

Ei-patogeenisten *Streptomyces*-bakteerien vuorovaikutus rupibakteerien kanssa ja potentiaali biologisessa ruventorjunnassa

Lea Hiltunen¹, Arjo Kangas², Elina Virtanen¹ ja Jari Valkonen³

¹MTT Biotekniikka- ja elintarviketutkimus, PL 413, 90014 Oulun yliopisto

²MTT Kasvintuotannon tutkimus, 61400 Ylistaro

³Maataloustieteiden laitos, PL 27, 00014 Helsingin yliopisto

Perunarupi on maailmanlaajuisesti yksi merkittävimmistä perunan ulkoista laatua pilaavista kasvitaudeista. Sitä aiheuttavat säde- eli *Streptomyces*-bakteerit. Meillä Suomessa perunarupea aiheuttavat tavallinen rupibakteeri, *Streptomyces scabies*, ja pohjanrupibakteeri, *S. turgidiscabies*, jotka voivat esiintyä samoilla pelloilla ja jopa samoissa rupilaikuissa. Perunarupi on vaikeasti torjuttava tauti, sillä se säilyy maassa ja leviää maan välityksellä. Yksipuolisessa viljelykierrossa rupibakteerien määrä maassa kasvaa lisäten tautiriskiä. Ilman perunaakin rupibakteerit säilyvät maassa vuosikautia, sillä ne kykenevät hyödyntämään maassa olevaa kasvijätettä ja muuta orgaanista ainetta. Perunapelloilla voi kehittyä luonnostaan rupibakteereille antagonistinen mikrobilajisto, minkä seurauksena ruven syntyminen hidastuu. Aiemmissä tutkimuksissa antagonisteiksi ovat osoittautuneet mm. sädebakteerien ei-patogeeniset lajit tai kannat. Tässä työssä selvitettiin rupea aiheuttavien ja ei-patogeenisten sädebakteerien vuorovaikutuksia sekä mahdollisuutta hyödyntää ei-patogeenisia *Streptomyces*-kantoja ruventorjunnassa.

Sädebakteerien vuorovaikutuksia tutkittiin laboratorio-, kasvihuone- ja kenttäoloissa. Pohjanrupibakteeri esti tavallisen rupibakteerin kasvua laboratoriokeissa, mikä viittaa siihen, että nämä rupibakteerilajit ovat kilpailijoita keskenään. Pohjanrupibakteeri näyttääkin olevan tavallista rupibakteeria sopeutuvampi ja kilpailukykyisempi ruvenaiheuttaja. Kun sitä lisäksi tavataan meillä yleisesti, tulokset viittaavat siihen, että pohjanrupibakteeri on merkittävä ruvenaiheuttaja Suomessa.

Potentiaaliset antagonistit, ts. rupilaikusta eristetty ei-patogeeninen sädebakteerikanta sekä kaupallisen biotorjuntavalmisteen sädebakteerikanta (*S. griseoviridis*), hidastivat rupibakteerien kasvua laboratoriooloissa sekä estivät pohjanrupibakteerin aiheuttamien rupioireiden kehittymistä kasvihuoneessa. Lisäksi rupilaikusta eristetty sädebakteerikanta vähensi rupibakteerien elävyyttä pellolla kasvaneiden perunoiden rupilaikuissa. Monivuotisissa kenttäkokeissa, joissa antagonistikäsittelyt toistettiin vuosittain samoilla paikoilla, molemmilla käytetyillä sädebakteerikannoilla oli antagonistisia vaikutuksia rupibakteereja vastaan. Perunasta eristetty *Streptomyces*-kanta vähensi rupea molemmilla koepaikoilla sekä alttiilla että kestäväällä perunalajikkeella, kun taas kaupallinen biotorjunta-valmiste oli tehokas toisella koepaikalla. Rupibakteereille antagonistinen mikrobilajiston kehittymistä koepaikoilla seurataan tulevana kasvukausina. Jatkotutkimukset ovat tarpeen biologisen torjunnan kehittämiseksi toimivaksi ja vakaaksi taudinhallintakeinoksi.

