



**NIBIO**

NORSK INSTITUTT FOR  
BIOØKONOMI

NIBIO RAPPORT | NIBIO REPORT

VOL.: 2, NR.: 33, 2016

## Kartlegging av bakteriesykdom (*Pseudomonas syringae*) på selje (*Salix caprea*) i Norge



PERMINOW J.I.S. & TALGØ V.  
NIBIO Bioteknologi og Plantehelse

## TITTEL/TITLE

KARTLEGGING AV BAKTERIESYKDOM (*PSEUDOMONAS SYRINGAE*) PÅ SELJE (*SALIX CAPREA*) I NORGE

## FORFATTER(E)/AUTHOR(S)

PERMINOW, JULIANA IRINA SPIES; TALGØ VENCHE

DATO/DATE:	RAPPORT NR./ REPORT NO.:	TILGJENGELIGHET/AVAILABILITY:	PROSJEKT NR./PROJECT NO.:	SAKSNR./ARCHIVE NO.:
06.07.2016	2(33) 2016	Åpen	8952	2016/233
ISBN-NR./ISBN-NO:	ISBN DIGITAL VERSION/ ISBN DIGITAL VERSION:	ISSN-NR./ISSN-NO:	ANTALL SIDER/ NO. OF PAGES:	ANTALL VEDLEGG/ NO. OF APPENDICES:
978-82-17-01594-9		2464-1162	15	

## OPPDRAUGSGIVER/EMPLOYER:

Norsk Genressurscenter

## KONTAKTPERSON/CONTACT PERSON:

Kjersti Bakkebø Fjellstad

## STIKKORD/KEYWORDS:

## FAGOMRÅDE/FIELD OF WORK:

Plantehelse

Plant Health

## SUMMARY:

*Pseudomonas syringae* was isolated from symptomatic goat willow trees (and some other tree species) from different locations in Norway. The isolates were characterized by different methods and their pathogenicity proven by bioassays. We conclude that the pathogen represents a threat to the health of goat willow and other host plants in Norwegian natural environment.

## LAND/COUNTRY:

Norge

## FYLKE/COUNTY:

Akershus

## KOMMUNE/MUNICIPALITY:

Ås

## STED/LOKALITET:

Ås

## GODKJENT /APPROVED

Arne Hermansen

NAVN/NAME

## PROSJEKTLEDER /PROJECT LEADER

Juliana Perminow

NAVN/NAME



# INNHALDSFORTEGNELSE

1	INNLEDNING .....	4
1.1	Om prosjektet .....	4
1.1.1	Kort om skadeorganismen <i>Pseudomonas syringae</i> på trær .....	5
2	METODER .....	6
2.1	Prøvetaking/Isolering .....	6
2.2	Identifisering .....	6
2.2.1	Fettsyreanalyse .....	6
2.2.2	Sekvensering .....	6
2.2.3	Hypersensitivitetstest .....	6
2.2.4	Smitteforsøk og reisolering .....	7
3	RESULTATER .....	8
4	KONKLUSJONER .....	14
5	LITTERATURREFERANSER .....	15

# 1 INNLEDNING

## 1.1 Om prosjektet

I «Genressursenteret sin aktivitetsplan for bevaring og bærekraftig bruk av skogtregenetske ressurser i Norge» står selje oppført som et tre som hører hjemme i Norge, men er uten «spesielle bevaringsbehov».

Vi har imidlertid observert delvis dramatisk skade på selje de siste årene som høyst sannsynlig er forårsaket av bakterien *Pseudomonas syringae*.

Selje, som er et treslag som har forekommet i Norge siden siste istid (ca. 10000 år siden), har stor utbredelse og stor betydning:

**Økologi:** Selje produserer svært næringsrik pollen og nektar i perioden april-mai, dette er en viktig næringskilde til bier og humler tidlig om våren når det er lite blomstring ellers i norsk natur. Selje er også en høyt preferert beiteplante for hjortevilt (rådyr, hjort og elg).

