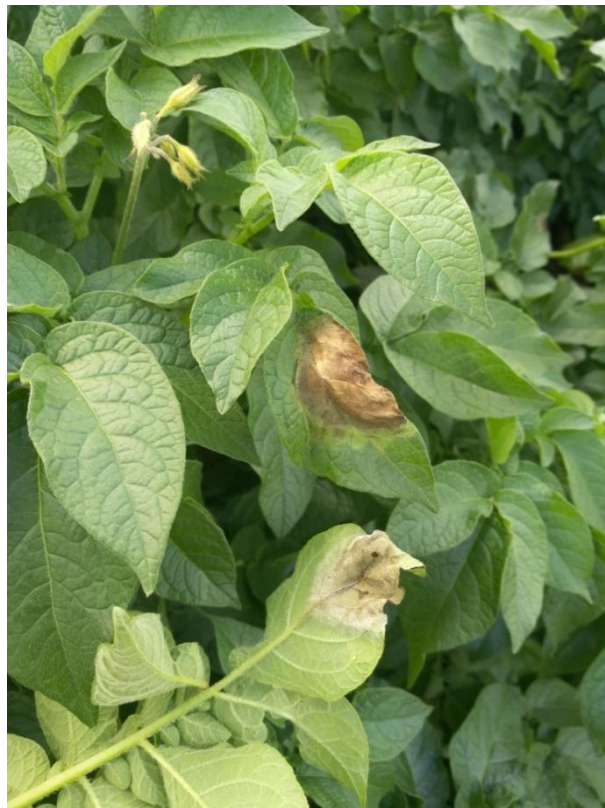


# Orsakar sortval och kemisk bekämpning populationsdifferentiering hos *Phytophthora infestans*?

Can cultivar and chemical control cause population  
differentiation in *Phytophthora infestans*?

*Lovisa Bergkvist*



## **Orsakar sortval och kemisk bekämpning populations-differentiering hos *Phytophthora infestans*?**

Can cultivar and chemical control cause population differentiation in *Phytophthora infestans*

*Lovisa Bergkvist*

**Handledare:** Lina Sjöholm, Sveriges Lantbruksuniversitet,  
Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi

**Examinator:** Nils Högberg, Sveriges Lantbruksuniversitet,  
Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi

**Omfattning:** 30 hp

**Nivå och fördjupning:** Avancerad nivå, A1E

**Kurstitel:** Självständigt arbete i biologi – magisterarbete, 30 hp

**Kurskod:** EX0732

**Program/utbildning:** Agronom Mark/växt

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2017

**Omslagsbild:** Potatisbladmögel i matpotatis, Foto: Lovisa Bergkvist

**Elektronisk publicering:** <http://stud.epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** potatisbladmögel, *Phytophthora infestans*, mikrosatelliter, populationsbiologi, sexuell reproduktion, asexuel reproduktion

**Sveriges lantbruksuniversitet**  
**Swedish University of Agricultural Sciences**

Fakulteten för naturresurser och jordbruksvetenskap  
Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi

## Abstract

*Phytophthora infestans* is a common plant pathogen in potato and have contributed to major economic losses in agriculture over the years. *Phytophthora infestans* is an oomycete with two mating types A1 and A2, thus reproducing both asexually and sexually. Using both asexual and sexual reproduction makes *P. infestans* an adaptable pathogen that can survive both with and without host growth.

To study how *P. infestans* population structures are affected by different control strategies and cultivars, a field trial was conducted at Mosslunda in Kristianstad. The field trial included two varieties, King Edward and Melody, and four treatments: untreated control,  $\frac{1}{4}$  recommended dose Revus,  $\frac{1}{2}$  dose Revus and phosphite, 5 l/ha. Leaflets infected with *P. infestans* was sampled on three occasions during the season. Genotypes were determined by microsatellites (SSRs) to get an overview of the genotypic variation in population and how it differed between the treatments, cultivars and sampling time.

This study shows that treatments in the field trial did not cause any population differentiation. Eighty six percent of the collected samples consisted of unique multilocus genotypes, indicating a sexual reproduction population.

## Sammanfattning

*Phytophthora infestans* är en vanlig växtpatogen i potatis och har under åren bidragit till stora ekonomiska förluster i jordbruket. *Phytophthora infestans* är en oomycet med två parningstyper A1 och A2 och kan på så sätt reproducera sig både asexuellt och sexuellt. Detta gör *P. infestans* till en anpassningsbar patogen som kan överleva både med och utan värdväxt.

För att studera hur *P. infestans* populationsstruktur påverkas av olika bekämpningsstrategier och sortval gjordes ett fältförsök på Mosslunda i Kristianstad. I fältförsöket ingick två sorter King Edward och Melody. Försöket hade fyra led, obehandlad kontroll,  $\frac{1}{4}$  rekommenderad dos Revus,  $\frac{1}{2}$  dos Revus och fosfit, 5 l/ha. Insamling av isolat gjordes vid tre tillfällen under säsongen. Genotyperna bestämdes med hjälp av mikrosatelliter (SSRs) för att få en överblick över den genotypiska variationen i populationen samt hur den skiljde sig mellan behandling, sort och provtagningstidpunkt.

Denna studie visar att behandlingarna i fältförsöket inte orsakade någon populationsdifferentiering. Åttiosex procent av de insamlade proverna utgjordes av unika multilocus genotyper, vilket indikerar en sexuell reproducerande population.

# Innehållsförteckning

<b>1</b>	<b>Inledning</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Syfte</b>	<b>6</b>
<b>3</b>	<b>Litteraturgenomgång</b>	<b>7</b>
3.1	<i>Phytophthora infestans</i>	7
3.2	Populationsbiologi	8
	3.2.1 <i>Phytophthora infestans</i> populationsstruktur i Norden	8
	3.2.1 Simple sequence repeat (SSRs)	9
3.3	Livscykel	10
	3.3.1 Asexuell livscykel	10
	3.3.2 Sexuell livscykel	11
3.4	Fungicider	12
	3.4.1 Revus	12
	3.4.2 Fosfit	13
<b>4</b>	<b>Material och Metod</b>	<b>14</b>
4.1	Försöksdesign	14
4.2	Insamling av prover	14
4.3	Gradering	15
4.4	Genotypning med mikrosatelliter	15
	4.4.1 DNA-extraktion	15
	4.4.1 PCR (Polymerase chain reaction)	16
4.5	Statistik	18
<b>5</b>	<b>Resultat</b>	<b>20</b>
5.1	Fältgradering	20
5.2	Resultat genotypning	21
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>26</b>
<b>7</b>	<b>Slutsats</b>	<b>28</b>
<b>8</b>	<b>Referenslista</b>	<b>29</b>
<b>9</b>	<b>Tackord</b>	<b>32</b>



# 1 Inledning

Oomyceten *Phytophthora infestans* som orsakar potatisbladmögel, är en förödande växtpatogen världen över (Cooke *et al.*, 2012). Potatisbladmögel uppträdde i Europa under 1840-talet och har sedan dess varit ett stort problem för potatisodlingen (Yuen & Andersson, 2013). Det är en utmaning att studera *P. infestans* då den utvecklas snabbt, har ett komplext genom samt att patogenen har olika populationsstrukturer i olika delar av världen (Sjöholm, 2012).

Bakgrunden till studien är att få mer kunskap om *P. infestans* biologi som ett led i att ta fram optimerade bekämpningsstrategier för att öka lönsamheten i potatisodlingen. Examensarbetet är utfört på Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi på SLU i Uppsala. Arbetet grundades på ett fältförsök placerat på Mosslunda gård utanför Kristianstad och försöket genomfördes som ett randomiserat blockförsök med fyra upprepningar. Småblad infekterade med *P. infestans* samlades in vid tre tillfällen under säsongen, och populationsstudien genomfördes med hjälp av mikrosatelliter (SSRs).

## 2 Syfte

Syftet med denna magisteruppsats är studera hur populationsstrukturen för *Phytophthora infestans* påverkas av olika bekämpningsstrategier och sortval. Detta för att kunna bidra till mera vetenskapligt baserade bekämpningsstrategier för bladmögel i potatis.

