

”Flatskurv (*Streptomyces* spp.) - kartlegging og identifisering:
- resultater fra skurvprosjektet”



Nasjonalt potetseminar, Hamar
24.-25. januar 2011
Merete Wiken Dees
PhD-student, Bioforsk/UMB

Flatskurv - kartlegging og identifisering (PhD-prosjekt)

- Del av KMB-prosjektet “Improved potato quality by reduced skin blemish diseases (scab and scurf) in Norwegian potato production”
- PhD-prosjektet fokuserer på flatskurv forårsaket av *Streptomyces* spp

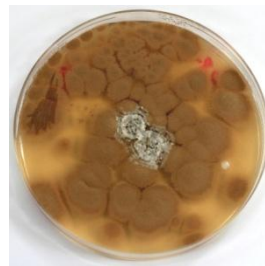
Flatskurv

- Forårsaket av arter i bakterieslekten *Streptomyces*
- Kjent i Norge siden 1920
- Begrenset kunnskap om flatskurvpatogenene i Norge siden det ikke har vært noen studier av skurvsykdommen siden slutten av 1960-tallet
- Forekommer overalt der en dyrker poteter
- Spres ved jord, vann og infisert settepotet
- I hovedsak kvalitetsreduksjon
 - Fører til knoller med lite tiltalende utseende
 - Nedgradering av matpotet til avrens
- Begrenset avlingsreduksjon

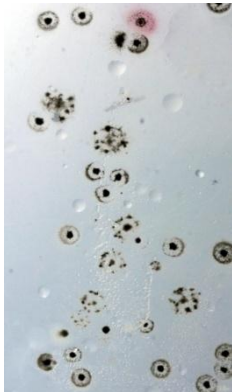
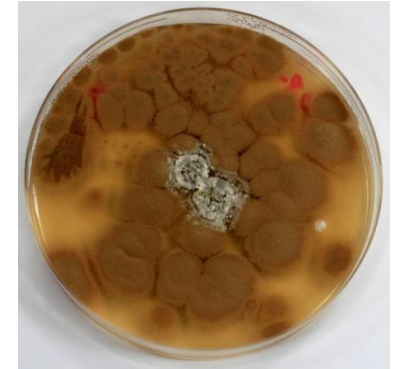


Streptomyces

- Jordboende bakterier (gram positive)
- > 500 beskrevne arter i slekten
- Antibiotikaproduserende
- Fleste arter er saprofytiske bakterier (lever av dødt organisk materiale)
- Kompleks morfologi
 - Mycelvekst (sopplignende)
 - Sporedannende



Morfologisk diversitet hos *Streptomyces*



Streptomyces

- Om lag 10 av >500 *Streptomyces*-arter er patogene
- Patogenitet i slekten baserer seg på toksinet thaxtomin (gir symptomer på flatskurv). Thaxtomin påvirker biosyntese av cellulose.
- Både patogene og ikke-patogene arter/stammer lever sammen i skurvsårene

- *S. scabies* - mest kjente og utbredte arten
- *S. europaeiscabiei* - ofte klassifisert sammen med *S. scabies*
- *S. turgidiscabiei* forekommer i Norden, Japan og Nord Amerika
- *S. acidiscabiei* - USA, Korea og Japan
- *S. aureofaciens* - Canada, enkelte Europeiske land
- *S. stelliscabiei* - USA og Frankrike

Streptomyces

- Flere planter er verter:
 - Potet
 - Gulrot
 - Søtpotet
 - Arter i korsblomstfamilien (reddik, kålrot)



