

Seittisien tartunta aktivoi systeemisen puolustusvasteen perunan iduissa

Mari J LEHTONEN¹, Panu SOMERVUO¹, Jari PT VALKONEN¹

¹ Kasvipatologian laboratorio, Soveltavan Biologian laitos, Helsingin Yliopisto

Mari.J.Lehtonen@helsinki.fi

Perunaseitti on yksi tärkeimmistä taudeista, joka vähentää perunan satoa ja sadon laatua. Seittisien (*Rhizoctonia solani*) säilyy siemenperunan pinnalla seittirupena ja maassa rihmastopahkoina, joista tartunta saa alkunsa. Taudin ensimmäinen vaihe ilmenee perunan idunkärkien kuolemisena, itujen haaroittumisena ja taimettumisen myöhästymisenä. Taimettuneiden varsien maanalaisiin osiin jää taudin näkyväksi merkiksi versolaikkuja. Miksi osa iduista pystyy kuitenkin tartunnasta huolimatta taimettumaan, on epäselvää. Tämän ilmiön tarkempi ymmärtäminen voisi edesauttaa perunaseitin haittavaikutusten lievittämistä kasvukauden alussa.

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, aiheuttaako seittisien tartunta puolustusreaktioita perunan iduissa. Mukulat idätettiin pimeässä olosuhteiltaan kontrolloidussa kasvatuskaapissa, jossa lämpötila vastasi taimettumisen kannalta suotuisia pelto-oloja. Olosuhteet suosivat myös seittisien aiheuttaman versolaikun syntymistä. Koejärjestelyssä perunan idun alaosa tartutettiin seittisienellä. Idun yläosa eristettiin alaosa muovikauluksellä, jonka tarkoitus oli estää sienirihman kasvaminen erittäin infektiiviseen idun kärkeen. Perunan geenien ilmentymistä idun kärkiosassa tutkittiin mikrosiruanalyysillä 48 ja 120 tuntia alaosan tartutuksen jälkeen. Analyysissä voitiin havainnoida samanaikaisesti n. 10,000 geenin ilmentymistä (noin kolmannes perunan kaikista geneistä).

Tulokset osoittivat, että suuri määrä kasvien taudinkestävyyteen liittyviä genejä aktivoitui itujen kärjissä, kun idun tyviosa tartutettiin seittisienellä. Nämä systeemiset puolustusvasteet olivat selvästi sienien aiheuttamia, sillä iduissa, joita ei tartutettu, samanlaista puolustuksen aktivoitumista ei tapahtunut. Rinnakkaisissa kokeissa tartutettiin idun kärkeä seittisienellä sen jälkeen, kun tyviosa oli tartutettu. Näissä iduissa kärjen havaittiin olevan huomattavasti kestävämpi seittitartunnalle kuin iduissa, joiden tyviosaa ei ollut ensin tartutettu seittisienellä. Kokeiden tulokset osoittivat, että perunan luontaiset puolustusreaktiot käynnistyvät seittisieni-infektion aikana, mikä selittänee, miksi osa iduista selviytyy seittitartunnasta ja pystyy taimettumaan. Näiden reaktioiden hyödynnettävyyttä seitintorjunnassa ei ole aiemmin tutkittu.

Asiasanat: peruna, perunaseitti, *Rhizoctonia solani*, puolustusreaktiot, mikrosiru

Johdanto

Rhizoctonia solani –sieni on yksi maailman laajimmille levinneistä ja laajaisäntäisimmistä kasvitautinaihauttajista. Sen tiedetään voivan infektoida yli 200 kasvilajia (Gvozdeva *et al.* 2006) joihin kuuluu maailman tärkeimpiä pelto-, puutarha- ja koristekasveja (Sneh *et al.*, 1996). *R. solani* on geneettisesti monimuotoinen laji, joka jaotellaan nykyisin 14:ään erilliseen ryhmään perustuen eri rotujen sienirihmojen kykyyn yhteensulautua eli anastomoida. Joitain poikkeuksia lukuun ottamatta, vain samaan anastomoosiryhmään (AG) kuuluvien sienikantojen rihmat kykenevät yhdistymään toisiinsa. Useat anastomoosiryhmät ovat erikoistuneet infektoimaan vain tiettyjen kasviryhmien edustajia. Kasvukausien välissä sienirihma säilyy maassa joko viljelymaahan jääneiden kasvijätteiden pinnalla tai ankaria olosuhteita hyvin sietävinä rihmastopahkoina eli sklerootioina. Rihmastopahkat ovat sienen pääasiallinen leviämismenetelmä kun maata tai pahkojen peittämää kasvimateriaalia siirretään uusille kasvualueille.