Frågeställningar som arbetet kommer utgå från är:

- Vilken av de fyra bekämpningsstrategierna är effektivast mot *Phytophthora infestans*?
- Påverkas *P. infestans* populationsstruktur av kemisk bekämpning, tidpunkt och sort?



## 3 Litteraturgenomgång

### 3.1 *Phytophthora infestans*

Potatisbladmögel är en av de mest förödande växtsjukdomarna världen över och orsakas av oomyceten *P. infestans* som tillhör familjen Pythiaceae (Widmark, 2010). *Phytophthora infestans* värdväxter tillhör bland annat släktena Solanum och Lycopersicum och de två ekonomiskt viktigaste värdarna är potatis och tomat (Widmark, 2010). Grödans avkastningen kan kraftigt påverkas av patogenen och en oskyddad potatisodling kan fullständigt förstöras före knölbildning (Hannukkala *et al.*, 2007).

Under åren 1845–1846 orsakade *P. infestans* katastrofala följder, speciellt på Irland. Stora delar av potatisodlingen i landet förstördes, vilket bidrog till hungersnöd samt stora ekonomiska problem (Erwin & Ribeiro, 1996). *Phytophthora infestans* förmodas härstamma från det mexikanska höglandet (Andersson, 2007). Första rapporten om angrepp av potatisbladmögel i Europa kom från Belgien år 1845. Två möjliga teorier om hur migrationen av *P. infestans* till Europa ägde rum är att patogenen antingen migrerat in i Europa med knölar från Mexiko via USA eller alternativt förflyttats med knölar direkt från Mexiko till Europa (Dyer *et al.*, 1993).

När potatisbladmögel först kom till Europa var det inte klart vad som orsakade att potatisen ruttnade i fält och lager (Widmark, 2010). Första personen att bestämma att orsaken till problemen var en patogen var en belgisk forskare vid namn Marie-Anne Libert. Hon föreslog namnet *Botrytis infestans* till patogenen. Året därpå beskrev forskaren Jean Francis Camille Montagne svampen och gick med på att döpa svampen till *Botrytis infestans*. Diskussionen kring vad som orsakade sjukdomen fortsatte till år 1876, då en forskare vid namn Anton de Bary blev den första som beskrev patogenens livscykel. Han bytte även namn på patogenen till *Phytophthora infestans*, vilket kan översättas till "smittsam växtförstörare" (Widmark, 2010). *Phytophthora infestans* livscykel kan delas in i en asexuell samt en sexuell del. Den sexuella livscykeln sker endast om båda parningstyperna, kallade

A1 respektive A2, infekterar samma blad. Oomyceters livscykel är huvudsakligen diploid och deras cellväggar innehåller cellulosa till skillnad från de äkta svamparna som innehåller kitin (Andersson, 2007). Man antar att de första migrationerna av *P. infestans* till Europa bara bestod av A1. År 1980 observerades parningstyp A2 i Schweiz samt andra områden i Europa, Afrika och Asien (Drenth *et al.*, 1993). En förklaring till migrationen av parningstyp A2 var att det under mitten av 1970-talet importerades potatisknölar från Mexiko till Europa (Sjöholm, 2012). Introduktionen av parningstyp A2 bidrog till en större genetisk diversitet samt aggressivare genotyper (Dyer *et al.*, 1993) på grund av att sexuell reproduktion hos *P. infestans* blev möjlig vilket fick en inverkan på det epidemiologiska beteendet hos patogenen (Drenth *et al.*, 1993).

## 3.2 Populationsbiologi

Svampsjukdomar kan orsaka stora ekonomiska förluster i jordbruket (McDonald & McDermott, 1993). Patogener kan snabbt förändras och anpassas till nya miljöer, och kännedom om en patogens ekologi och ursprung kan bidra till nya strategier för hantering av sjukdomen i jordbruksekosystem (Goodwin, 1997; McDonald, 1997). Förhållandet mellan sexuell- och asexuell reproduktion påverkar hur snabbt patogenen kan utveckla till exempel nya virulensgener och fungicidresistens. Sexuell reproduktion bidrar till skapa nya genkombinationer, och asexuell reproduktion kan snabbt uppföröka gynnsamma kombinationer av gener (McDonald & McDermott, 1993). Att bestämma en populations genetiska struktur är ett logiskt första steg när svamppopulationer ska studeras, då den genetiska strukturen återspeglar evolutionär historia samt ger en bild av populationens potential att utvecklas (McDonald, 1997). Hur stor genetisk variation en population har kan ge en uppfattning om hur snabbt en patogen kan anpassa sig och följaktligen ge en uppfattning om hur lång tid olika bekämpningsåtgärder kan vara effektiva (McDonald & McDermott, 1993).

### 3.2.1 *Phytophthora infestans* populationsstruktur i Norden

Samexistensen av *P. infestans* båda parningstyper gör att patogenen kan reproducera sig sexuellt, vilket leder till en större genotypisk diversitet. Populationsstrukturen hos *P. infestans* i Norden skiljer sig från andra delar av världen (Sjöholm, 2012). Flera studier tyder på att sexuell reproduktion av *P. infestans* är vanlig i Sverige (Andersson, 2007; Widmark, 2010; Sjöholm, 2012). Den sexuella reproduktionen påverkar patogenens populationsbiologi vilket kan resultera i en förbättrad förmåga i att anpassa sig till nya förhållanden såsom väder, kemisk bekämpning och andra odlingsåtgärder. En anledning till varför de nordiska länderna skiljer sig från övriga

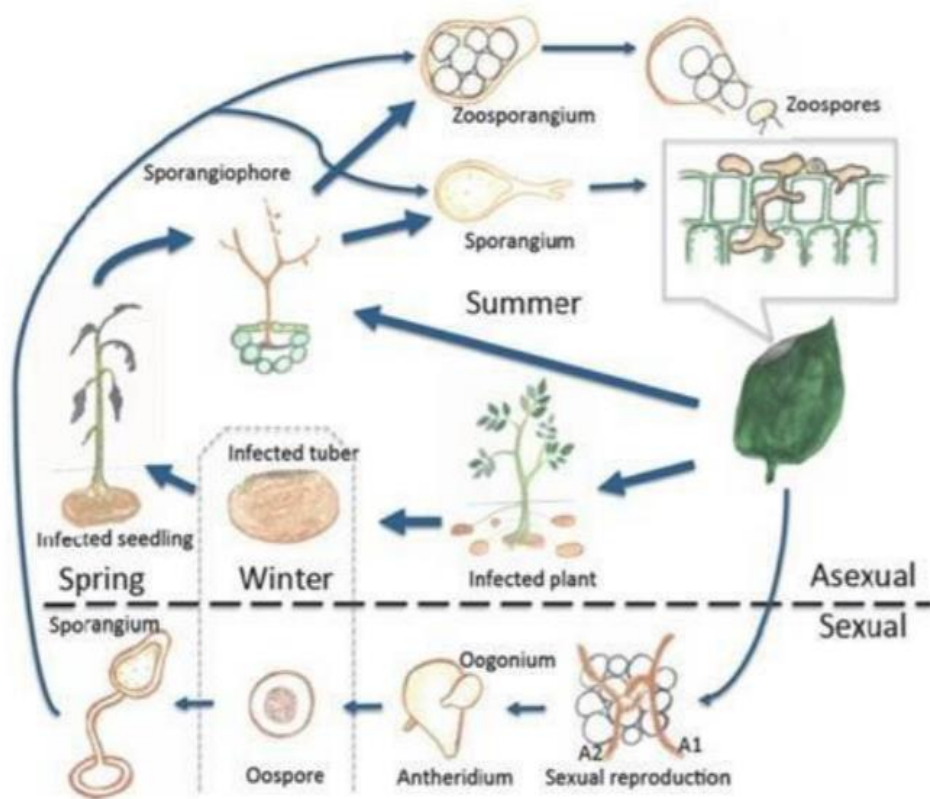
världen kan vara att *P. infestans* har en annan överlevnadsstrategi i ett klimat med kalla vintrar. Distinkt växande årstider gynnar övervintring som oosporer istället för klonal överlevnad i potatisknölar (Sjöholm, 2012).

