *D. solani* s0432-1 -kannan kanssa kasvaessa mutta ei Pcc-kannan SCC1 kanssa (kuva 8). Koska kokeet olivat huomattavan suuritöisiä ja tulokset eivät olleet kovin selviä, päätettiin kokeita jatkaa käyttäen eri menetelmää.

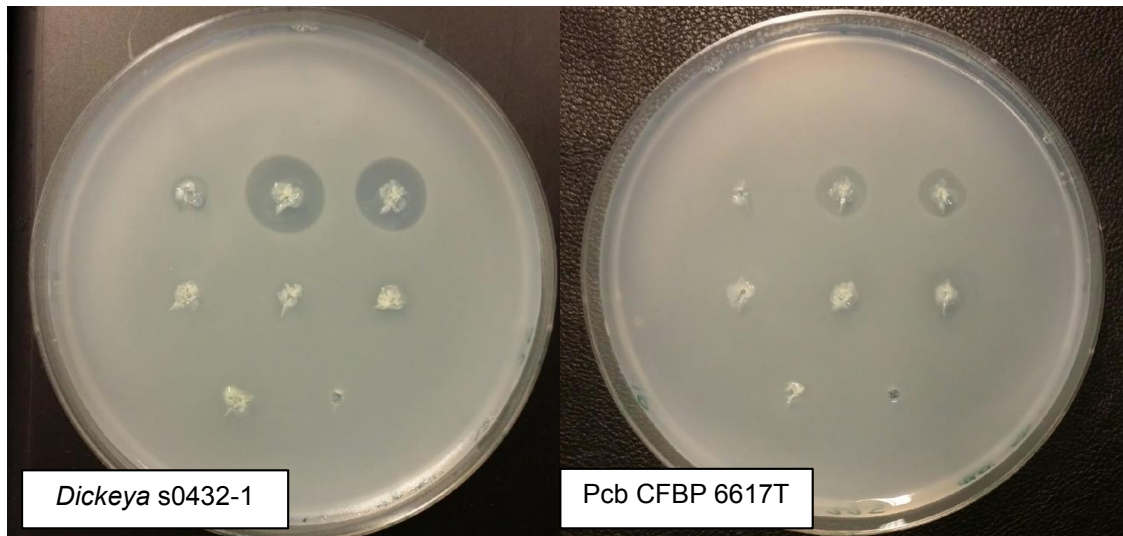


Kuva 8. Pcc-kantojen s0416, s0417, s0421 ja t0438 yhden vuorokauden kasvatuksen tulokset 5 ml:n liemikasvatuksissa, joihin oli inokuloitu kahta kantaa. Toisena kantana putkissa oli joko Pcc SCC1 tai *Dickeya solani* s0432-1.

Pektobakteerikantojen kykyä tuottaa muiden kantojen kasvua estäviä toksiineja testattiin kiinteällä minimi-alustalla, johon oli valettu vertailukanta pehmytagarissa ja siirrostettu testattava kanta hammastikulla. Positiivinen tulos havaittiin siirrostetun kannan ympärille muodostuvana estorengaana, kun siirrostetun kannan erittämät yhdisteet estivät pehmytagarissa olevia vertailukannan soluja kasvamasta. Estorengaat jaettiin kuuteen ryhmään renkaan koon ja selkeyden mukaan (kuvat 9-10 ja taulukko 2).



Kuva 9. Estorengastyypit 0-5: 1 = pieni diffuusiorengas ≤ 5 mm, 2 = keskikokoinen diffuusiorengas 6-9 mm, 3 = suuri mutta epäselvä diffuusiorengas ≥ 10 mm, 4 = suuri ja kirkas diffuusiorengas ≥ 10 mm, 5 = suuri, kirkas ja selkeäraajainen rengas ≥ 10 mm.



Kuva 10. Perunasta eristettyjen Pcc-kantojen muodostamat estorengaat maljoilla, joilla pehmytagariin oli maljattu *Dickeya*-kanta s0432-1 sekä Pcb-kanta 6617T. Ylärivissä ovat ryhmän 1 kannat s0416, s0417 ja s0421, keskimmaisessä rivissä ryhmän 2 kannat s0427, t0437 ja t0438 ja alarivissä negatiivisina kontrolleina sama kanta kuin agarissa sekä puhtaalla hammastikulla tehty inokulaatio ilman bakteerikasvustoa.

Taulukko 2. Estorenkaat minimalustalla. Maljoille pistoinokulaationa siirrostetut kannat ovat sarakkeissa, pehmytagarin avulla maljatut vertailukannat riveillä. Kaikki kannat testattiin. Estorengastyypit kuten kuvassa 9, tyhjä ruutu = 0, ei estorengasta

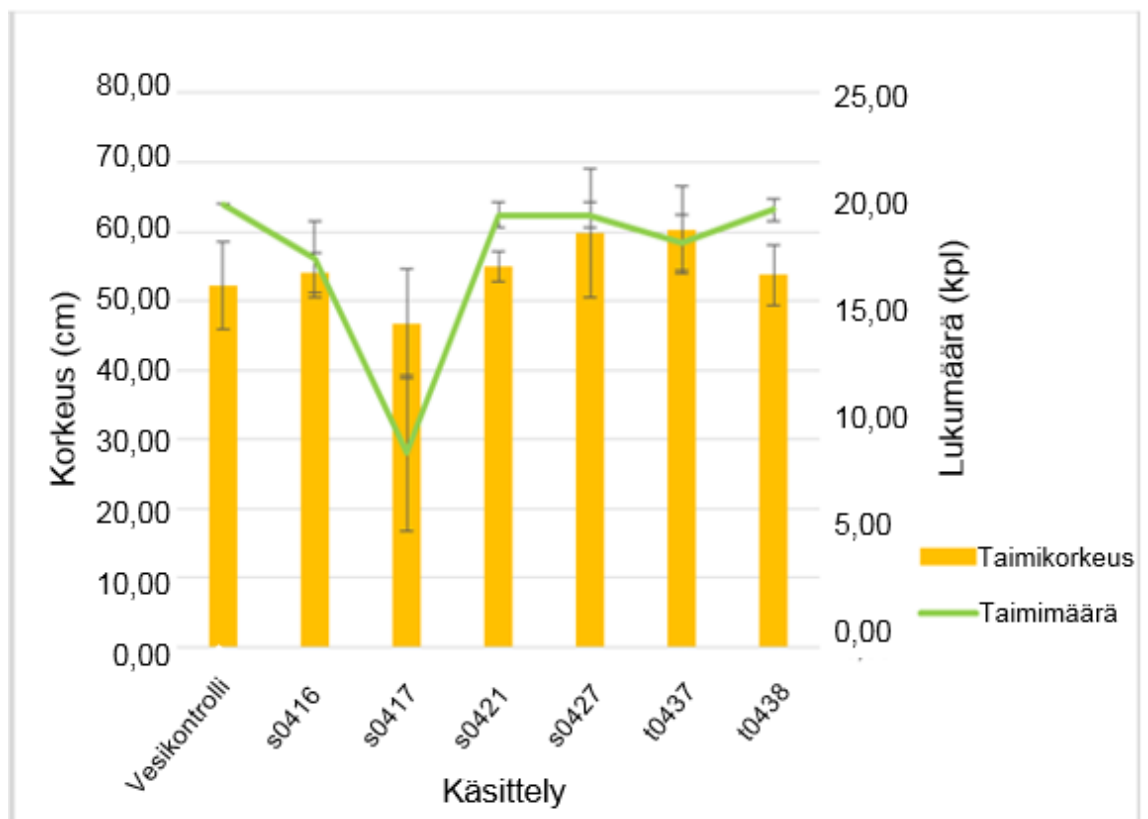
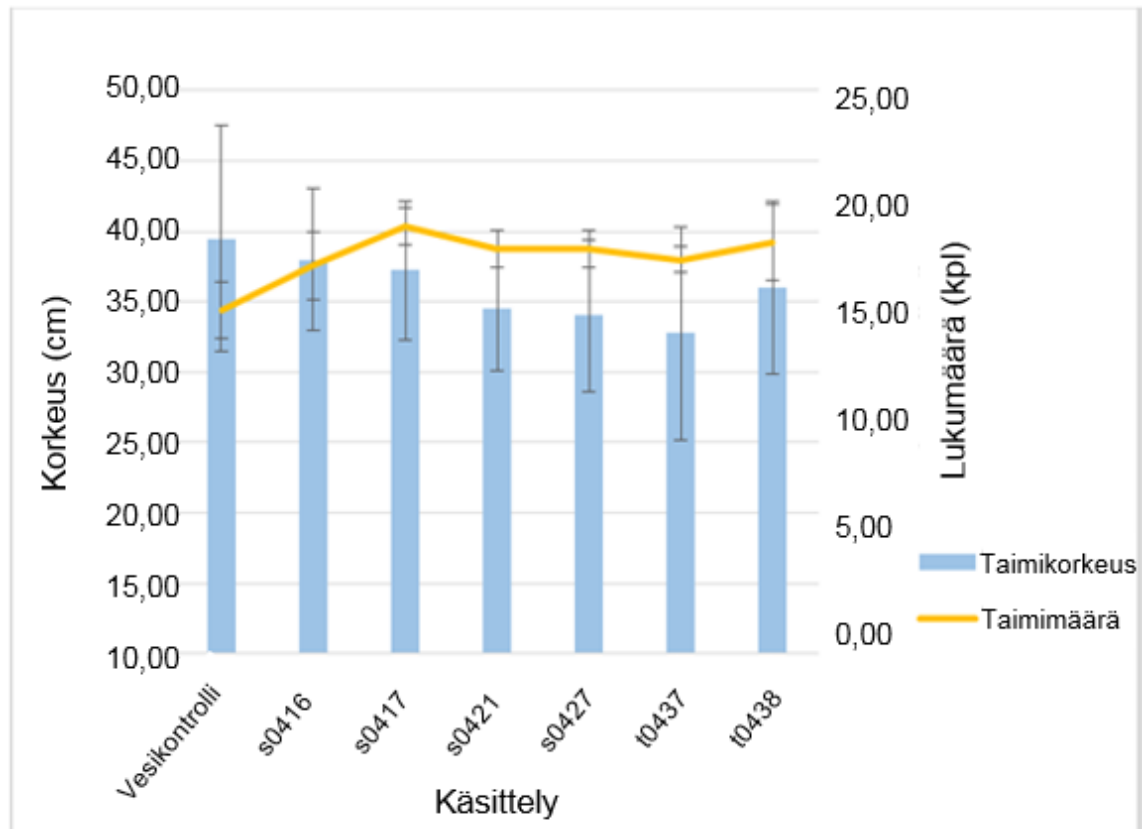
Maljatut vertailukannat	Siirrostetut kannat *																	
	Pcc s0416	Pcc s0417	Pcc s0421	Pcc s0427	Pcc t0437	Pcc t0438	Pcc SCC1	Pcc CFBP 2046	Pcb CFBP 6617	Pw 3193	Pw 0429-4	Pw CFBP 3304	Pa 1043	Pa 0409	Pa Hambi1429	D. solani s0432-1	D. solani IPO2019	D. solani IPO222
Pcc s0416		5	5					1		1	2		1		1	2	2	1
Pcc s0417										2	2					3	4	1
Pcc s0421		1								2	2					3	4	
Pcc s0427	1	2	2		1	1		1	2	2	2			1		3	3	
Pcc t0437	1	4	5					2		2	2					3	4	2
Pcc t0438	2	4	4						2	2	2					3	3	2
Pcc SCC1	2	2-3	2-3		2	2			3	2				1		3	2	2
Pcc CFBP 2046			2							1						3		
Pcb CFBP 6617	1	4-5	4-5		2	2				2	2			1		3	2	
Pw SCC3193		2	2															2
Pw 0429-4	2	2	2					1	1	2	2			1		2	4	2
Pw CFBP 3304	2	2	2						2	2	2							
Pa 1042									2							2	2	2
Pa 0409	1	2	1		1	1	3	1	2	1	1					2	2	2
Pa Hambi1429		1	1		1	1		1	1	1	1					2	2	2
D. solani s0432-1	3	5	5		1	1	1	2	2	1	1							
D. solani IPO2019		5	5						5					1				
D. solani IPO222		5	5		1				5					1				

