



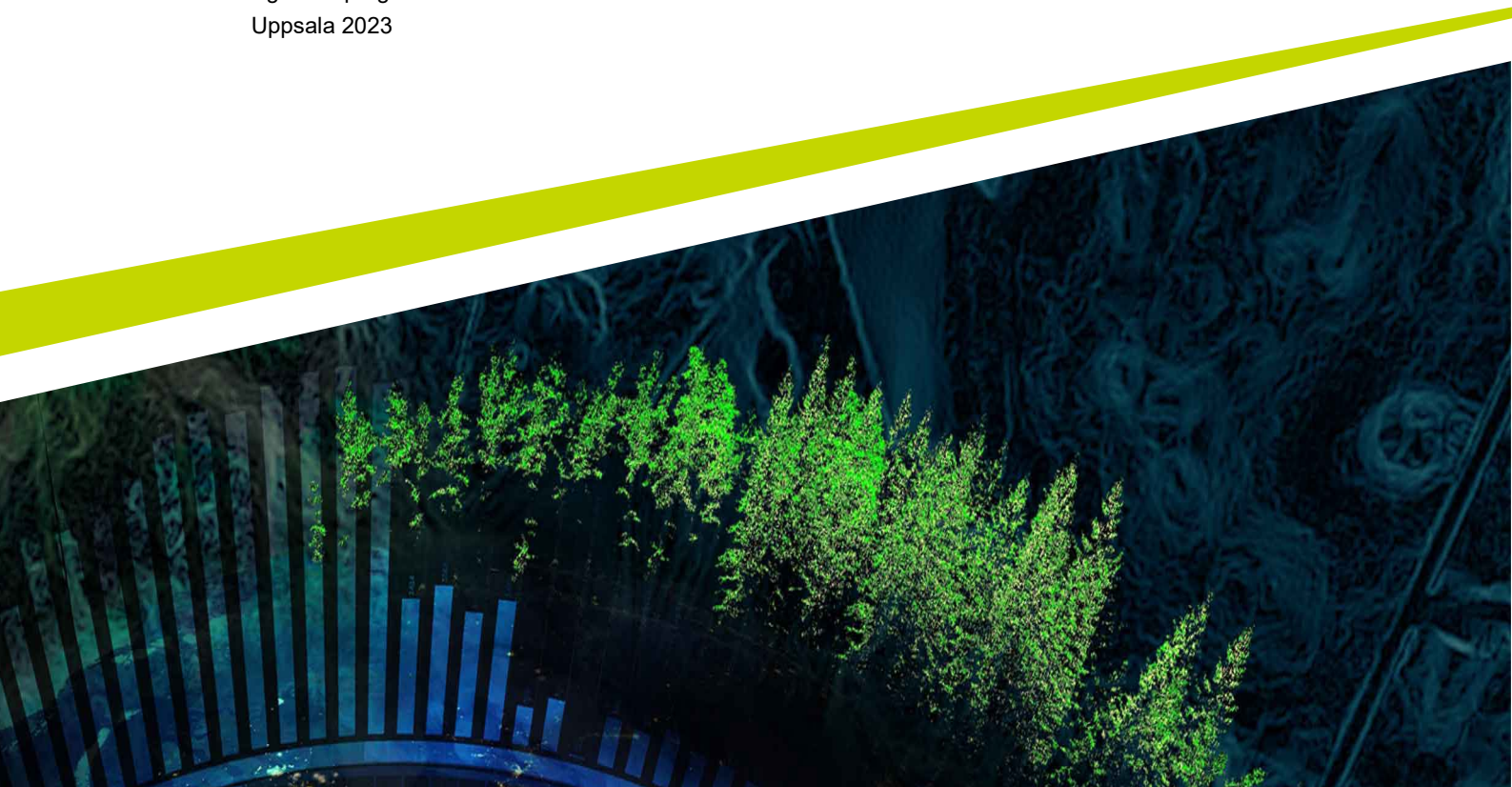
# ***Phoma* i skogsplanteskolor**

Fylogenetisk karakterisering av *Phoma herbarum*  
från svenska skogsplantor

---

Stina Åström

Examensarbete/Självständigt arbete • 15 hp  
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU  
Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi  
Agronomprogrammet mark/växt  
Uppsala 2023





# Phoma i skogsplantor. Fylogenetisk karakterisering av *Phoma herbarum* från svenska skogsplantor

Stina Åström

**Handledare:** Åke Olson, SLU, Skoglig mykologi och växtpatologi  
**Bitr. handledare:** Audrius Menkis, SLU, Skoglig mykologi och växtpatologi  
**Examinator:** Hanna Friberg, SLU, Skoglig mykologi och växtpatologi

**Omfattning:** 15 hp  
**Nivå och fördjupning:** Grundnivå, G2E  
**Kurstitel:** Självständigt arbete i biologi  
**Kurskod:** EX0894  
**Program/utbildning:** Agronom mark/växt  
**Kursansvarig inst.:** Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi  
**Utgivningsort:** Uppsala  
**Utgivningsår:** 2023

**Nyckelord:** Phoma, skogspatogen, multilokusfylogeni, molekylär fylogeni

**Sveriges lantbruksuniversitet**

Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi

## Sammanfattning

Svenska forskare har märkt av en ökning bland *Phoma* infekterade skogsplantor från plantskolor runt om i landet. Både skott och rötter från tidigare undersökning har detekterats infekterade med svampar från släktet *Phoma*. Denna studie undersöker isolat av svamp tagna från rötter och skott på gran och tall från 9 olika plantskolor. Isolaten är identifierade utifrån morfologi och molekylär fylogeni utifrån ITS-sekvensen och tillhör släktet *Phoma*. Studiens syfte var att genom multilokusfylogeni med sekvenserna ITS, aktin och translation elongation factor 1-alpha, utvärdera om svamparna som infekterar rot respektive skott på plantorna tillhör samma eller olika arter av *Phoma*. Resultatet som presenteras i tre fylogenetiska träd, stödjer inte att isolaten tillhör olika arter. Vidare kunde två isolat konstatera tillhöra annat släkte och indikera morfologisk identifiering som otillräcklig för att särskilja olika arter inom *Phoma*-släktet.

*Nyckelord:* *Phoma*, skogspatogen, multilokusfylogeni, molekylär fylogeni

## Abstract

An increase in infection rate by fungi of the genus *Phoma* amongst different forest nurseries in Sweden has been observed by Swedish researchers. This study includes isolates of the genus infecting both roots and shoots of both pine and spruce seedlings from nine different forest nurseries, identified by morphological and genetic features (sequencing of the ITS locus). The aim of the study was to determine if the fungi infecting roots and shoots belong to the same or different species, using multi locus phylogeny composed of the ITS, actin, and translation elongation factor 1-alpha sequences. The result, presented in three phylogenetic trees, does not support the isolates to belong to different species. Furthermore, according to the results of the study there were two isolates that did not belong to the genus *Phoma*, indicating morphological features to be incomplete when identifying species in the genus.

