



Mikrosopper i etterforskernes lupe

Forfatter

Ivar Mysterud, Biologisk institutt, UiO

Sammendrag

I to foregående artikler har vi begynt en gjennomgang av status i forskningen på sykdomskomplekset alveld hos sau. Flere og flere indikasjoner tyder på at det må være «noe» i tillegg til saponiner i rome som er årsaken til alveldlidelsen. Vi har kalt denne ukjente «faktor X» for en kofaktor, og nyere forskning har blitt konsentrert om letingen etter den. I forrige artikkel tok vi for oss mikrosoppen *P. chartarum*, her skal vi se på noen andre mikrosopper fra listen over «mistenkte» arter.

Publisert

2008

Referanse

Sau og Geit nr. 1/2008

Utskriftsdato

22.07.2019 www.fag.nsg.no

Jakten på alveldens «missing link» (9)

Mikrosopper i etterforskerens lupe

I to foregående artikler har vi begynt en gjennomgang av status i forskningen på sykdomskomplekset alveld hos sau. Flere og flere indikasjoner tyder på at det må være «noe» i tillegg til saponiner i rome som er årsaken til alvelidelsen. Vi har kalt denne ukjente «faktor X» for en kofaktor, og nyere forskning har blitt konsentrert om letingen etter den.

*I forrige artikkel tok vi for oss mikrosoppen *P. chartarum*, her skal vi se på noen andre mikrosopper fra listen over «mistenkte» arter.*

Om mikrosopper kan være noen del av årsaksforholdet i alveld er ikke fastslått, selv om forskningen har arbeidet mye med problemet. I forrige artikkel kommenterte vi at det finnes godt dokumenterte eksempler på at mikrosopp er en primær årsak til leversvikt og fotosensibilisering av lam. Mest kjent er *P. chartarum* som gir sykdommen «facial eczema». De forskere som arbeider med fylkesmannsprosjektene anser det imidlertid ikke lenger som sannsynlig at *P. chartarum* er den ukjente X i alvelidsammenheng. Det betyr ikke at mikrosopper, dvs. andre råte- og jordbunnssopper, er ute av fokus i den videre forskningen. Tvert imot, antagelsen som tar opp mulig betydning av mikrosopper som kofaktor, dvs. som medvirkende årsak til

alveld sammen med saponiner i rome, mener vi fortsatt er en aktuell hypotese (se Mysterud et al. 2003). Det anses sannsynlig at en giftig mikrosopp som i dag ikke er nærmere kjent, på en eller annen måte kan finne veien inn i dyrekroppen og medvirke til alveld. Undersøkelsene ved Biologisk institutt 2001-2003 konsentrerte seg derfor først og fremst om å få en oversikt over flest mulige mikrosopper, både på og i rome (endofytter), og seinere også på visne grasarter generelt. Mykologene Gry Koller, Klaus Høiland, Øyvind Stensrud og Maria Nuñez har gjennom årene vært med i dette forskerteamet. Flere andre forskerteam har arbeidet med det samme. Vi skal her se på en liste over en rekke viktige arter og slekter av sopp som nå er påvist i utmarksbeitene, og som vi mistenker kan opptre som kofaktor (Boks 1).

Mikrosopper på bladoverflater

Å kartlegge forekomsten av mikrosopper på bladoverflater er en formidabel oppgave. Bladoverflater på grønne planter, eller *fylloplanet* som det kalles på fagspråket, er i virkeligheten verdens største økosystem. Dette makrosystemet inneholder et utall av bakterier og sopper. Måten suksessen av mikroorganismer utvikler seg på i fylloplanet er avhengig av 1) næringsstatus i substratet, og eventuelle forandringer i næringen mens koloniseringen pågår, 2) forandringer i miljøforhold, spesielt temperatur og tilgjengelighet av vann, 3) forandringer i surhetsgrad (pH) og sammensetning av gasser i luft, 4) forandringer i vertens mottagelighet og 5) interaksjonen med andre mikroorganismer og virvelløse dyr (Lacey 1988). Undersøkelser i alvelidsammenheng for å få oversikt har etter hvert vist seg å være krevende metodisk og vanskelig å gjennomføre på en representativ måte.