*Maljoille siirrostetut bakteerilajit sekä eri fylogeneettisiin ryhmiin kuuluvat Pcc-kannat on merkitty eri värein.

3.3 Kenttäkokeen tulokset

Kenttäkokeessa haluttiin testata, vaikuttavatko märkämätäisistä mukuloista ja tyvimätäisistä varsista eristetyt Pcc-kannat perunan terveyteen ja tyvimädän muodostumiseen pellolla. Tätä tutkittiin saastuttamalla bakteerikannoilla kahden perunalajikkeen mukuloita ja tutkimalla niistä kasvatettujen kasvien terveyttä ja kokoa, sekä mittaamalla sadon määrä ja laatu kokeen jälkeen. Kokeessa käytetyt siemenperunaerät oli valittu sen vuoksi että siemenperunan tuottajan mukaan niissä epäiltiin olevan paljon muita taudinaiheuttajia. Kuten edellisessäkin kenttäkokeessa (Pasanen ym. 2013), tälläkään kertaa kasveissa ei havaittu tyvimätäisiä kasveja, mutta jotkin käsittelyt vähensivät selkeästi taimettumista (kuva 11). Tyvimätäisiä versoja ei löydetty, ja muutkin oireet koostuivat lähinnä kuivista lehdistä ja lehdenkärjistä sekä satunnaisista kloroottisista tai pienikasvuisista taimista (kuva 12). Rikealla edellä mainitut oireet ilmenivät pääasiassa varresta eristetyn kannan s0417 ja vesikontrollin kasveissa. Fontanella oireet havaittiin varresta eristettyjen kantojen s0417 ja s0421, mukulasta eristetyn kannan t0437 sekä vesikontrollin kasveissa. Muista selkeästi poikkeavan tuloksen antoi Fontanen s0417-kannan käsittely, sillä sen kasveista suuri osa jäi taimettumatta ja loputkin kasvit olivat pienikokoisia, kuivia ja kloroottisia.

Käsittelyiden tuloksissa oli merkittäviä lajikkeenvälisiä eroja. Rikean vesikontrolli oli lajikkeen tervein, kun taas Fontanen kohdalla vesikontrollin kasvien taimikorkeus ja sadon määrä olivat alhaiset (kuva 11, taulukko 3). Tuloksiin vaikuttaa varmastikin kesän 2010 poikkeukselliset helteet ja normaalitasoa vähäisempi sademäärä (Ilmatieteen laitoksen vuositilastot). Tuloksista voidaan päätellä, että kannat saattoivat parantaa yhden lajikkeen terveyttä, kun taas toisessa lajikkeessa niillä oli perunan terveyttä huonontava vaikutus. Vaikka käsittelyt eivät tuottaneet varsinaisia tyvimätäioireita, havaittiin joidenkin niistä mukuloissa muita enemmän mätää kokeen jälkeen. Kenttäkokeen tulokset eivät kuitenkaan anna syytä olettaa, että poikkeavat Pcc-kannat toimisivat antagonisteina vähentäen taudinoireita pellolla.



Kuva 11. Rikean (yllä) ja Fontanen (alla) keskimääräinen taimikorkeus sekä keskimääräinen taimien lukumäärä kenttäkokeen päättyessä



Kuva 12. Kenttäkokeen aikana ei havaittu juurikaan tyvimätäoireita. Suuri osa kasveissa havainnoiduista oireista johtui luultavasti muista tekijöistä kuin bakteerikäsittelyistä. Oireita olivat kellertävät ja rusehtavat laikut lehdistä, kellertävät ja rusehtavat lehdet ja lehden kärjet, kuivuneet lehdykät, harmaat ja kuivuneet versojen kärjet ja kokeen loppupuolella harmahtavat laikut varsissa.

Taulukko 3. Rikean ja Fontanen kokonaissato ja mädän solukon määrä

	Kokonaissato (kg), Rikea		Mädän solukon määrä (kg), Rikea	
	Keskiarvo	Keskihajonta	Keskiarvo	Keskihajonta
Vesikontrolli	9,601	1,762	0,140	0,109
s0416	9,627	0,212	0,028	0,032
s0417	10,190	1,496	0,069	0,137
s0421	9,721	1,599	0,027	0,053
s0427	9,315	2,029	0,000	0,000
t0437	8,673	1,122	0,004	0,008
t0438	9,326	0,383	0,042	0,084

	Kokonaissato (kg), Fontane		Mädän solukon määrä (kg), Fontane	
	Keskiarvo	Keskihajonta	Keskiarvo	Keskihajonta
Vesikontrolli	10,209	1,004	0,000	0,000
s0416	12,193	1,089	0,033	0,066
s0417	3,855	1,307	0,353	0,150
s0421	10,912	1,004	0,087	0,106
s0427	11,663	1,184	0,000	0,000
t0437	11,702	0,662	0,008	0,016
t0438	10,349	0,781	0,044	0,088

3.4 Kenttäkokeen mukuloista eristettyjen kantojen lajinmääritys

Kenttäkokeessa käytetyt kannat haluttiin eristää kokeen jälkeen mätäisistä mukuloista. Kantojen lajinmäärityksessä käytettiin apuna biokemiallisia testejä, mutta niiden tulokset olivat epämääräisiä eikä tuloksia esitetä. Vaikka osa kenttäkokeen mukuloista eristetyistä kannoista oli biokemiallisilta ominaisuuksiltaan Pcc-kannan kaltaisia, osoitti ITS-alueen sekvensointi niiden olevan yhtä lukuunottamatta muita, luonnossa ja maaperässä yleisesti esiintyviä bakteereita.

Kantojen ITS-alueelle löytyi homologiaa useista eri suvuista. Bakterikannalla t0438 käsitellyn kasvin satomukulasta eristetyn bakterikannan sekvenssi antoi BLAST-haussa homologiaa myös Pcc-kannoista (id-% 95-96, E 0.0), mutta ne löydettiin 16S-23S -alueelta. Listan kärkeen sijoittuivat Pcc-kannoista Pcc t0439 (id-% 95, E 0.0), Pcc t0433 (id-% 95, E 0.0), Pcc t0444 (id-% 95, E 0.0), Pcc t0443 (id-% 95, E 0.0) ja Pcc t0403 (id-% 95, E 0.0), Pcc t0435-5 (id-% 95, E 0.0) ja Pcc t0438 (id-% 95, E 0.0). Eristetyllä kannalla oli siis yhtäläisyyksiä Pcc-kannan t0438 kanssa, mutta yhtäläisyys oli kuitenkin vain 95%, joten tulosten perusteella ei voida olla varmoja onko kyse samasta kannasta. Linjauksesta näkyi että sekvenssit olivat huomattavan homologisia aminopäässä, jossa nukleotidit 1- 450 ovat lähes samat melkein kaikissa tuloksissa, kun taas karboksipäässä oleva saman pituinen alueen homologia oli alempi.

4 TULOSTEN TARKASTELU

4.1 Pcc-kannat voitiin jakaa kahteen ryhmään *acnA*-sekvenssien avulla

AcnA-geenin sekvensointi todisti että tutkimuksessa käytetyt Pcc-kannat jakautuvat selkeästi kahteen ryhmään, kuten Pasanen tutkimusryhmineen oli jo aikaisemmin havainnut (Pasanen ym. 2013). Ryhmä 1 pitää sisällään varresta eristetyt Pcc-kannat, ja ryhmä 2 yhden varresta eristetyn kannan ja kaksi mukulasta eristettyä kantaa. Koska kantojen jakaantuminen voitiin havaita selkeästi jo *acnA*-sekvenssien avulla piirrettyssä puussa, ei muita geenejä ollut tarpeen sekvensoida tässä työssä.