*Phytophthora infestans*-populationerna i Europa ser olika ut och förändras vilket betonar behovet av kontinuerlig bevakning. Detta sker i nätverket EuroBlight där forskare och andra specialister samordnar arbetet med potatisbladmögel. Denna samarbetsplattform bidrar till en bättre förståelse av populationsstrukturer hos *P. infestans* samt medverkar till förbättrade IPM-baserade bekämpningsstrategier ([www.euroblight.net](http://www.euroblight.net)).

### 3.2.1 Simple sequence repeat (SSRs)

Simple sequence repeat markers (SSRs) även kallat mikrosatelliter, är korta fragment av DNA (Cooke & Lees, 2004). En stor del av eukaryoternas genom består av repetitivt DNA-kod som är en till fem baspar lång (Lagercrantz *et al.*, 1993). Mikrosatellittekniken är en snabb och exakt metod för att studera genetisk populationsstruktur och har underlättat arbetet med att upptäcka den genetiska strukturen samt den reproduktiva biologin hos många växtpatogener (Li *et al.*, 2013).

### 3.3 Livscykel



Figur 1. *Phytophthora infestans* livscykel. (Illustration av Alvar Grönberg 2012)

#### 3.3.1 Asexuell livscykel

De asexuella sporerne kan överleva från säsong till säsong som mycel i infekterade potatisknölar. Infekterade knölar är en viktig källa för inokulum och fungerar som primärinokulum för en epidemisk utveckling nästkommande år (Li, 2012). Från de smittade knölarerna kan infekterade plantor utvecklas där sporangier bildas på sporangioforer på den infekterade vävnaden (figur 1) (Fry, 2008). Sporangierna frigörs och sprids oftast under morgonen då temperaturen stiger och fuktigheten i luften minskar (Drenth *et al.*, 1993; Sjöholm, 2012). Väderförhållanden och omgivningstemperaturen har stor betydelse för hur och när sporangier sprids (Li, 2012). Om sporangier har tillgång till fritt vatten gror de direkt om temperaturen ligger mellan 20-25°C. Vid lägre temperatur, 10-15°C, frigör istället sporangier cellväggslösa zoosporer som kan simma i fritt vatten och leta upp lämpliga ställen på bladet att infektera på (figur 1) (Fry, 2008). Vid regn och bevattning kan

sporangierna spridas ner i marken och infektera potatisens knölar via skador eller lenticeller. Dessa infekterade knölar kan starta bladmögelepidemin nästkommande år (Drenth *et al.*, 1993; Widmark, 2010). Den asexuella livscykeln tillåter en snabb uppförökning och spridning av sporangier. Med en latensperiod hos patogenen på endast till två-tre dagar riskerar potatisplantan få kraftiga angrepp och förstöras inom omloppet av en vecka (Sjöholm, 2012).

Symtom av *P. infestans* uppkommer först som cirkulära eller oregelbundna vatt-niga fläckar på bladen samt även på stjälken (figur 2) (Agrios, 1988).

### 3.3.2 Sexuell livscykel

Den sexuella cykeln sker endast en gång per växtsäsong (Li, 2012). När potatisplan-tan infekteras med isolat från båda parningstyperna kan sexuell reproduktion ske och oosporer bildas (Widmark, 2010). Oosporerna har två huvudsakliga funktioner i livscykel hos *P. infestans*. Dels är oosporerna en produkt av sexuell reproduktion, dels kan de överleva i jorden och fungera som primär inokulum (Grünwald & Flier, 2005). Antheridier och oogonia formas när hyfer av motsatt parningstyp träffas. Oogonium växer in i antheridium som omsluter och medför att oogonium börjar expandera (figur 1). Kärnorna i oogonium genomgår meios och från antheridierna växer ett befruktningsrör genom oogonium vilket resulterar i bildning av oosporer. Oosporerna kan gro och infektera potatisens knölar samt dess blad och stjälk (Drenth *et al.*, 1993).

Genom att nyttja både asexuella och sexuella sporer medför det att *P. infestans* är en anpassningsbar patogen som kan överleva både med och utan värdväxt (Goodwin, 1997).



Figur 2. Symtom på blad respektive stjälk av *Phytophthora infestans* (foto Lovisa Bergkvist)

## 3.4 Fungicider

I över tvåhundra år har odlare använt fungicider för att förhindra skador av svampar på sina grödor. Bekämpning av sjukdomar som orsakas av oomyceter har varit ett viktigt mål sedan starten av det kemiska växtskyddet. Preparat som baserats på sva-vel tillämpades under 1800-talet och på 1880-talet upptäcktes den så kallade Bordeaux-vätskan, vilket var en blandning av kopparsulfat och släckt kalk och hade god effekt mot växtsjukdomar (Edin, 2011; Thind, 2012). Denna vätska användes till att bekämpa svampsjukdomar på vinplantor och senare för bekämpning av bladmögel i potatis. I mitten av 1900-talet introducerades bisditiokarbamaterna som bekämpning mot bladmögel i potatis. Fungicider har under åren erhållit hårdare restriktioner i svenskt jordbruk, på grund av negativa miljöeffekter. Avgifter på bekämpningsmedel infördes av miljöskäl av riksdagen 1986, och det sattes även upp halveringsprogram för att minska användningen (Edin, 2011).

Fungicider kan delas in i kontaktverkande, systemiska och translaminära beroende på hur de beter sig i plantan. Kontaktverkande preparat har en förebyggande effekt mot svampsporer innan de hunnit gro eller trängt in i växten. Preparaten är känsliga mot regn då plantan måste vara täckt med fungiciden för att kunna skydda sig mot svampangreppen. Vanligtvis används denna typ av preparat vid bekämpning av potatisbladmögel. Preparat som verkar systemiskt har till uppgift att tränga in i växten och på så sätt stoppa angreppet. Kärllsträngarna i växten transporterar preparatet i växten som ger skydd mot angrepp. Fungicider som tillhör de translaminära preparaten tränger igenom bladvävnaden och sprids genom bladet.

Beroende på hur svamppatogenens funktioner påverkas av den aktiva substansen kan fungiciderna även delas in i multi-site och single-site. Multi-site preparaten verkar på flera olika sätt genom att till exempel, förstöra enzymer och proteiner vilket stör cellfunktionen hos svampen. Single-site preparat har en mer specifik effekt på biokemiska processer i växtpatogener (Edin, 2011).

### 3.4.1 Revus

Revus är fungicid som används vid bekämpning av potatisbladmögel och innehåller den aktiva substansen 250g/l mandiopropamid. Mandiopropamiden absorberas snabbt i växternas vaxlager i bladen vilket resulterar i en utmärkt regnfasthet. Preparatet har ett translaminärt verknings sätt och verkar framförallt mot oomyceter (Skelsey *et al.*, 2007).

### 3.4.2 Fosfit

Fosfit även kallat fosfonater är ett preparat som visat sig vara effektiv mot växtpatogener som phytophthora genom att stimulera växternas försvar samt ha en direkt effekt mot oomyceter. Fosfiter är en alkalimertsalt som kommer från fosforsyra och används i form av kaliumfosfit (Liljeroth *et al.*, 2016).

## 4 Material och Metod

### 4.1 Försöksdesign

Fältförsöket (55°58'08.3"N 14°06'18.0"E) var beläget på Mosslunda gård i Kristianstad. I försöket ingick två sorter, King Edward och Melody. Försöket sattes den 22 maj med 75cm radavstånd och 25 cm sätstavstånd. Försöket var upplagt som ett randomiserat blockförsök med fyra upprepningar. De behandlingar som ingick var obehandlat,  $\frac{1}{4}$  rekommenderad dos Revus,  $\frac{1}{2}$  dos Revus samt fosfit i dosen 5 l/ha. Första sprutning genomföres den 22 juni, och behandlingarna upprepades sedan var sjunde dag fram till den 10 augusti, totalt åtta bekämpningar.

