



Mirikka Kokkola



Arja Lilja

Mirikka Kokkola ja Arja Lilja

Phytophthora-lajien tunnistus ja tutkiminen perinteisin ja uusien menetelmin

Kokkola, M. & Lilja, A. 2005. *Phytophthora*-lajien tunnistus ja tutkiminen perinteisin ja uusien menetelmin. *Metsätieteen aikakauskirja* 3/2005: 347–358.

Phytophthora-mikrobien merkitys puiden taudinaiheuttajina on viime aikoina korostunut mm. uusien lajien löytymisen myötä. Myös ennestään tunnetut lajit ovat usein osoittautuneet puiden harsuuntumisen aiheuttajiksi abioottisten syiden asemesta. On myös havahduttu uhkaan, että kansainvälinen kasvikauppa levittää tauteja helposti maasta toiseen. Tautien leviämisen estämisessä tarvitaan tehokkaita seulontamenetelmiä, joiden avulla kasvien terveys voidaan nopeasti ja luotettavasti tutkia ja estää sairaan aineiston pääsy uusille alueille.

Phytophthora-lajien perinteinen morfologinen tunnistus on usein vaikeaa, koska niiden eristäminen tutkittavasta materiaalista on hankalaa. Lisäksi pysyviä muoto-opillisia tuntomerkkejä on vähän, lajinsisäinen vaihtelu on suurta ja lajien välillä esiintyy yhtäläisyyksiä ja risteytymistä. Käytännön määritystarpeisiin ja tutkimuksen apuvälineiksi on kehitetty polymeraasiketjureaktioon (PCR) perustuvia DNA:n monistusmenetelmiä, joilla taudinaiheuttaja voidaan tunnistaa suoraan kasvi-, vesi- tai maanäytteestä ilman maljaviljelyä.

Sormenjälkianalyysit (RFLP, AFLP, RAPD, RAMS, SSCP) vaativat tutkittavan mikrobin eristämisen puhtasviljelmäksi ja soveltuvat parhaiten tutkimuskäyttöön. Niiden avulla voidaan selvittää esim. patogeenien sukulaisuussuhteita, risteytymistä, lajinkehitystä, populaatiogenetiikkaa ja tautien epidemiologiaa. DNA:n emäsjärjestyksen selvittäminen antaa tarkkaa tietoa tutkittavasta kohteesta. *Phytophthora*-lajeistakin on jo kertynyt paljon tietoa DNA-tietokantoihin, joihin vertaamalla saadaan esim. varmistetuksi, ovatko eristetyt mikrobit jo kuvattuja vai uusia lajeja.

Molekulaariset menetelmät ovat helpottaneet ja nopeuttaneet kasvintarkastusta ja muuta käytännön kasvinsuojelutyötä. Ne eivät kuitenkaan yksin riitä patogeenin osoittamiseen viranomaistyössä, jossa löydöksistä usein seuraa torjuntatoimia. Suomen kasvintarkastuksessa positiiviset DNA-testien tulokset ja patogeenin elävyys varmistetaan aina myös maljaviljelyllä ja morfologisella tunnistuksella.

Asiasanat: kasvitaudit, mikrobit, sienitaudit, patogeenit, *Phytophthora*, torjunta, tunnistus

Yhteystiedot: Arja Lilja, METLA, Vantaan tutkimuskeskus, PI 18, 01301 Vantaa;

Mirikka Kokkola, KTTK, Kasvintarkastusyksikkö, PL 42, 00501 Helsinki

Sähköposti: arja.lilja@metla.fi, mirikka.kokkola@kttk.fi

Hyväksytty 14.9.2005

I Johdanto

Phytophthora-suvusta tunnetaan nykyisin 60–70 pääosin maalevintäistä lajia, jotka säilyvät kauan hengissä maan orgaanisessa aineksessa kestoasteina (Erwin ja Ribeiro 1996). Ne tartuttavat vain terveitä kasveja, ja puilla infektio usein alkaa juurista, jolloin oireet saattavat näkyä latvustossa vasta pitkänkin ajan päästä. Tsao (1990) on jopa esittänyt, että 90% puiden ja pensaiden versoissa näkyvistä sairauksista on *Phytophthora*-mikrobien aiheuttamia.

Euroopassa esiintyviin havu- ja lehtipuiden harsuuntumisiin liitetään lukuisia vanhastaan tunnettuja *Phytophthora*-lajeja (esim. Schubert ym. 1999, Balci ja Halmschlagler 2003, Jönsson ym. 2003, Oszako ym. 2004). Niiden lisäksi puista on löytynyt monia uusia lajeja, jotka on kuvattu viimeisten viiden vuoden aikana, kuten *P. inundata*, joka esiintyy puilla ja pensailla märillä paikoilla sekä *P. quercina*, *P. psychrophila*, *P. europaea*, *P. uliginosa* ja *P. pseudosyringae*, jotka kaikki ovat löytyneet tutkittaessa tammien harsuuntumista Euroopassa (Jung ym. 1999, 2002, Schubert ym. 1999, Balci ja Halmschlagler 2003, Brasier ym. 2003, Jönsson ym. 2003). *P. psychrophila*, joka Euroopassa on kuvattu juuristoa vahingoittavana patogeenina, on aiheuttanut USA:ssa yhdessä vasta äskettäin kuvatun *P. nemosan* kanssa lehtilaikkuja ja runkokoroja tammilla (*Quercus agrifolia*), parkkitammilla (*Lithocarpus densiflorus*), laakeripuilla (*Umbellularia californica*) ja punapuilla (*Sequoia sempervirens*) sekä Kaliforniassa että Oregonissa (Hansen ym. 2003). Yksi suurimmista huolenaiheista metsäpatologian alalla on tällä hetkellä tammen äkkikuoleman aiheuttaja *P. ramorum*, josta enemmän tässä samassa numerossa olevassa artikkelissa (Lilja ja Kokkola 2005).

Phytophthora-suvussa on *P. ramorum*in (Komission päätös väliaikaisista ... 2002, 2004) lisäksi muitakin hyvin haitallisia ja jopa vaarallisia kasvintuhoojia, kuten *P. cinnamomi* (Smith. ym. 1997) ja *P. fragariae* var. *fragariae* (Laki kasvinterveyden suojelemisesta 702/2003). Tällaisten tuhoojien leviämisen estäminen edellyttää laajoja kartoituksia ja suurten näytemäärien testaamista herkällä, täsmällisellä ja luotettavalla menetelmällä. Tunnistusmenetelmän tulee myös olla rutiinityöskentelyyn sopiva, toistettava ja nopea (esim. Bonants ym. 2000a,b,

Bilodeau ym. 2002, Garbelotto 2003, Kong ym. 2004). *Phytophthora*-tutkimuksissa tarvitaan myös menetelmiä lajien välisten risteymien havaitsemiseen, koska ne ovat verrattavissa tulokaslajeihin ja voivat aiheuttaa epidemioita uusilla esiintymisalueillaan (Brasier ym. 1999).