4.2 Kantojen toksiinintuottokyvyssä oli eroja

Osa perunanvarresta eristetyistä kannoista eritti kasvualustaan yhdisteitä, jotka estivät tehokkaasti muiden tyvimätäbakteerien kasvua. Perunanvarresta eristetyt kannat muodostivat eriasteisia estorenkaita mm. kantoja Pcc SCC1, *D. solani* s0432-1 ja *P. carotovorum* alalaji *brasiliense* CFBP 6617 vastaan, kun taas mukulasta eristetyt kannat eivät pystyneet estämään muiden kantojen kasvua yhtä tehokkaasti. Varresta eristetty mutta fylogeneettisesti mukulasta eristettyjen kantojen kanssa ryhmittäytyvä kanta Pcc s0427 muistutti ominaisuuksiltaan mukulassa viihtyviä kantoja, joten toksiinien tuoton suhteen ei ole olennaista mistä kasviosasta kanta on eristetty. Tuloksien perusteella voidaan olettaa, että varsista eristetyt kannat saattaisivat toimia antagonistina kasvissa. Tulokset osoittivat myös, että muille lähisukuisille kannoille toksisten yhdisteiden tuotto on yleinen pektobakteereiden ominaisuus. Vastaavia tuloksia on saatu aikaisemmissakin tutkimuksissa (Kazemi-Zaromi ym. 2016). Tuloksista voidaan päätellä myös että mukuloissa yleisesti esiintyvät Pcc-kannat sekä Pa-kannat olivat muita testattavia kantoja heikompia toksisten yhdisteiden tuoton suhteen. Myöskään wasabista eristetty *P. wasabiae* -tyyppikanta CFBP 3304 ei muodostanut estorenkaita mitään perunasta eristettyä kantaa vastaan.

4.3 Kannat eivät vähentäneet tyvimätäoireita kenttäkokeessa

Kesä 2010 oli poikkeuksellisen kuuma ja kuiva, joka luultavasti vaikeutti bakteerien kasvua kenttäkokeen aikana. Kasvukauden korkeiden lämpötilojen voisi olettaa suosivan luontaisista taudinaiheuttajista *D. solania*, sillä sen optimilämpötila on pektobakteereja korkeampi. Kenttäkokeen kasvit olivat kuitenkin yleisesti ottaen terveitä vaikka niiden oletettiin olevan heikkolaatuista siemenperunaa jossa oli paljon taudinaiheuttajia.

Käytetyt perunalajikkeet erosivat toisistaan. Fontane oli kokonaisuudessaan Rikeaa terveempi. Fontanen vesikontrollin kasvien korkeus oli lajikkeen toiseksi pienin, joka voi johtua siitä että mukuloiden kasvu on lähtenyt käyntiin muita käsittelyitä hitaammin. Bakteerikäsittelyillä on siis saattanut olla suotuisa vaikutus kasvin alkuvaiheen kehitykseen. Joidenkin tyyppiä sitovien juuristobakteerien tiedetään edistävän isäntäkasvin kasvua ja kehitystä sekä myös kilpailevan muita mikrobeja vastaan, ja niitä onkin mahdollista käyttää sekä biolannoitteina että biologisessa torjunnassa (Bevivino

ym. 1998, Fessehaie ym. 2002, Vessey 2003). Kannan s0417 käsittely tuotti Fontanella poikkeuksellisia tuloksia. Taimettumattomia oli paljon ja taimettuneet kasvitkin olivat pieniä ja kloroottisia. Tämä havainto tukee tutkimusryhmän aiemmin saamia kenttäkokeen tuloksia (Pasanen ym. 2013). Kannalla s0417 käsitellyissä Fontanen mukuloissa havaittiin kenttäkokeen jälkeen myös eniten märkämätää. Perunanvarsissa viihtyvän kannan s0417 ei ole kuitenkaan havaittu aikaisemmissa tutkimuksissa olevan aggressiivinen taudinaiheuttaja.

Rikean kohdalla bakteerikäsitellyt kasvit olivat vesikontrollia lyhyempiä. Tämä saattaa johtua siitä, että käsittelyiden indusoima puolustusvaste kasvissa on käyttänyt kasvin metaboliatuotteita (Herms ym. 1992, Agrawal 1999, Heil ym. 2000). Vaikka käsittely on saattanut hidastaa kasvin alkuvaiheen kehitystä, on kasveista tullut kuitenkin kestävämpiä ja useampi niistä säilyi hengissä kokeen loppuun. Vastaava havainto tehtiin myös Rikealla kantojen s0427 ja t0437 käsittelyiden kohdalla, joiden kasvien taimikorkeus ja kokonaissato olivat jäänet alhaisiksi, mutta sato oli hyvälaatuista eikä märkämätää havaittu.

4.4 Kantojen ominaisuudet ja tunnistus

Kenttäkokeen jälkeen kasveista eristettyjen bakteerikantojen sellulaasinhajotuskyky oli huono ja niiden tuloksia ketometyyli-glukosidialustalla oli ajoittain vaikea tulkita. Pektobakteerien biokemiallisissa ominaisuuksissa on kuitenkin havaittu paljon lajiensisäistä variaatiota (Oliveira ym. 2003, Yahiaoui-Zaidi ym. 2003). Kokeessa käytettyjen kantojen ominaisuudet ovat myös monilta osin tyyppikantojen ominaisuuksista poikkeavia, joten lajinmääritys pelkästään biokemiallisten testien perusteella ei ollut riittävä, vaan eristetyt kannat tunnistettiin myös sekvenssitietoa käyttäen.

Kenttäkokeen loputtua mukuloista ei useista yrityksistä huolimatta onnistuttu eristämään kokeessa käytettyjä kantoja. Yksi Rikean mukuloista eristetyistä kannoista oli ITS-alueen sekvensoinnin perusteella Pcc-kannan t0438 kaltainen, ja vaikka sen lajia ei pystytty määrittämään kuuluu se todennäköisesti *Pectobacterium*-sukuun. Aikaisemmissa tutkimuksissa onkin havaittu, että joidenkin pektobakteerikantojen ITS-alueen sekvenssit voivat poikeata huomattavastikin tyyppikantojen sekvensseistä (Baghaee-Ravari ym. 2011). Muiden kenttäkokeen mukuloista eristettyjen kantojen sekvenssit olivat

samankaltaisia *Enterobacter*-, *Raoultella*-, *Citrobacter*-, *Cedecea*- tai *Klebsiella*-sukujen bakteerien sekvenssien kanssa. Jotkin *Klebsiella*-suvun bakteerit ovat ihmispatogeneja, ja *Klebsiella oxytoca* on yleinen maaperäbakteeri. Jotkin *Klebsiella*-suvun bakteerit edistävät kasvien terveyttä ja ehkäisevät mm. eräiden sienitautien kasvua, ja *Enterobacter cloacae* on todettu olevan tehokas *Fusarium*-sienen aiheuttaman kuivamädän torjunnassa (Khalil 2010).

Tutkimuksessa käytetyistä Pcc-kannoista suurin osa oli eristetty alunperin perunanvarresta, joka saattaa olla niiden luontainen elinympäristö. Tämän vuoksi niiden puuttuminen mukuloiden solukosta ei ole yllättävää. Kenttäkokeen aikana ei kuitenkaan havaittu tyvimätäisiä versoja, joten niistä ei pystytty eristämään taudinaiheuttajia.

5 JOHTOPÄÄTÖKSET

Kantojen *acnA*-geenin sekvenssien fylogeneettinen analyysi sijoitti varsista ja mukuloista eristetyt kannat selkeästi omiin ryhmiinsä. Tutkimuksessa käytetyt, pääosin varsista eristetyt, ryhmään 1 kuuluvat Pcc-kannat poikkeavat ominaisuuksiltaan tyyppikannoista muodostaen oman ainutlaatuisen ryhmänsä. Varsista eristetyt ryhmän 1 kannat eivät oletettavasti ole kuitenkaan rajoittuneet ainoastaan perunanvarsiin, sillä samanlaisia kantoja on löydetty myös mukuloista. Kokeet osoittivatkin, että kantojen jaottelussa fylogeneettinen sijainti on merkitsevämpää, kuin se mistä ne on alun perin eristetty. Tulokset tukevatkin tutkimusryhmän aiempaa havaintoa (Pasanen ym. 2013), jonka mukaan perunan varsien ja mukuloiden luontaiset pektobakteeripopulaatiot ovat ominaisuuksiltaan hyvin erilaisia, mutta niiden elinympäristö ei välttämättä rajoitu vain siihen osaan kasvia, mistä ne on alun perin eristetty.

Yksi tämän tutkimuksen tavoitteista oli selvittää perunan varsista eristettyjen aikaisemmin tuntemattomien Pcc-kantojen roolia perunansolukossa. Kannat löydettiin tyvimätäisen perunan varsista ja mukuloista tilanteessa, jossa muita samansukuisia taudinaiheuttajia ei ollut läsnä. Kantojen ei kuitenkaan ole havaittu kokeellisesti aiheuttavan tyvimätää perunalla, ja niiden merkitys perunan varsisolukossa on edelleen osittain tuntematon. Kannat ovat voineet saapua perunan varsiin sekundääri-infektoijina. Niiden alkuperä voi olla joko kasteluvedessä tai ne saattavat kulkea siemenperunan tai hyönteisten mukana pellolta toiselle. Kannat ovat saattaneet elää jonkin aikaa kasvin

pinnalla ja ovat sen jälkeen tunkeutuneet taudinnoireiseen solukkoon vasta sen jälkeen kun jokin toinen bakteerikanta on aloittanut solukon hajottamisen.