*Keywords:* *Phoma*, forest pathogen, multi locus phylogeny, molecular markers

# Innehållsförteckning

<b>1</b>	<b>Introduktion</b> .....	<b>7</b>
1.1	Bakgrund.....	7
1.1.1	Svampsläktet <i>Phoma</i> .....	8
1.1.2	Molekylär fylogeni .....	9
1.1.3	Multilokusfylogeni .....	10
1.1.4	Fylogenetiska träd .....	11
1.2	Syfte .....	12
<b>2</b>	<b>Material och metod</b> .....	<b>13</b>
2.1	Material .....	13
2.2	Förberedelse av prover inför sekvensering .....	14
2.2.1	DNA-extraktion .....	14
2.2.2	DNA-kvantifiering.....	15
2.2.3	PCR-amplifikation och elektrofores .....	15
2.2.4	Analys av PCR-sekvenser .....	15
2.2.5	Fylogenetisk analys .....	15
<b>3</b>	<b>Resultat</b> .....	<b>17</b>
3.1	Diskussion.....	22
3.2	Slutsatser .....	23
<b>4</b>	<b>Referenser</b> .....	<b>24</b>
<b>5</b>	<b>Tack</b> .....	<b>27</b>



# 1 Introduktion

## 1.1 Bakgrund

Skogsindustrin genomgår för närvarande två stora förändringar: skogsbruksintensifiering och tilltagande klimatvariationer, vilka medför en förändring för hela det skogliga ekosystemet och kan resultera i stora populationsökningar och spridning av olika skogsskadegörare (Witzell m. fl. 2017). Friska träd är en grundförutsättning för skogsbrukets ekonomi och med en intensifiering tillkommer utökade ekonomiska risker, samtidigt som skogen ur ett ekologiskt perspektiv bidrar till stor biologisk mångfald.

I Sverige produceras 422 miljoner skogsplantor per år, vanligen genom sådd av frö eller vegetativ reproduktion (Skogsstyrelsen 2022). Av dessa utgörs 93 % av gran (*Picea abies* L.) och tall (*Pinus sylvestris* L.). I Sverige används vanligen två odlingsstrategier: barrot och täckrot, där täckrot dominerar. Täckrotstrategin innebär att plantorna odlas i behållare med torv i 1–2 år och får med sig torven då plantan ska planteras ut i skog. Barrotsplantor växer ute på friland och planteras vanligen ut efter 3–4 år (Johansson 2010).

För att säkerställa en högre överlevnad planteras endast symtomfria, friska plantor ut i skog – allvarliga skador på exempelvis rötter eller toppskott innebär att plantan uteblir från försäljning och vidare plantering (Wennström m.fl. 2016). Sådana skador kan bero på biotiska och abiotiska faktorer så som torka eller näringsbrist. Bland de biotiska faktorerna står svampangreppen för många av dessa skador.

Skadesvampar är välkända och allvarliga skadegörare som kan angripa träden genom olika mekanismer. Infektionerna är vanliga i trädens alla tillväxtstadier så som ungplantor i plantskolor eller fullvuxna träd ute i skog och kan angripa olika delar, så som rötter, stam, skott och barr. I svenska skogsplantskolor dominerar gråmögel (*Botrytis cinerea*) som den vanligaste sjukdomen. Svampen kan angripa olika trädarter samt olika växtdelar, under hela tillväxtsäsongen (Stenström 2004). Fukt kan gynna tillväxten hos många skadesvampar. Glesare placering av plantorna och bättre kontroll av bevattningen är därför vanliga åtgärder.

Runtom i Europa har flera studier de senaste åren beskrivit *Phoma*-orsakade sjukdomar, benämnda *Phoma* blight, som angriper gran och tall (Yarmalovich & Siaredzich 2019; Seredich 2016; Sheller m.fl. 2020; Martín-Pinto 2004). Att angripa skogsplantor är en utvecklig för svampsläktet som tidigare varit kända inom patologin hos åkerodlade växter. Symtom kan vara gulnade barr på skogsplantans nedre delar och en sämre tillväxt hos unga plantor.

Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi vid SLU tar regelbundet emot och undersöker prover från skogsplantaskolor runtom Sverige och har nyligen märkt av en ökning av plantor infekterade med svampar i släktet *Phoma*<sup>1</sup>.

### 1.1.1 Svampsläktet *Phoma*

*Phoma* är ett svampsläkte inom divisionen Ascomycota, klassen Dothideomycetes, ordning Pleosporales, tillhörande familjen Didymellaceae. Släktet innefattar flera marklevande svamparter som återfinns i markens vattensystem eller på organiskt material. Bland arterna förekommer många växtpatogener med värdar inom många olika växtfamiljer. Kända sjukdomar såsom torröta hos raps (*Brassica napus* L.) (Larsson 2017), rotbrand hos sockerbeter (*Beta vulgaris*) (Westman 2010) samt symtom på gran och tall (Yarmalovich m.fl. 2019) orsakas alla av arter inom släktet *Phoma*. Många av arterna i släktet har lång överlevnad även utanför sin värdväxt och kan exempelvis vila i jorden där de kan bilda en tät massa av mycel och jordpartiklar och överleva i över ett år (Deb m.fl. 2020).

Den taxonomiska beskrivningen av släktet *Phoma* är än idag inte fullkomligt, vilket innebär flera oidentifierade arter men även obestämda egenskaper hos de redan identifierade arterna. Hos majoriteten av de identifierade arterna saknas exempelvis en klarlagd beskrivning av dess teleomorfer (sexuella stadium) och hos de få arter som stadiet finns beskrivet, har man inte kunnat studera dessa i odlad tillstånd (Boerema 2004). Flera släkten så som *Phoma*, *Didymella* och *Ascochyta* inom familjen *Didymellaceae* har visat sig vara polyfyletiska och svåra att särskilja (Hou m.fl. 2020). Exempelvis har flera teleomorfer i släktet *Didymella* kunnat kopplas till anamorfer i släktet *Phoma*, samtidigt som andra arter ännu inte kopplats till någon känd teleomorf.

Morfologiska artbestämmelser inom släktet har sina brister. *Phoma* är uppdelat inom 9 olika sektioner varav vissa har tydligare egenskaper kopplade till sin sektion medan andra morfologiska egenskaper förekommer inom flera sektioner. Odlade på agar kan morfologin verka plastisk och ofta saknas karakteristiska drag att utgå

---

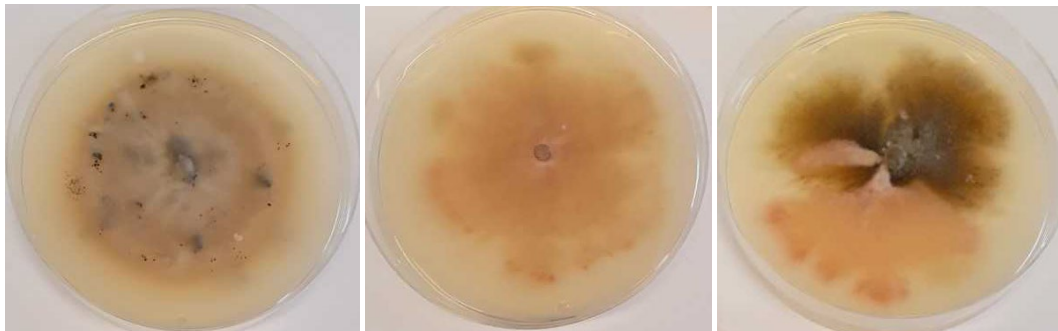
<sup>1</sup> Audrius Menkis, SLU, Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi, personlig kontakt.



ifrån (Avenskamp m.fl. 2009). Följaktligen innebär en genetisk identifikation en enklare och mer tillförlitlig identifiering av arter och dess släktskap inom *Phoma*.