**Kulturminne:** Ved av selje har tradisjonelt blitt brukt til håndverk, fremstilling av bruks- og pyntegjenstander, fletting, musikkinstrumenter osv. (Nedkvitne 1990). Høsting av selje og andre løvtreslag til bruk som dyrefor (løv, kvister, bark) i uår førte til trær med karakteristisk form (styvinger) på gårdene (= biologisk kulturminne).

I 2012 ble bakterien påvist i selje fra Fjellvørsøya i Hitra kommune (Fig. 1+2). Langs en veistrekning på 5 km telte vi i juli 2013 opp 63 sterkt skadde og døde trær (Talgø et al. 2014). Vi isolerte også bakterien fra døende selje i Ås kommune. På bakgrunn av dette anså vi denne bakteriesykdommen som en trussel for helsetilstanden til norsk selje (og andre treslag) og så behov for videre kartlegging og smitteforsøk. Vi ville gjerne finne ut om påvisningene som var blitt gjort ved de to lokaliteter representerte enkelttilfeller eller om sykdommen var mer utbredt





Fig.1. Blødende sår på selje (Foto: V. Talgø)  
Foto: V. Talgø



Fig.2. Død selje på Fjellværsøya (Foto: V. Talgø)  
Foto: V. Talgø

### 1.1.1 Kort om skadeorganismen *Pseudomonas syringae* på trær

*P. syringae* forårsaker alvorlig sykdom på kirsebær, plomme og andre *Prunus*-arter, men den er også funnet på en rekke andre treaktige planter i Norge: blankmispel, hestekastanje, hjertetre, liguster, poppel og syrin (Perminow et al. 2014). I USA har forskning vist at bakterien kan gjøre skade på 40 forskjellige busker og trær (Canfield et al. 1986). Symptomer varierer fra bladflekker, kreftsår og blødende flekker i barken til fullstendig ødeleggelse av kronen. Det antas at bakterien spres med formeringsmateriale og på kortere avstander med vinddrevne nedbør.

## 2 METODER

### 2.1 Prøvetaking/Isolering

Prøver av selje (og andre trær) med mistenkelige symptomer ble samlet inn fra følgende lokaliteter i 2015:

Ås (Kajaområdet, Askeveien, Nordskogen); på Ås også prøve av alm (NMBU ved Økonomikantine) Oslo (Holmlia, Ekraeveien); på Holmlia også prøve av lind.

Lærdal (i nærheten av fruktfelt); i Lærdal også prøver av hegg

Sogn (90/15 etter Framfjorden, 91/15 før Indrefjorden – begge: Når man reiser vestover fra Vik Østerdalen (Selje – nord for Sørumsand, Hegg – mellom Skarnes og Kongsvinger, Pil – nord for Sørumsand)

Isoleringer ble gjennomført både fra symptomer i barken (Fig.1) og bladflekker (Fig.4+5) på et medium hvor *P.syringae* danner fluorescerende kolonier (Fig.6). Isolater ble valgt ut under UV-lys og renses før videre analyse.

### 2.2 Identifisering

#### 2.2.1 Fettsyreanalyse

Identifikasjon av utvalgte isolater ved hjelp av fettsyreanalyse: Bakterier ble oppformert under standardiserte betingelser (medium, temperatur, inkuberingstid). Deretter ble fettsyrene ekstrahert og omdannet til fettsyremetylestere. Disse ble separert med gasskromatografi. Fettsyreanalyse resulterer i karakteristiske mønstre (kromatogrammer) som sammenlignes med kjente mønstre fra referanseisolater i databasen (MIDI).

#### 2.2.2 Sekvensering

Identifikasjon av utvalgte isolater ved hjelp av 16 S sekvensering: Genet som koder for 16S rRNA, som finnes i alle bakterier, ble amplifisert ved hjelp av PCR og produktene ble sendt til sekvensering. På grunn av dyr metode/ begrenset budsjett ble dette bare gjort for to isolater.