Foto: Leslie Wanner



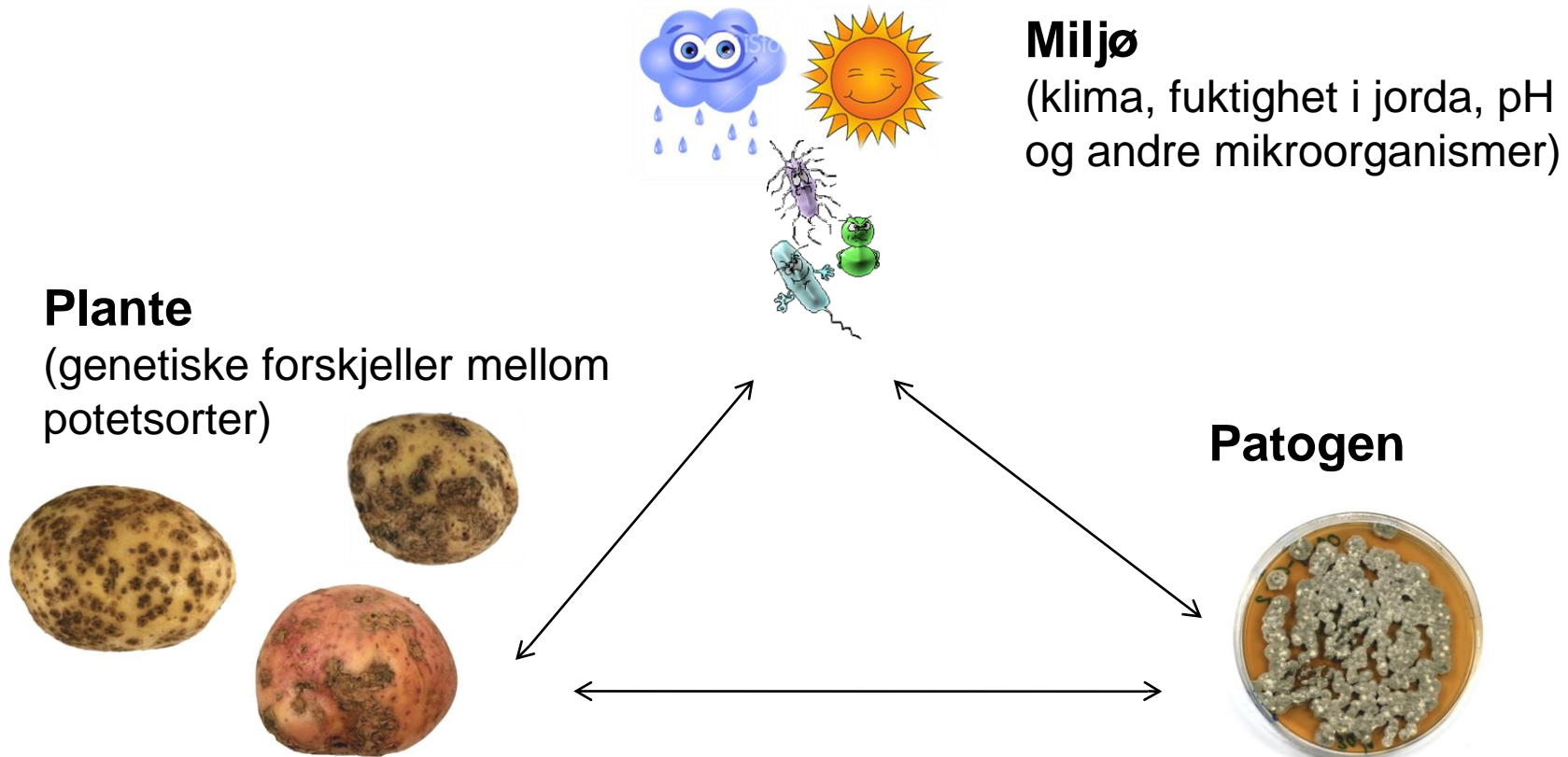
Symptomer

- *Streptomyces* forårsaker sykdom i underjordiske plantedeler
- Skurvlesjoner rammer stort sett ytre vev
- Uregelmessige, forkorkede, brune sårflækker med sprekker
- Kan variere fra få lesjoner i overflaten på knollen til dype, åpne skurvsår som dekker det meste av knolloverflaten
- 3 hovedtyper av symptomer:
 1. Skurvflekker på opphøyde "puter"
 2. Fordypninger
 3. Overflateskurv



Hva avgjør sykdomsutbrudd og symptomutvikling?

- Interaksjoner mellom plante, miljø og patogen



Symptomer 1



Saturna, Oppland



Kerrs Pink, Møre og Romsdal



Folva, Møre og Romsdal



Opera, Vestfold

Symptomer 2



Berber, Aust-Agder



N 97-5-23, Aust-Agder



Laila, Hedmark



Mandel, Oppland

Mål: Identifisering og karakterisering av de ulike *Streptomyces*-artene som forårsaker flatskurv i Norge