Asiasanat: perunarupi, *Streptomyces* spp., biologinen torjunta, antagonisti

Johdanto

Perunarupi on maailmanlaajuisesti yksi merkittävimmistä perunan (*Solanum tuberosum* L.) ulkoista laatua pilaavista kasvitaudeista. Suomessa perunarupi on taloudellisesti merkittävä ongelma kaikilla perunantuotantosektoreilla, ja sen aiheuttamat taloudelliset tappiot ja ympäristövaikutukset ovat huomattavia. Perunarupea aiheuttavat useat säde- eli *Streptomyces*-bakteerilajit, joista Suomessa tavataan kahta: tavallinen rupibakteeri (*Streptomyces scabies* (Thaxter) Lambert & Loria) ja pohjanrupibakteeri (*S. turgidiscabies* Takeuchi) (Lindholm ym. 1997; Kreuze ym. 1999; Lehtonen ym. 2004). Kaikki perunarupea aiheuttavat *Streptomyces*-lajit tuottavat fytotoksiineja, takstomiineja, jotka ovat edellytys rupioireiden synnylle (King ym. 1989; Lawrence ym. 1990; Healy ym. 2000).

Perunarupi on vaikeasti torjuttava tauti, sillä sen aiheuttajabakteerit säilyvät maassa ilman perunaakin hyödyntäen maassa olevaa kasvijätettä. Yksipuolisessa viljelykierrossa rupibakteerien määrä maassa kasvaa lisäen tauririskiä. Lisäksi monet ympäristötekijät, mm. sääolot, vaikuttavat taudin kehittymiseen.

Ruventorjuntaan on kokeiltu monia keinoja kuten kemiallisia torjunta-aineita, viljelykiertoa, kastelua ja maan pH:n säätöä, mutta mikään keino ei ole osoittautunut tehokkaaksi ja varmaksi (Lerat ym. 2009). Myöskään täysin ruvenkestäviä perunalajikkeita ei ole olemassa (Hiltunen ym. 2005). Tarve tehokkaan torjuntamenetelmän löytämiseen on siis suuri. Biologinen, maamikrobitasapainoon ja mikrobien keskinäisiin kilpailusuhteisiin perustuva torjunta on yksi mahdollisuus. Perunaruven torjuntaa myös biologisin keinoin on tutkittu, mutta kaupallisia bitorjunta-aineita ruventorjuntaan ei ole saatavissa.

Perunapellossa voi kehittyä luonnostaan supressiivisuutta eli estomaavaikutusta perunaruvelle, jolloin maassa runsainakaan olevat rupibakteerit eivät kykene aiheuttamaan rupea (Bowers ym. 1995; Lorang ym. 1995). Ilmiö perustuu siihen, että rupibakteereille antagonistinen eli rupibakteerien kasvua estävä mikrobilajisto runsastuu maassa. Aiemmissa tutkimuksissa rupibakteerin antagonisteiksi ovat usein osoittautuneet sädebakteerien ei-patogeeniset eli tautia aiheuttamattomat lajit tai kannat (Liu et al. 1995).

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää *Streptomyces*-bakteerien vuorovaikutuksia sekä mahdollisuutta hyödyntää ei-patogeenisia *Streptomyces*-kantoja ruventorjunnassa.

Aineisto ja menetelmät

Perunan rupilajikkeista eristettyjen *Streptomyces*-bakteerikantojen (Lindholm ym. 1997) vuorovaikutuksia tutkittiin laboratorikokeissa glukoosi-hiiva-mallas (GYM) -agaralustalla (Hiltunen ym. 2009) kolmessa eri pH:ssa (5,5, 6,5 ja 8,0). Estettävä bakteerikanta levitettiin vesisuspensiona GYM-agarmaljan pinnalle ja estävää kantaa sisältävä agarkiekko asetettiin saman GYM-maljan keskelle. Maljoja inkuboitiin 18°C:ssa 14 vrk, minkä jälkeen estovyöhykkeen leveys mitattiin. Jokaisesta käsittelystä oli kolme kerrannetta ja koe toistettiin.