### 1.1.2 Molekylär fylogeni

Morfologiska och fysiologiska karaktärer är ofta plastiska och påverkas av omgivande faktorer, såsom klimat och näringstillgång (Figur 1). Detta innebär även en oförutsägbarhet som gör egenskaperna svåra att använda utifrån en fylogenetisk synpunkt. Molekylär fylogeni innebär att via molekylär information, såsom DNA, kunna tolka evolutionära samband mellan olika organismer, släkten och arter (Graur & Li 2020).



Figur 1: Bilder (a, b och c) på isolat av *Phoma* odlade på agarplattor som uppvisar olika utseenden. Foto: Åke Olson.

Molekylära karaktärer ter sig mer konserverade än morfologiska och fysiologiska egenskaper vilket ger en starkare hereditär (ärftlig) karaktär. Evolutionära förändringar i DNA följer dessutom förutsägbara mönster, vilket tillsammans ger mer information om organismers evolutionära ursprung. Morfologiska egenskaper är ofta begränsade, speciellt då närbesläktade arter ska skiljas åt som i denna studie. Genetiskt material erbjuder en mycket större mångfald av egenskaper vilket gör en taxonomisk kartläggning enklare, även på artnivå. Utöver att de morfologiska egenskaperna ofta är färre, kan de även vara svårare att avgöra om de är homologa, alltså om de utvecklats från samma evolutionära ursprung eller inte. En sådan bedömning är lättare att göra utifrån genetiska egenskaper.

Lokus är ett genomiskt område för en specifik gen, som kan användas inom taxonomin för att jämföra och beskriva olika taxonomiska grupper. För att kunna jämföra DNA-sekvensen i specifika lokus görs PCR-reaktioner där utvalda primers används för att kopiera dessa. Efter sekvensering av en PCR-produkt blir resultatet en DNA-sekvens som kan användas som en specifik streckkod för den okända organismen och jämföras med redan artbestämda organismers streckkoder i databaser eller bibliotek (Goldstein & DeSalle 2010). Dessa databaser är dock inte

kompletta med alla lokus från alla kända arter, utan utökas kontinuerligt i takt med ny forskning. Detta innebär att det kan finnas brister i hur nära träff en sökning i databasen kan få. I släktet *Phoma* har man beskrivit de flesta arter som anamorfer, vilket kan innebära att telemorfer av dessa beskrivs som en annan art eller släkte i databasen.

ITS-regionen är ett välkänt och använt lokus som används för att beskriva svampars taxonomi. Den är belägen mellan den lilla subenheten 18S och den stora subenheten 26S och består av tre sammansatta regioner: en välbevarad sekvens som kallas 5.8S som ligger mellan två spacer-regioner (ickekodande DNA): ITS1 och ITS2, som kan te sig mer artspecifika (Iwen m.fl. 2002). Variationen mellan mer bevarat och artspecifikt DNA gör ITS till ett mycket användbart lokus för identifiering av svampar. Att sekvensen används brett inom forskning innebär också att DNA-databaserna har många ITS-sekvenser kopplade till många arter, vilket underlättar sökningar med sekvensen.

### 1.1.3 Multilokusfylogeni

För vissa släkten är ITS-regionen väldigt bevarad och oförändrad (trots evolutionens gång) mellan olika arter, vilket gör dem svåra särskilja enbart utifrån detta lokus (Taylor m.fl. 2000). Det kan därför vara fördelaktigt att inkludera flera lokus i jämförelserna då det kan ge mer variation att använda sig av. Att använda sig av flera lokus på detta sätt kallas multilokusfylogeni.

Redovisade sekvenser av ITS-regionen i arbetet av Stenströms m.fl. (2013) visade vid sökning i DNA-databaser på träffar hos flera olika arter och även släkten, vilket tyder på en låg variation i regionen som gör det svårt att avgränsa arttillhörighet endast utifrån denna sekvens. Familjen *Didymellaceae* har visat sig ha låg variation i ITS-sekvensen mellan både arter och släkten (Hou m.fl. 2020), vilket gör att användande av endast detta lokus kan vara otillräckligt för att artbestämma svampsläktet *Phoma*.

För att hitta variation och kunna avgränsa arters tillhörighet i släktet *Phoma*, kompletteras ITS i denna studie med två proteinkodande regioner: aktin och Translation elongation factor 1 alpha (TEF). TEF kodar för ett protein som ingår i proteinsyntesen och används brett inom *Phomas* taxonomi och är därav praktisk vid sökning i DNA-databaser. Aktin-genen kodar för proteinet aktin som används frekvent i alla eukaryota celler. Genen anses vara relativt bevarad och är därför ett bra komplement i den evolutionära kartläggningen (Aveskamp m.fl. 2009). Resultatet presenteras i ett fylogenetiskt träd, där noderna representerar genetisk samhörighet hos de sammansatta grenarna på någon taxonomisk nivå.

#### 1.1.4 Fylogenetiska träd

Fylogenetiska träd är diagram som redogör för en hypotes om det evolutionära släktskapet mellan valda grupper. Släktskapen i träden utformas genom att jämföra de medverkande organismernas närmsta gemensamma förfäder och på så sätt kartlägga ett evolutionärt samband. Träden startar från en gemensam förfader och förgrenar sig eller fortlöper utifrån de medverkande organismernas likheter och skillnader i egenskaper. Träden kan byggas utifrån olika typer av egenskaper, såsom morfologiska eller genetiska. I denna studie konstrueras träden utifrån gruppernas genetiska karaktärer.

En DNA-sekvens byggs upp av fyra olika nukleotider som placeras i olika ordningar och upprepningar, där varje nukleotid och dess placering kan ses som en karaktär för det specifika isolatet (Graur & Li 2020). Nukleotiderna kan bytas ut, utökas eller raderas under evolutionens gång och dessa genetiska förändringar följer statistiska, förutsägbara mönster. Dessa karaktärer och mönster kan jämföras mellan olika arter och utifrån skillnader och likheter i dessa kan taxonomin mellan arterna kartläggas.

I denna studie används isolat och sekvenser från okända arter och för att ge dessa en evolutionär tillhörighet jämförs de med rapporterade sekvenser från kända arter. Med hjälp av DNA-databaser kan de beskrivna sekvenserna ITS, aktin och TEF från kända arter tas fram och inkluderas i trädet för att jämföras med de okända arterna och därigenom kan en hypotes om släktskap mellan arterna bildas.

Fylogenetiska träd kan vara bra verktyg för att förstå sambanden mellan olika arter, dock finns viss problematik. Exempelvis används statistiska beräkningar för att utse vilken genetisk förändring som mest troligt gett den resulterande sekvensen, dock kan inte sambanden säkerställas och resultatet i träden kan därför inte tolkas som absoluta. Som tidigare nämnt (i avsnitt *Molekylär fylogeni*) är homologa karaktärer enklare att utse för genetiska egenskaper. Dock innebär det fortfarande vissa svårigheter i tolkningen av vad som bör räknas som evolutionärt och inte, samt att även detta endast är en hypotes och inte fastställda fakta.