#### 2.2.3 Hypersensitivitetstest

Hypersensitivitetstest i tobakkplanter gir en indikasjon på om identifiserte isolater er patogene. Suspensjoner med høyt celletall (fra 5 isolater) ble injisert i feltene mellom bladnervene til store planter av tobakk (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi). Det samme ble utført med steril fosfatbuffer som kontroll. Resultater ble lest av etter 24 og 48 timer.

## 2.2.4 Smitteforsøk og reisolering

Koch`s postulater foreskriver smitteforsøk med vertplanten og reisolering av bakterien fra de oppståtte symptomer. Seljefrø ble høstet våren (mai) 2015 i Lærdal fra et frisk utseende seljetre. Disse ble lagt til spiring umiddelbart. Småplanter av selje ble brukt til smitteforsøk i to omganger:

1. Smitting av blad, knapt 8 uker gamle planter, med 2 *Pseudomonas syringae* isolater fra selje, 1 *P.syringae* isolat fra morell, 1 *P.syringae* isolat fra plomme, 2 andre bakterieisolater (*Rahnella aquatilis*, *Pseudomonas fluorescens*) fra syk selje (negativ bakterie kontroll) og steril fosfatbuffer (negativ kontroll). Bakterieløsningene ble penslet på bladene med sterile vattpinne. Alle smittede planter ble dekket med fuktete plastposer (Fig. 3) for å opprettholde et fuktig miljø i smitteetableringsfasen. Disse ble fjernet etter 24 timer. Temperaturen i veksthuscellen holdt mellom 21 og 24° C. Reisoleringer ble gjennomført ca 4 uker etter smitting.



Fig. 3 Seljeplanter ble holdt fuktig de første 24 timene av smitteforsøk

Foto: J.Perminow

2. Smitting i toppen av 12 uker gamle planter, med 2 *Pseudomonas syringae* isolater fra selje, 1 *P.syringae* isolat fra morell, 1 *P.syringae* isolat fra lind og steril fosfatbuffer som negativ kontroll. Toppene av plantene ble skåret av med steril skalpell. Pipettespiss fylt med bakterieløsningen ble satt inn i såret og festet med parafilm. Pipettespissene og parafilm ble fjernet etter 4 døgn. Reisoleringer ble gjennomført ca 14 uker etter smitting.



### 3 RESULTATER

I prosjektperioden ble bakterien påvist i 2 prøver fra Oslo (Fig.4), 1 prøve fra Ås og 2 fra Sogn (Fig.5).



Fig.4. Selje fra Holmlia i Oslo med bladflekker

Foto: J.Perminow



Fig.5. Selje fra Sogn med bladflekker

Foto: J.Perminow



Bakterier ble isolert på et medium der *P.syringae* danner fluorescerende pigment (Fig.6)



Fig. 6 Vekst med fluorescerende pigment av *P. syringae* på Kings Medium B til venstre, til høyre vekst av samme bakterien på et annet medium (NGA), vanlig næringsagar

Foto: V. Talgø

I prosjektet ble bakterien også påvist i forskjellige andre vertsplanter: pil, hegg, lind (Fig. 7) og alm (Fig.8).



Fig. 7. Lind fra Holmlia med bladflekker

Foto: J.Perminow



Fig. 8. Alm fra Ås med bladflekker

Foto: V. Talgø

I forbindelse med andre NIBIO prosjekter har bakterien blitt påvist i en rekke andre viktige vertplanter (isolert fra planter med symptomer) i 2015:

Søtkirsebær (morell), surkirsebær, plomme, eple, prydeple, pære, laurbærhegg og forsythia.