Kahden rupibakteerien kasvua estäneen ei-patogeenisen *Streptomyces*-bakteerikannan kykyä hillitä ruven muodostumista testattiin kasvihuone- ja kenttäkokeissa. Kasvihuonekokeissa perunat kasvatettiin 1 m²:n laatikoissa. Kasvualustana käytettiin autoklavoidun turpeen ja hiekan seosta (3:1), jonka pH säädettiin kalkitsemalla 5,5–6,2:een. Rupibakteeri (*S. turgidiscabies*) ja testattavat antagonistit (*S. griseoviridis* ja *Streptomyces*-kanta 346) sekoitettiin kasvualustaan eri konsentraatioissa. Jokaisesta rupibakteeri ja antagonistikombinaatiosta oli kaksi kerrannetta. Kuhunkin laatikkoon istutettiin kahdeksan minimukulaa (lajike Bintje). Kasvatuslämpötila oli 24°C (päivä)/19°C (yö). Kuudentoista viikon kuluttua istutuksesta jokaisen kasvin sato korjattiin erikseen ja rupisuus määritettiin.

Laboratorio- ja kasvihuonekokeissa tehokkaiksi osoittautuneet *Streptomyces*-kannat testattiin kahtena vuonna pelloilla, joissa perunarupea oli aiemmin esiintynyt runsaasti. Ensimmäisenä vuonna siemenperunat peitattiin kostuttamalla hienoksi jauhettua turvetta antagonistiliuoksilla ja kierittämällä siemenmukulat (lajike Sabina) turpeessa ennen istutusta. Kokeessa oli kolme kerrannetta ja koemallina käytettiin satunnaistettujen lohkojen mallia. Toisena vuonna siemenperunat (lajikkeet Matilda ja Bintje) peitattiin istutuksen yhteydessä antagonistiliuoksilla istutuskoneeseen kytketyllä nestepeittauslaitteella. Kokeessa oli kuusi kerrannetta ja koemalli oli osaruutukoe. Kummankin kokeen sato korjattiin 16 viikon kuluttua istutuksesta. Jokaisen ruudun sadosta otettiin näyte rupimääritystä ja rupibakteerianalyysiä varten. Rupibakteeri määritettiin PCR-menetelmällä rupilajikkeista eristetystä DNA:sta käyttäen lajikohtaisia alukkeita (Lehtonen ym. 2004). Rupisuus määritettiin luokittelemalla mukulat ruven peittämän mukulapinta-alan mukaan asteikolla 1-11 (1, < 1 %; 3, 1 - < 10 %; 5, 10 - < 25 %; 7, 25 - < 50 %; 9, 50 - < 75 %; 11, ≥ 75 %) (Hiltunen ym. 2005).

Jatkokokeissa selvitettiin, voidaanko estomaavaikutuksen syntymistä kiihdyttää käyttämällä siemenperunan peittaukseen antagonistista mikrobikantaa samalla paikalla useampana vuonna peräkkäin.

Kenttäkokeet perustettiin Lumijoelle ja Ylistaroon keväällä 2009. Kokeissa oli mukana kaksi perunalajiketta, ruvenaltis Bintje ja rupea kohtalaisesti kestävä Nicola. Antagonistikäsittelyinä käytettiin perunan rupilaikusta eristettyä *Streptomyces*-kanta ja kaupallista biotorjuntavalmistetta (Mycostop, *S. griseoviridis*). Kumpaakin antagonistia käytettiin kahtena pitoisuutena. Peittaus tehtiin ruiskuttamalla vakoon istutetut siemenperunat antagonistia sisältävällä peittausliuoksella ennen perunoiden peittämistä. Antagonistikäsittelyt toistettiin vuosittain samoilla koelohjoilla ensimmäisen koevuoden tapaan. Sadoista tehtiin rupimääritys aiemmin esitetyllä tavalla. Kokeissa oli neljä kerrannetta ja koasetelma oli satunnaistettujen lohkojen koemalli, jossa lohkot oli sijoitettu antagonistikäsittelyjen sisälle.