Trädens utseenden påverkas även mycket på tillgänglig information, såsom utbudet av olika sekvenser i DNA-databaser. Alla sekvenser för alla arter finns ännu inte

tillgängliga, vilket gör att bestämning till artnivå inte alltid är möjlig. En gruppering av isolaten tillsammans med en känd art (där alla grenar kommer från samma nod) skulle kunna indikera genetiskt utbyte mellan dessa, alltså att de tillhör samma art – eller att närmare information om släktskap inte går att säkerställa.

## 1.2 Syfte

Denna rapport utgår från prover innehållande det identifierade svampsläktet *Phoma*, insamlade från 9 olika skogsplanteskolor i Sverige vid två tillfällen, provtagna från tall och grans rötter respektive skott. Rotproverna togs från rötterna på symptomfria plantor (Stenström m.fl. 2013) och skottproverna från skott på synligt infekterade plantor. Genom multi-lokusfylogeni med tre utvalda lokus; ITS, aktin och elongation factor 1 alfa, kartlagdes släktskapen mellan dessa isolat. Studiens hypotes var att släkträden skulle visa isolaten från rot och skott som separata grenar, vilket indikerar att de tillhör olika arter, inom släktet *Phoma*.

## 2 Material och metod

### 2.1 Material

I enlighet med tidigare studie av Stenström m.fl. (2013) samlades friska plantor in från 6 olika plantskolor i landet. Prover från rötter togs och dess svampar odlades upp på agarplattor. Dessa renades och släktskap hos de isolerade svamparna bestämdes utifrån deras morfologi. Fjorton slumpmässigt utvalda isolat tillhörande släktet *Phoma* från studien, används i denna rapport.

Vidare har institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi vid SLU samlat in synligt sjuka plantor från olika svenska skogsplantskolor och isolerat svampar från deras skott på agarplattor. Släktet identifierades utifrån morfologi och molekylär fylogeni utifrån isolatens ITS-lokus. Av de isolat som tillhörde släktet *Phoma*, valdes fjorton isolat ut slumpvis för att ingå i denna studie. Fortsättningsvis extraherades DNA från kulturerna. Utöver isolaten användes även resultatet från sekvenseringen av ITS-regionen. I nästkommande avsnitt beskrivs hur DNA från de totalt 28 isolaten förbereddes för sekvensering och vidare tolkning av dessa (Tabell 1).

Tabell 1. Tabell över isolaten och den växt del de isolerats från, värdväxt och plantskola.

Isolat	Växt del	Växt	Plantskola
8S3_23b	Skott	Gran	Flåboda
1S3_39a	Skott	Gran	Gideo
5S3_48b	Skott	Gran	Lugnet
5S3_35b	Skott	Gran	Lugnet
5P1_29b	Skott	Tall	Lugnet
5P2_41a	Skott	Tall	Lugnet
1P1_3b	Skott	Tall	Gideo
3S3_3b	Skott	Gran	Trekanten
9S3_22a	Skott	Gran	BogrunDET
5S4_50b	Skott	Gran	Lugnet
5S2_24b	Skott	Gran	Lugnet
5P1_31b	Skott	Tall	Lugnet
1P1_49a	Skott	Tall	Gideo
5S3_28a	Skott	Gran	Lugnet
K61_1	Rot	Tall	Kilåmon
K65_2	Rot	Tall	Kilåmon
S177_4	Rot	Tall	Stakheden
S178_2	Rot	Tall	Stakheden
V202_1	Rot	Gran	Vibytorp
V217_2	Rot	Gran	Vibytorp
V218_3	Rot	Gran	Vibytorp
V219_2	Rot	Gran	Vibytorp
V219_3	Rot	Gran	Vibytorp
L307_1	Rot	Gran	Lugnet
L294_2	Rot	Tall	Lugnet
P399_2	Rot	Tall	Svenska skogsplantor
P392_1	Rot	Tall	Svenska skogsplantor
P400_1	Rot	Tall	Svenska skogsplantor

## 2.2 Förberedelse av prover inför sekvensering

### 2.2.1 DNA-extraktion

Mycel från fjorton svampkulturer från rötter, homogenerade med Precellys 24 touch, bertin instruments, i två cykler med inställningarna 5000 RPM, 30 sekunders aktivitet och 60 sekunders vila. Vidare användes NucleoSpin Plant kit (Clontech) med buffert PL1 för att bryta ner cellmaterial, för att separera och rena provernas genetiska material, enligt rekommendationer från tillverkaren.

### 2.2.2 DNA-kvantifiering

Datorprogrammet och tillhörande absorbentsmätare NanoDrop användes, med inställt absorptionsmaximum på 260 nanometer, för att mäta halten DNA i de extraherade proverna.

### 2.2.3 PCR-amplifikation och elektrofores

Koncentrationerna av renat DNA optimerades och 25 µl från varje prov tillsattes i respektive PCR-rör tillsammans med 11,25 µl autoklaverat vatten, 5 µl buffert, 5 µl dNTP, 1,5 µl MgCl<sub>2</sub> 0,25 µl Taq-polymeras, samt 1 µl forward respektive reverse primer.

Polymerase Chain Reaction (PCR) genomfördes (med SimpliAmp Terminal Cycler, Thermo Fisher Scientific) och temperaturerna optimerades för varje reaktion. PCR för alla primerpar genomgick samma program men med olika annelingstemperaturer: 95 °C i 5 minuter följt av 35 cykler med temperaturen 95 °C i 30 sekunder, 30 sekunders annealing (58 °C för ITS, 50 °C för aktin och 55 °C för EF), följt av 72 °C i 30 sekunder och avslutades med 72 °C i 7 minuter.

Slutförda reaktioner kontrollerades genom elektrofores (250 V i 20 minuter) i agarosgel med 1 % agaros, renades enligt protokoll och användes vidare för sekvensering hos Macrogen och analys.

### 2.2.4 Analys av PCR-sekvenser

För att tolka resultaten från sekvenseringen användes datorprogrammet SeqMan Ultra (DNASTAR 2020) för att kombinera forward- och reverse-sekvenserna till en sammansatt konsensus-sekvens från varje sekvenserat lokus och isolat. Därefter användes mjukvaran Mega X (MEGA Software 2023) för att skapa en alignment och sammanställa sannolika fylogenetiska släktträd.

### 2.2.5 Fylogenetisk analys

Alignment av samtliga PCR-sekvenser samt utvalda sekvenser från kända arter (Tabell 2) gjordes i programvaran Mega X med hjälp av den inbyggda funktionen ClustalW utifrån dess standardinställningar och optimerades därefter ytterligare manuellt för att säkerställa att sekvensernas likheter kunde registreras i största möjliga mån. Vidare användes metoden Maximum Likelihood, som är en statistisk beräkning för att få fram den mest sannolika jämförelsen och sambanden mellan sekvenserna. Därtill användes testet Bootstrap (inställt på 1000 "replications") för att testa trovärdigheten av trädets topologi (placering av grenar) genom att jämföras med 1000 rekonstruerade träd. Det resulterar i ett bootstrapvärde för varje gren som högre än 95 anses vara korrekt.