### 4.2 Insamling av prover

Insamlingen av prover från fältförsöket på Mosslunda gård i Kristianstad gjordes vid tre tillfällen under säsongen, 1 augusti, 14 augusti samt 24 augusti. Vid varje provtagningsstillfälle samlades slumpvis 50 småblad in per behandling och sort. Varje enskilt småblad hade bara en lesion av *P. infestans*. Bladen placerades i kuvert och fick därefter torka i rumstemperatur tills DNA-extraktionen påbörjades. Vid tredje insamlingstillfället var försöket kraftigt angripet av *P. infestans* (figur 3). Detta medförde att antalet insamlade isolat blev färre än 50 stycken.





Figur 3. Jämförelse mellan första och tredje provtagningstillfället på Mosslanda gård. Kraftigt angrepp av *P. infestans* vid tredje provtagningstillfället vilket bidrog till färre antal insamlade isolat (foto Lovisa Bergkvist)

### 4.3 Gradering

Graderingen av fältföröket gjordes vid nio tillfällen under säsongen av Lars Wiik på Hushållningssällskapet i Skåne. Första graderingen gjordes 4:e juli och tiden mellan varje gradering var cirka en vecka. Metodiken följdes enligt en graderingsskala (% angripen yta). Mängden angrepp bestämdes med hjälp av ”Area under disease progress curve” (AUDPC).

### 4.4 Genotypning med mikrosatelliter

#### 4.4.1 DNA-extraktion

I slutet av augusti påbörjades laborationsarbetet i Uppsala. Första steget var att skära ut en angripen yta (lesion) av *P. infestans* för varje enskilt prov (figur 4). Den utskurna lesionen placerades i ett 2,0 ml plaströr tillsammans med fyra stycken 2 mm glaskulor, vilka tillsattes för att homogenisera det utskurna provet.



*Figur 4.* Ett av de insamlade proverna där en lesion skars ut och placerades i 2ml plaströr tillsammans med 2mm glaskulor. (foto Lovisa Bergkvist)

Proverna placerades i en homogenisator (Precellys®24) och kördes i 2 x 30 sekunder på 5200 rpm. DNA-extraktion genomfördes enligt ett CTAB protokoll. CTAB (3%) är en extraktionsbuffert och tillreddes enligt recept. 1000µl CTAB tillsattes proverna, som därefter inkuberades i 30 minuter vid 65°C (Techne Dri-block). Proverna skakades för hand var 10:e minut. Sedan placerades proverna i en centrifug (Biofuge), och kördes 10 000 rpm i 5 minuter. Den övre, klara, vätskan från proverna fördes över till Eppendorf-rör. 500µl kloroform tillsattes och provrören skakades i en Vortex-2 Gene för att vätskan skulle homogeniseras. Proverna centrifugerades igen vid 10 000 rpm i 5 minuter. 400 µl av den övre vätskan (supernatanten) överfördes till en ny 1,5 ml Eppendorf-rör. Supernatanten blandades med 600µl isopropanol och placerades på is i 20 minuter. Proverna centrifugerades därefter i 13 000 rpm under 10 minuter. Efter centrifugeringen tömdes vätskan bort och pelleten tvättades med 500 µl 70% etanol. Proverna centrifugerades 10 000 rpm i 2 minuter. Etanolen tömdes ut och rören placerades på papper för att torka i 5-30 min. När proverna torkat tillsattes 50 µl destillerat vatten. DNA-koncentrationen mättes med hjälp av med en spektrofotometer (NanoDrop 3300). Utifrån resultatet tillsattes destillerat vatten för att späda proverna till en koncentration på 20 ng/µl.

#### 4.4.1 PCR (Polymerase chain reaction)

Tolv mikrosatellitmarkörer användes för att bestämma genotyperna. Mikrosatelliterna var märkte med olika flouescens (tabell 1) för att kunna skilja dem åt vid senare analys.

Tabell 1. De tolv mikrosatellitmarkörer samt dess fluorescens som användes i PCR-reaktionen

Primer	Fluorescens
PiG11	NED
Pi02/PinfSSR3	NED
PinfSSR11	NED
PinfSSR8	FAM
PinfSSR4	FAM
Pi04	VIC
Pi70	VIC
PinfSSR6	VIC
Pi63	VIC
PinfSSR2	PET
Pi4B	PET
D13	FAM

Elva mikrosatellitmarkörer blandades till en Multiplex-Mix enligt QIAGEN Type-it® mikrosatellit PCR kit. Multiplex-mixen tillreddes med komponenter enligt tabell 2 till olika koncentration och volym. Till PCR reaktionen tillsattes 23µl Multiplex-mix samt 2µl DNA vilket gav en totalvolym på 25µl.

Tabell 2. Multiplex-mix innehåll

Komponent	Volym
MM	12,5 µl
Q-Solution	5 µl
H <sub>2</sub> O	0,5 µl
Primer-Mix	5 µl
DNA	2 µl

Primer D13 kördes separat då den inte kunde köras tillsammans med Multiplex-mixen. En mix med D13 tillreddes enligt tabell 3. Till PCR reaktionen tillsattes 13µl Multiplex-mix och 2µl DNA, vilket gav en totalvolym på 15µl.

Tabell 3. D13 mix innehåll

Komponent	Volym
Buffer	1,5 µl
dNP	1,5 µl
Taq	0,12 µl

Komponent	Volym
Primer D13F	0,45 $\mu$ l
Primer D13R	0,45 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	8,98 $\mu$ l

Första steget i PCR-reaktionen var denaturering av proverna. Denatureringen innefattade 5 minuter vid 95 °C, 30 cykler vid 95 °C i 30 sekunder, 58 °C i 90 sekunder, 72 °C i 30 sekunder och därefter avslutades programmet med 60°C i 30 min. För primer D13 genomfördes PCR reaktionen i ett separat PCR program där denatureringen innefattade 95°C i 5min , 33 cykler med 95°C i 30 sekunder, 50°C i 90 sekunder, 72°C i 30 sekunder och sedan avslutades programmet med 60° i 30 min.

Efter utförd PCR reaktion för samtliga prover och mikrosatelliter gjordes elektrofores på 1,5% agarosgel för att verifiera att PCR reaktionen fungerat. Till agarosgelen tillsattes 1 $\mu$ l Nancy för varje 50 ml gel. Gelen placerades i en behållare och kördes i ett program med 250 volt under 22 minuter. Därefter studerades gelerna under UV-ljus. Proverna späddes och lämnades in för fragmentanalys på SciLifeLab i Uppsala i en ABI3730XL DNA Analyser (Applied Biosystem).

Resultatet tolkades med hjälp av programmet GeneMarker v.2.6.4. (Soft Genetics). Längden på allel-fragmenten och om prover kom från en homozygot eller heterozygot individ bestämdes genom manuell avläsning för varje loci.

## 4.5 Statistik

JMP Pro version 13.0.0 användes för att analysera fältgraderingar för bladmögel förekomst. Area Under Disease Progress Curve (AUDPC) beräknades rutvis och analyserades med ANOVA. Student t-test användes för jämföra medelvärden.

Första steget i den genetiska analysen var att beräkna den genetiska diversiteten i populationen. Detta gjordes genom att dividera antalet unika multilocus genotyper (G) med totalt antal prov (N). Stor diversitet har ett värde nära ett medan en liten diversitet har ett värde nära noll.

Andra steget var att studera hur populationerna parvis skiljde sig åt. Detta genom att beräkna  $F_{ST}$  koefficienten. Dessutom analyserades skillnaden inom populationen genom att beräkna ett  $F_{IS}$  värde vilket är en inavelskoefficient. Inavelskoefficienten beräknades för att se om det skett en klonal förökning samt någon minskning av heterozygoter. I ekvationen var  $H_T$  den förväntade heterozygositeten i den totala populationen medans  $H_e$  den förväntade heterozygositeten och i underpopulationen.  $H_O$  är den observerade heterozygositeten och  $H_e$  är den förväntade heterozygositeten.