R. solani:n anastomoosiryhmä 3 (AG-3) on perunan pääasiallinen taudinaihauttaja viileillä perunan viljelyalueilla, kuten Suomessa (Lehtonen *et al.*, 2008). Sitä kutsutaan tavallisesti perunaseittisieneksi. Toisinaan muidenkin AG-ryhmien on raportoitu kykenevän infektoimaan perunaa tai ainakin elämään sen maanalaisissa osissa joko taudinaihauttajina tai hajoavaa kasvimateriaalia hyödyntävinä saprofyytteinä (esim. Carling & Leiner, 1986, Lehtonen *et al.*, 2008). Aikaisin kasvukaudella seittitartunnan aiheuttamia tuhoja voidaan havaita kaikissa perunan maanalaisissa osissa, kehittyvissä iduissa, versojen tyvillä sekä maavarsissa. Versolaikuksi kutsuttu vioitus näkyy solukossa tummina laikkuina, jotka edetessään pysäyttävät perunan kasvun ja vähentävät kasvin pintaan tulevien varsien sekä maavarsien lukumäärää. Versolaikusta kärsivä perunakasvi on heikkokasvuinen, myöhään taimettuva ja siitä saatava sato on epätasalaatuista. Perunasadon kehittyessä sienen infektiot strategia muuttuu ja se alkaa muodostaa kehittyvien tyärmukuloiden pinnalle rihmastopahkoja, seittiruveksi kutsuttua taudinmuotoa. Seittiruven peittämät mukulat tarjoavat sienelle tehokkaan leviämisreitit uusille viljelyalueille. Seittiruven määrää siemenperunassa valvotaan tarkasti, sillä hyvien viljelytapojen noudattamisen sekä torjunta-aineiden että torjuntaeliöiden käytön ohella, terve siemenmateriaali on tärkein keino hillitä taudinaihauttajaa.

Tämän työn tarkoituksena oli selvittää perunassa tapahtuvia molekylaarisia vasteita seittisien tartuttaessa isäntäkasviaan. Kiinnostuksen kohteena oli erityisesti perunan puolustusvasteiden mahdollinen aktivoituminen kehittyvissä iduissa. Pelto-oloissa ankarakaan seittisieni-infektio ei yleensä kykene kokonaan estämään perunan taimettumista, vaan jotkin idut pääsevät maanpinnalle seittisienestä huolimatta. Havainto itujen kestävyuden parantumisesta alkutartunnan seurauksena on raportoitu jo 1930-luvulla (Sanford, 1938), mutta sen perustana olevia perunan vasteita ei ole tutkittu.

Aineisto ja menetelmät

Sieni- ja kasvimateriaali sekä koejärjestely

Tutkimukseen valittiin aiemmissa kokeissa ankaraa versolaikkua perunalla aiheuttava AG-3-kanta R11 (Lehtonen *et al.*, 2008). Koekasvien tartutusta varten sientä kasvatettiin perunadekstroosi-agaralustalla (PDA, Biokar, Ranska) viiden päivän ajan huoneenlämmössä pimeässä.

Testatut, terveet Saturna-lajikkeen siemenmukulat saatiin Suomen Siemenperunakeskukselta. Iduttomat mukulat pintasteriloitiin kevyesti 1 %:lla natriumhypokloriitilla ja idätettiin kontrolloiduissa oloissa kasvatuskaapissa (Sanyo) pimeässä ja kosteassa 18°C:een lämpötilassa. Kasvatusolosuhteiden haluttiin jäljittelevän tilannetta maan alla, pellolla seittisien infektiota otollisena ajankohtana. Tämän vuoksi myös kaikki perunoiden tarkastelua ja käsittelyä vaativat toimenpiteet suoritettiin fotosynteesesti inaktiivisessa mustassa valossa (365 nm).

