



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi

Populationsbiologi av kronrost på havre

Jonas Törngren



Magisterarbete 30 hp
Agronom mark/växt
Uppsala 2015

Populationsbiologi av kronrost på havre

Jonas Törngren

Handledare: Anna Berlin, 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: Agronom mark/växt

Utgivningsort: Uppsala
Utgivningsår: 2015
Omslagsbild: Urediniosporer på havre, foto: Anna Berlin

Nyckelord: *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*, brakved, havre, getapel, mikrosatelliter, populationsbiologi



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi

Abstract

The genetic diversity and population structure of *Puccinia coronata*, the pathogen causing crown rust on oats, was investigated in Sweden. The aim of the study was to evaluate the importance of sexual reproduction. The purpose of the study is to contribute in developing methods for integrated pest management in oats.

Six oat fields were sampled in the late summer of 2009 and 2014. A population study was carried out on Swedish samples with the help of microsatellites developed for American isolates. Out of 37 different markers tested 12 were selected for this study and 108 samples were successfully analyzed. All sampled individuals were genetically different, no clones were found, which indicates a large genetic variation. The largest variation was discovered within the different fields but an indication of some population structure was found.

The hypothesis that the presence of common buckthorn, *Rhamnus cathartica*, the alternative host of crown rust, contributes to the large genetic diversity in *P. coronata* was confirmed. The eradication of buckthorn as an alternative host would prevent the sexual reproduction of *P. coronata* by preventing the completion of its life cycle. This will, however, not prevent spores from southern locations in Europe to travel by wind and infect Swedish oat fields.

There is very little research done on alder buckthorn, *Rhamnus frangula*, and its role as an intermediate host for the type of crown rust that attack oats. Before a possible eradication of common buckthorn is implemented, future studies should be performed to test the ability of crown rust on oats using alder buckthorn as its intermediate host. If that is the case then crown rust would still be able to reproduce sexually even though common buckthorn is not present.

Sammanfattning

Den genetiska diversiteten och populationsstrukturen hos svenska individer av *Puccinia coronata*, vilken orsakar kronrost i havre, undersöktes för att utreda hur viktig den sexuella reproduktionen är hos arten. Syftet med studien var att bidra till utvecklandet av integrerade växtskyddsmetoder för havre.

Provtagning skedde i sex havrefält i mellansverige under sensommaren 2009 och 2014. En populationsstudie utfördes på svenska prover med hjälp av mikrosatelliter utvecklade för amerikanska isolat. Utav 37 genetiska markörer användes 12 i denna studie för att analysera genotyper från 108 olika prov. Samtliga insamlade prover var genetiskt unika vilket tyder på stor genetisk variation. Den största variationen fanns inom de olika fälten men en viss tendens till lokala populationer hittades.

Hypotesen att getapel, *Rhamnus cathartica*, kronrostens alternativa värd, bidrar till en stor genetisk diversitet hos *P. coronata* bekräftades. Avlägsnandet av getapel som mellanvärd skulle förhindra sexuell reproduktion av *P. coronata* och därmed möjligheten för svampen att genomgå sin livscykel. Detta kan dock inte förhindra att sporer blåser in från varmare delar av Europa och infekterar havrefälten i Sverige.

I dagsläget finns väldigt lite forskning om betydelsen av brakveds, *Rhamnus frangula*, roll som alternativ värd för den typ av kronrost som angriper havre. Innan ett eventuellt avlägsnande av getapel utförs bör det undersökas om brakved kan vara alternativ värd för den typ av kronrost som angriper havre. Detta skulle innebära att kronrosten kan reproducera sig sexuellt trots att någon getapel inte finns tillgänglig.

Ordlista och förkortningar

HWE - Hardy Weinberg ekvilibrium, alternativt Hardy Weinberg jämvikt. En population som befinner sig i HWE behåller både allel- och genotypfrekvenser från generation till generation utan påverkan av evolutionära processer, såsom t.ex. mutationer eller naturligt urval. Det antas råda slumpmässig sexuell reproduktion inom populationen (Freeland *et al.*, 2011).

Formae specialis*, plural *speciales*, förkortat **f.sp.* – Grupp av raser hos en patogen som endast kan infektera en viss typ av värdväxt (Agrios, 2004).

Genflöde "gene flow" – Process där gener överförs mellan två geografiskt skilda populationer (Agrios, 2004).