Lam med alveld, en alvorlig sykdom med høy dødelighet, hvor årsaken fortsatt er ukjent. «Mikrosopp» og soppgifter har vært mistenkt enten som årsak, eller som del av årsaken (kofaktor), helt siden 1930-årene (Foto: Ivar Mysterud).

Et sted må man imidlertid bare begynne, og det er logisk å begynne med det nærmeste, nemlig en første kartlegging av mikrosopper som finnes på og i rome. Alle mikrosopper knyttet til denne planten ble i utgangspunktet betraktet som «aktuelle». Det er imidlertid langt fra sikkert at en eventuell kofaktor, dersom det i det hele tatt dreier seg om en mikrosopp, skal finnes akkurat på rome. Den kan finnes i de samme fuktheiene hvor rome dominerer, eller like gjerne helt andre steder i de samme utmarksområdene.

Cladosporium magnusianum

Arne Flåøyen og Margaret di Menna (se forrige artikkel) påviste ikke masse-sporulering av *P. chartarum* i sine undersøkelser, men de fant sporer av en annen sopp som var svært vanlig på rome i nesten alle områder de undersøkte. Det var råtesoppen *Cladosporium magnusianum*. Den ble derfor gjort til gjenstand for spesielle undersøkelser, men ble ikke funnet giftig for beitedyr verken alene eller i kombinasjon med saponiner (Flåøyen et al. 1993). Seinere er samme art påvist flere ganger. Selv etter de omfattende undersøkelser som er utført, kan en ikke være sikker på at *C. magnusianum* kan sjekkes ut av saken. For det første er det 1) mulig at akkurat den stammen som ble undersøkt under andre forhold kan være giftig, eller eventuelt at andre stammer av samme art kan være det under andre miljøforhold. For det andre 2) foreligger den muligheten, som påpekt av Arne Flåøyen, at rome kan reagere på angrep av *C. magnusianum* med å produsere såkalte *fytoaleksiner*. *Fytoaleksiner* er metabolitter som planter under visse forhold kan produsere for å hindre soppvekst og beskytte seg. Slike *fytoaleksiner* kan også være giftige for beitedyr, i alvelforskningen er dette formulert i den såkalte *fytoaleksinhypotesen* (Mysterud et al. 2003). Det er således ikke noen enkel sak å sjekke sopparter ut av alvelforholdet.

C. herbarum og C. macrocarpum

Også to andre arter i slekten *Cladosporium* kom i søkelyset. Olav Aas ved Universitetet i Bergen har, sammen med økologen og botanikeren Mary H. Losvik, drevet flerårige undersøkelser



Mikrosoppen Aspergillus tubingensis på romerøtter i Slettjellet, Surnadal (12x), innfelt en forstørret sporekoloni (50x) (Foto: Gry Koller).

av mikrosopper på rome i Sogn og Fjordane (se forrige artikkel). De studerte sopper også på fjorårgammelt materiale av rome. I deres undersøkelser ble det påvist hyppig forekomst og/eller dominans av *C. herbarum* og *C. macrocarpum*. Seinere er begge artene påvist flere ganger. Det er flere trekk ved disse artene som kunne nevnes i alveldssammenheng, blant annet at *C. macrocarpum* produserer metabolitter med *antibiotisk effekt* på andre sopper som forekommer i fylloplanet. Det er rettet særlig oppmerksomhet mot mikrosopper som produserer antibiotiske stoffer (Mysterud et al. 2003). Skjønt ulike giftstoffer (toksiner) kan forårsake akutt sykdom, er det muligens av større viktighet stadig å innta subkliniske doser, dvs. små, gjentatte doser som kan påvirke mikrofloraen i vomma og senke beitedyrets immunitet overfor andre påvirkninger (Lacey 1988). Begge disse artenes eventuelle giftighet for beitedyr i forbindelse med alveld er ikke nærmere undersøkt. Hvor sannsynlig er det så at artene i *Cladosporium*-gruppen har noe med alveld å gjøre?