Tulokset ja tulosten tarkastelu

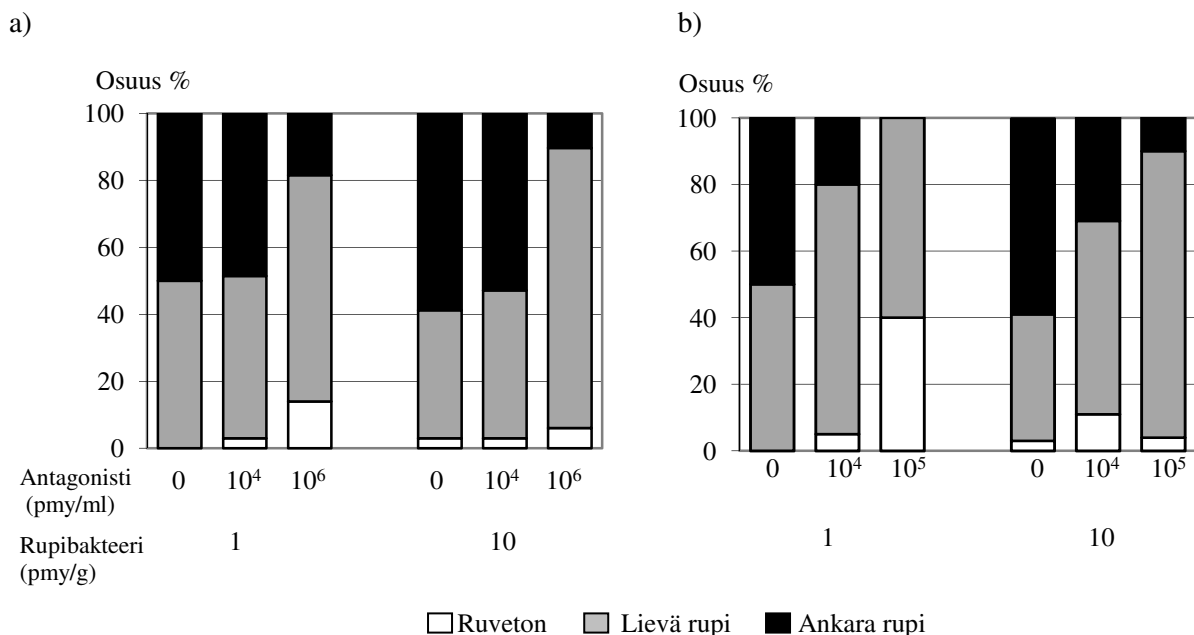
Laboratoriokokeissa kaikki testatut pohjanrupibakteerin (*S. turgidiscabies*) kannat estivät tavallisen rupibakteerin (*S. scabies*) kantojen kasvua (Taulukko 1). Aiemmissä kokeissa on havaittu, että pohjanrupibakteeri lisää tautiriskiä ja oireiden ankaruutta sekä kasvaa alhaisessa pH:ssa (Lindholm ym. 1997; Hiltunen ym. 2005).

Testatuista ei-patogeenisista *Streptomyces*-kannoista kaksi hidasti rupibakteerien kasvua laboratoriokokeissa (Taulukko 1). Toinen näistä (*Streptomyces*-kanta 346) oli eristetty Tyrnävällä kasvaneen perunan rupilaikusta ja toinen (*S. griseoviridis*) oli peräisin kaupallisesta biotorjuntavalmisteesta (Mycostop). Molemmat kannat vähensivät ankarasti rupisten (>25% perunan pinnasta ruven peitossa) perunoiden osuutta sadossa kasvihuonekokeissa, joissa ruvenaiheuttaja oli pohjanrupibakteeri (Kuva 1). Pelloilla tehdyissä kokeissa kumpikaan kanta ei vaikuttanut satomukuloiden ruven määrää, mutta molemmat vähensivät rupibakteerien, etenkin pohjanrupibakteerin, elävyyttä rupilaikuissa (Taulukko 2) (Hiltunen ym. 2009, 2010).

Lumijoella ja Ylistarossa tehdyissä jatkokokeissa molemmilla käytetyillä sädebakteerikannoilla oli antagonistisia vaikutuksia rupibakteereja vastaan. Perunasta eristetty *Streptomyces*-kanta vähensi rupea kummallakin koepaikalla. Rupisten osuus (yli 10 % mukulan pinnasta ruven peitossa) sadossa väheni alttiilla lajikkeella (Bintje) keskimäärin 30 %:lla ja kestäväällä lajikkeella (Nicola) lähes olemattomiin (alle 5 %) (tuloksia ei esitetty). Kaupallisen biotorjuntavalmiste oli tehokas toisella koepaikalla.