Bakteriene ble identifisert til artsnivå (*Pseudomonas syringae*) fra alle vertplantene ved hjelp av fettsyreanalyser (Fig.9)

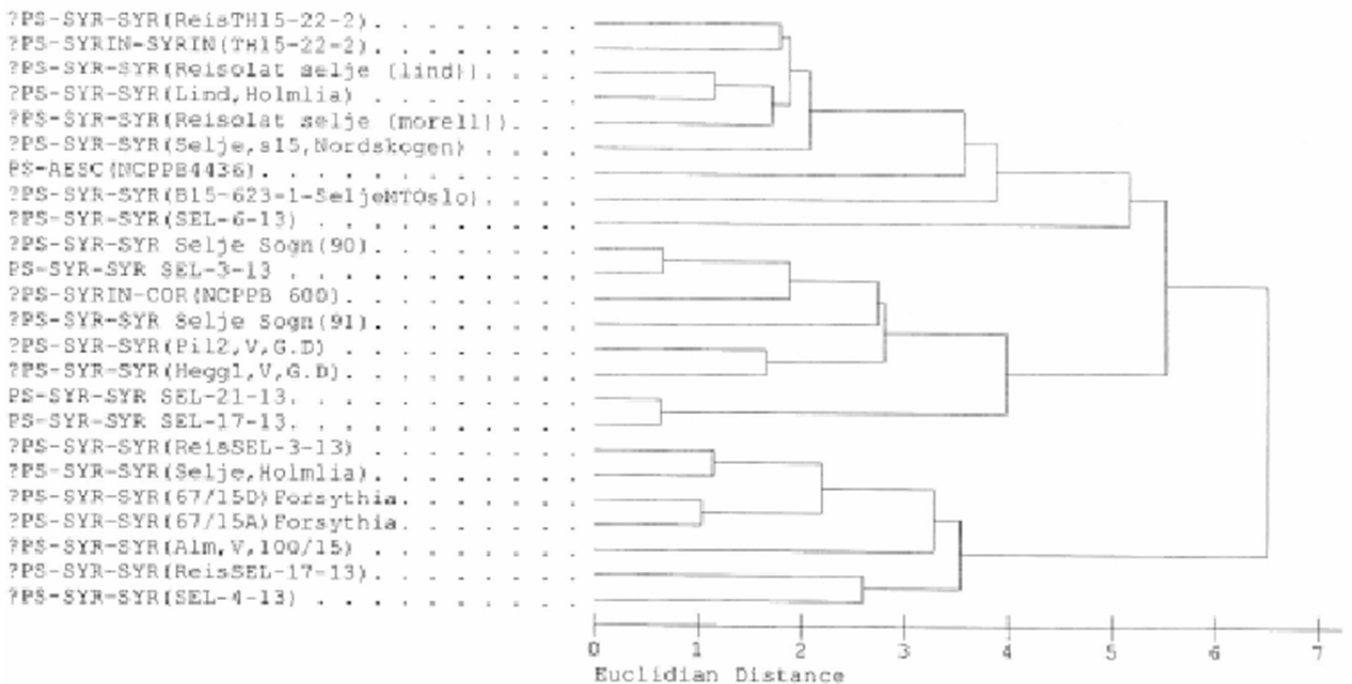


Fig. 9 Resultat fra fettsyreanalyse. *Pseudomonas syringae* fra selje og enkelte andre vertplanter. Euclidian distance under 10 regnes som samme art

To isolater fra 2015 ble identifisert til artsnivå (*Pseudomonas syringae*) ved 16S r DNA sekvensering, henholdsvis selje fra Holmlia og selje fra Ås, Nordskogen. For eventuell identifikasjon til underart må det brukes sekvensering av et annet gen (citrat syntetase gen). Primere er bestilt, men arbeidet kan ikke gjennomføres innen dette prosjektets ramme.

Hypersensitivitetstesten i tobakk som ble gjennomført med 5 isolater fra selje og ett fra lind ga positivt utslag (Fig.10), registrert etter 24 timer, noe som indikerer patogenitet.



Fig. 10 Nekrotisk vev der patogene bakterier ble injisert

Foto: J.Perminow

Som nevnt ble to typer smitteforsøk gjennomført og de utvalgte isolatene viste seg å være patogene. Forsøk 1: Etter to uker ble det registrert bladflekker i alle ledd unntatt negativ kontroll og negativ bakteriekontroll (*Rahnella*, *P. fluorescens*). Sterkest utslag ga et isolat fra morell (Fig.11). Reisoleringer ble gjennomført og reisolatene igjen identifisert vha. fettsyreanalyse.