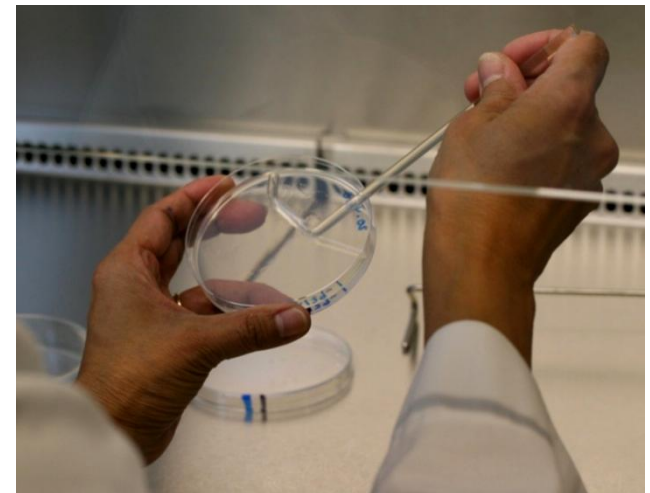
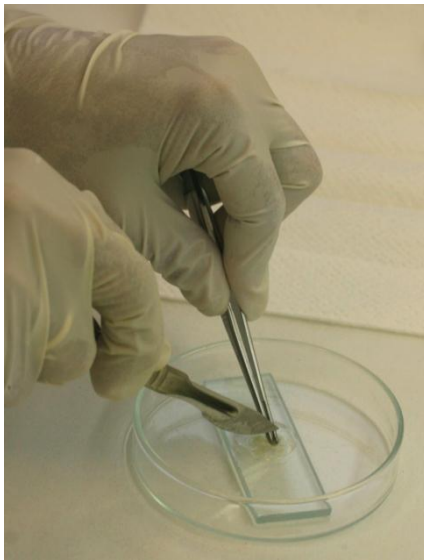
- Hvilke arter av *Streptomyces* som fører til flatskurv i Norge har blitt kartlagt.
- *Streptomyces* har blitt forsøkt isolert fra 256 potetprøver fra hele Norge i 2008 og 2009.
- Bakterieisolatene har blitt klassifisert ved PCR basert på sekvensvariable områder i 16S rRNA genet og gener forbundet med patogenitet (*txtAB*, *nec1* and *tomA*).
- Patogenitetstest er utført med et utvalg av isolatene på reddikspirer og/eller potet.
- 28 isolater ble valgt ut for micorarray-basert analyse (sammenliknende genomanalyse) på Universitetet i Helsinki.

Isolering av *Streptomyces*



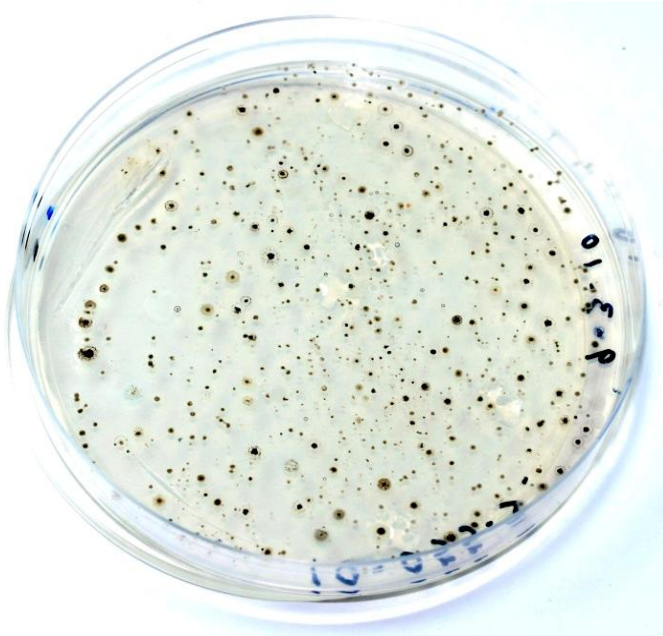
En liten vevsbit skjæres ut under overflaten av en flatskurvlesjon

Isolering av *Streptomyces*



Vevsbiten hakkes opp sammen med sterilt vann. Etter 30 min strykes dette ut på en petriskål med vannagar.