2 Perinteiset eristykseen ja morfologiaan perustuvat menetelmät

2.1 *Phytophthora*-lajien eristys

Phytophthora-lajien maljaviljely tiedetään yleisesti vaikeaksi, sillä niiden eristäminen kasveista, vedestä ja maasta on usein hankalaa (Ivors ja Garbelotto 2002). *Phytophthora* leviävät vain kasvussa olevissa kasvinosissa ja ovat yleensä huonoja kilpailijoita muiden mikrobien kanssa (Erwin ja Ribeiro 1996, Martin ym. 2004). Eristyksen epäonnistumisen voi aiheuttaa esim. kuuma ja kuiva vuodenaika tai kuiva kasvimateriaali (Kox ym. 2002, Garbelotto 2003). Paras eristämistulos saavutetaan, kun näytteet saadaan viipymättä ravintoalustoille, joihin on lisätty muiden mikrobien kasvua estäviä kemikaaleja (Tsao ja Ocana 1969, Hansen ym. 1979, Kennerley ja Bruck 1981, Hamm ja Hansen 1982, Jeffers ja Martin 1986). Maassa tai kasveissa olevia kestoasteita voidaan aktivoida kuivattamalla ja kostuttamalla materiaalia useamman kerran peräkkäin. Tähän voidaan liittää myös jakso, jonka aikana näytteitä pidetään kosteina viileässä (4–8 °C) sporangioiden eli parveiluitiöpesäkkeiden ja parveiluitiöiden tuoton vauhdittamiseksi (Rahimian ja Mitchell 1988).

Mikrobeja voidaan myös pyydystää sekä maasta, vedestä että kasveista käyttämällä syöttejä, joihin *Phytophthora* parveiluitiöt tarttuvat. Syötteinä käytetään joko raakoja hedelmiä tai kokonaisia kasveja tai kasvien osia. Esim. omena tehdään kolo, johon pannaan joko maata tai palanen oireista kasvia. Toinen vaihtoehto on lisätä astiaan, jossa on maata ja vettä tai pelkästään tutkittavaa vettä, syötiksi hedelmiä, kasveja tai kasvin osia. Syötteihin tulee parissa päivässä laikkuja, joista varsinainen eristys usein onnistuu (Streito ym. 2002, Themann ym. 2002).



Kuva 1. Phytophthora-lajeja voidaan pyydystää kasveista tai maasta raakojen 'Golden Delicious' -omenoiden avulla. Phytophthorat kasvavat omenan sisään asetetusta näytteestä maltoon, josta ne voidaan edelleen eristää ravintoalustalle. Kuva Arja Lilja, Metla.

2.2 Lajinmääritys morfologian perusteella

Yli 40 vuotta sitten Waterhouse (1963) jakoi ensimmäisenä eri puolilla maailmaa kuvatut *Phytophthoras* kuuteen ryhmään morfologian ja fysiologian mukaan. Jaottelun perusteina ovat mm. sporangioiden ja niiden suuaukon sekä munaitiöiden rakenne ja anteridiumien kiinnittymistapa munaitiöpesäkkeeseen (Waterhouse 1963). Yksi tärkeä jakoperuste on myös se, tuottaako viljelmä suvullisen asteen eli munaitiöitä ilman pariutusta (Waterhouse 1963). Yksinään, ilman pariutusta munaitiöitä tuottavia lajeja nimitetään homotallisiksi. Heterotalliset lajit sen sijaan vaativat eri kantojen, A1 ja A2, kohtaamisen ennenkuin suvullinen muoto voi syntyä. Oomycetes-mikrobit ovat siinä mielessä poikkeuksellisia, että ne voivat pariutua vieraan lajin kanssa kunhan se vain edustaa vastakkaista pariutumistyyppiä (Werres ym. 2001). Vaikka *Phytophthora*-lajeille on tehty monia määrittyskaavioita, Stampsin ym. (1990) täydentämä kuuden ryhmän luokitus on vielä yleisesti käytetty. Esim. uusien lajien kuvausten yhteydessä usein edelleen mainitaan mihin ryhmään kuvattu laji kuuluu, vaikka nykyisin tiedetään, että lajien kehittymisen historia ei tue tätä jakoa (Cooke ym. 2000a, Martin ja Tooley 2003a,b, Kroon ym. 2004a).

Hamm ja Hansen (1991) ovat tehneet yhteenvedon, jossa kerrotaan menetelmistä, joilla *Phytophthorien* eristäminen onnistuu metsäpuiden taimilta sekä niistä tekniikoista, joilla viljelmät saadaan tuottamaan tunnistuksen vaatimat rakenteet. Omat sovellukset tekniikoista on tehty myös tutkimuksessa, jossa kartoitettiin *Phytophthora*-lajien osuutta alueilla, joilla esiintyi tammien harsuuntumista (Jung ym. 1996).

Morfologisen tunnistuksen etuna on se, että patogeenin elävyys tulee osoitetuksi määrittelyn yhteydessä. Tämä on erityisen tärkeää epidemiologisissa tutkimuksissa ja tapauksissa, joissa löydökset aiheuttavat lakisääteisiä kasvinsuojelutoimenpiteitä (Jung ym. 1996, Garbelotto 2003).

2.3 Morfologisen lajinmäärityksen ongelmat

Perinteiset morfologiset määrittämenetelmät ovat yleensä vaivalloisia ja hitaita, sillä ne edellyttävät patogeenin eristämistä ravintoalustalle sekä puhtasviljelyä. Sen lisäksi on tunnettava tekniikat, joiden avulla viljelmä saadaan tuottamaan rakenteet, joihin lajin määrittäminen perustuu. Koxin ym. (2002) mukaan esim. *P. ramorum*in eristämiseen kasvista ja tun-

nistukseen kuluu aikaa vähintään 5–10 vrk. Vielä hitaampaa on maanäytteiden tutkiminen syöttikasvien avulla. Mansikan punamädän aiheuttajan, *P. fragariae* osoittaminen maasta syöttikasveilla vie 5–6 viikkoa. Myös pariutustestit ovat hitaita ja voivat usein epäonnistua (Kroon ym. 2004b).

Phytophthora-lajien morfologista määrittystä vaikeuttavat lajinsisäinen vaihtelu ja lajienväliset yhtäläisyydet sekä risteymät (Man in't Veld ym. 1998, Brasier ym. 1999, Bonants ym. 2002b). Morfologian samankaltaisuus on aiheuttanut myös sen, että lajeiksi on nimetty löyhästi samankaltaisten isolaattien muodostamia lajikomplekseja, kuten *P. megasperma* ja *P. drechsleri* (Cooke ja Duncan 1997, Liew ym. 1998, Cooke ym. 2000b). Pysyviä muoto-opillisia tuntomerkkejä on niukasti, minkä vuoksi lajitason tunnistus voi epäonnistua asiantuntijaltakin. Morfologian muuntelevuus ryhmien sisällä haittaa määrittyskaavojen käyttöä, ja onkin johtanut siihen, että uusia lajeja on luultu aiemmin kuvatuiksi tai jo tunnettuja lajeja uusiksi tautiriskeiksi (Cooke ym. 2000b).

3 Molekyylibiologiset menetelmät

3.1 Periaate

Taudinaiheuttajan DNA:n tai RNA:n tunnistamiseen perustuvat menetelmät ovat nopeasti yleistyneet ja osin syrjäyttäneet muita tekniikoita kasvitautien määrittämisessä ja tutkimuksessa. Useimmat näistä pohjautuvat polymeerasiketjureaktioon (PCR), jossa tutkittavan organismin DNA löydetään kasvi- ym. näytteestä keinoitekoisesti valmistettujen lyhyiden DNA-juosteiden eli alukkeiden avulla. Alukkeiden emäsjärjestys suunnitellaan siten, että ne kiinnittyvät pareittain tutkimuskohteen perimään, ja niiden väliin jää tunnistuksen tms. tarkoituksen kannalta sopiva DNA-jakso. Tätä jaksoa monistetaan keinoitekoisesti DNA-polymeerasientsyymien avulla, ja monistunut PCR-tuote tai sen puuttuminen havaitaan geeli-elektroforeesin tai merkkiaineiden välityksellä.

