



Bakteriekreft funnet på hestekastanje i Norge

Juliana Irina Spies Perminow, May Bente Brurberg, Arild Sletten & Venche Talgø, Bioforsk Plantehelse
juliana.perminow@bioforsk.no

I juli 2010 ble bakteriekreft funnet på hestekastanje (*Aesculus hippocastanum*) i Rogaland. Sykdommen skyldes *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*. Bakterien er påvist på hestekastanje i en rekke europeiske land. Angrep fører til visning i kronen og blødende sår på stamme og grener. I alvorlige tilfeller dør trærne.

Bakteriekreft på hestekastanje er en nylig oppdaget sykdom i Europa. Det er lite kunnskap om både bakteriens opprinnelse og biologi. *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* ble beskrevet for første gang på *Aesculus indica* i India i 1980, da som årsak til bladflekker (Durgapal & Singh 1980). I 2002 ble bakterien på nytt påvist, men da som årsak til blødende kreftsår på *A. hippocastanum* i Nederland (Dijkshoorn-Dekker 2005). Bakterien er også funnet i Storbritannia (Webber *et al.* 2007) og Tyskland (Schmidt *et al.* 2008). I disse landene har sykdommen spredt seg svært raskt i de påfølgende år.

Nylig publiserte molekylærbiologiske undersøkelser, hvor man har sammenlignet det opprinnelige bakterieisolatet fra India med isolater fra Europa, viser at det er genetiske forskjeller mellom disse. Man mener at det kan ha skjedd en genetisk videreutvikling som gjør at bakterien nå er i stand til å angripe stamme og grener. En slik utvikling kan være resultat av at infiserte hestekastanjetrær fra India har blitt plantet i Europa. Hvis dette er tilfelle viser det hvilken miljømessig risiko det kan være å introdusere en eksotisk plantepatogen bakterie til et nytt geografisk område (Green *et al.* 2010).



Figur 1. Hestekastanje (*Aesculus hippocastanum*) med døde grener i krona (venstre), rustrød, gummiaktig utflod på stammen (midten) og misfarge under barken (høyre) på grunn av angrep av bakterien *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*. Gardstun på Bryne 9. juli 2010. Foto: Venche Talgø.

Symptomer og vertplanter

Ved angrep av *P. syringae* pv. *aesculi* gulner løvet i kronen, grener og skudd dør, det blir blødende sår på stammene og noen ganger blir det gulbrun, gummiaktig utflod (figur 1). Trær i alle aldre er mottakelige. Fra utlandet er det kjent 10-30 år gamle trær kan drepes av bakterien i løpet av 3-5 år. Både hvite og røde kultivarer av hestekastanje angripes. *A. hippocastanum* 'Baumani' er spesielt mottakelig.

Funn i Norge

I juli 2010 ble det funnet tydelige kreftsymptomer på en hestekastanje på et gårdstun på Bryne i Rogaland (figur 1 og 2). I september samme året ble det registrert tilsvarende symptomer på en rekke hestekastanjer i Bryne sentrum (figur 3 og 4). Også i Bygdøy allé i Oslo (figur 5 og 6) og i sentrum av Moss og Lillestrøm (figur 7) har vi sett symptomer på bakteriekreft. I Bygdøy allé ble det tatt ut prøver 1. oktober, men her ble bakterien ikke isolert, trolig fordi prøvene ble tatt inn så sent på høsten at temperaturen var for lav til at bakterien var aktiv. Allerede i 2009 prøvde vi å isolere bakterien fra en prøve av hestekastanje fra Bergen sentrum, men prøven var negativ.



Figur 2. Tynne grener (ca. 2 cm i diameter) på treet i Figur 1 hadde langsgående sprekker (venstre). *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* ble isolert fra overgangen mellom friskt og sykt vev under slike sprekker (til høyre). Foto: Venche Talgø.



Figur 3. Skade på hestekastanje (*Aesculus hippocastanum*) angrepet av bakterien *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*. Bryne sentrum 9. september 2010. Foto: Venche Talgø.



Figur 4. Mange hestekastanjer (*Aesculus hippocastanum*) i Bryne sentrum hadde typiske blødende sår på stammene etter angrep av bakterien *Pseudomonas syringa* pv. *aesculi* (9. september 2010). Foto: Venche Talgø.



Figur 5. Ved en befaring i Bygdøy allé 1. oktober 2010 ble det funnet blødende sår på en rekke av kastanjetrærne (*Aesculus hippocastanum*). Det ble tatt ut prøver fra 10 trær med tydelige symptomer, men *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* ble ikke påvist. Det kan skyldes at det var sent på høsten og at bakterien ikke lenger var aktiv og derfor ikke kunne isoleres. Foto: Venche Talgø.