Fitness – Förmågan hos en organism att överleva och reproducera sig.

Mikrosatellit – Även kallade SSR, simple sequence repeat. Upprepande DNA-segment mellan 1-5 baspar där antal upprepningar skiljer sig mellan individer. Detta gör det möjligt att kartlägga en populations genotyper (Jarne & Lagoda, 1996).

PCR – Polymerase Chain Reaction.

DNA – Deoxiribonukleinsyra, bär genetisk information.

Meios – Celldelning där könsceller bildas och antalet kromosomer halveras.

F_{IS} - inbreeding coefficient, inavelsindex.

F_{ST} – fixation index, fixeringsindex.

IPM – Integrated Pest Management, Integrerat växtskydd. Bestämmelser om en mer hållbar användning av kemiska bekämpningsmedel inom jordbruket (Jordbruksverket, 2014a).

Innehållsförteckning

Introduktion	1
Litteraturgenomgång	2
Kronrost.....	2
Livscykel	2
Spridning	3
Kemisk bekämpning.....	4
Ras och <i>formae speciales</i>	4
Havre (<i>Avena sativa</i>).....	4
Getapel (<i>Rhamnus cathartica</i>)	4
Populationsbiologi.....	5
Definition av populationer	5
Material och metoder	6
Provtagning	6
Mikrosatelliter	6
Analys.....	8
Resultat	11
Mikrosatellitmarkörer.....	11
Provresultat.....	12
Populationsanalyser.....	13
Diskussion	15
Slutsatser	18
Tackord	19
Referenslista	20

Introduktion

Kronrost, orsakad av svampen *Puccinia coronata*, är i vissa delar av landet ett stort problem för havreodlingen. Rosten kan vissa år minska skördar avsevärt både vad gäller kvalitet och kvantitet medan andra år är näst intill fria från infektion i fält (Lerenius, 2000). Kronrost ses globalt som en av de största och viktigaste sjukdomarna på havre, *Avena sativa*, och vallgräs däribland olika svinglar och rajgräs (Wallenhammar, 1998; Agrios, 2004; Liu & Hambleton, 2013). Man räknar med att *Puccinia*-rostsvampar står för 10 % av den totala förlusten spannmål i världen varje år (Agrios, 2004). När *P. coronata* infekterar havre får grödan färre frön per planta, sämre kvalitet genom en lägre tusenkornsvikt och lägre proteininnehåll (Qaderi *et al.*, 2009).

En av anledningarna till kronrostens framfart är dess möjlighet att slutföra den sexuella delen av livscykeln på getapel. Detta gör att livscykeln kan fullföljas, vilket ökar den genetiska diversiteten hos patogenen (Simons, 1979; Qaderi *et al.*, 2009; Dracatos *et al.*, 2010). Detta gör att kronrosten hela tiden har chans att utvecklas i förhållande till de havresorter som tas fram.

Studien använder mikrosatelliter som utvecklats av Dambroski och Carson (2008) på amerikanska isolat av *P. coronata*. Dessa testas sedan på svenska prover i hopp om att några ska vara användbara. Med hjälp av denna metod kan det fastställas om kronrosten är sexuell eller klonalt reproducerande, dvs. hur lika eller olika individerna är varandra. Dessutom ger det en bild av hur stor genetisk diversitet som finns inom populationerna och en indikation till hur de är spridda i landet.

För att kunna bekämpa en patogen måste man först förstå dess biologi. Syftet med arbetet är därför att granska populationsbiologin hos svampen som orsakar kronrost på havre, *P. coronata*, för att öka förståelsen för biologin hos patogenen. Detta kan bidra till utveckling av integrerade bekämpningsmetoder (IPM).

Frågeställningar som ska besvaras i arbetet är:

1. Är getapel viktig för den genetiska variationen av *P. coronata*, svampen som orsakar kronrost på havre, i Sverige?
2. Skiljer sig populationer av *P. coronata* åt i olika delar av mellansverige?
3. Hur skiljer sig populationen åt på ett fält efter en femårsperiod?

Hypotesen som arbetet utgår ifrån är att getapel är viktig för att kronrosten ska kunna genomgå sin livscykel.

Avlägsnandet av getapel som mellanvärd skulle förhindra både sexuell reproduktion av *P. coronata* men även möjligheten för svampen att genomföra sin livscykel.

En avgränsning som gjorts för studien är att olika raser av havrekronrost (*P. coronata* f.sp. *avenae*) inte kommer att behandlas.