3.2 Tunnistuksessa ja tutkimuksessa käytetyt DNA-alueet

Perimän emäsjärjestyksen on todettu olevan samankaltainen läheisten lajien keskuudessa. Tutkimuksen tavoite ja se, millä taksonomisella tasolla organismeja halutaan tunnistaa ja erotella toisistaan, sanelee mitä perimän aluetta tarkoitukseen voidaan käyttää. Tuman ribosomaalisen DNA:n (rDNA) geenien välisten ITS-alueiden (internal transcribed spacer regions) emäsjärjestystä on laajasti hyödynnetty PCR-alukkeiden tunnistuskohtana taudinaiheuttajien, myös *Phytophthora*-lajien, määrittämisessä ja lajinkehityksen tutkimuksessa (Cooke ja Duncan 1997, Brasier ym. 1999, Schubert ym. 1999, Bonants ym. 2000a,b, Hughes ym. 2000, Nechwatal ym. 2001, Werres ym. 2001, Bonants ym. 2002, Duncan ja Cooke 2002, Grote ym. 2002, Ivors ja Garbelotto 2002, Kox ym. 2002, Garbelotto 2003, Martin ja Tooley 2003b). Ne ovatkin yleensä hyvin käyttökelpoisia, koska niiden kopioluku solussa on suuri ja emäsjärjestys useimmiten lajille ominainen.

ITS-alueiden emäsjärjestyksen vaihtelu ei kuitenkaan aina ole riittävää lähisukuisten lajien erottelamiseen (esim. Liew ym. 1998), ja ITS-alueisiin perustuvat lajispesifiset alukkeet voivat ristireagoida muiden lajien kanssa, etenkin jos PCR:n reaktio-olot eivät ole tarpeeksi tarkat tai jos kohde-DNA:ta on liikaa (Garbelotto 2003). Joillakin saman morfologiaryhmän lajeilla, kuten nelosryhmän *P. infestans*- ja *P. mirabilis*- sekä ykkösryhmän *P. cactorum*-, *P. idaei*- ja *P. pseudotsugae*-lajeilla on identtinen ITS-alueiden emäsjärjestys (Cooke ym. 2000b, Rizzo ym. 2002). Bilodeaun ym. (2002) mukaan ITS-alueiden DNA-sekvenssin analysointi ei myöskään erotellut luotettavasti *P. ramorum* ja *P. lateralis* toisistaan. Werres ym. (2001) osoittivatkin, että näiden lajien ITS1-alueilla on vain kolmen ja ITS2-alueilla kahdeksan nukleotidin ero. Ristireaktiosta aiheutuvan väärän määrityksen riski on kuitenkin käytännössä melko vähäinen, koska *P. lateralis* on juuristopatogeeni (Hall 1991), kun taas *P. ramorum* tartuttaa kasvien maanpäällisiä osia (Werres ym. 2001).

Mitokondrio-DNA:n sytokromi-c-oksidaasigeenien (*coxI* ja *coxII*) aluetta on myös usein käytetty PCR-alukkeiden suunnitteluun, koska siinä esiintyy lajienvälistä vaihtelua ja sen geenien kopioluku on suuri. Alueella on myös konservoituneita jaksoja,

joita voidaan hyödyntää sukuspesifisten alukkeiden suunnittelussa (Martin ym. 2004). *Cox*-geenien sekvenssiä on käytetty mm. *P. ramorum*in tunnistukseen ja sukulaisuuden vertailuun *P. nemorosan* ja *P. pseudosyringaen* kanssa (Garbelotto 2003, Martin ja Tooley 2003a,b, 2004). Viimeksi mainitut lajit aiheuttavat samanlaisia oireita kuin *P. ramorum* samoissa kasvilajeissa (Martin ym. 2004). Kroon ym. (2004b) kehittivät *cox1*-geeniin perustuvan testin, joka erottaa *P. ramorum*in A1- ja A2-pariutumistyyppit toisistaan.

Tuman DNA:ssa sijaitsevan beta-tubuliinigeenin emäsjärjestyksen on joillakin lajeilla todettu sisältävän enemmän lajienvälistä vaihtelua kuin ITS-alueiden. Tätä vaihtelua on käytetty mm. *P. ramorum*in tunnistamiseen (Garbelotto 2003) ja erottamiseen *P. lateralis*-lajista (Bilodeau ym. 2002). Beta-tubuliinigeeniä, kuten myös muutamia muita tuman DNA:n geenialueita, on hyödynnetty *Phytophthora*-lajien kehityshistorian selvittämisessä ja niiden perusteella on esitetty taksonomisen luokittelun uudistamista (Kroon ym. 2004a).

Phytophthora-lajien sisäistä muuntelua ja risteymiä on tutkittu tekniikoilla, jotka perustuvat tietyllä tai koko genomien alueella oleviin restriktioentsyymien (Brasier ym. 1999, Cooke ym. 2000b, Werres ym. 2001, Bonants ym. 2002, Fung ym. 2002) tai sattumanvaraisten PCR-alukkeiden tunnistuskohtiin (Cooke ym. 1996, Man in't Veld ym. 1998, English ym. 1999, Schubert ym. 1999) tai mikrosatelliittilokuksiin (Prospero ym. 2004).

3.3 Molekulaarinen lajimmääritys suoraan näytteestä

3.3.1 Tavallinen ja kaksois-PCR-testi

Tavallinen yksivaiheinen PCR-testi, jossa useimmiten käytetään vain yhdenlaista taksonispesifistä alukeparia kohteen tunnistamiseen, on osoittautunut käyttökelpoiseksi *Phytophthora*-lajien rutiinitestauksessa suoraan kasvista (esim. Liew ym. 1998, Schubert ym. 1999, Nechwatal ym. 2001, Grote ym. 2000, 2002, Kox ym. 2002, Garbelotto 2003) ja vedestä sekä vesiviljelyssä käytetystä ravinneliuoksesta ja kiviviljasta (Grote ym. 2000, 2002, Kong ym. 2003a). Sen sijaan Nechwatal ym. (2001) totesivat,

että maanäytteiden tutkimisessä testi voi antaa vääriä negatiivisia tuloksia, koska maasta eristettyyn DNA:han saattaa jäädä epäpuhtauksia, jotka estävät polymeraasin toimintaa PCR-monistuksessa.

Groten ym. (2002) mukaan tavallisella PCR-testillä voitiin tunnistaa 4 ng *P. medicaginis*-lajin DNA:ta näytteestä, jossa isäntäkasvin ja patogeenin DNA-pitoisuuksien suhde oli 1 000 000 : 1. Bonants ym. (2000a) puolestaan pystyivät osoittamaan 1 pg:n *P. fragariae*in DNA:ta parveilutiöliuoksesta. Yksivaiheisen PCR:n heikkoutena on kuitenkin toisinaan ollut suhteellisen huono tunnistusherkyys.

Tunnistuskyykyä on parannettu kehittämällä kaksois-PCR-testi (nested-PCR), jossa kohde-DNA monistetaan kahden erilaisen alukeparin avulla joko yhtäaikaaisesti tai kahden peräkkäisen monistuskierroksen aikana. Alukeparit on yleensä suunniteltu siten, että toinen tunnistaa ja monistaa laajemman eliöryhmän, esimerkiksi *Phytophthora*-suvun ja sen lähisukujen DNA:ta. Toisen alukeparin tunnistuskohdat sijaitsevat ensimmäisen parin monistaman DNA-jakson sisällä ja ovat etsittäville mikrobille ominaiset tarkemmalla taksonomisella tasolla.