Tulokset osoittivat, että pääosin varsissa elävät Pcc-kannat pystyvät estämään tehokkaasti muiden tyvimätäbakteerien kasvua tuottamalla toksisia, kenties antibiootin tai bakteriosiinin kaltaisia yhdisteitä. Onkin mahdollista, että varsissa tavattavat kannat käyttävät erittämiään yhdisteitä hyväkseen tunkeutuakseen kasvisolukkoon, joka on jo mädäntynyt ensisijaisen bakteeri-infektion toimesta.

Osa tutkimuksessa käytetyistä kannoista pystyi tuottamaan muille kannoille toksisia yhdisteitä huomattavasti Pcc-tyyppikantoja ja *P. atrosepticum* -kantoja tehokkaammin, minkä vuoksi niiden mahdollista antagonistivaikutusta haluttiin tutkia kenttäkokeessa. Kenttäkokeen tulokset eivät kuitenkaan vahvistaneet niillä olevan antagonistisia ominaisuuksia. *In vitro* -kokeiden tulokset ovatkin vain harvoin suoraan verrannollisia kentältä saatuihin tuloksiin, sillä pelto-olosuhteissa useat eri kannat ovat interaktiossa keskenään, ja tuloksiin vaikuttavat monet bioottiset ja abiottiset tekijät. Osa mukuloista eristetyillä kannoilla käsitellyistä kasveista tuotti kuitenkin kenttäkokeessa terveen ja hyvälaatuisen sadon. Viime vuosina onkin havaittu, että jotkut Pcc-kannat estävät virulenttien märkämätäbakteerien kasvua mukulassa varastoinnin aikana, ja niiden käyttöä perunanmärkämädän torjunnassa tullaan todennäköisesti kokeilemaan jo lähivuosina (Kazemi-Zaromi ym. 2016).

Kenttäkokeen vähäiset oireet johtuivat varmasti suurilta osin kuivasta kesästä, joka ei suosinut taudinkehitystä. Tyvimätäoireet voivat kuitenkin olla hyvinkin erilaisia riippuen mm. siemenperunan bakteerikonsentraatiosta, lajikkeen herkkyydestä ja sääoloista, kuten kasvukauden lämpötilasta ja maaperän kosteusasteesta (Pérombelon 2002). Vaikka kesä 2010 ei vastannut sääolosuhteiltaan Etelä-Suomen keskiarvoa, saattavat kuumat ja vähäsateiset kesät yleistyä lähivuosisikymmeninä. On mielenkiintoista seurata, miten kasvukauden keskilämpötilan nousu vaikuttaa viljelykasvien luontaisiin bakteereihin ja mitkä muodostuvat valtalajeiksi suomalaisessa perunanviljelyssä.

Kenttäkokeen tuloksissa merkittävin muuttuja oli perunalajike. Fontanella onkin havaittu aiemmissa tutkimuksissa olevan jonkinasteinen vastustuskyky tyvimätäbakteereja vastaan (Shafique ym. 2010). Fontanen tapauksessa kuitenkin Pcc-kannalla s0417 infektoidut kasvit olivat selkeästi muita sairaampia. Suuri osa kasveista jäi taimettumatta

ja loputkin olivat kitukasvuisia. Näiden kasvien sato jäi pieneksi ja mukuloissa havaittiin kokeen jälkeen eniten märkämätää. Kanta s0417 antoi kuitenkin lupaavia tuloksia *in vitro*-kokeissa estämällä virulenttien kantojen kasvua. Tästä voidaan päätellä, että varsissa viihtyvä Pcc-kanta s0417 on tehokas tuottamaan toksiineja jotka estävät muiden kantojen kasvua, mutta samalla se omaa patogeenisiä ominaisuuksia jotka vaikuttavat negatiivisesti kasvin terveyteen.

Kyky tuottaa muita samassa ekologisessa lokerossa eläviä bakteereita tappavia yhdisteitä on yleinen tyvi- ja märkämätäbakteerien ominaisuus. Se saattaa olla myös merkki kantojen yhteisestä kehityshistoriasta. Elintilasta ja ravinteista kilpailevat kannat ovat todennäköisesti olleet jo pidemmän aikaa vuorovaikutuksessa keskenään niiden luontaisessa elinympäristössä. Ne saattavat elää isäntäkasvissa lähellä toisiaan, jolloin niille on kehittynyt kyky tuottaa toisiinsa vaikuttavia yhdisteitä. Tätä tukevat myös *in vitro* -testien tulokset, joiden mukaan pääosin varsissa tavattavat ryhmän 1 kannat pystyivät estämään tehokkaasti *D. solani* -lajin ja hiljattain Suomeen levinneen Pcb-lajin kasvua minimialustalla, mutta *D. solani* kykeni myös estämään varresta eristettyjen Pcc-kantojen kasvua. Pääosin mukulasta eristetyt kannat eivät taas pysty estämään *D. solani* ja Pcb-kantojen kasvua. Tämä johtuu todennäköisesti siitä, että kannat viihtyvät kasvin eri osissa: *D. solani* ja Pcb kasvavat varsissa, kun taas ryhmän 2 Pcc-kantoja tavataan lähinnä mukuloissa, joten ne eivät joudu usein vuorovaikutukseen keskenään. Tällöin yhteistä kehityshistoriaa ei ole, eikä kannoilla ole kehittynyt tarvetta tuottaa toisiinsa tehoavia spesifisiä antimikrobisia yhdisteitä. Poikkeuksena tästä on mukulakantojen kanssa ryhmittynyt varresta eristetty kanta s0427, joka ei myöskään pystynyt estämään *D. solani* -kantojen kasvua. Se saattaa olla uudempi tulokas perunansolukossa, eikä yhteistä kehityshistoriaa tämän vuoksi ole. Bakteereiden yhteisen historian puuttuminen voi myös selittää, miksi wasabista eristetty *P. wasabiae* -lajin tyyppikanta CFBP 3304 ei tuottanut estorenkaita yhdelläkään perunasta eristetyistä bakteereista.

Tämän tutkimuksen tulokset vahvistavat aikaisemman ryhmän tulokset, joiden mukaan perunan varsista eristetyt, poikkeavat Pcc-kannat eivät kykene aiheuttamaan tyvimätää perunalla (Pasanen ym. 2013). Tämän kokeen tulokset antavat kuitenkin viitteitä niiden patogeenisesta luonteesta. Tässä valossa niiden käyttö antagonisteina ei ole todennäköisesti mahdollista. On kuitenkin vielä epäselvää, mikä tutkimuksessa käytettyjen Pcc-kantojen rooli isäntäkasvissa on, ja kuinka paljon ne vaikuttavat tyvimädän puhkeamiseen ja taudinkehitykseen. Selvää on kuitenkin se, että eri

bakteerikannat ovat monimutkaisessa vuorovaikutuksessa keskenään niin maaperässä kuin isäntäkasvin solukossa.

6 KIITOKSET

Haluan esittää erityiset kiitokset tämän tutkielman ohjaajille yliopistonlehtori Minna Pirhoselle ja tutkija Miia Pasaselle. Lisäksi haluan kiittää tutkielman tarkastajia yliopistonlehtori Asko Hannukkalaa ja Helsingin Yliopiston kasvipatologian professoria Jari Valkosta asiantuntevista kommentteista ja korjausehdotuksista. Lämmin kiitos kuuluu myös ystäväilleni ja perheelleni kaikesta saamastani tuesta.

7 VIITTEET

- Agostino, M. 2012. Introduction to the BLAST Suite and BLASTN. Practical Bioinformatics, 47-72.
- Agrawal, A. A. 1999. Induced plant defense: evolution of induction and adaptive phenotypic plasticity. Inducible plant defenses against pathogens and herbivores: biochemistry, ecology, and agriculture. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, 251-268.
- Agrios, G.N. 2006. Plant Pathology. 5. painos. Academic Press
- Alippi, A. M. & Lopez, A. C. 2009. First Report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* on *Spathiphyllum wallisii* in Argentina. Plant Disease 93 (8): 842-842.
- Avrova, A. O., Hyman, L. J., Toth, R. L., & Toth, I. K. 2002. Application of amplified fragment length polymorphism fingerprinting for taxonomy and identification of the soft rot bacteria *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. Applied and Environmental Microbiology 68 (4): 1499-1508.
- Aysan, Y., Karatas, A. & Cinar, O. 2003. Biological control of bacterial stem rot caused by *Erwinia chrysanthemi* on tomato. Crop Protection 22(6): 807-811.
- Baghaee-Ravari, S., Rahimian, H., Shams-Bakhsh, M., Lopez-Solanilla, E., Antúnez-Lamas, M. & Rodríguez-Palenzuela, P. 2011. Characterization of *Pectobacterium* species from Iran using biochemical and molecular methods. European Journal of Plant Pathology 129(3): 413-425.
- Barnard, A. M., Bowden, S. D., Burr, T., Coulthurst, S. J., Monson, R. E. & Salmond, G.