Litteraturgenomgång

Kronrost

Kronrost orsakas av svamppatogenen *Puccinia coronata* Corda som är en basidiomycet (Agrios, 2004) av ordningen Pucciniales, tidigare Uredinales (Szabo & Aime, 2008). Namnet kronrost kommer från svampens karaktäristiska teliosporer som har en slags utskjutande del på den översta cellen i sporen (se Figur 1) vilket skulle kunna jämföras med en krona (Liu & Hambleton, 2013). *P. coronata* är en värdskiftande patogen vilket innebär att den måste växla mellan två värdar för att kunna genomföra sin livscykel. Detta har länge varit känt och kronrosten växlar mellan olika gräsarter och både getapel, *Rhamnus cathartica*, och brakved, *Rhamnus frangula* (Melhus & Durrel, 1919). Dock finns det inga tydliga bevis för att brakved är mellanvärd för de *formae speciales* av kronrost som angriper havre.

Generellt för rostsvarpar, och som gäller även för *P. coronata*, är att de både tar näring från plantan och förstör bladytan vilket leder till en minskad möjlighet till fotosyntes. Även minskad rottillväxt, ökad respiration och förflyttning av näringsämnen från växten till svampen är faktorer som alla påverkar skördemängd och kvalitet (Agrios, 2004).

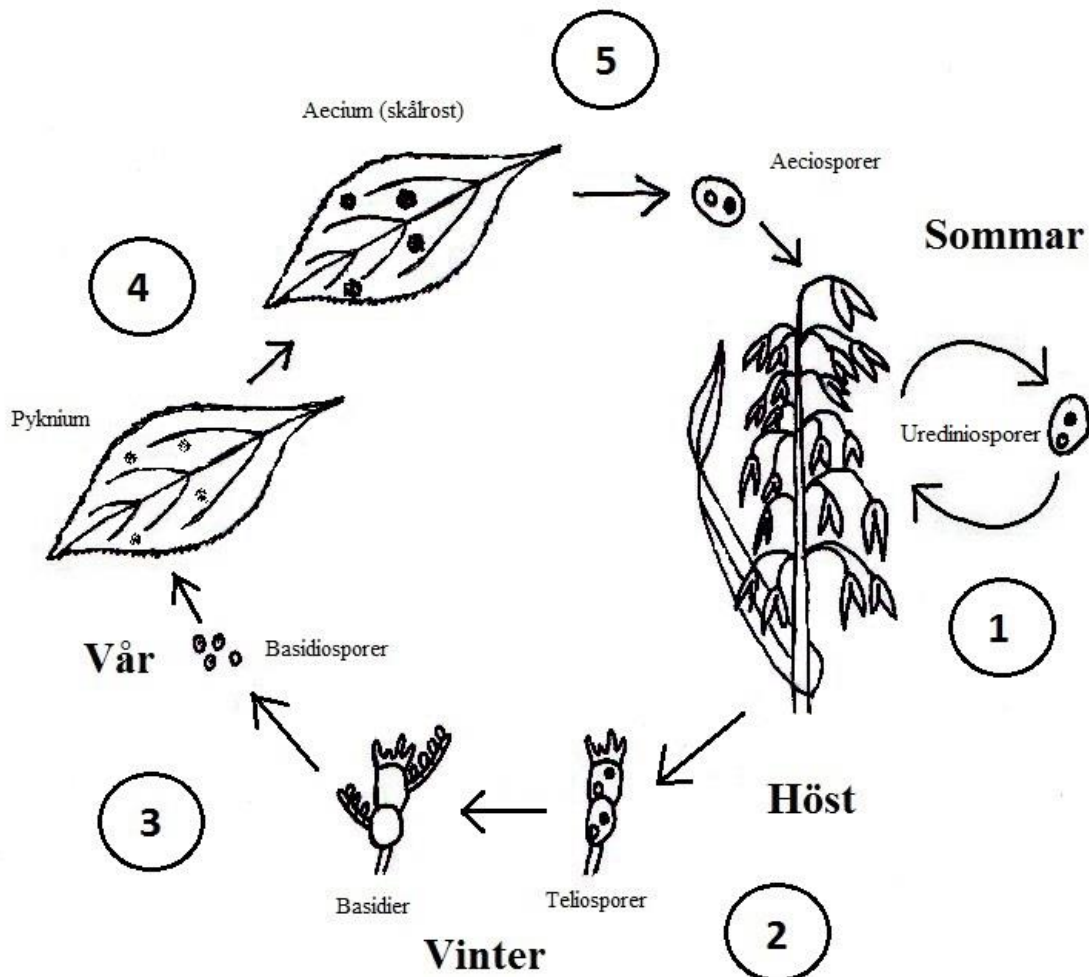
Alla rotsvarpar är obligata parasiter, vilket för rosten innebär att den behöver levande vävnad för att kunna växa och reproducera sig (Agrios, 2004). I kronrostens fall är det dess teliosporer, vintersporer, som kan överleva på vallgräs eller skörderester. Liu & Hambleton (2013) fann att *P. coronata* som angriper havre även angriper vissa vallgräs såsom t.ex. rörsvingel (*Festuca arundinacea*) och engelskt rajgräs, (*Lolium perenne*). Detta förklarar hur kronrosten kan överleva vintern i Sverige antingen på vildvuxna gräs eller i en flerårig vall. Angrepp av kronrost är oftast värst mot slutet av sommaren och därför kan en sen gröda vara extra utsatt (Jordbruksverket, 2012a).