Isolering av *Streptomyces*

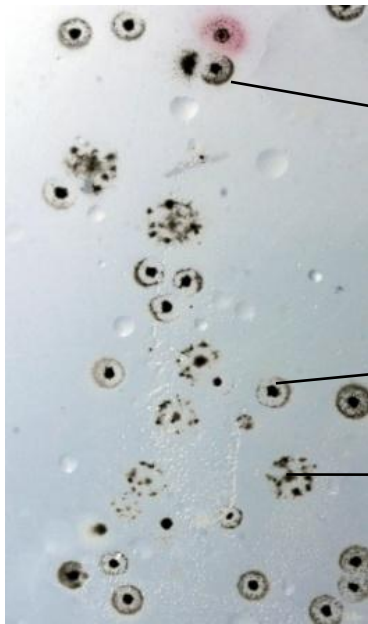


Flere hundre kolonier av *Streptomyces* kan vokse opp på vannagar etter isolering.

Blant disse finnes både patogene og ikke-patogene *Streptomyces*, samt flere ulike arter.

Disse kan ikke skilles visuelt.

Isolering av *Streptomyces*



Kolonier av *Streptomyces* spp.



Isolater av *Streptomyces* spp.



- Fra hver skål med vannagar velges 1-4 kolonier ut og overføres til hver sin skål med næringsagar.
- Fra hvert isolat ekstraheres DNA. Isolatene klassifiseres som antatt patogene/ikke-patogene ved PCR. Deretter artsbestemmes de antatt patogene isolatene ved PCR basert på sekvensvariable områder i 16S rRNA.

Artsbestemmelse ved polymerase kjedereaksjon (PCR)

- Sekvensvariable områder i 16S rRNA genet benyttes for å skille mellom *S. scabies*/*S.europaeiscabiei* og *S. turgidiscabies*
- En ytterligere analyse må til for å skille mellom *S. scabies* og *S. europaeiscabiei* (en restriksjonsanalyse utføres på et område av ITS-regionen (internal transcribed spacer region))

Resultater

- Kartlegging av de ulike *Streptomyces*-artene som forårsaker flatskurv i Norge



Resultater - kartlegging

- *Streptomyces* er forsøkt isolert fra 256 potetprøver (957 knoller) fra 15 fylker i Norge.
- 222 antatt patogene isolater isolert fra 29 ulike potetsorter
- 263 ikke-patogene isolater

Resultater vekstsesongen 2008

- NB! Resultatene må sees i lys av isoleringsmetoden
- *Streptomyces* ble forsøkt isolert fra totalt 140 prøver
- I 72 av prøvene ble det til sammen funnet 116 patogene isolater av *Streptomyces*

	Isolater	Prøver	<i>S. europaeiscabiei</i>	<i>S. turgidiscabies</i>	<i>S. scabies</i>
Nord-Norge	2	2	2	-	-
Midt-Norge	18	9	17	1	-
Østlandet	58	35	45	13	-
Vestlandet	10	4	4	6	-
Sørlandet	2	1	-	2	-
Ukjent lokalitet	26	21	14	12	-
Totalt	116	72	82 (70 %)	34 (30 %)	-

Resultater vekstsesongen 2009

- NB! Resultatene må sees i lys av isoleringsmetoden
- Streptomyces ble forsøkt isolert fra totalt **XX** prøver
- I 52 av prøvene ble det til sammen funnet 99 patogene isolater av *Streptomyces*.

	Isolater	Prøver	<i>S. europaeiscabiei</i>	<i>S. turgidiscabies</i>	<i>S. scabies</i>
Nord-Norge	12	6	11	1	-
Midt-Norge	21	8	21	-	-
Østlandet	22	10	15	7	-
Vestlandet	-	-	-	-	-
Sørlandet	10	5	6	4	-
Ukjent lokalitet	34	23	17	17	-
Totalt	99	52	70 (70 %)	29 (30 %)	-

- Resultatene viser ingen sammenheng mellom bakterieart og geografisk område.
- *S. scabies* er foreløpig ikke funnet i Norge.
- *S. europaeiscabiei* og *S. turgidiscabies* kan forekomme i samme prøve.
- *S. europaeiscabiei* og *S. turgidiscabies* kan også forekomme i samme lesjon på knollen.
- Resultatene så langt vil ikke kunne utelukke at en art finnes i et område, men de vil sannsynligvis kunne indikere hvilken art som eventuelt dominerer.
- Resultatene viser så langt ingen sammenheng mellom bakterieart og potetsort.

Patogenitetstest på reddik

- 46 isolater av *S. europaeiscabiei* og *S. turgidiscabies* ble testet for patogenitet på reddikspirer. Ikke-patogene isolater ble inkludert som kontroll.