Cladosporium svært vanlig i beitene

Omfattende undersøkelser av økologien til saprotrofe mikrober har vist at sporer fra arter i slekten *Cladosporium* er blant de som spres tidligst i beite-

sesongen, og de er blant dem som hyppigst koloniserer fylloplanet (Lacey 1988). Det kan forekomme mange arter av *Cladosporium* på bladoverflater samtidig. Undersøkelser i England har vist at midt på dagen, i de varmeste periodene da vindhastighet og turbulens er størst, er *Cladosporium*-sporer blant de absolutt dominerende. På fine sommerdager på landsbygda i England er det i luft målt toppkonsentrasjoner på 10^5 sporer pr. m^{-3} . *Cladosporium* spp. er faktisk den vanligste og hyppigst forekommende sporetype gjennom hele året i den tempererte sone så vel som i de fleste tropiske regioner (Lacey 1988).

Cladosporium og sau på beite

I en bredt anlagt undersøkelse i England i forbindelse med fotosensibilisering av sau er det utført omfattende kartlegginger av mikrosopper på beiten. I disse ble det påvist masse-sporulering av flere arter *Cladosporium* der det gikk beitedyr (Lacey 1975). For å gjøre historien kort, - det har ikke vært mulig å sette noen av disse artene i forbindelse med fotosensibilisering. Det kan vel også slutes den andre veien at dersom norsk sau på beite i utmark har store problemer med å takle sporer av mikrosopper som er så vanlige som *Cladosporium*, ville saue-

Fortsetter neste side.

holdet være i alvorlige vanskeligheter. Vi må kunne anta at beitedyr er godt tilpasset massesporulering fra arter i denne gruppen, og at sau generelt ikke har noe problem med disse artene (se Mysterud et. al. 2003). Det er naturligvis knyttet usikkerhet til om interaksjonen med rome i helt spesielle tilfeller kan være utslagsgivende, men det er neppe nødvendig å gi disse artene noen topp prioritet i det videre forskningsarbeidet. Da stiller det seg annerledes med sopper som kan produsere metabolitter med *antibiotiske effekter*.

Penicillium spp.

Blant de mikrosoppene som ble påvist allerede i Biologisk institutts prosjekter i 2001 var det flere arter i slekten *Penicillium*. Dette er en svært aktuell gruppe, da arten *Penicillium viridicatum* er blant de soppene som tidligere forskning har antatt kan fotosensibilisere dyr. *Penicillium* spp. er arter som er kjent for å produsere antibiotiske forsvarsstoffer som kan påvirke både bakterier og andre mikrosopper. Stoffer med slike egenskaper er ikke minst kjent for sin anvendelse i moderne medisin. Om dette

«*Penicillium*-komplekset» påvist i Halså/Surnadal kan være av interesse i alveldsammenheng er ikke avklart.