Formlerna som användes för detta var:

$$F_{IS} = (H_e - H_o)/(H_e) \quad F_{ST} = (H_T - H_e)/H_T$$

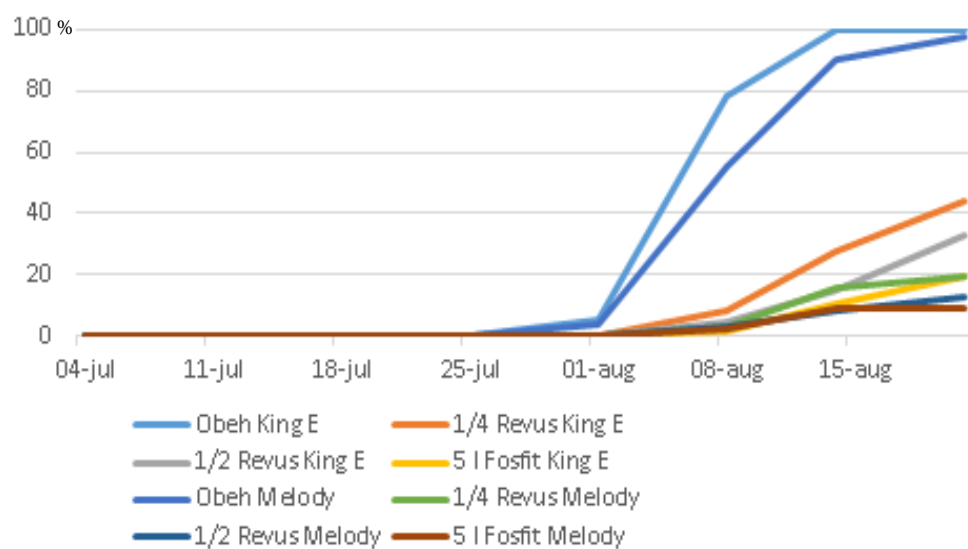
Det genetiska avståndet samt den genetiska variationen mellan populationen beräknades och visualisera med hjälp av PCoA (Principal Coordinate Analysis). För att beräkna skillnaderna inom populationen gjordes även ett AMOVA (Analysis of molecular variance) vilket är en metod för att bestämma hur den molekylära variationen fördelas inom respektive mellan populationerna. GenAlEx 6.502, ett add-in i Excel (Peakall & Smouse, 2012), användes för dessa analyser. Datasetet klonkorrigerades innan analys. En klon ansågs vara en genotyp med samma allelstorlek för samtliga loci som en annan genotyp.

R (version 3.4.1) och R studio (version 1.1.38) användes tillsammans med *poppr* (version 2.5.0) (Kamvar *et al.*, 2014) för att ta fram en mättnadskurva som visar hur väl markörsystemet beskriver variationen i datasetet. Minimum spanning network analys gjordes för att analysera eventuell populationsdifferentiering. För samtliga analyser i R skapades en fil där mer än 45 procent missing-värden togs bort.

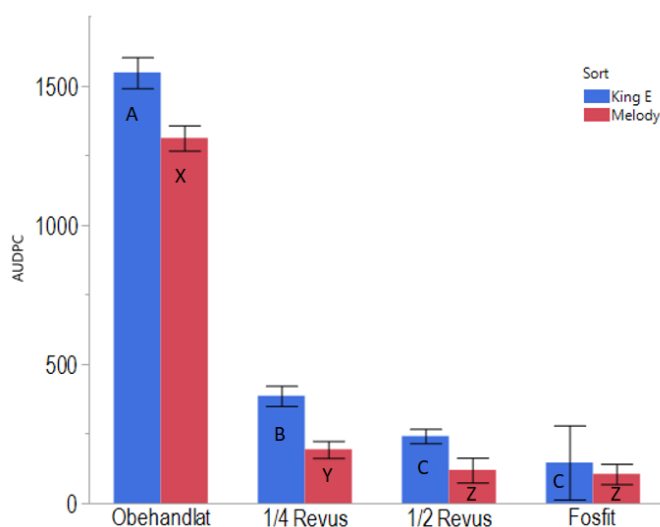
## 5 Resultat

### 5.1 Fältgradering

Första angreppen av *P. infestans* observerades den 25 juli. Angreppen följdes genom veckovisa graderingar, se figur 5 och 6. Första bekämpningen gjordes den 22 juni och upprepades sedan vart 7:e dag.



Figur 5. (%) Angrepp av *Phytophthora infestans* under odlingssäsongen på Mosslunda gård



Figur 6. AUDPC för bladmögelförekomst, medelvärden av 8 graderingar i de olika behandlingarna och de två sorterna. Staplar betecknade med samma bokstav är inte signifikant skilda ( $p < 0,0001$ , Student t-test).

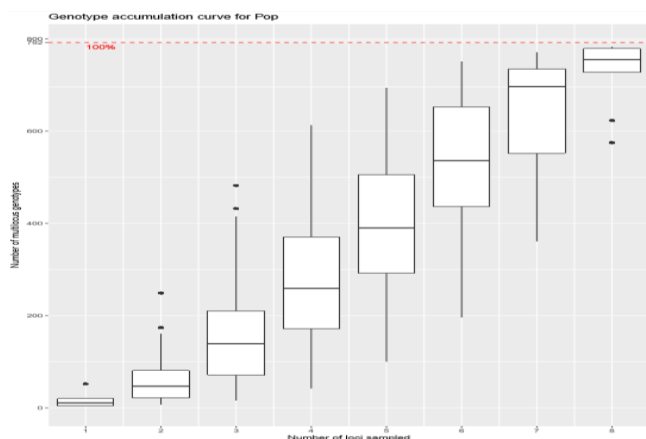
## 5.2 Resultat genotypning

Totalt ingick 938 prover i analysen och antalet unika multilocus genotyper var 792. Av de tolv ursprungliga markörerna gav inte Pi63, Pi04 samt SSR4 någon produkt och togs därför bort från analysen.

Tabell 4. Andel missing-värde för samtliga markörer uppdelat på sort, provtagningstidpunkt och behandling

Pop	G11	Pi4B	Pi70	D13	SSR2	SSR3	SSR6	SSR8	SSR11
King Edward	0,91	0,52	0,63	0,15	0,33	0,30	0,41	0,10	0,59
Melody	0,38	0,37	0,29	0,28	0,31	0,24	0,28	0,15	0,32
<b>Totalt</b>	<b>0,83</b>	<b>0,44</b>	<b>0,46</b>	<b>0,21</b>	<b>0,32</b>	<b>0,27</b>	<b>0,34</b>	<b>0,13</b>	<b>0,45</b>
Provtagning 1	0,83	0,58	0,65	0,26	0,42	0,36	0,49	0,12	0,59
Provtagning 2	0,83	0,38	0,37	0,21	0,33	0,18	0,25	0,15	0,39
Provtagning 3	0,83	0,39	0,39	0,18	0,22	0,28	0,32	0,10	0,40
<b>Totalt</b>	<b>0,83</b>	<b>0,44</b>	<b>0,46</b>	<b>0,21</b>	<b>0,32</b>	<b>0,27</b>	<b>0,34</b>	<b>0,13</b>	<b>0,45</b>
Behandling A	0,36	0,34	0,38	0,37	0,33	0,19	0,25	0,14	0,36
Behandling B	0,29	0,35	0,42	0,12	0,31	0,22	0,27	0,15	0,39
Behandling C	0,14	0,43	0,41	0,21	0,36	0,17	0,27	0,12	0,39
Behandling D	0,18	0,66	0,62	0,15	0,29	0,49	0,59	0,09	0,67
<b>Totalt</b>	<b>0,24</b>	<b>0,44</b>	<b>0,46</b>	<b>0,20</b>	<b>0,32</b>	<b>0,27</b>	<b>0,34</b>	<b>0,13</b>	<b>0,45</b>

Även de övriga nio markörerna uppvisade många missing-värden (tabell 4).