Kaksois-PCR-testiä käytetään yleisesti *Phytophthora*-lajien tunnistamiseen ja rikastamiseen näytteistä (esim. Bonants ym. 2000a, Cooke ym. 2000b, Hughes ym. 2000, Nechwatal ym. 2001, Duncan ja Cooke 2002, Grote ym. 2002, Garbelotto 2003, Kroon ym. 2004b, Martin ym. 2004). Groten ym. (2002) mukaan kaksois-PCR oli tuhat kertaa herkempi *P. nicotianaen* tunnistuksessa kuin tavanomainen yksinkertainen PCR. Nechwatal ym. (2001) totesivat, että kahden sisäkkäisen alukeparin PCR:llä voitiin havaita 5 kpl *P. citricolan* ja 300 kpl *P. quercinan* parveilutiöitä 100 ml:ssa näytettä, joskin orgaanisesta maa-aineksesta tunnistus oli heikompa. Duncanin ja Cooken (2002) mukaan kaksois-PCR lisää testauksen herkkyyttä ja spesifisyyttä ja sopii erityisen hyvin *Phytophthora*-lajien etsimiseen epäpuhtaista, useita mikrobilajeja sisältävistä kasvi- ja vesinäytteistä. Vaikka maassa olevat inhiboivat aineet haittaavat polymeraasiketjureaktiota, kaksois-PCR on heidän mukaansa kyllin herkkä likaistenkin näytteiden, kuten ojaveden ja maan tutkimiseen.

3.3.2 Kvantitatiivinen PCR-testi

Kvantitatiivisissa PCR-testeissä (real-time PCR) kohde-DNA tunnistetaan ja monistetaan samalla tavalla kuin tavallisessa ja kaksois-PCR-testissä. Erona on kuitenkin se, että monistustuotteen määrää voidaan mitata merkkiaineiden välityksellä monistuksen aikana ja siten saada tietoa esim. taudinaiheuttajan runsaudesta tutkitussa näytteessä. Merkkiaineet aktivoituvat mitattavaan muotoon alukkeiden tunnistaessa kohteensa ja DNA:n monistuksessa ja ilmaisevat monistustuotteen määrän kasvun reaktioseoksessa.

Kvantitatiivisen PCR:n käyttö on yleistymässä myös *Phytophthora*-lajien diagnostiikassa ja tutkimuksessa (Ivors ja Garbelotto 2002, Hayden ym. 2004). Ivors ja Garbelotto (2002) tutkivat *P. ramorum* tunnistusta ja tartunnan voimakkuutta sekä *P. ramorum* ja *P. ilicis*-tyyppisen tuntemattoman lajin yhtäaikaista tunnistusta samassa koeputkessa kvantitatiivisella PCR-tekniikalla (TaqMan®). Kahden lajin yhtäaikaisten tunnistus onnistui hyvin, mutta ITS2-alueille tehdyt *P. ramorum*-alukkeet ristireagoivat *P. lateralis*-lajin kanssa.

Kvantitatiivinen PCR-tekniikka on hyödyllinen esim. epidemiologisissa ja etiologisissa tutkimuksissa, koska sen avulla voidaan erottaa tartunnan saaneet kasvit sellaisista kasveista, joiden pinnalla taudinaiheuttaja on satunnaisena epäpuhtautena (Garbelotto 2003, Hayden ym. 2004). Garbelotto (2003) on esittänyt, että kvantitatiivisen PCR-analyysin avulla voitaisiin määrittää se taudinaiheuttajan pitoisuus, joka osoittaa, että patogeeni on elävä ja tartutuskykyinen. Tätä tietoa voitaisiin hyödyntää esim. kasvinsuojelusäädösten toimeenpanossa. Kvantitatiivisten PCR-menettelmien etuna on myös testiin kuluvan ajan lyheneminen pariin tuntiin (esim. Ivors ja Garbelotto 2002), koska PCR-tuotetta ei tarvitse analysoida geielektroforeesin avulla.

3.4 Puhdasviljelmien tutkiminen sormenjälkiteknikoilla

Sormenjälkianalyysillä tarkoitetaan tekniikoita, joilla tutkittavan organismin koko perimää tai sen osaa pilkkomalla ja monistamalla saadaan aikaan eliölle ominainen ja yksilöllinen eripituisten DNA-

palojen joukko. Erikokoiset palat erotellaan toisistaan tavallisesti geielektroforeesin avulla, jolloin niistä muodostuu DNA-sormenjäljiksi nimitetty juovakuvio. DNA-sormenjäljet poikkeavat toisistaan yleensä sitä enemmän, mitä kaukaisempaa sukua eliöt ovat toisilleen. Sormenjälkianalyysit sopivat parhaiten tutkimustarkoituksiin, koska niiden onnistunut tulkinta edellyttää tutkittavien mikrobien eristämistä puhdasviljelmiksi.

3.4.1 RFLP- ja AFLP-analyysit

Restriktiofragmenttien pituusvaihtelun analyysissä (RFLP, restriction fragment length polymorphism) tutkittava DNA-alue pilkotaan restriktioentsyymeillä, jotka katkaisevat sen kullekin entsyymille ominaisista tunnistuskohdista tiettyjen emäryhmien välistä. Katkaisukohtien lukumäärä ja etäisyys toisistaan vaihtelevat yksilöiden ja organismien välillä ja saavat aikaan toisistaan poikkeavat sormenjälkikuviot.

ITS-alueiden analysointia RFLP-tekniikalla on käytetty *Phytophthora*-risteymien selvittämiseen (Bonants ym. 2000b) ja lajintunnistukseen (Duncan ja Cooke 2002). Cooke ym. (2000b) totesivat RFLP-analyysin käyttökelpoiseksi lajintunnistusmenetmäksi silloin, kun näytteessä oli vain yhtä *Phytophthora*-lajia. Jos lajeja oli useampia tai joukossa oli *Pythiumeja*, RFLP-sormenjälkikuvion fragmenttien yhteenlaskettu pituus saattoi ylittää alkuperäisen pilkotun alueen pituuden. Tällöin tunnistus vaati työläitä ja aikaa vieviä jatkotoimia.

Tapauksissa, joissa sukulaistaksoneilla on samankaltaiset ITS-alueet tai, kun tarvitaan lajinsisäistä erottelua, AFLP-analyysi (amplified fragment length polymorphism) on sopivampi kuin RFLP (Cooke ym. 2000b). AFLP-analyysi perustuu restriktioentsyymeillä pilkotun DNA:n spesifiseen PCR-monistukseen, joka tuottaa suuren joukon monimuotoisia DNA-merkkijaksoja. AFLP:n etuna pidetään erityisesti sitä, että tulokset ovat toistettavia ja selkeitä ja tekniikan avulla saadaan tietoa koko genomien alueelta kohtuullisessa ajassa.

Werres ym. (2001) käyttivät AFLP-analyysiä muiden tekniikoiden ohella kuvatessaan *P. ramorum* uutena lajina. Heidän mukaansa *P. ramorum* AFLP-sormenjälkikuvio, kuten isoentsyymi-

profiilikin, poikkesi muista lajeista, myös läheisestä *P. lateraliksesta*. *P. ramorum*in lajinsisäinen vaihtelu sen sijaan oli hyvin vähäistä. Bonants ym. (2002) havaitsivat AFLP-analyysillä pieniä eroja amerikkalaisten ja eurooppalaisten *P. ramorum*-isolaattien välillä. DNA:n emäsjärjestyksen selvittäminen (sekvensointi) varmisti kuitenkin, että isolaatit kuuluivat samaan lajiin. Kroon ym. (2004b) kritisoivat AFLP:n käyttöä pariumistyyppien määrittämisessä, koska menetelmä on työläs ja tuloksia on toisinaan vaikea analysoida. Fung ym. (2002) tutkivat Kalifornias-ta eri kasvilajeista kerättyjä *P. ramorum*-näytteitä AFLP-analyysillä ja havaitsivat sekä eroja että yhtäläisyyksiä eri isolaattien välillä.