Mikrosopper påvist i rome

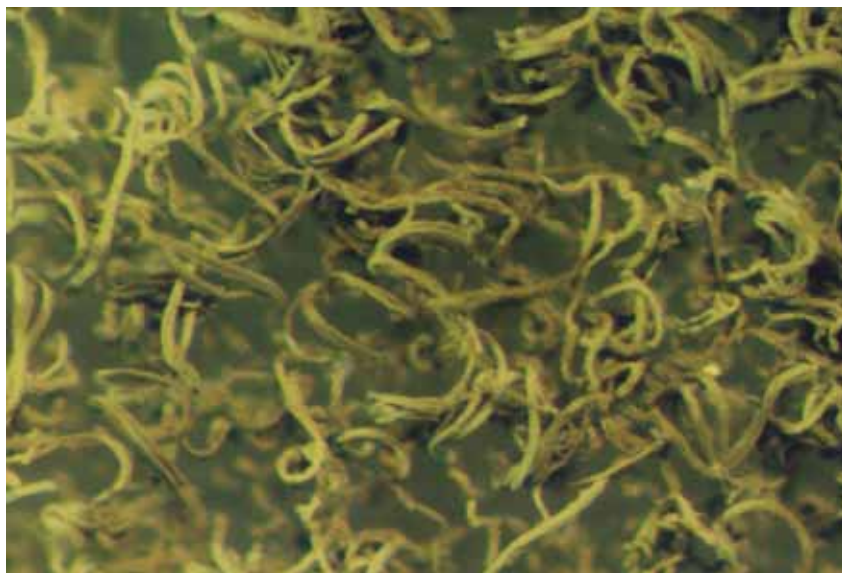
Til nå har vi sett på arter påvist på romeplanter, i det etterfølgende skal vi se på noen av artene påvist i rome, såkalte endofytter (Boks 1). I Biologisk institutts undersøkelser i Halså/Surnadal 2001, ble det påvist 4 endofytter fra røtter på rome. Disse fire var *Entyloma ossifragi* (gammelt navn; se under), *Aspergillus tubingensis*, *Penicillium minioluteum* og *Trichoderma viride*. Blant disse er *Aspergillus* vel kjent i mykotoksikologisk litteratur for blant annet å produsere *aflatoksiner* (Mysterud et. al. 2003). En av disse endofyttene omtalt under *Penicillium* (se under), er også påvist på andre planter enn rome i Halså/Surnadal. En annen av endofyttene, nemlig *Entyloma ossifragi*, finnes bare i rome.

Entyloma ossifragi/Gjaerumia ossifragi

Entyloma ossifragi tilhører sotsoppene (Ustilaginales). Slekten *Entyloma* er stor, og inneholder mer enn 150 arter fordelt på planter med tilhørighet i mer enn 30 ulike familier. Blant disse er det som nevnt én art som kun finnes i rome (Mysterud et al. 2003). Denne sotsoppen er tidligere påvist også på blader av rome, og da også sotsopper kan tenkes å produsere giftige sporer har den kommet på listen over mistenkte arter (Boks 1). *E. ossifragi* finnes flekkvis i alveldområdene, og er ikke på noen måte så sjelden som tidligere antatt. Den avslører seg som svarte flekker («flekksot») på romebladene utover i sesongen. (se Mysterud et al. 2003). Forskeren ved Biologisk institutt har samlet materiale til en tysk forskergruppe som har vært spesielt interessert i denne arten. Gruppen er ledet av den tyske mykologen Robert Bauer ved Universität Tübingen i Tyskland. De har blant annet arbeidet med å revidere artens systematiske stilling og kartlegge livshistorien (Bauer et al. 2005). Genetiske undersøkelser førte til at soppen ikke bare fikk nytt navn, den ble også plassert i en egen slekt *Gjaerumia* og i en helt ny familie Gjaerumiaceae. Navnsettingen er etter den norske mykologen Halvor B. Gjerum (Anonymous 2005). Rome-



Endofyten Trichoderma viride fra romerøtter (18x) i Slettjället, Surnadal (Foto: Gry Koller).



Penicillium spp. fra rome (50x). En av de mest interessante funnene som ble gjort i undersøkelser av sopper på alveldbeitene i Møre og Romsdal 2001-2003, var forekomsten av flere arter Penicillium (Foto: Gry Koller).

sotsoppen *Entyloma ossifragi* heter altså i dag *Gjaerumia ossifragi*. Dens mulige giftighet for beitedyr og betydning i alveldsammenheng er uavklart.