Figur 7. Mättnadskurva för nio mikrosatellitmarkörer och det totala antalet multilocus genotyper av *P. infestans*

Mättnadskurvan visar att resultaten inte beskriver variationen i populationen på ett tillfredsställande sätt (figur 7).

Tabell 5. Genotypisk data för *P. infestans*

Pop	G/N	H <sub>o</sub>	S.E.	H <sub>e</sub>	S.E.
King Edward	0,80	0,193	0,068	0,359	0,110
Melody	0,86	0,168	0,056	0,345	0,106
<b>Totalt</b>	<b>0,82</b>	<b>0,180</b>	<b>0,043</b>	<b>0,352</b>	<b>0,074</b>
Provtagning 1	0,95	0,196	0,073	0,375	0,112
Provtagning 2	0,97	0,176	0,058	0,364	0,107
Provtagning 3	0,92	0,170	0,058	0,338	0,100
<b>Totalt</b>	<b>0,82</b>	<b>0,181</b>	<b>0,035</b>	<b>0,359</b>	<b>0,059</b>
Behandling A	0,99	0,174	0,058	0,358	0,108
Behandling B	0,93	0,184	0,062	0,345	0,107
Behandling C	0,94	0,191	0,065	0,359	0,107
Behandling D	0,83	0,171	0,062	0,338	0,106
<b>Totalt</b>	<b>0,82</b>	<b>0,180</b>	<b>0,030</b>	<b>0,350</b>	<b>0,051</b>

G/N= antal genotyper dividerat med antalet prover; H<sub>o</sub>= observerad heterozygositet; S.E.= standardavvikelse; H<sub>e</sub>= förväntad heterozygositet

G/N värdet för proverna var högt och varierade mellan 0,80 och 0,99 (tabell 5). Den observerade heterozygositeten (H<sub>o</sub>) var lägre i jämförelse med den förväntade heterozygositeten (H<sub>e</sub>) (tabell 5), vilket indikerar på en asexuell population.

För både sort, provtagningstidpunkt och behandling var de flesta F<sub>IS</sub> värdena positiva, vilket indikerar en klonal population (tabell 6).



Tabell 6.  $F_{IS}$  värden för de olika jämförelserna: sort, provtagningstidpunkt och behandling

Primer	$F_{IS}$ Sort	$F_{IS}$ Provtagnings- tidpunkt	$F_{IS}$ Behandling
G11	0,997	0,979	0,165
Pi4B	0,164	0,155	0,884
Pi70	0,539	0,608	0,472
D13	0,319	0,427	0,001
SSR2	-0,002	0,295	0,587
SSR3	0,015	-0,003	0,610
SSR6	0,443	0,032	1,000
SSR8	0,497	0,443	0,868
SSR11	0,441	0,569	0,089

$F_{ST}$  värdena varierade och kan utläsas från tabell 7, 8 och 9. Värden mellan 0–0,05 indikerar på låg genetisk populationsdifferentiering och  $F_{ST}$ -värden mellan 0,05–0,25 ger en hög genetisk populationsdifferentiering (Freeland et al., 2011b).

Tabell 7. Parvisa jämförelser av de fyra behandlingarna. Värden under diagonalen anger  $F_{ST}$  värdet och värden över diagonalen p-värden.

	A	B	C	D
A		0,002	0,001	0,017
B	0,007		0,047	0,001
C	0,011	0,004		0,001
D	0,007	0,009	0,010	

A; Obehandlat, B; 1/4 dos Revus, C; 1/2 dos Revus och D; Fosfit 5 l/ha

Tabell 8. Parvisa jämförelser av de två olika sorterna. Värden under diagonalen anger  $F_{ST}$  värdet och värden över diagonalen p-värden.

	King Edward	Melody
King Edward		0,001
Melody	0,010	

Tabell 9. Parvisa jämförelser av de tre olika provtagningstidpunkterna. Värden under diagonalen anger  $F_{ST}$  värdet och värden över diagonalen p-värden.

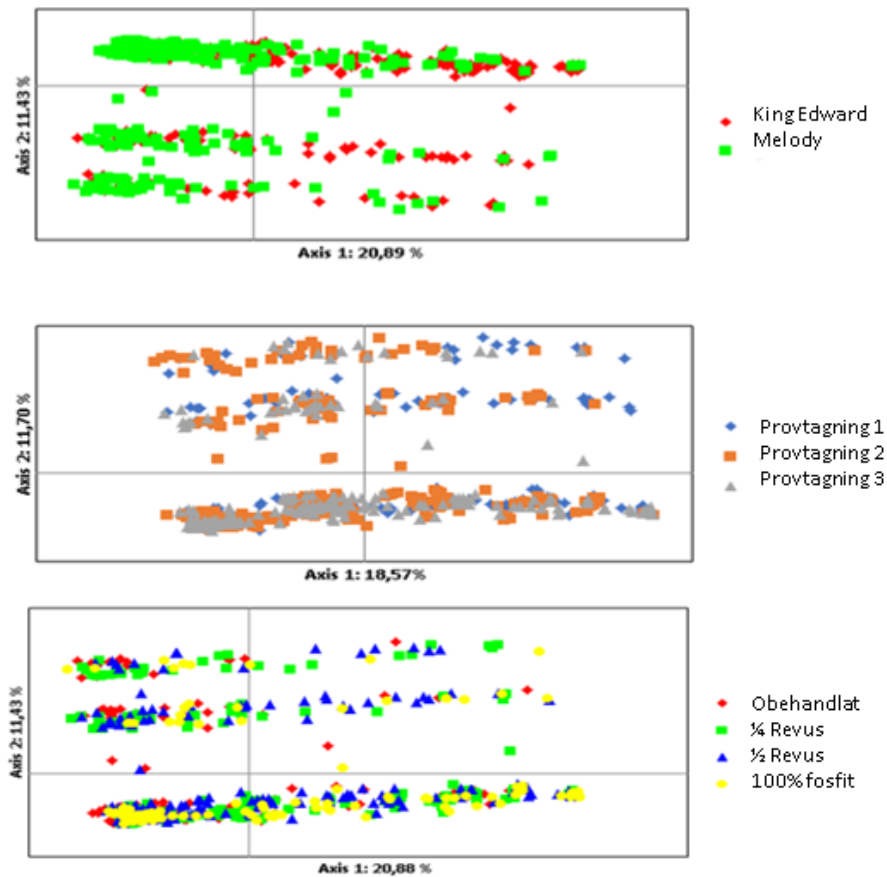
	Provtagning 1	Provtagning 2	Provtagning 3
Provtagning 1		0,001	0,001
Provtagning 2	0,007		0,001
Provtagning 3	0,015	0,008	

AMOVA-analysen visar för sort, provtagningstidpunkt och behandling att den största variationen finns inom populationen (tabell 10).