Livscykel

Det är rostens urediniosporer, sommarsporer, som bildar de orangegula pustlarna och också själva sjukdomen. Det är även dessa som bildas i den klonala delen av livscykeln (Wallenhammar, 1998) och bidrar till de stora angreppen under växtsäsongen. Den infekterade plantan ser orangeprickig ut av pustlarna som bildas främst på plantans blad. Genom att reproducera sig klonalt bidrar urediniosporerna till att infektion kan ske om och om igen utan en sexuell förökning (Nagarajan & Singh, 1990). Då teliosporer, vintersporer, utvecklas uppstår en svart kant runt de orangea pustlarna vilket ger kronrosten dess karaktäristiska utseende (Wallenhammar, 1998). Det är lätt hänt att kronrosten förväxlas med svartrost under sommarsporstadiet då båda angrepp är orangegula i färgen (Jordbruksverket, 2012a). Dock sker svartrostangrepp främst på plantans strå och då teliosporer utvecklats är det lättare att särskilja de två rotsvarparna (Wallenhammar, 1998). I teliosporerna sker meiosen, dvs. rekombination, och de sporer som överlevt vintern, antingen på skörderester eller andra gräsarter, gror och bildar så kallade basidier. Dessa sprider i sin tur basidiesporer som ska infektera getapel men sporererna har svårt att transportera sig över längre sträckor så det måste finnas en värd inom en relativ närhet (Elander & Pettersson, 2000). De sporer som lyckas infektera getapel bildar så småningom ett pyknium på bladets ovansida och det är där den sexuella reproduktionen sker via så kallad plasmogami. Därefter tränger hyfer igenom bladet och på undersidan bildas sedan det som kallas skålrost, aecium. Härifrån sprids sedan aeciosporerna som kan infektera havre och andra gräsarter (Wallenhammar, 1998; Elander & Pettersson, 2000).

Spridning

Rostsporer kan färdas stora avstånd med hjälp av både vind, fåglar, bilar och flygplan. Nagarajan & Singh (1990) sammanställde information om möjliga spridningsvägar för rostsporer över hela världen. Här konstateras att stråsådesrost kan färdas långväga till Skandinavien från länder som Marocko i västra delen av Europa och Rumänien eller Turkiet i de östra delarna. Detta bör även kunna gälla för kronrostens sporer. Dock är det troligare att det just i de fallen rör sig om rost som angriper vete då havre inte odlas där i samma utsträckning. Andra exempel på spridning av sporer över extrema avstånd är "Puccinia pathway" i USA där rostsporer, inklusive *P. coronata*, sprids från de södra delarna av landet till de norra där de infekterar havrefält (Dambroski & Carson, 2008). När det nordliga klimatet sedan blir för ogynnsamt i norr kan sporer istället spridas söderut där de kan övervintra (Nagarajan & Singh, 1990). Denna slags vindspridning sker dock oftast successivt genom att fält infekteras på vägen och sedan producerar mer urediniosporer som kan spridas vidare (Elander & Pettersson, 2000).