Råtesopper på visne planter

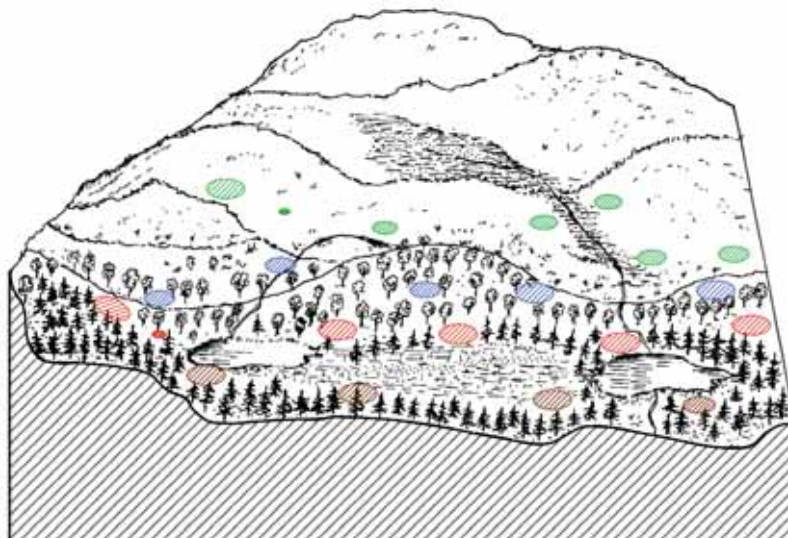
Som nevnt behøver ikke en kofaktor nødvendigvis å være direkte assosiert med rome, det er like sannsynlig at den kan opptre på helt andre steder i beitet. Virkningen av et eventuelt aktivt giftstoff kan også tenkes å være forsinket i forhold til inntaket. I 2003 ble det derfor gjennomført en undersøkelse av gammelt, vissent plantemateriale (særlig grasarter) i beitekorridoren til en sauebesetning i Halså, som nesten kronisk har vært rammet av alveld. Det ble opprettet samlestasjoner for mikrosopper fra innmarka på gården hele lia oppover gjennom bjørkebeltet og inn på de åpne romemyrene over tre-grensen. Dette resulterte i funn av et vell av arter (Myrsterud et al. 2007). Vi har satt opp på listen over mistenkte arter noen av dem vi synes er mest aktuelle (Boks 1).

Cladosporium

Flere arter i slekten *Cladosporium* ble påvist også i denne undersøkelsen, en slekt som vi allerede har kommentert (se over). Som nevnt er de blant de aller vanligste råtesopper på planteoverflater både i tropiske og tempererte strøk. Det er til nå påvist 18 arter her i landet. *Cladosporium*-arter ble særlig påvist i de høyestliggende områdene i Halså-gradienten. Arter i denne gruppen er ikke lenger blant de hovedmistenkte.

Penicillium

Det ble i bjørkebeltet i Halså-gradienten påvist to arter i slekten *Penicillium*, nemlig *P. minioluteum* og *P. citrinum/westlingii*. Arter i denne slekten er også påvist på romeblader og som endofytter (se over), og har tydeligvis en flekkvis utbredelse i disse utmarksområdene. *Penicillium*-arter kan produsere giftstoffer over et vidt temperaturområde, som blant annet kan forårsake både lever- og nyreskader på beitedyr. Ingen av de to påviste artene er nevnt i en revidert, internasjonal liste over arter som produserer giftstoff, men dette kan bare skyldes manglende undersøkelser. En annen egenskap som gjør denne gruppen aktuell i alveldsammenheng,



Cladosporium
Penicillium

Trichoderma
Fusarium

Landskapsskisse som anskueliggjør hypotesen om mikrosopp som kofaktor. På og ved fukthei med mye rome (horisontal skravur), er det påvist flekkvise forekomster av giftige mikrosopper (fargefelter). Foreløpige undersøkelser i Halså-gradienten 2003 antydte en viss høydefordeling av arter, dette er også antydte i modellen. Det må imidlertid utføres langt mer omfattende undersøkelser før en kan si noe sikkert når det gjelder en slik fordeling (se teksten).