Inställningarna i Mega X för samtliga träd var följande: Rates among Sites – Uniform Rates, Partial Deletion – 70 % (en del av sekvensen tas bort innan analysen börjar om den innehåller högre andel än 70 % av ospecificerade nukleotider), Heuristic Method – Nearest-Neighbor-Interchange (orotade träd jämförs för att få fram den mest sannolika följd, utan en närmast gemensam förfäder), Initial Tree – Make initial tree automatically, Branch Swap Filter – none och Number of Threads – 3. Substitutionsmodeller valdes utifrån programvarans egen rekommendation (MEGAX-Help 2023).



### 3 Resultat

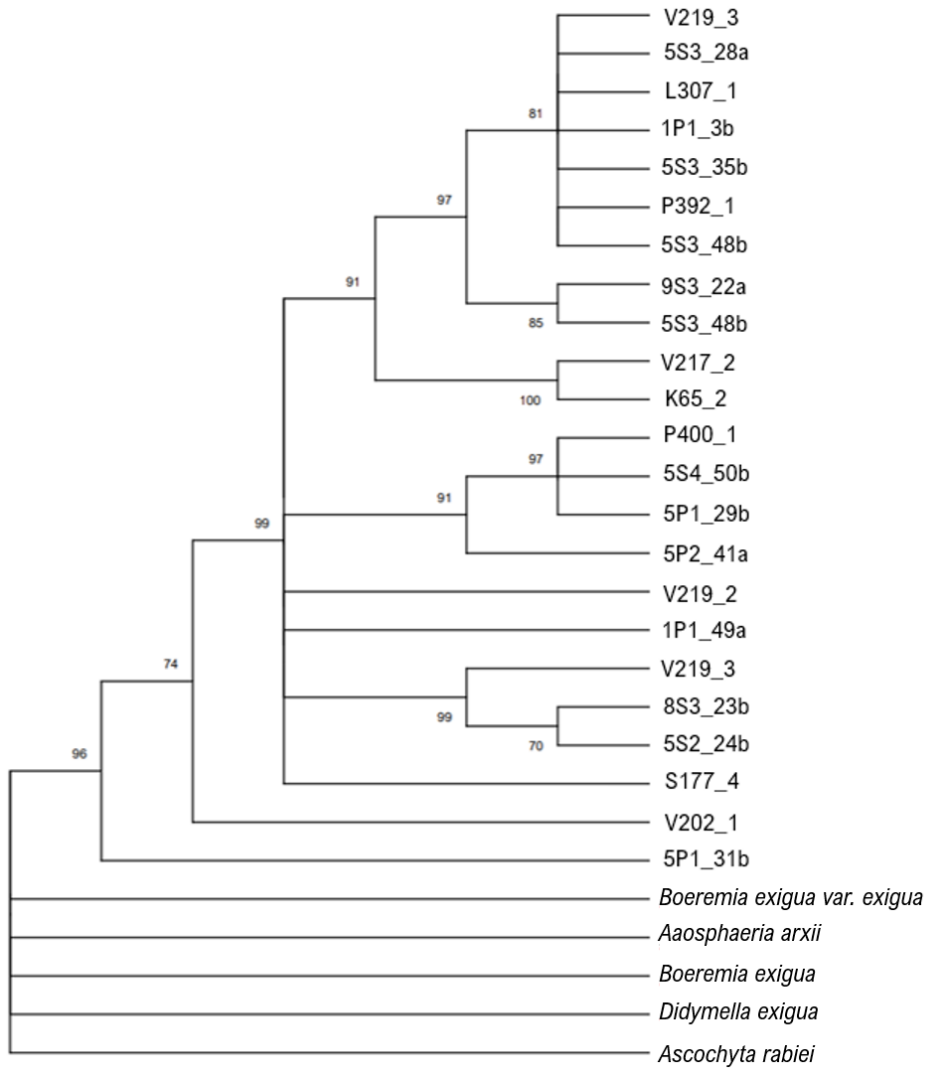
Av de PCR-produkter som skickades för sekvensering (14 av ITS-sekvensen och 28 vardera av aktin- och TEF-sekvensen), erhöles slutligen 13 ITS-sekvenser (exklusive de tidigare sekvenserade 14 proverna, totalt 27 sekvenser), 23 aktin-sekvenser och 23 TEF-sekvenser. De bortfallna sekvenserna var från olika isolat hos alla tre lokus. Tre fylogenetiska träd för de tre sekvenserna kunde utformas i mjukvaran MegaX utifrån mjukvarans förslag om bästa modell för evolution av vardera lokus; modell TN93+G för translation elongation factor 1-alpha, modell K2 för ITS, samt modell TN93+G för aktin-sekvenserna. Konsensussträd med lägsta bootstrapvärde satt till 70 % visas i Figur 2, 3 och 4.

Hos alla tre fylogenetiska träd (Figur 2, 3 och 4) beblandades sekvenserna oavsett om de härstammade från plantors rötter eller skott, tall eller gran. I två av träden grupperades majoriteten av isolat-sekvenserna tillsammans med någon av databassekvenserna: ITS-sekvenserna (Figur 4) grupperades tillsammans med databassekvensen från arten *Didymella boeremae* (även kallad *Phoma boeremae* enligt EPPO) (Tabell 2), respektive aktin-sekvenserna (Figur 3) tillsammans med två datorbas-sekvenser, båda tillhörande arten *P. herbarum* (Tabell 2). Sekvenserna för TEF (Figur 2) grupperades dock inte tillsammans med någon sekvens från databasen. Detta träd var också mer förgrenat bland isolatens sekvenser än de övriga två träden, där vissa grupperingar endast innehöll plantor från plantskolan Lugnet medan andra innehöll en geografisk blandning med avseende på isolatens ursprung.