Brasier ym. (1999) osoittivat AFLP:n avulla, että uusi aggressiivinen lepän *Phytophthora*, jonka Brasier ym. (2004) kuvasivat vasta viime vuonna (*P. alni* subsp. *alni*, *P. alni* subsp. *uniformis* ja *P. alni* subsp. *multiformis*), käsitti joukon heteroploidisia lajienvälisiä risteymiä, joihin olivat osallisina *P. cambivoran* ja *P. fragariaen* kaltaiset patogeeneit. Vaikka AFLP-sormenjälkitekniikkaa pidetään erityisen sopivana lajinsisäisen muuntelun ja risteymien tutkimiseen, sitä on käytetty myös lajinmäärittäykseen (Bonants ym. 2000a, 2002).

3.4.2 RAPD-analyysi

RAPD-analyysi (randomly amplified polymorphic DNA) on PCR-tekniikka, jossa DNA:n vaihtelevuutta tutkitaan monistamalla sitä lyhyiden sattumanvaraisten alukkeiden avulla. Monistukseen käytetään yleensä vain yhdenlaisia alukkeita, jotka tarttuvat tunnistuskohtiinsa tutkittavalle DNA-alueelle, joka usein käsittää koko genomia. PCR-monistustuotetta syntyy silloin, kun tunnistuskohdat sijaitsevat sopivan välimatkan päässä toisistaan ja alukkeet suuntautuvat toisiaan kohden oikealla tavalla. RAPD-analyysi ei vaadi lainkaan etukäteistietoa kohde-DNA:n emäsjärjestyksestä, vaan käyttökelpoiset sormenjälkikuviot saadaan aikaan kokeilemalla eri alukkeita.

RAPD-tekniikkaa on useimmiten käytetty lajinsisäisen muuntelun havaitsemiseen (esim. Lilja ym. 1998). Cooke ym. (1996) kuitenkin tutkivat sen avulla lähisukuisten lajien *P. cactorum*, *P. clandestina*, *P. pseudotsugae*, *P. iranica* ja *P. idaei* eroja ja

havaitsivat, että RAPD:t erottelivat lajit paremmin kuin ITS-alueiden sekvenssien analysointi. RAPD-tekniikkaa on myös hyödynnetty lajispesifisten PCR-alukkeiden valmistamisessa (Schubert ym. 1999).

RAPD-sormenjälkiä on lisäksi käytetty *Phytophthora*-hybridien analysointiin. Man in't Veld ym. (1998) osoittivat *P. nicotianae*- ja *P. cactorum*-lajien välisen luonnollisen risteymän RAPD:n ja isoenzymianalyysin avulla ja English ym. (1999) käyttivät sitä *P. capsicin* ja *P. nicotianaen* risteytyksen tutkimiseen.

3.4.3 Mikrosatelliitit

Mikrosatelliitit ovat DNA-alueita, jotka koostuvat yhdestä kuuteen emäksen muodostamista toistojaksoista, joille on ominaista suuri mutatoivuus. Niitä esiintyy runsaasti erilaisten eliöiden perimässä, ja ne ovat pituudeltaan poikkeuksellisen vaihtelevia jopa saman populaation yksilöiden välillä. Mikrosatelliitteja voidaan siis käyttää merkkijaksoina myös hyvin lähisukuisten organismien erottamiseksi toisistaan. Merkkijaksojen eristämiseen, valintaan ja monistukseen on kehitetty monenlaisia menetelmiä, jotka kaikki ovat varsin monivaiheisia ja -mutkaisia.

Mikrosatelliitteja ei ole kovin paljon hyödynnetty *Phytophthora*-tutkimuksessa, mahdollisesti tekniikan työläyden vuoksi. Prospero ym. (2004) kehittivät mikrosatelliittimerkkijaksot *P. ramorum*in leviämisen ja populaatorakenteen tutkimiseen Oregonissa. He havaitsivat A1- ja A2-pariumistyyppien välillä eroja seitsemässä lokuksessa 14 monistetusta ja totesivat neljä lokusta käyttökelpoisiksi lajinmäärittäyksessä, koska ne erottivat *P. ramorum*in myös lähisukuisista lajeista. Tämän lisäksi mikrosatelliittimerkkijaksoja on hyödynnetty RAMS (random amplified microsatellites) -analyysissä, jossa vertailtiin eri isäntäkasveista eristettyjen *P. cactorum*-kantojen geneettisiä eroja (Hantula ym. 1997, 2000).

3.4.4 SSCP-analyysi

Yksisäikeisen nukleinihapon rakenteen ja kolmiulotteisen muodon vaihteluun perustuva SSCP-analyysi (single strand conformation polymorphism) on erityisesti pistemutaatioiden havainnointiin kehitetty tekniikka. Tutkittava DNA-alue monistetaan PCR:llä ja denaturoidaan yksisäikeiseksi. Yksisäikeinen juoste muodostaa emästen pariutumisen kautta itsensä kanssa kaksisäikeisiä rakenteita. Pienetkin muutokset emäsjärjestyksessä voivat vaikuttaa sisäisiin emästen pariutumisiin ja niiden myötä DNA-kappaleen muotoon ja liikkuvuuteen geelielektroforeesissa. Tekniikka vaatii elektroforeesilta hyvää erotelukykyä.

SSCP-analyysi ei ole ollut kovin yleinen *Phytophthora*-lajien tutkimuksessa. Kong ym. (2003b) monistivat 29 *Phytophthora*-lajin ribosomaalista DNA:ta käyttäen ITS6 ja ITS7 alueita alukkeina ja analysoivat PCR-tuotteen SSCP-analyysillä käyttäen kehittämäänsä yksijuosteista DNA:ta molekyylipainoverrokkina ja totesivat, että tekniikalla oli mahdollista erottaa kaikki lajit toisistaan geeliin muodostuneiden sormenjälkikuvioiden avulla. Lisäksi analyysi osoitti *P. megasperma*- ja *P. drechsleri*-lajikompleksien sisäisen muuntelun ja jakaantumisen alaryhmiin. SSCP-analyysiä on myös esitetty keinoksi, jolla *P. ramorum* voidaan löytää nopeasti epäilyttävistä kasvieristä (Kong ym. 2004). Garbelotto (2003) puolestaan mainitsee SSCP-tekniikan sopivan mm. lajispesifisen PCR:n monistustuotteen oikeellisuuden tarkistamiseen.

3.5 Sekvensointi

DNA:n emäsjärjestyksen selvittäminen ja vertaaminen tunnettuihin sekvensseihin antaa kaikkein tarkinta tietoa tutkittavan kohteen identiteetistä, kehityshistoriasta ja sukulaisuussuhteista. *Phytophthora*-lajeistakin on jo kertynyt paljon sekvenssitietoa DNA-tietokantoihin. Duncan ja Cooke (2002) mainitsivat, että kaikkien tunnettujen silloin olemassa olevien *Phytophthora*-lajien ITS-alueiden emäsjärjestykset oli v. 2002 selvitetty ja koottu tietokannaksi. Uusia lajeja voidaan verrata tietokantaan, mikä helpottaa ja nopeuttaa niiden määrittystä suuressi.

Cooke ym. (2000a) selvittivät *Phytophthora*-suvun epäselvää asemaa Oomycetes-mikrobien ryhmässä ITS-alueiden emäsjärjestyksen avulla. Oomycetes-taksoni jakaantui kahteen selvään päähaaraan, joista toisessa olivat Saprolegniales-lahkon ja toisessa Pythiales- ja Peronosporales-lahkojen jäsenet. *Phytophthor*at ryhmittyivät Peronosporales-haarassa varsin tiiviiksi ryhmäksi, jossa niiden lisäksi oli myös lehtihomeiden edustaja *Peronospora sparsa*. Viimeksi mainittu havainto voi Cooken ym. (2000a) mukaan viitata siihen, että biotrofiset lehtihomeet ovat aika äskettäin kehittyneet *Phytophthora*-kantamuodosta. Tulokset tukivat myös käsitystä, että *Phytophthor*at ovat kehittyneet *Pythium*-lajien kaltaisen kantamuodon välityksellä tuntemattomasta esi-isästä.