er som nevnt at de kan produsere metabolitter med antibiotiske effekter. Antibiotiske stoffer kan påvirke mikroorganismer i vomma hos drøvtyggere og ødelegge membraner i tarm-systemet. At de kan ha slike effekter er blant annet dokumentert i undersøkelser i Canada (Myrsterud et al. 2003). Om *Penicillium*-artene i Møre og Romsdal kan ha noen relasjon til alveld er helt ukjent.

Trichoderma

En annen aktuell slekt som ble påvist i Halså-gradienten er *Trichoderma*. Dette er en slektsgruppe som er kosmopolitisk utbredt i jord, råtnende treverk og vissent plantemateriale. Arter i denne slekten kan dominere samfunnet av jordbunnsopper innenfor mange ulike landskapstyper og habitater. Disse soppene kan også produsere stoffer med antibiotisk virkning, og blant annet et sterkt virksomt stoff som heter *trichodermin*. En hel rekke giftstoffer har blitt identifisert og beskrevet kjemisk fra denne gruppen. I Halså ble *Trichoderma* påvist midt i gradienten. *Trichoderma viride* er for eksempel blant de artene som er fakultativt anaerobe (dvs. kan tåle perioder uten oksygen), og hvis den inntas med føret, kan den potensielt

sett overleve og influere mikroorganismene i vomma på drøvtyggere. Slike arter er derfor aktuelle i alveldsammenheng av to grunner: 1) deres evne til å modifisere fysiologiske egenskaper av membraner og 2) deres potensial til direkte påvirkning av mikrober i vomma på beitedyr (Myrsterud et al. 2003). De to sekvensene som ble påvist i Halså-gradienten tillot ikke bestemmelse til art.

Fusarium

Fusarium er kanskje den mest aktuelle gruppen av de mikrosoppene vi har omtalt fra Halså-gradienten. Dette er en stor og kompleks slekt som er tilpasset en vid variasjon av leveområder over hele verden. Arter i denne slekten produserer en lang rekke giftstoffer, hvorav mange er av betydning for beitedyr. Spekteret av *Fusarium*-metabolitter som kan påvirke dyrehelse er ikke bare de kjemisk mest mangfoldige, men de er også en stoffgruppe som har den mest varierte biologiske påvirkning av alle kjente stoffer. De 11 prøvene fra Halså-gradienten som inneholdt *Fusarium* ble alle funnet i de lavere delene av gradienten, det vil si på innmark

Fortsetter neste side.

(Mysterud et al. 2007). Undersøkelsene tillot ikke sikkert å avgjøre om det dreide seg om en eller to arter. En mer detaljert kartlegging av *Fusarium* i alveldbeitene i disse delene av landet bør gjennomføres, da dette er arter som er svært aktuelle i rollen som en mulig kofaktor.