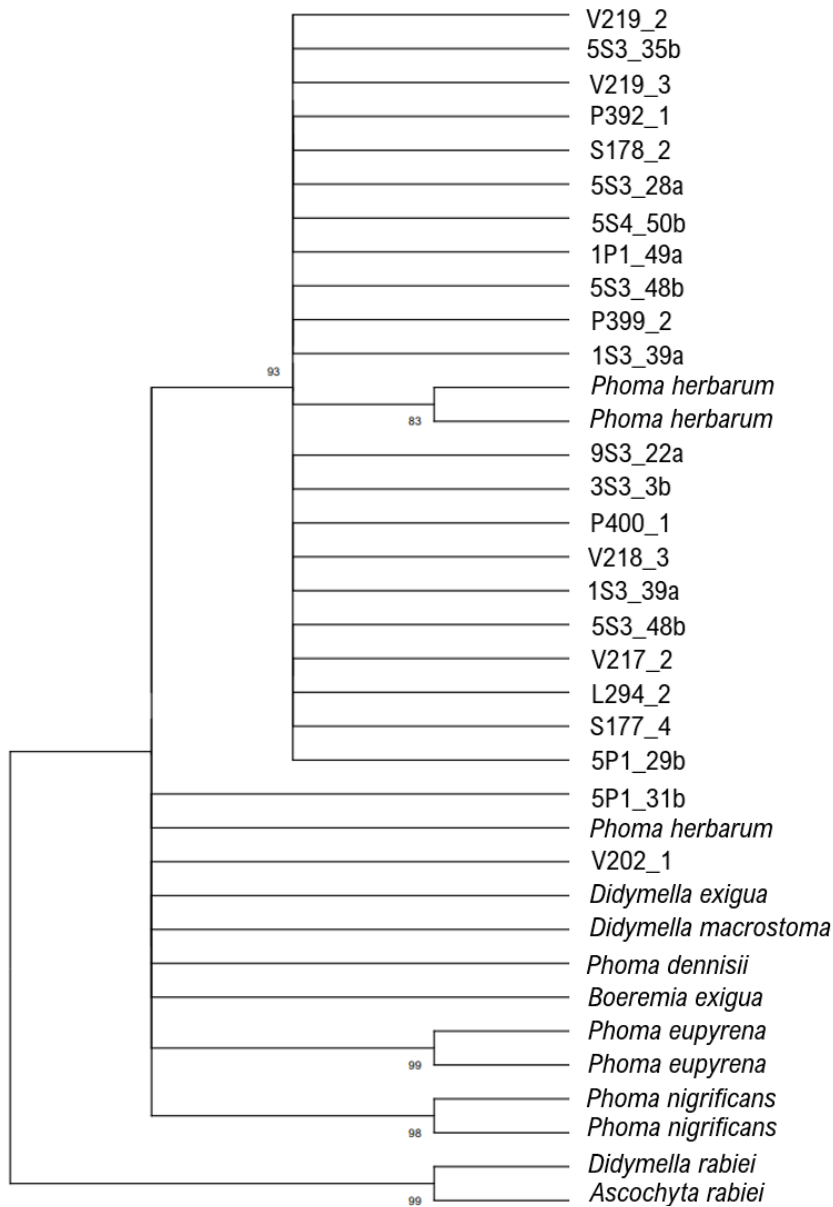
Två isolat separeras från de övriga i samtliga träd: isolat V202\_1 från skott och 5P1\_31b från rot (förutom ITS-sekvensen för 5P1\_31b som inte kunde sekvenseras och därför inte redovisas i trädet). Trädet över TEF-sekvenserna placerade V202\_1 närmre grupperingen av de andra isolaten och 5P1\_31b från en nod längre ifrån. Utifrån aktin-sekvenserna (Figur 3) placerades de från samma nod tillsammans med de övriga databas-sekvenserna som uteblev från grupperingen av övriga isolat. ITS-sekvensen för V202\_1 grupperades tillsammans med sekvensen från arten *Ascochyta phasae* tagen från databasen.

Tabell 2. Tabell över sekvenser som hämtats från DNA-databasen National Center for Biotechnology Information (NCBI). Uppger namn på arten som sekvensen tillhör, databasens stam och accession nummer samt sekvenserat lokus.

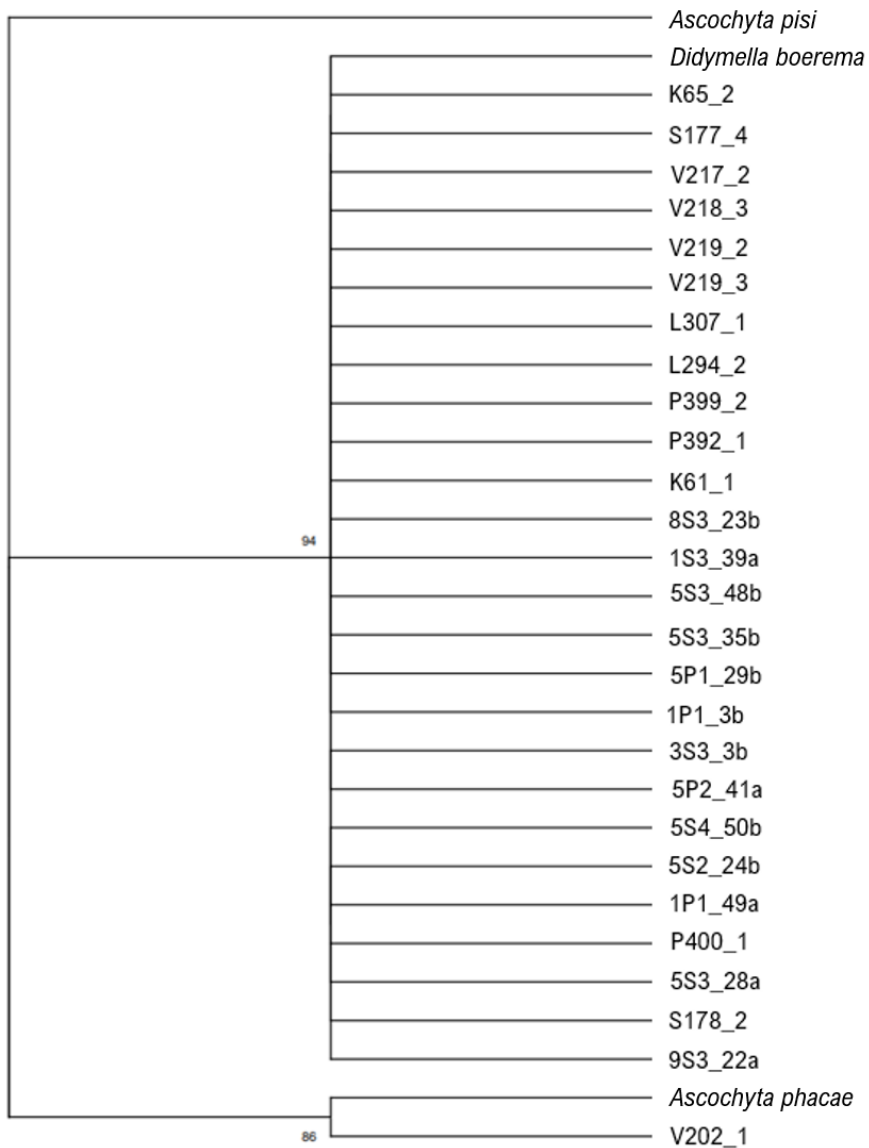
<b>Art Namn</b>	<b>Stam Nr.</b>	<b>Ac. Nr.</b>	<b>Lokus</b>
<i>Boeremia exigua</i>	DAR 79101	JF925328	TEF
<i>var. exigua</i>			
<i>Aaosphaeria arxii</i>	CBS 175.79	XM_033525593	TEF
<i>Boeremia exigua</i>	-	XM_046136058	TEF
<i>Didymella exigua</i>	CSB 183.54	XM_033593526	TEF
<i>Ascochyta rabiei</i> ( <i>Didymella rabiei</i> )	-	XM_038938193	TEF
<i>Ascochyta pisi</i>	CBS 122785	NR_135981	ITS
<i>Didymella boeremae</i>	CBS 109942	NR_135962	ITS
<i>Ascochyta phacae</i>	CBS 184.55	NR_135942	ITS
<i>Phoma herbarum</i>	CBS 567.63	AY748978	Aktin
<i>Phoma herbarum</i>	CBS 276.37	AY748977	Aktin
<i>Phoma betae</i>	CBS 112.85	AY748973	Aktin
<i>Didymella exigua</i>	CBS 183.55	XM_033586749	Aktin
<i>Didymella macrostoma</i>	-	MZ_666950	Aktin
<i>Phoma dennisii</i>	CBS 631.68	AY748974	Aktin
<i>Boeremia exigua</i>	-	XM_046140936	Aktin
<i>Phoma eupyrena</i>	CBS 527.66	AY748976	Aktin
<i>Phoma eupyrena</i>	CBS 361.51	AY748975	Aktin
<i>Phoma nigrificans</i>	-	AY748980	Aktin
<i>Phoma nigrificans</i>	CBS 740.96	AY748981	Aktin
<i>Didymella rabiei</i>	AR628	KM244530	Aktin
<i>Ascochyta rabiei</i>	-	XM_038941744	Aktin