- P. 2007. Quorum sensing, virulence and secondary metabolite production in plant soft-rotting bacteria. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 362(1483): 1165-1183.
- Bell, K. S., Sebaihia, M., Pritchard, L., Holden, M. T. G., Hyman, L. J., Holeva, M. C. & Atkin, R. 2004. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. *Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America* 101(30): 11105-11110.
- Bender, C. L., Alarcón-Chaidez, F. & Gross, D. C. 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63(2): 266-292.
- Bevivino, A., Sarrocco, S., Dalmastrì, C., Tabacchioni, S., Cantale, C. & Chiarini, L. 1998. Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. *FEMS Microbiology Ecology* 27(3): 225-237.
- Bogdanove, A. J., Bauer, D. W. & Beer, S. V. 1998. *Erwinia amylovora* secretes DspE, a pathogenicity factor and functional AvrE homolog, through the Hrp (type III secretion) pathway. *Journal of Bacteriology* 180(8): 2244-2247.
- Casadevall, A. & Pirofski, L. A. 1999. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infection and Immunity* 67(8): 3703-3713.
- Case, R. J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W. F. & Kjelleberg, S. 2007. Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and Environmental Microbiology* 73(1): 278-288.
- Chan, Y. C., Wu, J. L., Wu, H. P., Tzeng, K. C. & Chuang, D. Y. 2011. Cloning, purification, and functional characterization of Carocin S2, a ribonuclease bacteriocin produced by *Pectobacterium carotovorum*. *BMC Microbiology* 11: 99.
- Chao, Y. C., Feng, C. T. & Ho, W. C. 2006. First Report of Aglaonema Bacterial Blight Caused by *Erwinia chrysanthemi* in Taiwan. *Plant Disease* 90 (10):1358.
- Chuang, D. Y., Chien, Y. C. & Wu, H. P. 2007. Cloning and expression of the *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* gene encoding the low-molecular-weight bacteriocin carocin S1. *Journal of Bacteriology* 189: 620-626.
- Czajkowski, R., de Boer, W. J., van Veen, J. A. & van der Wolf, J. M. 2012. Characterization of bacterial isolates from rotting potato tuber tissue showing antagonism to *Dickeya* sp. biovar 3 *in vitro* and *in planta*. *Plant Pathology* 61: 169-182.

- Czajkowski R., Perombelon M. C. M., van Veen J. A. & van der Wolf J. M. 2011. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. *Plant Pathology* 60(6): 999–1013.
- Das, S, & K. Chaudhuri, K. 2003. Identification of a unique IAHP (IcmF associated homologous proteins) cluster in *Vibrio cholerae* and other proteobacteria through in silico analysis. *In Silico Biology* 3: 287–300
- Davies, D. G., & Marques, C. N. 2009. A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *Journal of Bacteriology* 191(5): 1393-1403.
- De Boer, S. H. 2003. Characterization of pectolytic erwinias as highly sophisticated pathogens of plants. *European Journal of Plant Pathology* 109(9): 893-899.
- De Haan, E. G., Dekker-Nooren, T. C., van den Bovenkamp, G. W., Speksnijder, A. G., van der Zouwen, P. S., & van der Wolf, J. M. 2008. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* can cause potato blackleg in temperate climates. *European Journal of Plant Pathology*, 122(4): 561-569.
- Duarte, V., De Boer, S. H., Ward, L. J., & Oliveira, A. M. R. 2004. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. *Journal of Applied Microbiology* 96(3): 535-545.
- Duerkop, B. A., Varga, J., Chandler, J. R., Peterson, S. B., Herman, J. P., Churchill, M. E., & Greenberg, E. P. 2009. Quorum-sensing control of antibiotic synthesis in *Burkholderia thailandensis*. *Journal of Bacteriology* 191(12): 3909-3918.
- Engbrecht, J., & Silverman, M. 1984. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81(13): 4154-4158.
- FAO. 2016. FAOstat. <http://faostat.fao.org/default.aspx>. Vienna, Austria: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Tulostettu syyskuussa 2016.
- Fessehaie, A., De Boer, S. H., & Lévesque, C. A. 2002. Molecular characterization of DNA encoding 16S 23S rRNA intergenic spacer regions and 16S rRNA of pectolytic *Erwinia* species. *Canadian Journal of Microbiology* 48(5): 387-398.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C., & Greenberg, E. P. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology* 176(2): 269.
- Gallois, A., Samson, R., Ageron, E., & Grimont, P. A. 1992. *Erwinia carotovora* subsp. *odorifera* subsp. nov., associated with odorous soft rot of chicory (*Cichorium intybus* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 42(4): 582-588.

- Gardan, L., Gouy, C., Christen, R., & Samson, R. 2003. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53(2): 381-391.
- Glasner, J. D., Marquez-Villavicencio, M., Kim, H. S., Jahn, C. E., Ma, B., Biehl, B. S. & Dangl, J. L. 2008. Niche-specificity and the variable fraction of the *Pectobacterium* pan-genome. *Molecular Plant-microbe Interactions* 21(12): 1549-1560.
- Goto, M., & Matsumoto, K. 1987. *Erwinia carotovora* subsp. *wasabiae* subsp. nov. isolated from diseased rhizomes and fibrous roots of Japanese horseradish (*Eutrema wasabi* Maxim.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 37(2): 130-135.
- Grant, S. R., Fisher, E. J., Chang, J. H., Mole, B. M. & Dangl, J. L. 2006. Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annual Reviews of Microbiology* 60: 425-449.
- Grinter, R., Milner, J. & Walker, D. 2012. Ferredoxin containing bacteriocins suggest a novel mechanism of iron uptake in *Pectobacterium* spp. *PLoS One* 7:e33033.
- Haas, D., & Keel, C. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual Review of Phytopathology*, 41(1), 117-153.
- Hauben, L., Moore, E. R., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L. & Swings, J. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. *Systematic and Applied Microbiology* 21(3): 384-397.
- Heil, M., Hilpert, A., Kaiser, W. & Linsenmair, K. E. 2000. Reduced growth and seed set following chemical induction of pathogen defence: does systemic acquired resistance (SAR) incur allocation costs? *Journal of Ecology* 88(4): 645-654.
- Herms, D. A. & Mattson, W. J. 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. *Quarterly Review of Biology*: 283-335.
- Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R. & Peterson, S. B. 2010. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology* 8(1): 15-25.
- Hogan C. S., Mole B. M., Grant S. R., Willis D. K. & Charkowski A. O. 2013. The Type III Secreted Effector DspE Is Required Early in *Solanum tuberosum* Leaf Infection by *Pectobacterium carotovorum* to Cause Cell Death, and Requires W_{X(3-6)}D/E

Motifs. PLoS ONE 8(6).

- Holeva, M. C., Bell, K. S., Hyman, L. J., Avrova, A. O., Whisson, S. C., Birch, P. R. & Toth, I. K. 2004. Use of a pooled transposon mutation grid to demonstrate roles in disease development for *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* putative type III secreted effector (DspE/A) and helper (HrpN) proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17(9): 943-950.
- Horinouchi, S. 2002. A microbial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 7:d2045-57.
- Hossain, M. M. & Tsuyumu, S. 2006. Flagella-mediated motility is required for biofilm formation by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Journal of General Plant Pathology* 72(1): 34-39.
- Irie, Y., O'toole, G. A. & Yuk, M. H. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids disperse *Bordetella bronchiseptica* biofilms. *FEMS Microbiology Letters* 250(2): 237-243.
- Jones, S., Yu, B., Bainton, N. A., Birdsall, M., Bycroft, B. W., Chhabra, S. R., Cox, A. J., Golby, P., Reeves, P. J. & Stephens, S. 1993. The lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. *The EMBO Journal* 12(6): 2477.
- Kaiser, D. & Losick, R. 1993. How and why bacteria talk to each other. *Cell* 73:873-885.
- Kazemi-Zaromi, S., Baghaee-Ravari, S., Khodaygan, P. & Falahati-Rastegar, M. 2016. Screening bactericidal effect of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strains against causal agent of potato soft rot. *Journal of Basic Microbiology* 56(2): 196-205.
- Kearns, D. B. 2010. A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology* 8(9): 634-644.
- Khalil, I. & El-Mghrabia, K. 2010. Biological control of *Fusarium* dry rot and other potato tuber diseases using *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter cloacae*. *Biological Control* 53(3): 280-284.
- Khayri, S., Des Essarts, Y. R., Quêtu-Laurent, A., Moumni, M., Hélias, V. & Faure, D. 2015. Genomic overview of the phytopathogen *Pectobacterium wasabiae* strain RNS 08.42. 1A suggests horizontal acquisition of quorum-sensing genes. *Genetica*, 143(2): 241-252.
- Kim, J. H., Joen, Y. H., Kim, S. G. & Kim, Y. H. 2007. First report on bacterial soft rot of graft-cactus *Chamaecereus silvestrii* caused by *Pectobacterium carotovorum*

- subsp. *carotovorum* in Korea. *The Plant Pathology Journal* 23(4): 314-317.
- Kim, H.-S., Ma, B., Perna, N. T. & Charkowski, A. O. 2009. Phylogeny and virulence of naturally occurring type III secretion-deficient *Pectobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 4539–4549.
- Kim, H. S., Thammarat, P., Lommel, S. A., Hogan, C. S. & Charkowski, A. O. 2011. *Pectobacterium carotovorum* elicits plant cell death with DspE/F but the *P. carotovorum* DspE does not suppress callose or induce expression of plant genes early in plant-microbe interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24(7): 773-86.
- Kwan, G., Charkowski, A. O. & Barak, J. E. 2013. *Salmonella enterica* Suppresses *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Population and Soft Rot Progression by Acidifying the Microaerophilic Environment. *mBio* 4(1): e00557-12
- Lanham, P. G., McIlravey, K. I. & Perombelon, M. C. M. 1991. Production of cell wall dissolving enzymes by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* *in vitro* at 27°C and 30°C. *Journal of Applied Bacteriology* 70: 20–24.
- Laurila, J., Ahola, V., Lehtinen, A., Joutsjoki, T., Hannukkala, A., Rahkonen, A. & Pirhonen, M. 2008. Characterization of *Dickeya* strains isolated from potato and river water samples in Finland. *European Journal of Plant Pathology* 122(2): 213-225.
- Lindeberg, M., Salmond, G. P. & Collmer, A. 1996. Complementation of deletion mutations in a cloned functional cluster of *Erwinia chrysanthemi* out genes with *Erwinia carotovora* out homologues reveals OutC and OutD as candidate gatekeepers of species-specific secretion of proteins via the type II pathway. *Molecular Microbiology* 20(1): 175-90.
- Liu, H., Coulthurst, S. J., Pritchard, L., Hedley, P. E., Ravensdale, M., Humphris, S., Burr, T., Takle, G., Brurberg, M.-B., Birch, P. R. J., Salmond, G. P. C. & Toth, I. 2008. Quorum Sensing Coordinates Brute Force and Stealth Modes of Infection in the Plant Pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *PLoS Pathogens* 4(6): e1000093.
- Ma, B., Hibbing, M. E., Kim, H. S., Reedy, R. M., Yedidia, I., Breuer, J., Breuer, J., Glasner, J. D., Perna, N. T., Kelman, A. & Charkowski, A. O. 2007. Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Phytopathology* 97(9): 1150-1163.
- Mae, A., Montesano, M., Koiv, V. & Palva, E. T. 2001. Transgenic plants producing the bacterial pheromone N-acyl-homoserine lactone exhibit enhanced resistance to the bacterial phytopathogen *Erwinia carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* 14: 1035–1042.