Idun kasvettua n. 5 cm mittaiseksi, alaosa eristettiin yläosasta pehmeästä muovista tehdyllä kauluksella. Kauluksen tehtävänä oli estää idun alaosaan laitetun seittisien tartukkeen (\varnothing 5 mm pala sienirihmamaljalta) kasvu idun kärkeen (Kuva 1). Näytteeksi otettiin idunkärki 48 ja 120 tuntia idun alaosan tartutuksen jälkeen. Näytteenottoajankohdat määritettiin seuraamalla sienirihman kasvua idun pinnalla: 48 tuntia tartutuksesta rihma kasvoi tiiviisti idun pinnalla ja 120 tunnin kuluttua ensimmäiset infektorakenteet alkoivat kehittyä. Rihman ei havaittu kasvavan kauluksen ohi. Kukin koe sisälsi kuusi (6) koekasvia, joista samana ajankohtana otetut idunkärkinäytteet yhdistettiin analyysijä varten. Koe toistettiin kahdesti.

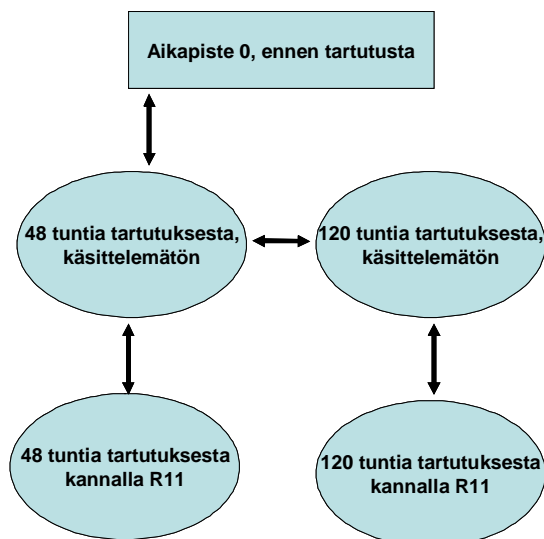


Kuva 1. Seittisien tartukkeen (osoitettu nuolella) kasvu perunan idun tyvellä (vasemmalla). Oikealla koekasviyksilö, jonka idun yläosa on eristetty tartutetusta alaosaan muovisella kaulurilla.

Mikrosiruanalytiikka

Idunkärjissä aktivoituvia ja inaktivoituvia geenejä tunnistettiin perunan cDNA klooneja sisältävällä mikrosirulla (NSF Potato Functional Genomics Project, TIGR Solanaceae Genomics Resource, Rockville, MD, USA). Sirut mahdollistavat noin 10,000 geenin ilmentymisen samanaikaisen seuraamisen ja vertaamisen tartutettujen itujen kärjissä ja samanikäisissä tartuttamattomissa iduissa. Itunäytteiden RNA eristettiin Trizol-reagenssilla (Caldo *et al.*, 2004) ja lähetti-RNA monistettiin, puhdistettiin ja leimattiin fluoresoivilla värilaineilla Cy3 ja Cy5 käyttäen Amino Allyl MessageAmp™ II aRNA Amplification Kit –tuotetta valmistajan ohjeiden mukaisesti (Ambion, Texas, USA). Näytteiden hybridisointi mikrosirulla suoritettiin sirujen valmistajan suositusten mukaisesti noudattaen kuvassa 2 esitettyä kaaviota. Koe toistettiin kahdesti. Teknisissä toistoissa hybridisaatioissa käytettyjä värejä vaihdettiin verrattavien näytteiden kesken. Koetinten antamat fluoresenssisignaalit skannattiin GenePix 4200 AL -laitteella (Axon Instruments) 10 μ m:n resoluutiolla. Skannauksesta saatujen kuvien tulkinta ja käsittely suoritettiin GenePix Pro 6.0 ohjelmistolla. Kuvista saatu numeerinen tieto normalisoitiin, sovitetiin lineaariseen malliin ja analysoitiin tilastollisesti. Aktivoituneiksi/hiljentyneiksi katsottiin geenit joiden ilmenemistaso muuttui enemmän kuin 0,5 tai vähemmän kuin -0,5 log₂ asteikolla. Geenit, joiden ilmenemistason muutos suhteessa infektoimattomaan näytteeseen oli tilastollisesti merkitsevä ($p < 0,05$) jaoteltiin toiminnallisiin ryhmiin tiedetyn tai oletetun toimintonsa perusteella.

Mikrosiruanalyysin antamia tuloksia tarkistettiin 25 valikoidun geenin osalta kvantitatiivisella polymeraasiketjureaktiolla (qRT-PCR). Alukkeet geenien testaamiseen suunniteltiin sekvenssitietojen pohjalta Primer Express® v2.0 ohjelmistolla (Applied Biosystems). Näytteistä syntetisoitu komplementaarinen DNA (cDNA) käsiteltiin ja monistettiin LightCycler® 480 -laitteella LightCycler® 480 SYBR Green I Master Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) -valmistajan ohjeiden mukaisesti.