Taulukko 1. Patogeenisten ja ei-patogeenisten *Streptomyces*-kantojen välille muodostuvien estovyöhykkeiden leveys (mm) GYM-alustalla pH:ssa 6,5. (SG, *Streptomyces griseoviridis*; SS, *Streptomyces scabies*; ST, *Streptomyces turgidiscabies*; SA, *Streptomyces aureofaciens*). PME, pienin merkitsevä ero ($\alpha = 0,05$).

Estettävä kanta	Estävä kanta								
	Ei-patogeeninen			Patogeeninen					
	SG	346	161V	SS 53	SS 267	ST 253	ST 268	ST 287	SA 316
SG	0,0	8,0	0,7	2,7	1,0	2,2	2,5	0,2	2,6
346	4,2	0,0	0,0	0,5	0,3	0,9	2,4	1,5	1,3
161V	4,5	12,5	0,0	0,2	0,5	3,7	3,5	3,2	3,2
SS 53	13,8	6,5	0,9	0,0	0,0	2,3	3,0	1,7	2,5
SS 267	18,3	9,3	0,9	0,0	0,0	2,5	3,2	2,5	2,2
ST 253	8,5	4,3	0,8	0,2	1,0	0,0	1,7	0,0	0,3
ST 268	15,1	3,9	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0	0,0	0,2
ST 287	12,2	3,3	1,6	0,0	0,8	0,0	0,5	0,0	0,1
SA 316	12,7	8,0	1,1	0,2	1,4	0,0	1,3	0,0	0,0
Keskiarvo	9,92	6,20	0,67	0,42	0,71	1,29	2,01	1,01	1,38
PME	3,79	2,83	1,52	0,83	0,47	0,89	0,92	0,62	0,77



Kuva 1. Antagonistien, a) *S. griseoviridis* ja b) perunasta eristetyn *Streptomyces*-kannan 346, vaikutus pohjanrupibakteerin (*S. turgidiscabies*) aiheuttamien rupioireiden ankaruuteen kasvihuonekokeissa. Pmy, pesäkkeen muodostava yksikkö; lievä rupi, ruvenpeitto $\leq 25\%$; ankara rupi, ruvenpeitto $>25\%$ perunan pinnasta.

Taulukko 2. Antagonistien (*S. griseoviridis* ja *Streptomyces*-kanta 346) vaikutus tavallisen rupibakteerin (*S. scabies*) ja pohjanrupibakteerin (*S. turgidiscabies*) esiintymiseen kenttäkokeilta nostettujen mukuloiden rupilaisuissa.

	Kontrolli	<i>S. griseoviridis</i>	<i>Streptomyces</i> – kanta 346
Vuosi 1: ‘Sabina’			
<i>S. scabies</i>	16/18	7/18	7/18
<i>S. turgidiscabies</i>	13/18	2/18	3/18
Vuosi 2: ‘Bintje’			
<i>S. scabies</i>	24/24	23/24	24/24
<i>S. turgidiscabies</i>	22/24	22/24	20/24
‘Matilda’			
<i>S. scabies</i>	24/24	24/24	23/24
<i>S. turgidiscabies</i>	23/24	22/24	17/24

Johtopäätökset

Pohjanrupibakteeri esti tavallisen rupibakteerin kasvua laboratorionkokeissa, mikä viittaa siihen, että nämä rupibakteerilajit ovat kilpailijoita keskenään. Pohjanrupibakteeri näyttää olevan tavallista rupibakteeria sopeutuvampi ja kilpailukykyisempi ruvenaiheuttaja. Kun lisäksi pohjanrupibakteeria tavataan meillä yleisesti, tulokset viittaavat siihen, että pohjanrupibakteeri on merkittävä ruvenaiheuttaja Suomessa.

Potentiaaliset antagonistit, ts. rupilaisuudesta eristetty ei-patogeeninen sädebakteerikanta sekä kaupallisen biotorjuntavalmisteen sädebakteerikanta (*S. griseoviridis*), hillitsivät perunaruven muodostumista kasvihuoneessa ja pellolla. Tulokset antoivat viitteitä siitä, että näitä kantoja voitaisiin hyödyntää biologisen ruventorjuntamenetelmän kehittämisessä. Lisäksi ensimmäistä kertaa saatiin osoitus biologisen torjunnan tehosta myös pohjanrupibakteeria vastaan.