Sekvensointia on luonnollisesti käytetty sukulaisuuden ja lajinkehityksen tutkimiseen myös *Phytophthora*-suvun sisällä. Kroon ym. (2004a) havaitsivat tuman- ja mitokondrio-DNA:n geenien sekvenssien perusteella, ettei klassinen (Waterhouse 1963) luokittelu kuvasta *Phytophthorien* lajinkehitystä. He esittivät lajien uutta jakoa kahdeksaan pääryhmään tutkimiansa 48 lajin perusteella. Heidän mukaansa myös morfologisten, patogeenisten ja lisääntymiseen liittyvien piirteiden evoluutiosta voitiin tehdä päätelmiä lajien muodostamasta sukupuukaaviosta. Ilmiasun piirteet eivät kuitenkaan välttämättä kuvasta lajinkehityksellistä sukulaisuutta, koska ne ovat voineet kehittyä toisistaan riippumatta eri lajeilla. Myöskään homo- tai heterotallisuus ei näyttänyt periytyvän yhdeltä ainoalta kantalajilta.

Cooke ja Duncan (1997) tutkivat 16 *Phytophthora*-lajin kehitystä ja sukulaisuutta ITS-alueiden sekvensoinnilla ja saivat aikaan ryhmittelyn, joka osittain oli yhteneväinen klassisen jaottelun kanssa. Papillattomat lajit erottuivat selvästi muista, mutta papillalliset ja puolipapillalliset ryhmittyivät samaan puukaavion haaraan. ITS-sekvenssien analyysi viitattiin siihen, ettei pariutumistyyppiä tai anteridiumin kiinnittymistapaa voi pitää luotettavina luokitteluperusteina. Cooken ja Duncanin (1997) mukaan em. ominaisuudet voivat olla geneettisesti melko yksinkertaisesti säädeltäviä, ja ne ovat voineet muuttua evoluutiossa useammin kuin yhden kerran.

Uusia lajeja ovat tutkineet sekvensoimalla esim. Martin ja Tooley (2003b). He esittivät *coxII*-geenin ja ITS-alueen emäsjärjestyksen perusteella, että

P. ramorum, *P. nemorosa* ja *P. pseudosyringae* ovat kehityshistorialtaan erillisiä uusia lajeja eivätkä lajienvälisen risteytymisen tulosta. Kahta viimeksi mainittua, vähemmän aggressiivista lajia, on tavattu *P. ramorum*in lisäksi tammen äkkikuoleman yhteydessä oireellisissa kasveissa Kaliforniassa.

Sekvensointi on helpottunut ja nopeutunut kaupallisten reagenssipakettien ja automaattisten sekvensointilaitteistojen yleistymisen myötä, ja sitä voidaankin käyttää myös käytännön kasvinsuojelutyössä vaikkapa muiden tunnistusmenetelmien tulosten tarkistamiseen. Esimerkiksi lajispesifisen PCR-määrityksen oikeellisuus voidaan melko kätevästi varmistaa sekvensoimalla PCR-tuote, etenkin jos se on kooltaan melko pieni, mieluummin alle 500 emäsparia (Garbelotto 2003). Suurten puhdasviljelmämäärien rutiinimäärityksiin sekvensointi kuitenkin saattaa olla vielä liian kallis menetelmä. Tällaisiin tarkoituksiin sopivat esim. sormenjälkitekniikat toistaiseksi paremmin (Kong ym. 2003b).

4 Molekulaaristen menetelmien edut kasvin-tarkastuksessa

DNA:n monistamiseen perustuvien menetelmien tunnistusherkyys on usein todettu muita tekniikoita paremmaksi. Esimerkiksi Koxin ym. (2002) mukaan PCR-tekniikalla pystyttiin havaitsemaan 94 % ja maljaviljelyyn avulla 74 % *P. ramorum* -positiivisista näytteistä. Myös Garbelotto (2003) totesi, että PCR:n avulla voitiin väriin negatiivisten tulosten määrää vähentää. Testi soveltui maljaviljelyssä vaikeiksi osoittautuneille *P. ramorum*in isäntäkasvilajeille, ja oli käytännössä näiden tutkimiseen ainoa vaihtoehto. Etuna oli myös se, että taudinaiheuttaja voitiin luotettavasti tunnistaa suoraan isäntäkasvista pieninäkin pitoisuuksina. PCR-menetelmä soveltui myös näytteille, joissa patogeeni oli tarkoituksellisesti tehty tartutuskyvyttömäksi ja joita siten voitiin käsitellä aiheuttamatta tartuntavaaraa ympäristöön. Taudinaiheuttaja voitiin löytää nopeasti suurista näytemääristä, joskin huolellinen näytteen valmistus ja DNA:n eristys oli ensiarvoisen tärkeää testin luotettavuuden kannalta. Huonosti onnistunut DNA:n

eristys johtaa väriin negatiivisiin tuloksiin, joiden havaitsemiseksi testiin onkin sisällytettävä kontrollialukkeet, jotka monistavat esim. kasvin DNA:ta.

Molekulaariset tunnistusmenetelmät eivät kuitenkaan yksin riitä taudinaiheuttajan osoittamiseen kasvintarkastuksessa, jossa löydöksistä usein seuraa torjuntatoimenpiteitä. Blomqvist ja Kubiasiak (2003) huomauttivat, että maissa, joissa vaarallisen patogeenin jo tiedetään esiintyvän, oireiltaan tyypillisten kasvien positiivinen DNA-testin tulos saattaa riittää varmistamaan tuhoajan esiintymisen. Sen sijaan, jos tuhoojaa ei ole alueella aiemmin tavattu, tarvitaan positiivisen DNA-testin lisäksi morfologinen määrittely ja/tai sopivan DNA-alueen sekvensointi.

KTTK:n kasvitarkastuslaboratoriossa molekyyli-biologiset tekniikat ovat helpottaneet ja nopeuttaneet kasvintarkastusta ja muuta käytännön kasvinsuojelutyötä. Suomen kasvintarkastuksessa bakteerien ja sienten DNA-pohjainen määrittely varmistetaan kuitenkin aina myös muilla menetelmillä. Viranomaisytyössä keskitytään pääasiassa niihin tuhoajiin, jotka mainitaan lainsäädännössä, ja niiden tunnistukseen käytetään tutkijoiden kehittämiä valmiita menetelmiä. Onkin ensiarvoisen tärkeää, että tieteellisellä tutkimuksella selvitetään laajempaa *Phytophthora*-lajistoa ja sen merkitystä sekä kehitetään diagnostisia menetelmiä. Tämän ryhmän mikrobeilla on todennäköisesti luultua suurempi merkitys puiden tuhoajina, sillä viime aikoina on osoitettu selvästi, että harsuuntuneiden puiden vaivojen syynä on kuivuuden ja muiden abioottisten tautien sijasta vanhoja tai uusia *Phytophthora*-lajeja (Jung ym. 1999, 2002, 2003, Schubert ym. 1999, Balci ja Halmschlager 2003, Brasier ym. 2003, Jönsson ym. 2003).