Fig. 11 Bladflekker på selje forårsaket av *P.syringae* isolat fra *Prunus avium*

Foto: J.Perminow

**Forsøk 2:** Etter 12 uker ble det ikke registrert tydelige symptomer utenpå de infiserte «treetoppene». Etter 14 uker ble disse derfor kuttet av, brakt til laboratoriet og snittet opp. Angrep kunne sees som brunfarging og svakt råttent vev i alle ledd unntatt negativ kontroll. Isolatene fra morell (samme som i første forsøk) og lind ga sterke angrep (Fig.12). Reisoleringer ble gjennomført i ca. 8 cm avstand fra opprinnelig inokuleringssted og reisolatene igjen identifisert vha. fettsyreanalyse.





Fig.12 Råte i stengelen på selje forårsaket av *P.syringae* isolat fra *Prunus avium*

Foto: J.Perminow

Etter den avsluttende behandlingen ble de smittede seljene flyttet utendørs på veksthusområdet for å kunne observere evtl. videre sykdomsutvikling i 2016.

## 4 KONKLUSJONER

Vi har vist at *Pseudomonas syringae* er patogen på selje og dermed potensiell er årsak til stor skade på seljepopulasjoner, som for eksempel på Fjellværsøya i Hitra kommune. Bakterien ble også påvist i selje med symptomer på 4 andre lokaliteter i landet. I tillegg ble bakterien detektert i 4 andre treslag i prosjektet.

Det er tankevekkende at *P. syringae* isolatet fra *Prunus avium*, som ble isolert fra trær som var nylig importert fra utlandet, viste seg å være mest aggressiv i smitteforsøk. Det viser at import av frukttrær ikke bare innebærer fare for å introdusere denne skadegjørereren i fruktproduksjonen, men at den også er en trussel for helsen til diverse treslag i norsk natur.

## 5 LITTERATURREFERANSER

Canfield, M.L., Baca, S., and Moore, L.W. 1986

Isolation of *Pseudomonas syringae* from 40 cultivars of diseased woody Plants with Tip Dieback in Pacific Northwest Nurseries. *Plant Disease* 70: 647-650

Nedkvitne, K., 1990. *Selja i norsk natur og tradisjon*. Elverum Trykk A/S, Elverum

Perminow, J., Sletten, A., Akselsen, I., Brurberg, M. & Talgø, V. 2014

Angrep av *Pseudomonas* på busker og trær i Norge. *Bioforsk Fokus*, Vol: 9, s.114

Talgø, V, Magnusson, C, Blystad, D., Brurberg, M, Perminow, J., Herrero, M, & Strømgren, G. 2014

Global og nasjonal handel med pryddplanter – effektiv spredningsvei for planteødeleggende mikroorganismer og nematoder. *Bioforsk Tema*, Vol:9, Nr.2, s. 8



Norsk institutt for bioøkonomi (NIBIO) ble opprettet 1. juli 2015 som en fusjon av Bioforsk, Norsk institutt for landbruksøkonomisk forskning (NILF) og Norsk institutt for skog og landskap.

Bioøkonomi baserer seg på utnyttelse og forvaltning av biologiske ressurser fra jord og hav, fremfor en fossil økonomi som er basert på kull, olje og gass. NIBIO skal være nasjonalt ledende for utvikling av kunnskap om bioøkonomi.

Gjennom forskning og kunnskapsproduksjon skal instituttet bidra til matsikkerhet, bærekraftig ressursforvaltning, innovasjon og verdiskaping innenfor verdikjedene for mat, skog og andre biobaserte næringer. Instituttet skal levere forskning, forvaltningsstøtte og kunnskap til anvendelse i nasjonal beredskap, forvaltning, næringsliv og samfunnet for øvrig.

NIBIO er eid av Landbruks- og matdepartementet som et forvaltningsorgan med særskilte fullmakter og eget styre. Hovedkontoret er på Ås. Instituttet har flere regionale enheter og et avdelingskontor i Oslo.



Forsidefoto: Juliana Perminow