Figur 6. Bygdøy allé ble anlagt i 1894-95. De eldste trærne er derfor godt over 100 år gamle, men stedvis er det i årenes løp plantet inn nye trær (høyre) til erstatning for trær som av ulike grunner måtte felles. Dersom det til våren/sommeren 2011 blir bekreftet at symptomene i Bygdøy allé skyldes bakterien *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*, er det grunn til å anta at smitten har kommet inn ved nyplanting av trær som er blitt importert fra land i Europa hvor sykdommen finnes. Oslo 1. oktober 2010. Foto: Venche Talgø.



Figur 7. Den gamle hestekastanjen (*Aesculus hippocastanum*) til venstre står på Jeløya nær Moss sentrum og den i midten i Storgata i Lillestrøm (høyre). Symptomene tyder på bakteriekreft (*Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*), men det får vi ikke svar på før tidligst våren 2011. Moss 20. September 2010 og Lillestrøm 5. nov. 2010. Foto: Venche Talgø.

Isolering av bakterien

Bakterier ble isolert fra plantedeler med symptomer etter standard prosedyre. Det ble benyttet Kings B-medium, hvor bakterier i slekten *Pseudomonas* utvikler et fluorescerende pigment (figur 8). Fire isolater

ble videreført for identifikasjon, tre av dem ble senere identifisert som *P. syringae* pv. *aesculi*. Alle tre isolater ble isolert fra kvist med symptomer (figur 2), ikke fra kreftsår på stamme.



Figur 8. Dannelse av fluoriserende pigment ved vekst på Kings B-medium (skålen til venstre) er typisk for isolater av slekten *Pseudomonas*. I skålen til høyre ser man samme bakterien på et annet medium (nutrient glukose agar). Foto: Venche Talgø.



Figur 9. For å finne ut om *Pseudomonas*-isolatet fra hestekastanje (*Aesculus hippocastaneum*) på Bryne som ble isolert i juli 2010 var patogenet, ble bakterien sprøytet inn i bladplaten på en tobakkplante (hypersensitivitetstest). Dannelse av nekrotiske flekker indikerer patogenitet, noe som var svært tydelig etter 48 timer (midten), men også allerede etter 24 timer (venstre). Bladet til høyre er negativ kontroll med den ikke-plantepatogene bakterien *Cedecea neteri* (ingen symptomer). Foto: Juliana I. S. Perminow.

Identifikasjon

Påvisningen av *P. syringae* pv. *aesculi* ble bekreftet med følgende metoder:

Morfologisk

Karakteristiske, fluoriserende kolonier på Kings B-medium (figur 8).

Hypersensitivitetstest

Hypersensitivitetstesten benytter seg av enkelte planters forsvarsreaksjon mot inkompatible plantepatogene bakterier (planten er ikke vertplante for bakterien). Til testen brukte vi tobakk-planter (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi). En suspensjon av et bakterieisolat ble ført inn i bladet med en injeksjonsprøyte. Tilsvarende ble gjort med plantepatogene bakterieisolater fra refeansesamlingen vår og med steril fosfatbuffer. Etter 24 timer ble bladet brunt og nekrotisk på det stedet bakterien var injisert (figur 9). Bakterier som ikke er plantepatogene, eller steril fosfatbuffer gir ingen fargeforandring i tobakkblader.

Fettsyreanalyse

Fettsyrer er en viktig bestanddel av bakterienes cellevegg og cellemembran. Flere hundre forskjellige fettsyrer er kjent. Hvilke fettsyrer, og den mengde av den enkelte fettsyre som forekommer hos en enkelt bakterie, kan undersøkes ved hjelp av gass-kromatogra-

fisk analyse av et ekstrakt av bakterien. Slike fettsyreundersøkelser kan brukes til identifikasjon av bakterier, fordi fettsyresammesetningen er artspesifikk. Ved hjelp av et dataprogram kan resultatene fra analysen sammenlignes mot en database over fettsyresammensetningen hos mer enn 1000 forskjellige bakteriearter. Bakterieisolater fra Bryne, og et referanseisolat av *P. syringae* pv. *aesculi* fra England ble undersøkt for fettsyresammensetning. Fettsyreanalysen, med en påfølgende statistisk analyse, viste at isolatene fra Bryne og referanseisolatet var samme art.

DNA analyse

DNA-basert diagnostikk er velegnet for sikker identifikasjon av alle typer planteskadegjørere. DNA analyse viste at Bryne-isolatene var *P. syringae* pv. *aesculi*, det vil si at genet som koder for topoisomerase (*gyrB*) var identisk hos de tre isolatene og et referanseisolat av *P. syringae* pv. *aesculi* fra Tyskland. Genet i Bryne-isolatene var også identisk med sekvensen fra en rekke isolater fra Tyskland og Storbritannia som er rapporterte til den såkalte genbanken (GenBank).

Bekjempelse

Dette er en ny sykdom i Europa, og det er forløpig lite kjent hvordan bakterien spres. Lokalt skjer det trolig med vann, insekter, beskjæring og smittede plantedeler. Smitte over større avstander følger sannsynligvis med unge trær som er smittet, men som ikke har klare tegn på sykdom.