Figur 2. Fylogenetiskt träd över sekvensen för translation elongation factor 1 alfa (TEF) från 23 isolat och 5 arter tagna från DNA-databasen National Library of Medicine. Trädet är uppbyggt med hjälp av mjukvaran MEGAX utifrån maximal sannolikhet, med den bäst passande modellen TN93+G enligt programmet. Bootstrapvärden (>70 %) syns ovanför varje gren.



Figur 3. Fylogenetiskt träd över sekvensen för aktin från 23 isolat och 13 arter tagna från DNA-databasen National Library of Medicine. Trädet är uppbyggt med hjälp av mjukvaran MEGAX utifrån maximal sannolikhet, med den bäst passande modellen TN93+G enligt programmet. Bootstrapvärden (>70 %) syns ovanför varje gren.



Figur 4. Fylogenetiskt träd över sekvensen för ITS från 27 isolat och 3 arter tagna från DNA-databasen National Library of Medicine. Trädet är uppbyggt med hjälp av mjukvaran MEGAX utifrån maximal sannolikhet, med den bäst passande modellen K2 enligt programmet. Bootstrapvärden (>70 %) syns ovanför varje gren.

### 3.1 Diskussion

Hos samtliga träd utgick majoriteten av isolaten (isolerat från både rot och skott) från samma gren, vilket innebar att resultaten inte kan stödja hypotesen att dessa skulle vara separata arter inom släktet *Phoma*. För att styrka att dessa tillhör samma art bör fler lokus testas och jämföras samt jämföras med andra närbesläktade arter från DNA-databasen, då resultaten från denna studie inte kan fastställa att dessa skulle vara samma art. Utöver en beblandning av isolatens härkomst, syntes även beblandning av värdväxt vilket tyder på att det inte rör sig om olika arter som infekterar gran och tall.

För de fylogenetiska träden baserade på sekvenserna för ITS och aktin, klumpades majoriteten av isolaten samman med sekvenserna för *Didymella boerema* och *Phoma herbarum* (tab. 2.). Då båda arterna tillhör släktet *Phoma* (*D. boerema* kallas även *Phoma boerema*), vilket tyder på att sekvenseringen av studiens valda lokus var tillräckliga för att bestämma släkttillhörighet hos dessa isolat. Samtidigt sågs två isolat i samtliga träd på separata grenar från övriga isolat, V202\_1 och 5P1\_31b, vilket tyder på att dessa skulle kunna vara från annat släkte. Ytterligare sökning i NCBI gjordes för dessa sekvenser visade stora likheter mellan sekvenserna och arter från andra släkten än *Phoma*. Isolat 5P1\_31b visade starka likheter med arten *Ilyonectria destructans* för både TEF- och aktin-sekvensen (sekvenseringen för ITS av detta isolat misslyckades och kunde därför inte jämföras). Även de nästkommande träffarna uppgav likheter med andra arter inom samma släkte, *Ilyonectria*. Isolat V202\_1 kunde sökas utifrån alla tre sekvenserade lokus i databasen och visade stora likheter med olika arter inom släktet *Epicoccum* hos sekvenserna av ITS och TEF. Aktin-sekvensen gav lägre nivåer av likheter till flera olika släkten, vilket skulle kunna bero på att forskning med sekvensering av aktin för detta släkte saknas i databasen.

Dock kan konstateras att dessa resultat tyder på att isolat V202\_1 och 5P1\_31b inte tillhör svampsläktet *Phoma* och därtill att identifieringen via morfologiska karaktärer samt sekvenseringen av endast ITS-lokuset kan ses som otillräckligt för att fastställa släktskap hos detta släkte.

Trädet över TEF-sekvenser grupperade majoriteten av isolaten, precis som övriga träd, dock inte tillsammans med någon känd art hämtad från databas. Detta kan tyda på att tillräckligt närbesläktade arter inte fanns tillgängliga med denna sekvens. Samtidigt var isolatens gruppering mer förgrenad i detta träd än de övriga. Dessa mindre subgrupper som bildades bland isolaten i trädet, kan tyda på större genetisk likhet, exempelvis på grund av geografiska faktorer. Ursprungen i tabell 1 visade att de mindre grupperingarna innehöll isolat från samma plantskola, Lugnet. För att fastställa om dessa grupperingar beror på geografien och att dessa skulle kunna vara

isolerade populationer, bör ytterligare studier inkludera fler isolat från varje plantskola.

Vidare skulle studien kunna förbättras genom att använda fler loki för att kunna få bättre träffar bland redan studerade arter vars sekvenser finns att jämföra med i databasen, samt att inkludera fler arter, även inom *Phoma* och utanför, för att få en bättre kartläggning av isolatens släktskap.

### 3.2 Slutsatser

Sammanfattningsvis indikerar denna studie att isolaten av svampar ur släktet *Phoma* som infekterar rötter och skott hos gran och tall, inte tillhör olika arter. Som många studier tidigare, stödjer även denna en problematik kring släktets plastiska morfologi.

Vidare skulle studien kunna förbättras genom att använda fler loki för att kunna få bättre träffar bland redan studerade arter vars sekvenser finns att jämföra med i databasen, samt att inkludera fler arter, inom *Phoma* och utanför, för att få en bättre kartläggning av isolatens släktskap. För vidare studier skulle dessa resultat kunna kompletteras med en spårning av svampangreppen av släktet *Phoma*, för att kartlägga hur utbrotten ser ut i tid och rum i Sverige men även runtom i Europa, samt utvärdera bekämpande och förebyggande metoder för att minska infektionerna.