Kuva 2. Kaaviokuva kokeissa suoritetuista hybridisaatioista perunan cDNA mikrosiruilla. Tartuttamattomia näytteitä verrattiin toisiinsa sekä ennen koetta otettuun 0-näytteeseen perunan iduissa tapahtuvien fysiologisen iän aiheuttamien muutosten havaitsemiseksi. Seittisienen infektiosta aiheutuneita geenien ilmenemismuutokset selvitettiin vertaamalla tartutettujen itujen kärkiä samanikäisiin käsittelemättömiin ituihin 48 ja 120 tuntia seittisienitartutuksen jälkeen. Koe toistettiin kahdesti.

Tautikestävyiden virittyminen

Kokeissa selvitettiin myös lisääkö kehittyvän idun alaosan tartutus seittisienellä kärjen tautikestävyttä. Idun alaosa tartutettiin edellä kuvatulla tavalla, mutta 120 tunnin kuluttua kauluksen päällä kärjen tuntumaan asetettiin uusi tartuke, jonka annettiin kasvaa idun yläosaan ja kärkeen. Sienirihman kasvua idun yläosassa seurattiin 'mustan valon' alla kolmen päivän välein aina kolmeen viikkoon asti. Itujen yläosien versolaikkuoireita ja pinnan sienirihmankasvustoa tarkasteltiin mikroskoopilla (Leica MZFLIII) laktofenolisella värjäytystä näytteistä. Havainnot kuvattiin ViewFinder 1.0.135 ja StudioLite 1.0.136 ohjelmistoilla (Pixera Corboration, Los Gatos, CA, USA).

Tulokset ja tulosten tarkastelu

Perunan itujen kärkiosassa tapahtuvia geenien ilmenemistasojen muutoksia tutkittiin aluksi vertaamalla toisiinsa tartuttamattomia ituja eri ajankohtina, jolloin havaittiin kasvin fysiologisesta iästä ja kasvusta johtuvat muutokset. Ne olivat varsin vähäisiä tutkimuksen (120 h) aikana eikä niillä ollut merkitystä sieninfektion aikaansaamien geenien tunnistamisessa eikä ilmenemistasojen muutosten tarkastelussa. Tutkimuksessa muuttuneisuuden merkittävyyden rajattiin koskevan genejä joiden ilmenemistaso kaksinkertaistui tai väheni puoleen (ero tilastollisesti merkitsevä). Tämän kriteerin mukaisesti 48 tuntia tartutuksesta 76 geenin ilmenemistaso nousi ja 45 geenin puolestaan laski. Huomattavasti suurempia muutoksia oli tapahtunut 120 tuntia tartutuksesta, jolloin havaittiin 453 geenin aktivoituneen ja 326 hiljentyneen. Kokeen tulokset ja ilmentymiseltään muuttuneiden geenien jako toiminnallisiin luokkiin on esitetty Taulukossa 1.

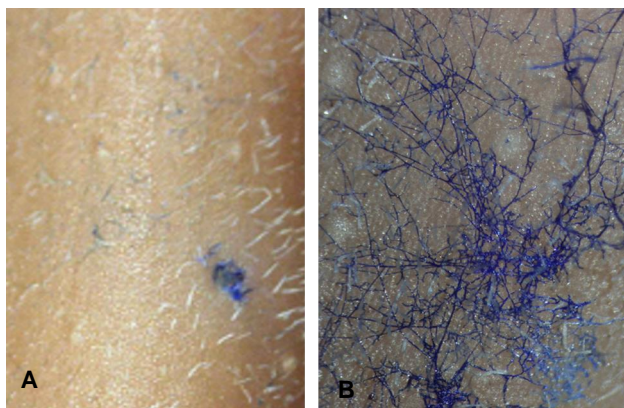
Mikrosirukokeesta valittujen 25:n geenin ilmenemistaso varmistettiin kvantitatiivisella polymeraasiketjureaktiolla (qRT-PCR). Näillä kahdella menetelmällä saatujen tulosten todettiin vastaavan toisiaan.

Taulukko 1. Ilmentymiseltään muuttuneiden geenien määrä idun kärkiosassa 48 ja 120 tuntia seittisienitartutuksen asetuksen jälkeen.