I de landene som hittil har kjempet mot sykdommen har man ofte gått drastisk til verks ved å felle trær for å hindre videre spredning. På grunn av muligheten for forveksling av symptomene med symptomer forårsaket av *Phytophthora* spp., bør bakterieangrepet påvises ved hjelp av en laboratorieanalyse som første skritt. Forsøk på kurerende inngrep, som å fjerne angrepet bark, fører med seg fare for å spre smitten (Webber 2010).

Når det blir nødvendig med beskjæring av smitta trær, er det best å starte arbeidet med de trærne som har minst angrep og deretter beskjære de med sterkest angrep. Dette er for å få minst mulig overføring av smitte med redskapene. Verktøyet bør desinfiseres jevnlig (for eksempel ved dypping i 1 del vanlig husholdningsklorin blandet med 9 deler vann). For smittsomme plantesykdommer er det en fordel å gjennomføre all beskjæring på den tiden av året smittefaren er lavest, det vil si om vinteren og tidlig om våren før veksten kommer i gang.

All fjerning av tydelig syke planter og plantedeler vil bidra til å redusere smittepresset. Er det bare få av mange trær som er smittet, kan det lønne seg å fjerne dem helt, særlig når de er unge.

Et firma i England har utviklet et hvitløkbasert ekstrakt som med spesialutstyr kan sprøytes med høyt trykk inn i stammen. Det sies å ha god effekt, men man har foreløpig begrenset erfaring med midlet. Bruk av dette midlet i Norge vil eventuelt kreve godkjennelse fra Mattilsynet.

På steder hvor sykdommen ikke er påvist bør det ikke plantes nye hestekastanjetrær fra andre områder.

Mattilsynet har i samråd med Bioforsk bestemt at det ikke settes i verk tiltak i offentlig regi (dvs. tiltak hjemlet i Matloven) for å bekjempe bakteriekreft, fordi skadegjøreren sannsynligvis allerede har spredt seg til flere steder i Norge. Erfaringer fra andre land i Europa viser at muligheten for å lykkes med en bekjempelse/utryddelse når sykdommen har stor spredning ikke er tilstede. Bakterien står på "EPPO Alert List" (EPPO 2010), men ingen land har oppført skadegjøreren i sitt planteheslovsverk, eller anbefalt bekjempelse i offentlig regi.

Det vil derfor være opp til den enkelte treeier/ kommune hva det vil gjøre med infiserte trær. Bioforsk anbefaler at det fokuseres på tiltak som reduserer videre smittespredning.



Takk

Takk til Sabine Werres ved Julius Kühn-Institut (JKI) i Tyskland for frysetørket DNA av *P. syringa* pv. *aesculi* som ble brukt som referanse ved sekvensering av de norske isolatene. Videre vil vi takke Grete Lund, Monica Skogen og Inger-Lise Akselsen for teknisk hjelp.

Litteratur

Dijkshoorn-Dekker, MWC. 2005. Eindrapport onderzoek-sprogramma "Red de kastanje voor Nederland". Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Wageningen: Werkgroep Aesculaap, Boskoop, 48 s.

Durgapal, JC & Singh, B. 1980. Taxonomy of *Pseudomonas pathogenic* to horse-chestnut, wild fig and wild cherry in India. Indian Phytopathology 33:533-535.

EPPO Alert List. 2010. *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*, 1 s. http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert_List/bacteria/Pseudomonas_s_aesculi.htm

Green, S, Studholme, DJ, Laue, BE, Dorati, F, Lovell, H, Arnold D, Cottrell, JE, Bridgett, S, Blaxter, M, Huitema, E, Thwaites, R, Sharp, PM, Jackson, RW & Kamoun, S. 2010. Comparative genome analysis provides insights into the evolution and adaptation of *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* on *Aesculus hippocastanum*. PLoS ONE 5(4): e10224.

Schmidt, O, Dujesiefken, D, Stobbe, H, Moreth, U, Kehr, R & Schröder, Th. 2008. *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* associated with horse chestnut bleeding canker in Germany. For. Path 38:124-128.

Webber, J. 2010. Bleeding Canker of Horse Chestnut. Forestry Commission, England, 1 s. <http://www.forestry.gov.uk/fr/INFD-6KYBGV>

Webber, J, Parkinson, N, Rose, J, Stanford, H, Cook, RTA & Elphinstone, J. 2007. Isolation and identification of *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* causing bleeding canker of horse chestnut in the UK. Plant Pathol. New Dis. Rep 15, 1.

BIOFORSK TEMA
vol 5 nr 23
ISBN: 978-82-17-00721-0
ISSN 0809-8654

Fagredaktør:
Direktør Ellen Merethe Magnus
Ansvarlig redaktør:
Forskningsdirektør Nils Vagstad

www.bioforsk.no