Tabell 10. AMOVA för de insamlade proverna av *P. infestans* för sort, provtagningstidpunkt och behandling

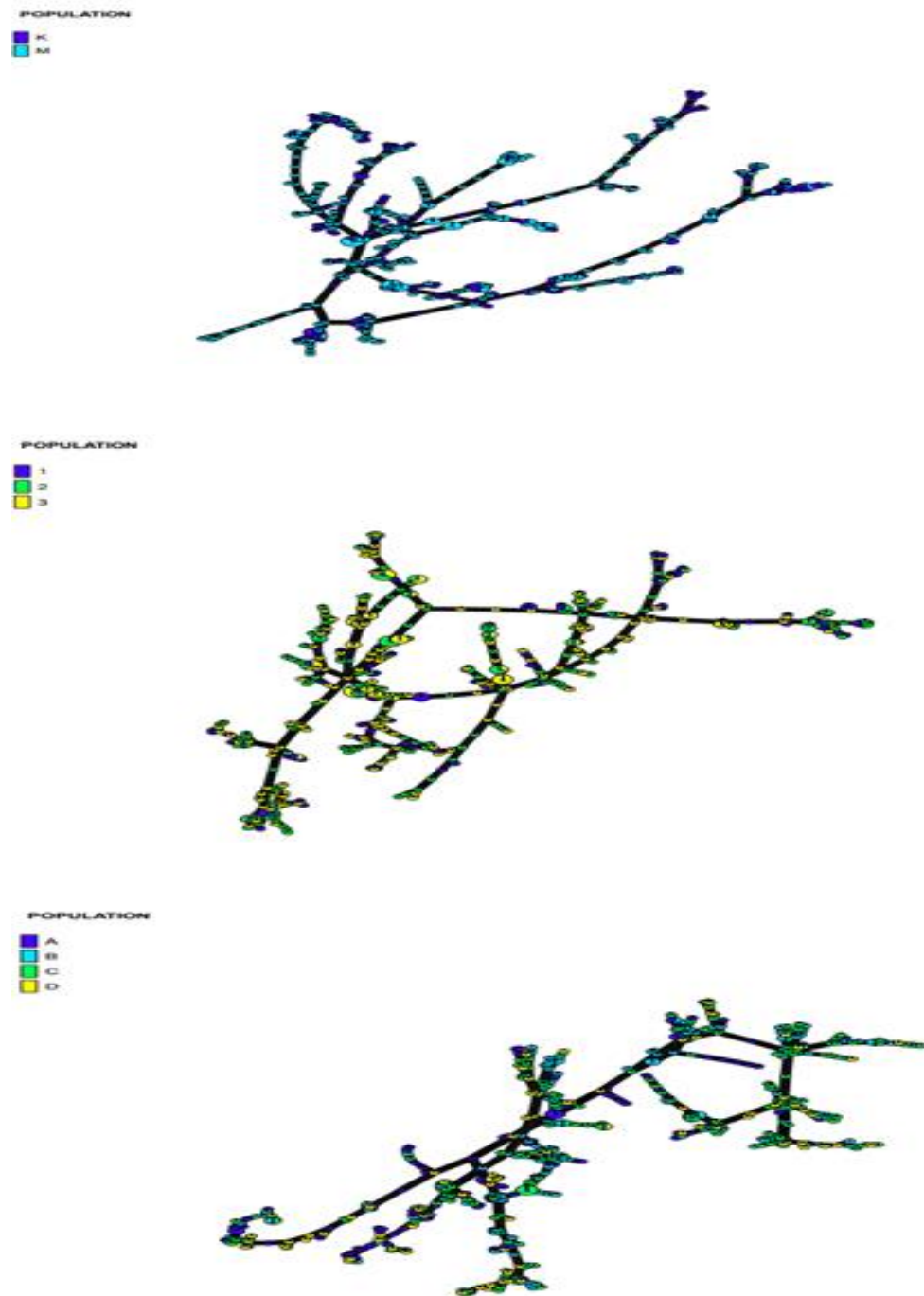
Källa	Inom pop. (%)	Mellan pop. (%)	P-värde
Sort	94	6	>0,001
Provtagningstidpunkt	97	3	>0,001
Behandling	98	2	>0,001

PCoA för sort, provtagningstidpunkt och behandling visar en gruppering i tre kluster, figur 8.



Figur 8. Principal Coordinates (PcoA) för insamlade prover av *P. infestans* för sort, provtagningstidpunkt och behandling

Minimum spanning network-analysen visar ingen populationsdifferentiering samt att de flesta prover har unika multilocus genotyper, figur 9.



Figur 9. Minimum spanning network för de insamlade proverna av *P. infestans* för sort, provtagningstidpunkt och behandling

## 6 Diskussion

Resultatet från fältgraderingarna visar att de första angreppen av *P. infestans* uppträdde relativt sent på säsongen, detta på grund av en torr och kall vår samt att försöket sattes sent. Behandlingarna med låga doser av Revus visade god bekämpningseffekt. Angreppsnivån i de fosfitbehandlade leden var lägre än i de övriga behandlade leden. Efter den sena angreppsstarten var sjukdomsförloppet snabbt i de obehandlade leden. Signifikanta skillnader mellan behandlade och obehandlade led kunde konstateras. Trots att Melody anses vara mer resistent mot *P. infestans* jämfört med King Edward kunde endast små skillnader i angrepp observeras mellan sorterna.

Datasetet som användes för de genetiska studierna innehåller många missing-värden vilket kan ha påverkat analyserna. Metoden för Multiplex-analysen är utvecklad för användning av FTA-kort (Li *et al.*, 2013). En förklaring till många missing-värden kan vara användandet av torkade blad istället för FTA-kort. Missing-värdena kan även gjorts att man vid klonkorrigering överskattat antalet kloner.

Tidigare studier visar att *P. infestans* har en hög genetisk diversitet i Sverige (Widmark, 2010), vilket bekräftades i denna studie. G/N och Minimum spanning network visade ingen populationsdifferentiering. Den observerade heterozygositeten ( $H_o$ ) var enligt resultatet lägre i jämförelse till den förväntade heterozygositeten ( $H_e$ ), vilket tyder på motsatsen, det vill säga en klonal populationsstruktur. Detta stöds också av inavelskoefficienten  $F_{IS}$  som visade positiva värden. En förklaring till de positiva  $F_{IS}$  värdena kan vara att man vid klonkorrigering överskattat och tagit bort för många värden från datasetet. En annan förklaring kan vara att försöksfältet ligger i ett område med högt bladmögeltryck vilket bidrar till att det finns en stor risk för oosporer i marken. Då försöksrutorna låg intill varandra i försöket kan detta orsakat att det samlats in nära besläktade isolat vid de tre olika provtagningstidpunkterna. Vilket visas i de positiva  $F_{IS}$  värdena.

$F_{ST}$ -värdet för samtliga jämförelser indikerade på att den genetiska populationsdifferentieringen var relativt låg, med värden mellan 0–0,15. Detta stämde bra

överens med AMOVA-resultaten som visade på en större variation inom populationen än mellan dem. Resultaten tyder på att behandlingarna i fältförsöket inte orsakade någon populationsdifferentiering. PCoA indikerade på att det inte fanns någon differentiering mellan populationerna varken mellan sort, provtagningstidpunkt eller behandling. Resultatet visar en gruppering men kan inte kopplas till sort, provtagningstidpunkt eller behandling.

Studier av *P. infestans* populationer i Sverige baserade på SSRs visar på en hög variation och dynamik hos patogenen, medan i andra delar av världen domineras patogenens populationsstruktur av sexuell reproduktion. En förklaring till detta kan vara att oosporer har en större betydelse som primärinokulum på grund av kalla vintrar med tjäle som förhindrar biologisk nedbrytning av oosporer (Widmark *et al.*, 2007). Detta i sin tur kan ha gynnat individer med förmåga att producera vitala oosporer, och härigenom fått populationen att skifta överlevnadsstrategi från överlevnad i knölar mot att överleva som oosporer i jorden (Sjöholm, 2012). Åtgärder som kan vidtas för att minska risken för oosporer samt hålla marksmitta borta från fältet är att ha en bra växtföljd, gärna 3-4 år (Andersson, 2007).

Användningen av mikrosatelliter bidrar till en bättre förståelse av *P. infestans* populationsdynamik och kommer även bidra till utveckling kring fler hållbara strategier för exempelvis sjukdomshantering (Li, 2012).

## 7 Slutsats

Arbetet utgick från ett antal frågeställningar som skulle besvaras.

- Vilken av de fyra bekämpningsstrategierna är effektivast mot *Phytophthora infestans*?
  - De bekämpningsstrategier som enligt studien visat sig vara effektivast mot *P. infestans* var , ½ dos Revus samt full dos fosfit.
- Påverkas populationsstrukturen hos *P. infestans* av kemisk bekämpning, tidpunkt och sort?
  - Nej, populationsstrukturen hos *P. infestans* har inte påverkats av kemisk bekämpning, tidpunkt och sort.