## 4 Referenser

- Avenskamp, M.M., Verkley, G.J.M., de Gruyter, J., Murace, M.A., Perelló, A., Woudenberg, J.H.C., Groenewald, J.Z. & Crous, P.W. (2009). DNA Phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. *Mycologia*. 101:3, 363-382.
- Aveskamp, M.M., Woudenberg J.H.C., de Gruyter, J., Turco, E., Groenewald, J.Z. & Crous, P.W. (2009). Development of taxon-specific sequence characterized amplified region (SCAR) markers based on actin sequences and DNA amplification fingerprinting (DAF): a case study in the *Phoma exigua* species complex. *Molecular Plant Pathology*. Volym 10 (3), 403-414.  
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00540.x>
- Boerema, G.H., de Gruyter, J., Noordeloos, M.E & Hamers, M.E.S. (2004). *Phoma Identification Manual*. Oxfordshire; CABI Publishing.
- Deb, D., Khan, A. & Dey, N. (2020). Phoma diseases: Epidemiology and control. *British Society of Plant Pathology*. Vol 69 (7). <https://doi.org/10.1111/ppa.13221>
- DNASTAR (2020). *SeqMan Ultra* (version) [Programvara].  
<https://www.dnastar.com/software/lasergene/seqman-ultra/>
- Goldstein, P.Z. & DeSalle, R. (2010). Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: Determination, discovery, and description. *BioEssays*. Volym 33 (2), 135-147. <https://doi.org/10.1002/bies.201000036>
- Graur, D. & Li, W.H. (2000). Molecular Phylogenetics. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Andra upplagan, Sunnerland, USA: Sinauer Associates.
- Hou, L.W., Groenewald, J.Z., Pfenning, L.H., Yarden, O., Crous, P.W. & Cai, L. (2020). The *Phoma*-like dilemma. *Studies of Micology*. Volym 96, 309-396.  
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.05.001>
- Iwen, P. C., Hinrichs, S. H. & Rupp, M. E. (2002). Utilization of the Internal Transcribed Spacer Regions as Molecular Targets to Detect and Identify Human Fungal Pathogens. *Medical Mycology*. Vol 40 (1), 87-109.  
<https://doi.org/10.1080/mmy.40.1.87.109>
- Johansson, K. (2010). Produktion av barrotsplanter. *PLANTskolan, kapitel 14*. Skogskunskap.  
[https://www.skogskunskap.se/cd\\_20161122200304/contentassets/26ceb5bb942646d781cf7810ff38ba5a/plantskolan\\_14\\_produktion\\_av\\_barrotsplanter\\_komp2.pdf](https://www.skogskunskap.se/cd_20161122200304/contentassets/26ceb5bb942646d781cf7810ff38ba5a/plantskolan_14_produktion_av_barrotsplanter_komp2.pdf)
- Larsson, E. (2017). *Resistensförädling av höst- och vårraps i Sverige*. Grundnivå, G2E. Uppsala: SLU; Institutionen för växtproduktionsekologi.  
<https://stud.epsilon.slu.se/10226/>



- Martin-Pinto, P., Pajares, J.A., Nanos Nikolaos, Díez, J.J. (2004). Site and Seasonal Influences on the Fungal Community on Leaves and Stems of Pinus and Quercus Seedlings in Forest Nurseries. *Sydowia*. Vol 56.  
[https://www.zobodat.at/pdf/Sydowia\\_56\\_0243-0257.pdf](https://www.zobodat.at/pdf/Sydowia_56_0243-0257.pdf)
- MEGA Software (2023). *MEGA X* (11) [Programvara].  
<https://www.megasoftware.net/>
- NucleoSpin. Protokoll.  
[https://www.takarabio.com/documents/User%20Manual/NucleoSpin%20Plant%20II%20Genomic%20DNA%20Purification%20User%20Manual%20%28PT5028/NucleoSpin%20Plant%20II%20Genomic%20DNA%20Purification%20User%20Manual%20%28PT5028-1%29\\_Rev\\_09.pdf](https://www.takarabio.com/documents/User%20Manual/NucleoSpin%20Plant%20II%20Genomic%20DNA%20Purification%20User%20Manual%20%28PT5028/NucleoSpin%20Plant%20II%20Genomic%20DNA%20Purification%20User%20Manual%20%28PT5028-1%29_Rev_09.pdf)
- Schoch m.fl. (2012). *Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi*. Philadelphia; University of Pennsylvania. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Seredich, M. O. (2016). Cultural and Morphological Characteristics of Fungus Phoma sp.1 – Phoma Blight Causing Agents in Coniferous Tree Seedlings. *Proceedings of Belarusian State Technological University*. No. 1.  
<https://elib.belstu.by/handle/123456789/20825>
- Sheller, M. A., Shilkina, E. A., Ibe, A. A., Razdorozhnaya, T. Y. & Sukhkih, T. V. (2020). Pathogenic Fungi in Forest Nurseries of Middle Siberia. *iForest – Biogeosciences and Forestry*. Vol 13 (6). <https://doi.org/10.3832/ifor3507-013>
- Skogsstyrelsen (2020). *Levererade skogsplantor*. Skogsstyrelsen.  
<https://www.skogsstyrelsen.se/statistik/statistik-efter-amne/levererade-skogsplantor/>
- Stenström, E., Ndobe, N.E., Jonsson, M., Stenlind, J. & Menkis, A. (2013). *Root-associated fungi of healthy-looking Pinus sylvestris and Picea abies seedlings in Swedish forest nurseries*. Scandinavian Journal of Forest Research. Vol. 29, No. 1, 12–21. <https://doi.org/10.1080/02827581.2013.844850>
- Stenström, E. (2004). Svampar – de vanligaste skadorna. *Plantskolan, Lektion 11*. Skogskunskap.  
[https://www.skogskunskap.se/cd\\_20161122200304/contentassets/26ceb5bb942646d781cf7810ff38ba5a/plantskolan\\_lektion11.pdf](https://www.skogskunskap.se/cd_20161122200304/contentassets/26ceb5bb942646d781cf7810ff38ba5a/plantskolan_lektion11.pdf)
- Wennström, U. m.fl. (2016) Produktion av frö och plantor. *Skogsskötselserien, kapitel 2*. Skogsstyrelsen.  
<https://www.skogsstyrelsen.se/globalassets/mer-om-skog/skogsskotselserien/skogsskotsel-serien-2-produktion-av-fro-och-plant.pdf>
- Westman, C. (2010). Svampsamhällen och svampsjukdomar på åkerböna samt svamparnas inverkan på grobarheten. Avancerad nivå, A1E. Uppsala: SLU; Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi.  
<https://stud.epsilon.slu.se/2798/>
- Witzell, J. (2017) Skador på skog. *Skogsskötselserien, kapitel 12*. Skogsstyrelsen.  
<https://www.skogsstyrelsen.se/globalassets/mer-om-skog/skogsskotselserien/skogsskotselserien-12-skador-pa-skog-del-2-gamla-och-nya-epidemier-och-utbrott-pa-skog.pdf> [2023-04-10]

Yarmalovich, V.A. & Siaredzich M.O. (2019). Phoma Blight of Plant Stock of Pinus Sylvestris L. and Picea Abies L. in Forest Nurseries of Belarus. *Bulletin of Transilvania University of Basov*. Vol 12 (61).  
<https://doi.org/10.31926/but.fwiafe.2019.12.61.2.2>

## 5 Tack

Stort tack till mina handledare Åke Olson och Audrius Menkis som bidragit med kunskap och stöttat mig i detta arbete.

## Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Även om du inte publicerar fulltexten kommer den arkiveras digitalt. Om fler än en person har skrivit arbetet gäller krysset för samtliga författare. Du hittar en länk till SLU:s publiceringsavtal på den här sidan:

- <https://libanswers.slu.se/sv/faq/228316>.

JA, jag/vi ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

NEJ, jag/vi ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.