Toiminnallinen luokka	48 tuntia tartutuksesta		120 tuntia tartutuksesta	
	aktivoituneet	hiljentyneet	aktivoituneet	hiljentyneet
Metabolia	19	12	103	94
Energia	1	3	20	11
Puolustusreaktiot	26	6	79	24
Replikaatio ja transkriptio	7	2	43	35
Signaalinvälitys	4	2	29	29
Solunsisäinen kuljetus ja organisaatio	0	0	23	17
Kasvu ja kehitys	3	10	17	36
Proteiinisynteesi ja proteiinien muokkaus	1	0	20	11
Ei tunnettu/biologinen toiminta tuntematon	15	10	119	69
Yhteensä	76	45	453	326

Tulokset osoittivat, että seittisienitartunta idun tyvellä aiheuttaa kärkiosassa merkittäviä geeninilmenemistason muutoksia. Monet aktivoituneet geenit kuuluivat puolustusgeenien ryhmään joiden ilmenemistason on todettu nousevan monilla kasvilajeilla *R. solani* –sienen infektiossa tai perunalla muiden taudinaiheuttajien hyökkäyksessä (Dellagi *et al.* 2000, Montesano *et al.* 2005, Pompe-Novak *et al.* 2006, Ros *et al.* 2004, Tian *et al.* 2006). Aktivoitumista havaittiin myös puolustusproteiinien synteesireitteihin liittyvillä geeneillä ja yleisesti proteiinien tuottoon ja kuljetukseen osallistuvilla geeneillä. Tämä viittaa puolustusvasteiden systeemiseen aktivoitumiseen seittisieni-infektion seurauksena infektiokohdan ulkopuolella sijaitsevassa solukossa. Yksi merkittävä aktivoitunut geeniryhmä olivat kitinaasit, jotka kykenevät hajottamaan sienien soluseinärakenteeseen kuuluvaa kitiniä. Kitinaasit ovat tärkeitä puolustusensyymejä myös kasvin taistelussa seittisientä vastaan, sillä tasaisesti kitinaaseja tuottavien siirtogeenisten kasvien on todettu olevan kestävämpiä *R. solani* –sienen aiheuttamille kasvitaudeille (Lorito *et al.* 1998, Punja 2001). Muiden puolustusgeenien synergistinen yhteisaktivoituminen kitinaasien kanssa takaa kasville paremman mahdollisuuden taistella etenevää taudinaiheuttajaa vastaan.

Alaosastaan infektoitujen itujen yläosien tautikestävyuden muutosta *Rhizoctonia solani* –sienen aiheuttaman versolaikun muodostumista vastaan tutkittiin kahdessa rinnakkaisessa kokeessa. Itujen yläosien tautikestävyys parani selvästi, kun idun puolustusvaste oli ensin käynnistetty idun alaosan tartutuksella. Aktiivisesti puolustautuvien itujen kärjissä ei havaittu sienirihman kasvua eikä infektiarakenteiden muodostumista (Kuva 3A). Ainoan poikkeuksen muodostivat idut, jotka olivat haavoittuneet käsittelyjä tehtäessä. Haavakohta tarjosi sienelle suoran pääsyn isäntäkasvin solukkoon ja ravinteita sienirihman kasvuun. Kun idun alaosa ei ensin tartutettu, idun yläosa pysyi alttiina tartunnalle ja siinä havaittiin runsasta seittisienikasvua sekä voimakkaita infektiarakenteita (Kuva 3B), joiden avulla seittisieni ottaa ravinteita isäntäkasvista aiheuttaen lopulta versolaikulle tyypillisiä tummia, solukon kuolemista johtuvia laikkuja.



Kuva 3. Idun alaosan tartutuksella aikaansaatu puolustuksen virittyminen idun kärkiosassa. Alaosastaan aiemmin tartutettujen itujen yläosissa ei havaittu kuin hyvin vähäistä sienirihman kasvua (A) eikä infektiarakenteita muodostunut. Aiemmin tartuttamattoman idun yläosassa seittisieni kasvoi sen sijaan voimakkaasti, mikä johti sienirihmapeiton muodostumiseen idun pinnalle sekä voimakkaiden infektiarakenteiden kehittymiseen (B).