Slutsatser som kan dras från denna studie är att behandlingarna med låga doser av Revus gav en bra bekämpningseffekt, resultaten visar även på en dos respons effekt. Fosfitbehandlingarna visade en jämförbar effekt med Revus. Genotypning med mikrosatelliter visade en stor genotypisk variation men ingen populationsdifferentiering av sort, behandling och provtagningstidpunkt.

För att få en bättre förståelse av den praktiska betydelsen av populationsstrukturen hos *P. infestans* krävs studier av kopplingen mellan genotypen och dess fenotypiska uttryck.

## 8 Referenslista

- Agrios, G. (1988). *Plant pathology*. third edition. ISBN 978-0-12-044563-9.
- Andersson, B. (2007). *Sexual reproduction in Phytophthora infestans: epidemiological consequences*. Diss. Uppsala: Dept. of Forest Mycology and Pathology, Swedish University of Agricultural Sciences.
- Brurberg, M. B., Elameen, A., Le, V. H., Nærstad, R., Hermansen, A., Lehtinen, A., Hannukkala, A., Nielsen, B., Hansen, J., Andersson, B. & Yuen, J. (2011). Genetic analysis of *Phytophthora infestans* populations in the Nordic European countries reveals high genetic variability. *Fungal Biology*, 115(4–5), pp 335–342.
- Cooke, D. E. L. & Lees, A. K. (2004). Markers, old and new, for examining *Phytophthora infestans* diversity. *Plant Pathology*, 53(6), pp 692–704.
- Cooke, D. E. L., Cano, L. M., Raffaele, S., Bain, R. A., Cooke, L. R., Etherington, G. J., Deahl, K. L., Farrer, R. A., Gilroy, E. M., Goss, E. M., Grünwald, N. J., Hein, I., MacLean, D., McNicol, J. W., Randall, E., Oliva, R. F., Pel, M. A., Shaw, D. S., Squires, J. N., Taylor, M. C., Vleeshouwers, V. G. A. A., Birch, P. R. J., Lees, A. K. & Kamoun, S. (2012). Genome Analyses of an Aggressive and Invasive Lineage of the Irish Potato Famine Pathogen. (Dodds, P. N., Ed) *PLoS Pathogens*, 8(10), p e1002940.
- Daniel Altman, R. & Carl W, B. *Fundamentals of plant pathology*. ISBN 978-0-7167-0822-3.
- Drenth, A., Turkensteen, L. J. & Govers, F. (1993). The occurrence of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* in the Netherlands; significance and consequences. *European Journal of Plant Pathology*, 99, pp 57–67.
- Dyer, A., Matusral, M., Drenth, A., Cohen, A. & Splelman, L. J. (1993). Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: chronology, pathways, and implications. *Plant disease*, 77, pp 653–661.
- Edin, E. (2011). Fungicider och fungicidresistens. [online],. Available from: [http://pub.epsilon.slu.se/8456/1/edin\\_e\\_111124.pdf](http://pub.epsilon.slu.se/8456/1/edin_e_111124.pdf).
- Erwin, D. C. & Ribeiro, O. K. (1996). *Phytophthora Diseases Worldwide*.
- Freeland, J. R., Petersen, S. D. & Kirk, H. (2011b). 4: Genetic Analysis of Multiple Populations. *Molecular Ecology*. 2nd Ed. Chichester, UK: WileyBlackwell.
- Fry, W. (2008). *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Molecular Plant Pathology*, 9(3), pp 385–402.
- Goodwin, S. B. (1997). The population genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology*, 87(4), pp 462–473.

- Grünwald, N. J. & Flier, W. G. (2005). The Biology of *Phytophthora infestans* at Its Center of Origin. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), pp 171–190.
- Hannukkala, A. O., Kaukoranta, T., Lehtinen, A. & Rahkonen, A. (2007). Late-blight epidemics on potato in Finland, 1933–2002; increased and earlier occurrence of epidemics associated with climate change and lack of rotation. *Plant Pathology*, 56(1), pp 167–176.
- Jönsson, M. & Olsson, G. (2016). *Reducerade fungiciddoser vid bekämpning av potatismögel-vilka blir följderna?*. Diss. Available from: <http://stud.epsilon.slu.se/8726/>. [Accessed 2017-09-28].
- Kamvar, Z. N., Tabima, J. F. & Grünwald, N. J. (2014). Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*, 2, p e281.
- Lagercrantz, U., Ellegren, H. & Andersson, L. (1993). The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Research*, 21(5), pp 1111–1115.
- Lees, A. K., Wattier, R., Shaw, D. S., Sullivan, L., Williams, N. A. & Cooke, D. E. L. (2006). Novel microsatellite markers for the analysis of *Phytophthora infestans* populations. *Plant Pathology*, 55(3), pp 311–319.
- Li, Y. (2012). *Multiplex SSR analysis of Phytophthora infestans in different countries and the importance for potato breeding*. ISBN 978-94-6173-279-8.
- Li, Y., Cooke, D. E. L., Jacobsen, E. & van der Lee, T. (2013). Efficient multiplex simple sequence repeat genotyping of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Journal of Microbiological Methods*, 92(3), pp 316–322.
- Liljeroth, E., Lankinen, A. A., Alexandersson, E. & Andreasson, E. (2016). Kan växtstärkaren kaliumfosfit bli en del av bekämpningsstrategierna mot bladmögel i potatis?
- McDonald, A. E., Grant, B. R. & Plaxton, W. C. (2001). Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. *Journal of plant nutrition*, 24(10), pp 1505–1519.
- McDonald, B. A. (1997). The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology*, 87(4), pp 448–453.
- McDonald, B. A. & McDermott, J. M. (1993). Population Genetics of Plant Pathogenic Fungi. *BioScience*, 43(5), pp 311–319.
- Peakall, R. & Smouse, P. E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28(19), pp 2537–2539.
- Potato blight tracking in Europe. [online]. Available from: <http://euroblight.net/currently/news/nyhed/artikel/potato-blight-tracking-in-europe/>. [Accessed 2017-12-06].
- Sjöholm, L. (2012). *How sexual reproduction affects the population biology of Phytophthora infestans*. Diss. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences.
- Sjöholm, L., Andersson, B., Högberg, N., Widmark, A.-K. & Yuen, J. (2013). Genotypic diversity and migration patterns of *Phytophthora infestans* in the Nordic countries. *Fungal Biology*, 117(10), pp 722–730.
- Skelsey, P., Van der Werf, W., Rossing, W. & Holtslag, B. (2007). *Simulation of potato late blight in the Netherlands: validation of the blightspace model reveals dichotomy in the epidemiological effects of resistance components*.



- Thind, T. S. (Ed) (2012). Fungicide resistance in crop protection: risk and management. Wallingford: CABI. ISBN 978-1-84593-905-2.
- Widmark, A.-K., Andersson, B., Cassel-Lundhagen, A., Sandström, M. & Yuen, J. E. (2007). *Phytophthora infestans* in a single field in southwest Sweden early in spring: symptoms, spatial distribution and genotypic variation. *Plant Pathology*, 56(4), pp 573–579.
- Widmark, A.-K. (2010). *The late blight pathogen, Phytophthora infestans: interaction with the potato plant and inoculum sources*. Diss. Uppsala: Department of Forest Mycology and Pathology, Swedish University of Agricultural Sciences.
- Widmark, A.-K., Andersson, B., Sandström, M. & Yuen, J. E. (2011). Tracking *Phytophthora infestans* with SSR markers within and between seasons – a field study in Sweden. *Plant Pathology*, 60(5), pp 938–945.
- Yuen, J. E. & Andersson, B. (2013). What is the evidence for sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in Europe? *Plant Pathology*, 62(3), pp 485–491.

## 9 Tackord

Stort tack till min handledare Lina Sjöholm på SLU som har bidragit med vägledning samt goda råd genom arbetets gång. Jag vill även tacka Björn Andersson och Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi på SLU för bra stöd och guidning.