- MacIntyre, D. L., Miyata, S. T., Kitaoka, M. & Pukatzki, S. 2010. The *Vibrio cholerae* type VI secretion system displays antimicrobial properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(45): 19520-19524.
- Mattinen, L., Somervuo, P., Nykyri, J., Nissinen, R., Kouvonen, P., Corthals, G., Auvinen, P., Aittamaa, M., Valkonen, J. P. & Pirhonen, M. 2008. Microarray profiling of host-extract-induced genes and characterization of the type VI secretion cluster in the potato pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *Microbiology* 154(8): 2387-96.
- Marits, R., Kõiv, V., Laasik, E. & Mäe, A. 1999. Isolation of an extracellular protease gene of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain SCC3193 by transposon mutagenesis and the role of protease in phytopathogenicity. *Microbiology* 145(8): 1959-66.
- Mashburn, L. M., Jett, A. M., Akins, D. R. & Whiteley, M. 2005. *Staphylococcus aureus* serves as an iron source for *Pseudomonas aeruginosa* during *in vivo* coculture. *Journal of Bacteriology* 187(2): 554-566.
- Moleleki, L. N., Onkendi, E. M., Mongae, A. & Kubheka, G. C. 2013. Characterisation of *Pectobacterium wasabiae* causing blackleg and soft rot diseases in South Africa. *European Journal of Plant Pathology* 135(2): 279-288.
- Nabhan, S., De Boer, S. H., Maiss, E. and Wydra, K. 2012. Taxonomic relatedness between *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* subsp. nov. *Journal of Applied Microbiology* 113: 904–913.
- Nabhan, S., De Boer, S. H., Maiss, E. & Wydra, K. 2013. *Pectobacterium aroidearum* sp. nov., a soft rot pathogen with preference for monocotyledonous plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 2520–2525.
- Nguyen, H. A., Tomita, T., Hirota, M., Kaneko, J., Hayashi, T. & Kamio, Y. 2001. DNA inversion in the tail fiber gene alters the host range specificity of carotovoricin Er, a phage-tail-like bacteriocin of phytopathogenic *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Er. *Journal of Bacteriology* 183: 6274-6281.
- Nykyri, J., Niemi, O., Koskinen, P., Nokso-Koivisto, J., Pasanen, M., Broberg, M., Plyusnin, I., Törönen, P., Holm, L., Pirhonen, M. & Palva, E. T. 2012. Revised phylogeny and novel horizontally acquired virulence determinants of the model soft rot phytopathogen *Pectobacterium wasabiae* SCC3193. *PLoS Pathogens* 8(11): e1003013.
- Oliveira, A. M., Duarte, V., Silveira, J. R. & Moraes, M. G. 2003. Incidence of pectolytic erwinias associated with blackleg of potato in Rio Grande do Sul. *Fitopatologia*

- Brasileira 28(1): 49-53.
- Palacios, J. L., Zaror, I., Martínez, P., Uribe, F., Opazo, P., Socías, T. & Venegas, A. 2001. Subset of hybrid eukaryotic proteins is exported by the type I secretion system of *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of Bacteriology* 183(4): 1346-1358.
- Panda, P., Fiers, M. A. W. J., Armstrong, K. & Pitman, A. R. 2012. First report of blackleg and soft rot of potato caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* in New Zealand. *New Disease Reports* 26(15): 2044-0588.
- Parkinson, N., DeVos, P., Pirhonen, M. & Elphinstone, J. 2014. *Dickeya aquatica* sp. nov., isolated from waterways. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64(7): 2264-2266.
- Pasanen, M., Laurila, J., Brader, G., Palva, E. T., Ahola, V., van der Wolf, J., Hannukkala, A. & Pirhonen, M. 2013. Characterisation of *Pectobacterium wasabiae* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* isolates from diseased potato plants in Finland. *Annals of Applied Biology* 163: 403–419.
- Pérombelon, M. C. M. 1992. Potato blackleg: Epidemiology, host–pathogen interaction and control. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 98(2): 135–146.
- Pérombelon, M. C. M. 2002. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology* 51(1): 1-12
- Pérombelon, M. C. M. & Hyman, L. J. 1986. A rapid method for identifying and quantifying soft rot erwinias directly from plant material based on their temperature tolerances and sensitivity to erythromycin. *Journal of Applied Bacteriology* 60: 61–66.
- 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 Phytopathology* 18: 361–387.
- Pérombelon, M. C. M. & Van Der Wolf, J. M. 2002. Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*) on potatoes: a laboratory manual. Dundee, Scotland: Scottish Crop Research Institute Occasional Publication 10.
- Pessi, G. & Haas, D. 2000. Transcriptional Control of the Hydrogen Cyanide Biosynthetic Genes hcnABC by the Anaerobic Regulator ANR and the Quorum-Sensing Regulators LasR and RhlR in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 182(24): 6940-6949.

- Pirhonen, M., Flego, D., Heikinheimo, R., Palva, E. T. 1993. A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *EMBO Journal* 12(6): 2467-76.
- Pirhonen, M., Saarilahti, H. T., Karlsson, M.-B. & Palva, E. T. 1991. Identification of pathogenicity determinants of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by transposon mutagenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* 4: 276-283.
- Pitman, A. R., Wright, P. J., Galbraith, M. D. & Harrow, S. A. 2008. Biochemical and genetic diversity of pectolytic enterobacteria causing soft rot disease of potatoes in New Zealand. *Australasian Plant Pathology* 37(6): 559-568.
- Pitman, A. R., Harrow, S. A. & Visnovsky, S. B. 2010. Genetic characterisation of *Pectobacterium wasabiae* causing soft rot disease of potato in New Zealand. *European Journal of Plant Pathology* 126(3): 423-435.
- Preston, G. M., Studholme, D. J. & Caldelari, I. 2005. Profiling the secretomes of plant pathogenic Proteobacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 331–360.
- Rafiei, S., Khodakaramian, G. H. & Baghaee-Ravari, S. 2015. Characterization of *Pectobacterium* species isolated from vegetable crops in north-west of Iran. *African Journal of Agricultural Research* 10(46): 4258-4267.
- Rainey, P. B. & Travisano, M. 1998. Adaptive radiation in a heterogeneous environment. *Nature*, 394(6688): 69-72.
- Riley, M. A 1998. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annual Review of Genetics* 32(): 255-78.
- Robinson, K. & Foster, G. 1987. Control of potato blackleg by tuber pasteurisation: the determination of time-temperature combinations for the inactivation of pectolytic erwinia. *Potato Research* 30(1): 121-125.
- Roh, E., Park, T. H., Kim, M. I., Lee, S., Ryu, S., Oh, C. S., Rhee, S., Kim, D. H., Park, B. S. & Heu, S. 2010. Characterization of a new bacteriocin, Carocin D, from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 7541-7549.
- Salmond G. P., Bycroft B. W., Stewart G. S. & Williams P. 1995. The bacterial 'enigma': cracking the code of cell-cell communication. *Molecular Microbiology* 16: 615–624.
- Samson, R., Legendre, J. B., Christen, R., Saux, M. F. L., Achouak, W. & Gardan, L. 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953; Brenner et al. 1973) and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya*

- dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zae* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55: 1415–1427.
- Schaad, N. W., Jones, J. B. & Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3. painos. American Phytopathological Society. St Paul, MN.
- Shafique, M., Javed, N., Rasheed, A. & Arif, M. J. 2010. Genetic response of some potato varieties against blackleg disease. Pakistan Journal of Phytopathology 22(1): 16-19.
- Sławiak, M., Łojkowska, E. & Van der Wolf, J. M. 2009. First report of bacterial soft rot on potato caused by *Dickeya* sp.(syn. *Erwinia chrysanthemi*) in Poland. Plant Pathology 58(4): 794-794.
- Thomson, S. V., Hildebrand, D. C. & Schroth, M. N. 1981. Identification and Nutritional Differentiation of the *Erwinia* Sugar Beet Pathogen from Members of *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. Phytopathology 71: 1037-1042
- Toth, I. K., Avrova, A. O. & Hyman, L. J. 2001. Rapid identification and differentiation of the soft rot erwinias by 16S-23S intergenic transcribed spacer-PCR and restriction fragment length polymorphism analyses. Applied and Environmental Microbiology 67(9): 4070-4076.
- Toth, I. K., Bell, K. S., Holeva, M. C. & Birch, P. R. 2003. Soft rot erwiniae: from genes to genomes. Molecular Plant Pathology 4(1): 17-30.
- Toth I. K., van der Wolf J. M., Saddler G., Lojkowska E., Hélias V., Pirhonen M., Tsrer (Lahkim) L. & Elphinstone J. G. 2011. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. Plant Pathology 60: 385–399.
- Toth, I. K., Pritchard, L. & Birch, P. R. 2006. Comparative genomics reveals what makes an enterobacterial plant pathogen. Annual Review of Phytopathology 44: 305-336.
- Tseng, T. T., Tyler, B. M. & Setubal, J. C. 2009. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. BMC Microbiology 9(1): 1.
- Van der Merwe, J. J., Coutinho, T. A., Korsten, L. & van der Waals, J. E. 2010. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing blackleg on potatoes in South Africa. European Journal of Plant Pathology 126(2): 175-185.
- Van der Wolf J. M., Nijhuis E. H., Kowalewska M. J., Saddler G. S., Parkinson N., Elphinstone J. G., Pritchard L., Toth I. K., Lojkowska E., Potrykus M., Waleron M., de Vos P., Cleenwerck I., Pirhonen M., Garland L., Hélias V., Pothier J. F., Pflüger V., Duffy B., Tsrer L. & Manulis S. 2013. *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plant pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*). International

- Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 64: 768–774.
- Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255(2): 571-586.
- Waleron, M., Waleron, K. & Lojkowska, E. 2013. Occurrence of *Pectobacterium wasabiae* in potato field samples. *European Journal of Plant Pathology* 137(1): 149-158.
- Wassenaar, T. M. & Gaastra, W. 2001. Bacterial virulence: can we draw the line? *FEMS Microbiology Letters* 201(1): 1-7.
- Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Slater, H., Simpson, N. J. & Salmond, G. P. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 25(4): 365-404.
- Yahiaoui-Zaidi, R., Jouan, B. & Andrivon, D. 2003. Biochemical and molecular diversity among *Erwinia* isolates from potato in Algeria. *Plant Pathology* 52(1): 28-40.
- Yang, S.-C., Lin, C.-H., Sung, C. T. & Fang, J.-Y. 2014. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology* 5: 241.
- Yap, M.-N., Barak, J. D. & Charkowski, A. O. 2004. Genomic diversity of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and its correlation with virulence. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 3013–3023.
- Yen, Y. T., Bhattacharya, M. & Stathopoulos, C 2008. Genome-wide in silico mapping of the secretome in pathogenic *Yersinia pestis* KIM. *FEMS Microbiology Letters* 279: 56–63.
- Zhang, Y., Fan, Q. & Loria, R. 2016. A re-evaluation of the taxonomy of phytopathogenic genera *Dickeya* and *Pectobacterium* using whole-genome sequencing data. *Systematic and Applied Microbiology* 39(4): 252-259.

8 LIITTEET

LIITE 1. *acnA* –geenisekvenssien rinnastus

CLUSTAL multiple sequence alignment by MUSCLE (3.8)

```

SeeLT2 -----
PaICMP1526 -----
PbICMP4226 -----
PwaICMP9121 -----
Pcc_s0421 TCAACACCGCTCCGCCACCGCTTGTGACGTCAGATATCTTTCAGGTAGACGGCTTCC
Pcc_s0416 -----
Pcc_s0417 -----
Pcc_t0438 -----
Pcc_s0427 -----
Pcc_t0437 -----
PcoICMP11533 -----
PccICMP5702 -----

```

```

SeeLT2 -----
PaICMP1526 -----
PbICMP4226 -----
PwaICMP9121 -----
Pcc_s0421 CGTCACATCTTCACCCAGCGTTCGCTCAGATCGACGTTCAATTTCCCTTGGCCTCGCC
Pcc_s0416 -----TGGCCTCGCC
Pcc_s0417 -----CGGC
Pcc_t0438 -----CGCC
Pcc_s0427 -----TCGCC
Pcc_t0437 -----
PcoICMP11533 -----
PccICMP5702 -----

```

```

SeeLT2 -----GGTGGTCGCGTATGCGCTGGCCGGAAACATGAATATTAACCTCGCGACAGACC
PaICMP1526 -----GGTGGTCGCTACGCGCTGGCGGGAAATATGAATGTCGATCTGACGCAACAAC
PbICMP4226 -----GGTGGTCGCGTACGCGCTGGCGGGAAATATGAATGTCGATCTGACGCAAGAAC
PwaICMP9121 -----GGTGGTCGCGTATGCGCTGGCGGGAAATATGAACATCGATCTGACACAAGAAC
Pcc_s0421 CCGCGCTGGTGGTCGCGTATGCGTTGGCAGGGAATATGAACGTCGATCTGACGCAAGAAC
Pcc_s0416 C-GCGCTGGTGGTCGCGTATGCGTTGGCGGGAAATATGAACGTCGATCTGACGCAAGAAC
Pcc_s0417 C-GCGCTGGTGGTCGCGTATGCGTTGGCGGGAAATATGAACGTCGATCTGACGCAAGAAC
Pcc_t0438 C-GCGCTGGTGGTCGATACGCGCTGGCGGGAAATATGAACGTCGATCTGACGCAAGAAC
Pcc_s0427 C-GCGCTGGTGGTCGATACGCGCTGGCGGGAAATATGAACGTCGATCTGACGCAAGAAC
Pcc_t0437 -----CTGGTGGTCGATACGCGCTGGCGGGAAATATGAACGTCGATCTGACGCAAGAAC
PcoICMP11533 -----GGTGGTCGCGTATGCGCTGGCGGGAAATATGAATGTCGATCTGACGCAAGAAC
PccICMP5702 -----GGTGGTCGCGTATGCGCTGGCGGGAAATATGAACGTCGATCTGACGCAAGAAC
***** ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

```

```

SeeLT2 CGCTGGGTACGATCGTAAAGGCGATCCGGTATACCTGAAGGATATCTGGCCCTCGGCGC
PaICMP1526 CGCTGGGTGAAGATCGTGACGGAAAAGCCGTTTATCTGAAAGACATCTGGCCCTCGACGA
PbICMP4226 CGCTGGGTGAAGATCGTGACGGAAAAGCCGTTTATCTTAAAGACATCTGGCCCTCGACGA
PwaICMP9121 CGCTGGGGAAAGATGGTGACGGCAAAGCAGTCTATCTGAAAGACATCTGGCCCTCGACGA
Pcc_s0421 CGCTGGGTGAAGATCGTGACGGAAAAGCCGTTTATCTGAAAGATATCTGGCCGTCGACGA
Pcc_s0416 CGCTGGGTGAAGATCGTGACGGAAAAGCCGTTTACCTGAAAGATATCTGGCCGTCGACGA
Pcc_s0417 CGCTGGGTGAAGATCGTGACGGAAAAGCCGTTTACCTGAAAGATATCTGGCCGTCGACGA
Pcc_t0438 CGCTGGGTGAAGATCGTGACGGAAAAGCCGTTTACCTGAAAGATATCTGGCCGTCGACTA
Pcc_s0427 CGCTGGGTGAAGATCGTGACGGAAAAGCCGTTTACCTGAAAGATATCTGGCCGTCGACTA
Pcc_t0437 CGCTGGGTGAAGATCGTGACGGAAAAGCCGTTTACCTGAAAGATATCTGGCCGTCGACTA
PcoICMP11533 CGCTGGGTGAAGATCGTGACGGAAAAGCCGTTTACCTGAAAGATATCTGGCCGTCGACAA
PccICMP5702 CGTTGGGTGAAGATCGTGACGGAAAAGCCGTTTACCTAAAGATATCTGGCCGTCGACTA
** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