Johtopäätökset

Työn tarkoituksena oli selvittää, aktivoituvatko perunan luontaiset puolustautumismekanismit jo perunan iduissa, ennen taimettumista, versolaikkua aiheuttavan seittisienen infektion alettua. Tulokset osoittivat perunan käynnistävän aktiivisen puolustautumisreaktioiden sarjan nopeasti seittisieni-infektion alkaessa. Puolustautumisen todettiin olevan systeemistä, sillä puolustusvaste käynnistyi myös alkuperäisen infektiokohtaan (idun tyvi) ulkopuolella ja suojasi taudille alttiita idunkärkiä tartunnalta sekä versolaikkuoireiden kehittymiseltä. Tulokset selittävät osaltaan pelto-oloissa tehtyjä havaintoja perunan kyvystä taimettua huolimatta seittisienen aiheuttamasta kovasta tartuntapaineesta, joka ilmenee versolaikkuoireina. Lisäkokeilla tulisi selvittää, miten muiden organismien sekä toisten seittisienikantojen yhteistoiminta vaikuttaa puolustuksen kehittymiseen ja voimakkuuteen ja kuinka luontaista puolustautumista voitaisiin vahvistaa.

Kirjallisuus

Dellagi, A., Heilbronn, J., Avrova, A.O., Montesano, M., Palva, E.T., Stewart, H.E., Toth, I.K., Cooke, D.E.L., Lyon, G.R., Birch, P.R.J. 2000. Potato gene encoding a WRKY-like transcription factor is induced in interactions with *Erwinia carotovora* subs. *atroceptica* and *Phytophthora infestans* and is coregulated with Class I endochitinase expression. *Molecular Plant Microbe interaction* 13:1092-1101.

Caldo, R.A., Nettleton, D., Wise, R.P. 2004. Interaction-dependent gene expression in Mla-specified response to barley powdery mildew. *Plant Cell* 16 (9):2514-28.

Carling, D.E., Leiner, R.H. 1986. Isolation and characterization of *Rhizoctonia solani* and binucleate *R. solani*-like fungi from aerial stems and subterranean organs of potato plants. *Phytopathology* 76: 725-729.

Gvozdeva, E.I., Volotskaya, A.V., Sofin, A.V., Kudryavtseva, N.N., Revina, T.A., Valueva, T.A. 2006. Interaction of proteinases secreted by fungal pathogen *Rhizoctonia solani* with natural proteinase inhibitors produced by plants. *Applied Biochemistry and Microbiology* 42:502-507.

Lehtonen, M.J., Ahvenniemi, P.M., Wilson, P.S., German-Kinnari, M., Valkonen, J.P.T. 2008. Biological diversity of *Rhizoctonia solani* (AG-3) in a northern potato-cultivation environment in Finland. *Plant Pathology*, *in press*.

Lorito, M., Woo, S.L., Garcia Fernandez, I., Colucci, G., Harman, G.E., Pintor-Toro, J., Filippone, E., Muccifora, S., Lawrence, C.B., Zoina, A., Tuzun, S., Scala, F. 1998. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *PNAS* 95:7860-7865.

Montesano, M., Brader, G., Ponce de León, I., Palva, E.T. 2005. Multiple defence signals induced by *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* elicitors in potato. *Molecular Plant Pathology* 6:541-549.

Pompe-Novak, M., Gruden, K., Baebler, S., Krečič-Stres, H., Novač, M., Jongsma, M., Ravnikar, M. 2006. Potato virus Y induces changes in hte gene expression of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Phytological and Molecular Plant Pathology* 67:237-247.

Punja, Z.K. 2001. Genetic engineering of plans to enhance resistance to fungal pathogens – a review of progress and future prospects. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23:216-235.

Ros, B., Thummler, F., Wenzel, G. 2004. Analysis of differentially expressed genes in a susceptible and moderately resistant potato cultivar upon *Phytophthora infestans* infection. *Molecular Plant Pathology* 5:191-201.

Sanford, G.B. 1938. Studies on *Rhizoctonia solani* Kühn. IV. Effect of soil and moisture on virulence. *Canadian Journal of Research* 16:203-213.

Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S., Dijst, G. 1996. *Rhizoctonia* species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Kluwer Academic Publishers. ISBN 0-7923-3644-5.

Tian, Z.D., Liu, J., Wang, B.L., Xie, C.H. 2006. Screening and expression analysis of *Phytophthora infestans* induced genes in potato leaves with horizontal resistance. *Plant Cell Reports* 25:1094-1103.