Kirjallisuus

- Balci, Y. & Halmschlager, E. 2003. Incidence of *Phytophthora* species in oak forests in Austria and their possible involvement in oak decline. *Forest Pathology* 33: 157–174.
- Bilodeau, G., Lévesque, C.A., De Cock, A.W.A.M., Kristjansson, G., McDonald, J. & Hamelin, R.C. 2002. Detection and identification of *Phytophthora ramorum* causal agent of sudden oak death by molecular beacon. Poster abstract. Sudden oak death science symposium,

- December 15–18, 2002, Monterey, California.
- Blomqvist, C. & Kubisiak, T. 2003. Laboratory diagnosis of *Phytophthora ramorum* from field samples. Sudden oak death online symposium, April 21–May 12, 2003.
- Bonants, P.J.M., van Gent-Pelzer, M.P.E. & Hagenaar-de Weerd, M. 2000a. Characterization and detection of *Phytophthora fragariae* in plant, water and soil by molecular methods. *EPPO Bulletin* 30: 525–531.
- , Hagenaar-de Weerd, M., Man in't Veld, W.A. & Baayen, R.P. 2000b. Molecular characterization of natural hybrids of *Phytophthora nicotianae* and *P. cactorum*. *Phytopathology* 90: 867–874.
- , de Weerd, M., Baayen, R., de Gruyter, H., Man in't Veld, W. & Kroon, L. 2002. Molecular identification and detection of *Phytophthora* species and populations of *P. ramorum*. Poster abstract. Sudden oak death science symposium, December 15–18, 2002, Monterey, California.
- Brasier, C.M., Cooke, D.E.L. & Duncan, J.M. 1999. Origin of a new *Phytophthora* pathogen through interspecific hybridization. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 96: 5878–5883.
- , Sanchez-Hernandez, E. & Kirk, S.A. 2003. *Phytophthora inundata* sp. nov., a part heterothallic pathogen of trees and shrubs in wet or flooded soils. *Mycological Research* 107: 477–484.
- , Kirk, S., Delcan, J., Cooke, D.E.L., Jung, T. & Man In't Veld, W.A. 2004. *Phytophthora alni* sp. nov. and its variants: designation of emerging heteroploid hybrid pathogens spreading on *Alnus* trees. *Mycological Research* 108: 1172–1184.
- Cooke, D.E.L., Duncan, J.M. 1997. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on ITS1 and ITS2 sequences of the ribosomal RNA gene repeat. *Mycological Research* 101: 667–677.
- , Drenth, A., Duncan, J.M., Wagels, G. & Brasier, C.M. 2000a. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. *Fungal Genetics and Biology* 30: 17–32.
- , Duncan, J.M., Williams, N.A., Hagenaar-deWeerd, M. & Bonants, P.J.M. 2000b. Identification of *Phytophthora* species on the basis of restriction enzyme fragment analysis of the internal transcribed spacer regions of ribosomal RNA. *EPPO Bulletin* 30: 519–523.
- , Kennedy, D.M., Guy, D.C., Russel, J., Unkles, S.E. & Duncan, J.M. 1996. Relatedness of group I species of *Phytophthora* as assessed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPDs) and sequences of ribosomal DNA. *Mycological Research* 100: 297–303.
- Duncan, J. & Cooke, D. 2002. Identifying, diagnosing and detecting *Phytophthora* by molecular methods. *Mycologist* 16: 59–66.
- English, J.T., Laday, M., Bakonyi, J., Schoelz, J.E. & Ersek, T. 1999. Phenotypic and molecular characterization of species hybrids derived from induced fusion of zoospores of *Phytophthora capsici* and *Phytophthora nicotianae*. *Mycological Research* 103: 1003–1008.
- Erwin, D.C. & Ribeiro, O.K. 1996. *Phytophthora. Diseases Worldwide*. APS Press, St Paul, Minnesota. 562 s.
- Fung, C., Ivors, K. & Garbelotto, M. 2002. AFLP analysis of single-zoospore isolates of *Phytophthora ramorum*. Sudden oak death science symposium, December 15–18, 2002, Monterey, California.
- Garbelotto, M. 2003. Molecular diagnostics of *Phytophthora ramorum*, causal agent of sudden oak death. Sudden oak death online symposium, April 21–May 12, 2003.
- Grote, D., Olmos, A., Kofoet, A., Tuset, J.J., Bertolini, E. & Cambra, M. 2000. Detection of *Phytophthora nicotianae* by PCR. *EPPO Bulletin* 30: 539–541.
- , Olmos, A., Kofoet, A., Tuset, J.J., Bertolini, E. & Cambra, M. 2002. Specific and sensitive detection of *Phytophthora nicotianae* by simple and nested-PCR. *European Journal of Plant Pathology* 108: 197–207.
- Hall, G. 1991. *Phytophthora lateralis*, IMI Descriptions of fungi and bacteria No. 1065. *Phytopathologia* 115: 227–229.
- Hamm, P.B. & Hansen, E.M. 1982. Pathogenicity of *Phytophthora* species to Pacific Northwest conifers. *European Journal of Forest Pathology* 12: 167–174.
- , Hansen, E.M. 1991. The isolation and identification of *Phytophthora* species causing damage in bare-root conifer nurseries. *Proceedings of IUFRO Working Party S2.07-09. Diseases and Insects in Forest Nurseries*, Victoria, British Columbia, Canada, August 22–30, 1990. s. 169–179.
- Hansen, E.M., Hamm, P.B., Julis, A.J. & Roth, L.F. 1979. Isolation, incidence and management of *Phytophthora* in forest tree nurseries in the Pacific Northwest. *Plant Disease Reporter* 63: 607–611.
- , Reeser, P., Davidson, J.N., Garbelotto, M., Ivors, K., Douhan, L. & Rizzo, D.M. 2003. *Phytophthora nemorosa*, a new species causing cankers and leaf blight of forest trees in California and Oregon., USA. *Mycotaxon* 88: 129–138.