```

```

SeeLT2          AGGAAATTGC--CCGCGCCGTTGAACTGGTATCA--TCAGATATGTTCCGTAAGAGATAT
PaICMP1526     AAGCGGTGGCGGACGCGGTATTGAAT----GTCAACGCTGGCATGTTCCACAAACAATAT
PbICMP4226     AAGCGGTGGCGGATGCGGTATTGAAT----GTCAGCGCAGGCATGTTCCACAAGCAATAT
PwaICMP9121    AAGCGGTGGCGGACGCGGTATTGAAT----GTCAGCGCAGGCATGTTCCACCAACAATAT
Pcc_s0421      AAGCGGTGGCGGATGCGGTATTGAAC----GTCAGCGCAGGCATGTTCCACAAACAGTAT
Pcc_s0416      AAGCGGTGGCGGATGCGGTATTGAAC----GTCAGCGCAGGCATGTTCCACAAACAGTAT
Pcc_s0417      AAGCGGTGGCGGATGCGGTATTGAAC----GTCAGCGCAGGCATGTTCCACAAACAGTAT
Pcc_t0438      AAGCGGTGGCAGACGCAGTATTGAAC----GTCAGCGCGGGAATGTTCCACAAACAGTAT
Pcc_s0427      AAGCGGTGGCAGACGCAGTATTGAAC----GTCAGCGCGGGAATGTTCCACAAACAGTAT
Pcc_t0437      AAGCGGTGGCAGACGCAGTATTGAAC----GTCAGCGCGGGAATGTTCCACAAACAGTAT
PcoICMP11533   AAGCGGTGGCGGAGGCAGTATTGAAC----GTTAGCGCTGGCATGTTCCACAAACAGTAT
PccICMP5702    AAGCGGTGGCGGACGCAGTATTGAAC----GTCAGCGCTGGCATGTTCCACAAACAGTAT
* * * * *
SeeLT2          GCGGAAGTGTTTGAAGGCACGGAAGAATGGAAATCGATTGAGGTTGA--ATCGTCCGATA
PaICMP1526     GCCGCAGTGTTTGAAGGTACGCAGGAGTGGCAAGATATCGAGGTCGACGATAATCC--TA
PbICMP4226     GCTGCGGTGTTTGAAGGCACGCAGGAGTGGCAGGATATCGAGGTCGACGACAACCC--TA
PwaICMP9121    GCGGCGGTGTTTGAAGGAACAGAGGAGTGGCAAGACATTGAGGTCGACGACAACCC--TA
Pcc_s0421      GCTGCGGTGTTTGAAGGTACGCAGGAGTGGCAAGACATCGAAGTCGACAACAATCC--TA
Pcc_s0416      GCTGCGGTGTTTGAAGGTACGCAGGAGTGGCAAGACATCGAAGTCGACAACAATCC--TA
Pcc_s0417      GCTGCGGTGTTTGAAGGTACGCAGGAGTGGCAAGACATCGAAGTCGACAACAATCC--TA
Pcc_t0438      GCCGCTGTGTTTGAAGGCACGCAGGAGTGGCAAGATATCGAGGTTGACGACAATCC--TA
Pcc_s0427      GCCGCTGTGTTTGAAGGCACGCAGGAGTGGCAAGATATCGAGGTTGACGACAATCC--TA
Pcc_t0437      GCCGCTGTGTTTGAAGGCACGCAGGAGTGGCAAGATATCGAGGTTGACGACAATCC--TA
PcoICMP11533   GCGGCAGTGTTTGAAGGCACGCAGGAGTGGCAAGATATCGAAGTCGACAACAACCC--CA
PccICMP5702    GCCGCCGTGTTTGAAGGCACGCAGGAGTGGCAAGATATCGAGGTCGACAACAACCC--CA
* * * * *
SeeLT2          CCTACGGCTGGCAGTCGGATTCAACCTATATTGCGCTGTGCGCTTTCTTTGATGAAATGC
PaICMP1526     CCTATCAGTGGCCGGAAGAATCGACCTATATTGCGCAGACGCCTTTCTTTCTGGATATGG
PbICMP4226     CCTATCAGTGGCCGGAAGAATCGACCTATATTGCGCAAACGCCTTTCTTTCTGGATATGG
PwaICMP9121    CCTATCAATGGCCGGAAGAGTCAACCTATATTGTCAGACGCCTTTCTTTCTGGATATGG
Pcc_s0421      CCTATCAATGGCCGGAAGAATCGACCTATATCCGTGACAGCGCTTTCTTTCTGGATATGG
Pcc_s0416      CCTATCAATGGCCGGAAGAATCGACCTATATCCGTGACAGCGCTTTCTTTCTGGATATGG
Pcc_s0417      CCTATCAATGGCCGGAAGAATCGACCTATATCCGTGACAGCGCTTTCTTTCTGGATATGG
Pcc_t0438      CCTATCAATGGCCGGAAGAATCGACCTATATCCGTGACAGCGCTTTCTTTCTGGACATGG
Pcc_s0427      CCTATCAATGGCCGGAAGAATCGACCTATATCCGCCAGACGCCTTTCTTTCTGGACATGG
Pcc_t0437      CCTATCAATGGCCGGAAGAATCGACCTATATCCGCCAGACGCCTTTCTTTCTGGATATGG
PcoICMP11533   CCTATCAATGGCCGGAAGAGTCAACCTATATTGCGCAGACGCCTTTCTTTCTGGATATGG
PccICMP5702    CCTATCAATGGCCGGAAGAGTCAACCTATATTGCGCAGACGCCTTTCTTTCTGGACATGG
**** * * * *
SeeLT2          AGGCCAGCCTGCGCCAGTCAAAGATATCCACGGCGCGCATCTGGCGATGCTGGGCG
PaICMP1526     GAAAAGAACCGGAGCCGGTTCAGGATATCCACAAGGCGCGCATTCTGGCGATGCTGGGCG
PbICMP4226     GAAAAGAGCCGGAACCGATTGAGGATATCCACAAGGCGCGCATTCTAGCGATGCTGGGCG
PwaICMP9121    GAAAAGAACCTGAGCCGGTTCAGGATATCCACAAGGCGCGCATTCTGGCGATGCTGGGGG
Pcc_s0421      GAAAAGAGCCTGAGCCGGTTCAGGATATCCACAACGCGCGCATTCTGGCGATGTTGGGCG
Pcc_s0416      GAAAAGAGCCTGAGCCGGTTCAGGATATCCACAACGCGCGCATTCTGGCGATGTTGGGTG
Pcc_s0417      GAAAAGAGCCTGAGCCGGTTCAGGATATCCACAACGCGCGCATTCTGGCGATGTTGGGTG
Pcc_t0438      GAAAAGAACCTGAGCCAGTTCAGGATATCCACAATGCACGATTCTGGCGATGCTGGGCG
Pcc_s0427      GAAAAGAACCTGAGCCAGTTCAGGATATCCACAATGCACGATTCTGGCGATGCTGGGCG
Pcc_t0437      GAAAAGAACCTGAGCCAGTTCAGGATATCCACAATGCACGATTCTGGCGATGCTGGGCG
PcoICMP11533   GAAAAGAGCCTGAGCCGGTTCAGGATATCCACAATGCACGATTCTGGCGATGCTGGGCG
PccICMP5702    GAAAAGAACCTGAGCCAGTTCAGGATATCCACAATGCACGATTCTGGCGATGCTGGGCG
* * * * *

```

```

SeeLT2          ATTCGGTGACGACCGACCATATTTCCCGGCCGGCAGTATCAAGCCGGACAGTCCCGCCG
PaICMP1526     ATTCGGTTACAACCGACCATATCTCGCCAGCAGGCAACATCAAGCGTGATAGCCCTGCAG
PbICMP4226     ATTCGGTTACAACCGACCATATCTCGCCAGCAGGCAATATCAAGCGTGATAGCCCGGCAG
PwaICMP9121    ATTCGGTCACGACCGACCATATCTCACCGGCAGGTAACATCAAGCGGATAGCCCGGCAG
Pcc_s0421      ATTCGGTGACAACTGACCATATCTCACCGGCAGGCAACATCAAGCGGATAGCCCGGCAG
Pcc_s0416      ATTCGGTCACCACCGACCATATCTCGCCGGCAGGCAACATCAAGCGGATAGCCCGGCAG
Pcc_s0417      ATTCGGTCACCACCGACCATATCTCGCCGGCAGGCAACATCAAGCGGATAGCCCGGCAG
Pcc_t0438      ATTCGGTCACAACGGACCATATCTCACCAGCAGGTAACATCAAGCGTGACAGCCCGGCAG
Pcc_s0427      ATTCGGTCACAACGGACCATATCTCACCAGCAGGTAACATCAAGCGTGACAGCCCGGCAG
Pcc_t0437      ATTCGGTCACAACGGACCATATCTCACCAGCAGGTAACATCAAGCGTGACAGCCCGGCAG
PcoICMP11533   ATTCGGTCACAACGGATCATATCTCACCAGCAGGCAACATCAAACGTGATAGTCCGGCAG
PccICMP5702    ATTCGGTCACAACGGACCATATCTCACCAGCAGGCAACATCAAGCGGATAGCCCGGCAG
                **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

SeeLT2          GACGCTATCTGCAAAACCACGGCGTTGAGCGGAAGGATTTTAACTCCTATGGATCACGGC
PaICMP1526     GGAAA-----
PbICMP4226     GGAAA-----
PwaICMP9121    GAAAA-----
Pcc_s0421      GGAAATACTTGCTGGAGCGCGGTGTCGAAACTGCGGAGTTCAACTCTTACGGTTCACGAC
Pcc_s0416      GGAAATATTTGCTGGAGCGCGGCGTCGAAACTGCGGAGTTCAACTCTTACGGTTCACGGC
Pcc_s0417      GGAAATATTTGCTGGAGCGCGGCGTCTAAACTGCGGAGTTCAACTCTTACGGTTCACGGC
Pcc_t0438      GAAAAATATTTGCTGGAGCGCGGCGTCGAAACGGCGGAGTTCAACTCTTACGGTTCACGAC
Pcc_s0427      GAAAAATATTTGCTGGAGCGCGGCGTCGAAACGGCGGAGTTCAACTCTTACGGTTCACGAC
Pcc_t0437      GAAAAATATTTGCTGGAGCGCGGCGTCGAAACGGCGGAGTTCAACTCTTACGGTTCACGAC
PcoICMP11533   GAAAA-----
PccICMP5702    GAAAA-----
                *

SeeLT2          GCGGCAACCA-----
PaICMP1526     -----
PbICMP4226     -----
PwaICMP9121    -----
Pcc_s0421      GTGGTAACCATGAAGTGTGGATGCGCGG
Pcc_s0416      GTGGTAACCATGAAGTGTG-----
Pcc_s0417      GTGGTAACCATGAAGTGTGATGAT-----
Pcc_t0438      GCGGTAACCATGAAGTTGG-----
Pcc_s0427      GCGGTAACCATG-----
Pcc_t0437      GCGGTAACCATGAA-----
PcoICMP11533   -----
PccICMP5702    -----

```

LIITE 2. Minimalusta

Suolat ja sokerit	Per 1 litra	Lopullinen konsentraatio
1 M fosfaattipuskuria, pH 5,7	50 ml	50 mM
1 M (NH ₄) ₂ SO ₄	7,6 ml	7,6 mM
1 M MgCl ₂	1,7 ml	1,7 mM
5 M NaCl	0,3 ml	1,7 mM
20% sukroosi	25 ml	0,50 %

Valmista liuokset, steriloi autoklaavissa. Sukroosin kohdalla käytä steriilifiltteriä, sillä korkea kuumuus voi karamellisoida sokerin.

1 M fosfaattipuskuri: Per 100 ml

1 M K ₂ HPO ₄	8,4 ml
KH ₂ PO ₄	91,6 ml

Valmista puskuri, säädä pH-arvoksi 5,7 käyttäen apuna NAOH:ia.

Steriloi autoklaavissa.

Puolijähmeä alusta: Per 1 litra

Agar	7,5 g
Steriili vesi	täyttö 1000 ml:aan

1. Autoklavoi agar ja 50-80% tarvittavasta vedestä. Jäähdytä kunnes 60°C.
2. Lisää steriloidut suolat ja sokeri.
3. Täytä lopputilavuuteen steriilillä kuumalla vedellä, sekoita hyvin.
4. Säilytä lämpökaapissa jotta seos ei jähmety.

Maljat: Per 1 litra

Agar	15 g
Steriili vesi	täyttö 1000 ml:aan

1. Autoklavoi agar ja 50-80% tarvittavasta vedestä. Jäähdytä kunnes 60°C.
2. Lisää steriloidut suolat ja sokeri.
3. Täytä lopputilavuuteen steriilillä kuumalla vedellä, sekoita hyvin.
4. Vala maljat.