Kahdella eri paikkakunnalla tehdyt monivuotiset kenttäkokeet, joissa antagonistikasittelyt tehtiin aina samalla paikalla, osoittivat, että molemmat käytetyt sädebakteerikannat ovat antagonistisia rupibakteereja vastaan pelto-oloissa. Rupibakteereille antagonistisen mikrobilajiston kehittymistä sekä estomaavaikutuksen säilymistä koepaikoilla seurataan tulevina kasvukausina. Jatkotutkimuksilla biologisesta torjunnasta pyritään kehittämään toimiva ja vakaa perunaruven hallintakeino.

Kirjallisuus

- Bowers, J. H., Kinkel, L. L. & Jones R. K.** 1995. Influence of disease-suppressive *Streptomyces* on the native *Streptomyces* community in soil as determined by the analysis of cellular fatty acids. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 27-37.
- Healy, F. G., Wach, M., Krasnoff, S. B., Gibson, D. M. & Loria, R.** 2000. The *txtAB* genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity. *Molecular Microbiology* 38: 794-804.
- Hiltunen, L.** 2010. *Streptomyces scabies* and *S. turgidiscabies* as pathogens causing potato common scab, and potential methods for their control. University of Helsinki. Faculty of Agriculture and Forestry. Department of Agricultural Sciences. Publications 5: 59 p. Diss.: Helsinki: Helsingin yliopisto, 2010. (Väitöskirja). ISBN 978-952-10-4307-9.
- Hiltunen, L. H., Ojanperä, T., Kortemaa, H., Richter, E., Lehtonen, M. J. & Valkonen, J. P. T.** 2009. Interactions and biocontrol of pathogenic *Streptomyces* strains co-occurring in potato scab lesions. *Journal of Applied Microbiology* 106: 199-212.
- Hiltunen, L. H., Weckman, A., Ylhäinen, A., Rita, H., Richter, E. & Valkonen, J. P. T.** 2005. Responses of potato cultivars to the common scab pathogens, *Streptomyces scabies* and *S. turgidiscabies*. *Annals of Applied Biology* 146: 395-403.
- King, R. R., Lawrence, C. H., Clark, M. C. & Calhoun, L. A.** 1989. Isolation and characterization of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*. *Journal of Chemistry Society, Chemical Communications* 13: 849-850.
- Kreuze, J. F., Suomalainen, S., Paulin, L. & Valkonen, J. P. T.** 1999. Phylogenetic analysis of 16S rRNA genes and PCR analysis of the *necl* gene from *Streptomyces* spp. causing common scab, pitted scab and netted scab in Finland. *Phytopathology* 89: 462-469.
- Lawrence, C. H., Clark, M. C. & King, R. R.** 1990. Induction of common scab symptoms in aseptically cultured potato tubers by the vivotoxin, thaxtomin. *Phytopathology* 80: 606-608.
- Lehtonen, M. J., Rantala, H., Kreuze, J. F., Bång, H., Kuisma, L., Koski, P., Virtanen, E., Vihlman, K. & Valkonen, J. P. T.** 2004. Occurrence and survival of potato scab pathogens (*Streptomyces scabies*) on tuber lesions: quick diagnosis based on a PCR-based assay. *Plant Pathology* 53: 280-287.
- Lerat, S., Simao-Beaunoir, A. M. & Beaulieu, C.** 2009. Genetic and physiological determinants of *Streptomyces scabies* pathogenicity. *Molecular Plant Pathology* 10: 579-585.
- Lindholm, P., Kortemaa, H., Kokkola, M., Haahtela, K., Salkinoja-Salonen, M. & Valkonen, J. P. T.** 1997. *Streptomyces* spp. isolated from potato scab lesions under Nordic conditions in Finland. *Plant Disease* 81: 1317-1322.
- Liu, D., Anderson, N. A. & Kinkel, L. L.** 1995. Biological control of potato scab in the field with antagonistic *Streptomyces scabies*. *Phytopathology* 85: 827-831.
- Lorang, J. M., Liu, D., Anderson, N. A. & Schottel, J. L.** 1995. Identification of potato scab inducing and suppressive species of *Streptomyces*. *Phytopathology* 85: 261-268.