- Hantula, J., Lilja, A. & Parikka, P. 1997. Genetic variation and host specificity of *Phytophthora cactorum* in Europe. *Mycological Research* 101: 565–572.
- , Lilja, A., Nuorteva, H., Parikka, P. & Werres, S. 2000. Pathogenicity, morphology and genetic variation of *Phytophthora cactorum* from strawberry, apple, rhododendron, and silver birch. *Mycological Research* 104: 1062–1068.
- Hayden, K.J., Rizzo, D., Tse, J. & Garbelotto, M. 2004. Detection and quantification of *Phytophthora ramorum* from California forests using a real-time polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* 94: 1075–1083.
- Hughes, K.J.D., Inman, A.J. & Cooke, D.E.L. 2000. Comparative testing of nested PCR-based methods with bait-plant tests for detecting *Phytophthora fragariae* var. *fragariae* in infected strawberry roots from fruit crops in the UK. *EPPO Bulletin* 30: 533–538.
- Ivors, K. & Garbelotto, M. 2002. TaqMan PCR for detection of *Phytophthora* DNA in environmental plant samples. Sudden oak death science symposium, December 15–18, 2002, Monterey, California.
- Jeffers, S.N. & Martin, S.B. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease* 70: 1038–1043.
- Jung, T., Blaschke, H. & Neumann, P. 1996. Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. *European Journal of Forest Pathology* 26: 253–272.
- , Cooke, D.E.L., Blaschke, H., Duncan, J.M. & Osswald, W.F. 1999. *Phytophthora quercina* sp. nov., causing root rot of European oaks. *Mycological Research* 103: 785–798.
- , Hansen, E.M., Winton, L., Osswald, W.F. & Delatour, C. 2002. Three new species of *Phytophthora* from European oak forests. *Mycological Research* 106: 397–411.
- , Nechwatal, J., Cooke, D.E.L., Hartmann, G., Blaschke, M., Osswald, W., Duncan, J.M. & Delatour, C. 2003. *Phytophthora pseudosyringae* sp. nov., a new species causing root and collar rot of deciduous tree species in Europe. *Mycological Research* 107: 772–789.
- Jönsson, U., Lundberg, L., Sonesson, K., Jung, T. 2003. First record of soilborne *Phytophthora* species in Swedish oak forests. *Forest Pathology* 33: 175–179.
- Kennerley, C.M. & Bruck, R.I. 1981. *Phytophthora* root rot of balsam fir and Norway spruce in North Carolina. *Plant Disease* 65: 614–615.
- Komission päätös väliaikaisista kiireellisistä kasvinsuojelutoimenpiteistä *Phytophthora ramorum* Werres, De Cock & Man in't Veld sp. nov. -organismin yhteisöön kulkeutumisen ja siellä leviämisen estämiseksi (2002/757/EY). Euroopan yhteisöjen virallinen lehti L 137: 37–39.
- Komission päätös väliaikaisista kiireellisistä kasvinsuojelutoimenpiteistä *Phytophthora ramorum* Werres, De Cock & Man in't Veld sp. nov. -organismin yhteisöön kulkeutumisen ja siellä leviämisen estämiseksi tehdyn päätöksen 2002/757/EY muuttamisesta (2004/426/EY). Euroopan yhteisöjen virallinen lehti L 189: 1–3.
- Kong, P., Hong, C., Jeffers, S.N. & Richardson, P.A. 2003a. A species-specific polymerase chain reaction assay for rapid detection of *Phytophthora nicotianae* in irrigation water. *Phytopathology* 93: 822–829.
- , Hong, C., Richardson, P.A. & Gallegly, M.A. 2003b. Single-strand-conformation polymorphism of ribosomal DNA for rapid species differentiation in genus *Phytophthora*. *Fungal Genetics and Biology* 39: 238–249.
- , Hong, C.X., Tooley, P.W., Ivors, K., Garbelotto, M. & Richardson, P.A. 2004. Rapid identification of *Phytophthora ramorum* using PCR-SSCP analysis of ribosomal DNA ITS-1. *Letters of Applied Microbiology* 38: 433–439.
- Kox, L., de Gruyter, H., Garbelotto, M., van Brouwershaven, I., Admiraal, J. & Baayen, R. 2002. Validation of a PCR method for detection and identification of *Phytophthora ramorum*. Poster abstract. Sudden oak death science symposium, December 15–18, 2002, Monterey, California.
- Kroon, L.P.N.M., Bakker, F.T., van der Bosch, G.B.M., Bonants, P.J.M. & Flier, W.G. 2004a. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genetics and Biology* 41: 766–782.
- , Verstappen, E.C.P., Kox, L.F.F., Flier, W.G. & Bonants, P.J.M. 2004b. A rapid diagnostic test to distinguish between American and European populations of *Phytophthora ramorum*. *Phytopathology* 94: 613–620.
- Laki kasvinterveyden suojelemisesta 702/2003.
- Liew, E.C.Y., Maclean, D.J. & Irwin, J.A.G. 1998. Specific PCR based detection of *Phytophthora medicaginis* using the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. *Mycological Research* 102: 73–80.

- Lilja, A. & Kokkola, M. 2005. Phytophthora-lajien aiheuttamat uudet uhkat metsätaloudessa. Metsätieteen aikakauskirja 3/2005: xxx–xxx.
- , Karjalainen, R., Parikka, P., Kammiovirta, K. & Nuorteva, H. 1998. Pathogenicity and genetic variation of *Phytophthora cactorum* from silver birch and strawberry. *European Journal of Plant Pathology* 104: 529–535.
- Man in't Veld, W.A., Veenbaas-Rijks, W.J., Ilieva, E., de Cock, A.W.A.M., Bonants, P.J.M. & Pieters, R. 1998. Natural hybrids of *Phytophthora nicotianae* and *Phytophthora cactorum* demonstrated by isozyme analysis and random amplified polymorphic DNA. *Phytopathology* 88: 922–929.
- Martin, F.N. & Tooley, P.W. 2003a. Phylogenetic relationships among *Phytophthora* species inferred from sequence analysis of mitochondrially encoded cytochrome oxidase I and II genes. *Mycologia* 95: 269–284.
- & Tooley, P.W. 2003b. Phylogenetic relationships of *Phytophthora ramorum*, *P. nemorosa*, and *P. pseudosyringae*, three species recovered from areas in California with sudden oak death. *Mycological Research* 107: 1379–1391.
- , Tooley, P.W. & Blomqvist, C. 2004. Molecular detection of *Phytophthora ramorum*, the causal agent of sudden oak death in California, and two additional species commonly recovered from diseased plant material. *Phytopathology* 94: 621–631.
- Nechwatal, J., Schlenzig, A., Jung, T., Cooke, D.E.L., Duncan, J. M. & Osswald, W.F. 2001. A combination of baiting and PCR techniques for the detection of *Phytophthora quercina* and *P. citricola* in soil samples from oak stands. *Forest Pathology* 31: 85–97.
- Oszako, T., Orlikowski, L.B. & Szkuta, G. 2004. *Phytophthora cinnamomi* and *P. citrophora* in Polish forest stands. Root and Butt Rots of Forest Trees. 11th International conference on root and butt rots. 16–22 August 2004, Poznan – Białowieza, Poland. s. 65.
- Prospero, S., Black, J.A. & Winton, L.M. 2004. Isolation and characterization of microsatellite markers in *Phytophthora ramorum*, the causal agent of sudden oak death. *Molecular ecology notes* 4: 672–674.
- Rahimian M.K. & Mitchell, J.E. 1988. detection and quantification of *Phytophthora cactorum* in naturally infested soil. *Phytopathology* 78: 949–952.
- Rizzo, D.M., Garbelotto, M., Davidson, J.M. & Slaughter, G.W. 2002. *Phytophthora ramorum* as the cause of extensive mortality of *Quercus* spp. and *Lithocarpus densiflorus* in California. *Plant Disease* 86: 205–214.
- Stamps, D.J., Waterhouse, G.M., Newhook, F.J. & Hall, G.S. 1990. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. Commonwealth Mycology Institute, Mycology Paper 162. 28 s.
- Schubert, R., Bahnweg, G., Nechwatal, J., Jung, T., Cooke, D.E.L., Duncan, J.M., Müller-Strarck, G., Langebartels, C., Sandermann Jr., H. & Osswald, W. F. 1999. Detection and quantification of *Phytophthora* species which are associated with root-rot diseases in European deciduous forests by species-species polymerase chain reaction. *European Journal of Forest Pathology* 29: 169–188.
- Smith, I.M., McNamara, D.G., Scott, P.R., Holderness, M. (Eds.). 1997. Data sheets on quarantine pests, *Phytophthora cinnamomi*. Quarantine pests for Europe. CAB International, New York–Oxon. 2nd Ed. 1425 s.
- Streito, J.-C., Jarnouen de Villartay, G. & Tabary, F. 2002. Methods for isolating the alder *Phytophthora*. *Forest Pathology* 32: 193–196.
- Themann, K., Werres, S., Diener, H.-A. & Lüttmann, R. 2002. Comparison of different methods to detect *Phytophthora* spp. in recycling water from nurseries. *Journal of Plant Pathology* 84: 41–50.
- Tsao, P.H. 1990. Why many *Phytophthora* root rots and crown rots of tree and horticultural crops remain undetected. *EPPO Bulletin* 20: 11–17.
- & Ocana, G. 1969. Selective isolation of species of *Phytophthora* from natural soils on an improved antibiotic medium. *Nature* 223: 636–638.
- Waterhouse, G.M. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Commonwealth Mycological Institute, Mycological Papers 92. 22 s.
- Werres, S., Marwitz, R., Man in't Veld, W.A., de Cock, A.W.A.M., Bonants, P.J.M., de Weerd, M., Themann, K., Ilieva, E. & Baayen, R.P. 2001. *Phytophthora ramorum* sp. nov., a new pathogen on *Rhododendron* and *Viburnum*. *Mycological Research* 105: 1155–1165.

67 viitettä