Oppsummering

Undersøkelser så langt har altså resultert i en liste over *mistenkte sopper* som forekommer i alveldbeitene (Boks 1). Selv om vi enten vet eller mistenker at de produserer giftstoffer og dermed kan tenkes å opptre som kofaktor, er deres betydning for alveld uavklart. *Status er med andre ord ukjent*. Det vil by på omfattende og dyre forskningsprosjekter å utrede forholdene nærmere. Først må man samle inn og isolere de soppartene man ønsker å gå videre med. Deretter må man formere dem opp, og så føre dem tilbake til lam med og uten rome. Problemet i denne forskningen på mikrosopper er at det tydeligvis foreligger relativt mange muligheter. Det er derfor forbundet med et stort arbeid å komme fram til en sikker identifikasjon av en eventuell «faktor X». De innledende undersøkelsene i kartleggingen 2001–2003 som har vært utført i Halså/Surnadal, har også vist at det er til dels betydelige metodiske problemer forbundet med å arbeide i fylloplanet. *I sum vil det derfor være forbundet med et stort arbeid å finne, identifisere og dyrke opp eventuelle giftige stammer av alle disse artene, deretter teste dem på levende lam i dyreforsøk, med og uten påvirkning av saponin*. Det vil uansett dreie seg om omfattende forskningsprosjekter med medvirkning av mange ulike spesialister. Et annet forhold er at forskning av denne typen, hvor man bevisst ser seg nødt til å forgifte forsøksdyr, i dag ikke er populær ut fra hensyn til forsøksdyrenes velferd. Da en enda ikke har noen sikkerhet for at «faktor X» virkelig er en mikrosopp, kan det lønne seg å vurdere om man bør nærme seg forskningen på alveld fra en litt annen vinkel. Etter at vi i neste artikkel gjør oss ferdig med å kommentere alle de løse trådene når det gjelder mikrosopper, skal vi presentere forslag til helt andre strategier i alveldforskningen.

Av Ivar Mysterud

Biologisk institutt, Universitetet i Oslo

Liste over mistenkte mikrosopper fra alveldområder som er, eller har vært, aktuelle i diskusjonen om mulig kofaktor

Mikrosopper fra bladoverflater på rome:

Pithomyces chartarum
Cladosporium magnusianum
Cladosporium herbarum
Cladosporium macrocarpum

Mikrosopper i rome:

Entyloma ossifragi/*Gjaerumia ossifragi*
Aspergillus tubingensis
Penicillium minioluteum
Trichoderma viride

Mikrosopper på visne planter:

Cladosporium
Penicillium
Trichoderma
Fusarium

Sitert litteratur:

Anonymous 2005. Forskerveteran blir navnefar til sopp. *Nationen* 9. november 2005. (Melding i dagspresse).

Bauer, R., Lutz, M. & Oberwinkler, F. 2005. *Gjaerumia*, a new genus in the *Georgiefischeriales* (*Ustilaginomycetes*). *Mycol. Res.* 109 (11): 1250–1258.

Flåøyen, A., di Menna, M. E., Collin, R. G. & Smith, B. L. 1993. *Cladosporium magnusianum* (Jaap) M. B. Ellis is probably not involved in alveld. *Vetr. Res. Comm.* 17 (3): 241–245.

Lacey, J. 1975. Airborne spores in pastures. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 64: 265–281.

Lacey, J. 1988. Aerial dispersal and the development of microbial communities. Pp. 207–237; I: Lynch, J. M. & Hobbie, J. E. (eds.) *Micro-organisms in action: Concepts and applications in microbial ecology*. London, Blackwell, 363 pp.

Mysterud, I., Vang, M. & Nortvedt, S. 2003. Lammedødelighet 2001 og tapsituasjon 1999–2001 i et alveldområde i Halså/Surnadal, Møre og Romsdal. Med en oversikt over hypoteser i alveldforskningen. *Utmarksnæring i Norge 1-03*: 1–127.

Mysterud, I., Nuñez, M. & Høiland, K. 2006. *Pithomyces chartarum* – beryktet imperfekt sopp/mikrosopp som er ettersøkt i Norge. Festskrift til professor Leif Ryvardens 70 års jubileum. *Sopp og nyttevekster 1* (4): 49–53.

Mysterud, I., Høiland, K., Koller, G. & Stensrud, Ø. 2007. Molecular characterization and evaluation of plant litter-associated fungi from the «spring grazing corridor» of a sheep herd vulnerable to alveld disease. *Mycopathologia 164*: 201–215.

Aas, O. & Losvik, M. H. 1998. Microfungi on *Narthecium ossifragum* (L) Huds., in four mires in Sogn and Fjordane, western Norway. *Agarica 15* (24/25): 199–213.