Ikke-patogen *Streptomyces* spp.



Streptomyces turgidiscabies



Streptomyces europaeiscabiei



Patogenitetstest på potet

- 10 isolater av *txtAB*-positive *S. turgidiscabies* og 11 *txtAB*-positive isolater av *S. europaeiscabies* ble valgt ut til patogenitetstest på 'Blå Kongo'.
- I tillegg ble ikke-patogene (*txtAB*-negative) isolater av *Streptomyces* valgt ut til kontroll.
- Poteter ble dyrket i 5 liters pottes med P-jord iblandet 50 % perlite (volume). To skåler av hvert *Streptomyces*-isolat, ble blandet i jorda. 3 repetisjoner av hvert isolat/behandling.
- Potetene ble dyrket ved 18°C og naturlig lys og høstet etter 9 uker.

- Alle de *txtAB*-positive isolatene gav symptomer på flatskurv ved høsting, mens ingen av de *txtAB*-negative isolatene gav symptomer.
- Variasjoner i grad av symptomer ble observert innenfor en art.

Patogenitetstest på potet

Kontroll



S. turgidiscabies



S. europaeiscabiei



Variasjon i symptomer

'Blå Kongo' smittet med to ulike isolater av *S. turgidiscabies*:



Effekt av kjemiske og fysiske jordforhold på ulike *Streptomyces* arter under kontrollerte vekstbetingelser (klimakammerforsøk)

- Forsøk planlagt og utført av Tor J. Johansen, Bioforsk Nord - Holt
- Poteter av sorten 'Gulløye' (lysgrodd) ble dyrket i sandbasert kompost "Proffjord" iblandet 50 % perlite (volum) i 10 liters pottar i 2009.
- Pottene ble tilført smitte av to flatskurvorganismer (henholdsvis *S. europaeiscabiei* og *S. turgidiscabies*) i tillegg var det kontrollpottar uten smitte.
- Potetene ble dyrket ved 18 °C i dagslysrom under naturlige lysforhold i Tromsø.
- I knolldanningsperioden ble det gjennom ulike vanningsstrategier oppnådd tørre (0,5 N), normalt fuktige (N) og fuktige (1,5 N) vekstbetingelser. Fuktigheten ble kontrollert ved veiing av pottar.

Foreløpige resultater - klimakammerforsøk 2009

- (statistisk beregning gjenstår)

- *S. turgidiscabies* førte til sterkere angrep enn *S. europaeiscabiei*
- Ulik fuktighet hadde ingen innvirkning på angrepet av *S. turgidiscabies*
- For *S. europaeiscabiei* var det en klar tendens til sterkest angrep under de tørreste forholdene

Bekjempelse av flatskurv

- Stort mangfold av *Streptomyces*-arter som fører til skurv
- Kompleks bekjempelse da artene har ulike krav til vekstbetingelser og dermed varierende toleranseevne overfor forskjellige miljøfaktorer (f.eks: fuktighet, pH)
- Ved utvikling av kontrollstrategier for et dyrkingsområde må en først kartlegge alle patogene *Streptomyces*-arter som er tilstede
- Nye resultater fra USDA viser at vekstskifte kan redusere angrep av flatskurv til tross for at *Streptomyces* er effektive patogener på mange en- og tofrøbladete vekster og dermed kan opprettholde populasjonen over flere år ved vekst på disse
- Biokontroll av patogene *Streptomyces*-arter kan være mulig ved bruk av ikke-patogene *Streptomyces*-stammer
- Friske settepoteter



Oppsummering

- Resultater fra kartleggingen viser at *S. europaeiscabiei* og *S. turgidiscabies* fører til flatskurv i Norge
- *S. scabies* er foreløpig ikke funnet i Norge
- Resultatene viser ingen sammenheng mellom bakterieart og geografisk område
- Resultatene så langt vil ikke kunne utelukke at en art finnes i et område, men de vil sannsynligvis kunne indikere hvilken art som eventuelt dominerer
- Resultater fra Finland:
 - *S. turgidiscabies* viser antagonisme mot *S. scabies* og kan ha potensial til å erstatte *S. scabies* under dyrkningsforhold for poteter i Skandinavia.
- Kompleks bekjempelse da artene har ulike krav til vekstbetingelser og dermed varierende toleranseevne overfor forskjellige miljøfaktorer