Figur 1. Livscykel för *P. coronata*. (1) Urediniosporer bildas på havreplantor och producerar i sin tur fler urediniosporer som kan infektera fler plantor. (2) Teliosporer bildas runt pustlarna på havren. (3) Basidier bildas då teliosporerna gror på våren och basidiesporerna infekterar getapel. (4) Pyknium bildas på ovansidan av bladet och det är där den sexuella förökningen slutförs för att sedan övergå till Aecium, skålröst, på undersidan av bladet. (5). Aeciosporer bildas och infekterar havreplantor. Ritat av J. Törngren efter (Elander & Pettersson, 2000).

Kemisk bekämpning

Den kemiska bekämpningen av både svartrost och kronrost sker i dagsläget med liknande preparat (Jordbruksverket, 2012a; b). Däremot sker inte alltid en bekämpning då angreppen ofta anses vara för sena på säsongen för att löna sig. Vissa preparat kan även försena avmognaden hos grödan. Lönsamheten av en kemisk behandling är svår att uppskatta och heller inte alltid garanterad (Mellqvist, 2007) utan måste göras med hänsyn till rådande pris på både havre och bekämpningsmedel. Någon egentlig bekämpningströskel finns inte utan begynnande angrepp gäller som riktvärde för en eventuell behandling och tidpunkten för bekämpning är då vippan precis är framme (Jordbruksverket, 2012a).

Ras och *formae speciales*

P. coronata delas upp i olika *formae speciales*. Denna term definieras som en grupp av raser hos en patogen som endast kan infektera en viss typ av värdväxt (Agrios, 2004). En ras är i sin tur en grupp inom arten som specialiserar sig på en viss typ av värd. I detta fall en grupp av patogener som angriper en viss typ av gröda (Agrios, 2004). Elander & Petterson (2000) sammanställde information om 21 olika f.sp. och dess respektive rapporterade värdväxter. Den f.sp. som angriper havre benämns, *P. coronata* f.sp. *avenae*. Just denna f.sp. har även rapporterats angripa andra gräsarter vilket innebär att havre inte är det enda gräset som rosten potentiellt kan överleva på (Liu & Hambleton, 2013).

Havre (*Avena sativa*)

Under 2014 odlades runt 164 000 hektar havre i Sverige att jämföra med den totala spannmålsproduktionen på ca 1 miljon hektar. Den övervägande andelen odlas i Västra Götalands län där hela 61 000 hektar odlades under 2014. Detta kan jämföras med Västmanlands län som odlar näst mest havre i landet med 14 000 hektar havre under 2014 (Olsson, 2015).

I Sverige sås havre på våren och skördas på sensommaren. Detta innebär att kronrosten måste infektera och reproducera sig under den här perioden eftersom den endast kan överleva och reproducera sig på levande värdplantor. (Jordbruksverket, 2015). I länder som t.ex. Storbritannien odlas även vinterhavre vilket sås på hösten eller vintern och skördas nästkommande höst. Detta ger ett större fönster för infektion under sommaren och även en större chans för rosten att överleva vintern (Impey, 2014). Då kronrost utvecklas relativt sent på säsongen angrips sent mognande havre värst. En viktig åtgärd för att minska rostens framgång är därför att försöka få en tidigt mognande gröda (Jordbruksverket, 2015). I svenska sortförsök finns exempel på sorter som visat på hög motståndskraft mot kronrost. Dessa är främst Cilla, Symphony och Ivory. Av dessa tre är det dock endast Symphony som i sortförsöken gett en avkastning större än referensnivån (Larsson, 2013).

Getapel (*Rhamnus cathartica*)

Getapel är mellanvärd för *P. coronata* f.sp. *avenae*, vilken orsakar kronrost på havre. Eftersom den sexuella reproduktionen hos *P. coronata* slutförs på getapel är den viktig för den genetiska diversiteten hos kronrost (Simons, 1979; Qaderi *et al.*, 2009; Dracatos *et al.*, 2010). Qaderi *et al.* (2009) redogjorde för en rapport där infektion av *P. coronata* inventerades i Ontario, Kanada. Där fann man att nästan alla havrefält som var kraftigt infekterade av kronrost kunde spåras till närliggande populationer av getapel. Även i de fall där endast en, stor buske fanns i närheten var infektionen i närliggande fält ”måttligt-stor”. Vidare såg man att förekomsten av getapel kunde påskynda infektionen av havrefält med upp emot 2-4 veckor, därefter var källan för infektion vindburna urediniosporer söderifrån (Qaderi *et al.*, 2009). Även Wallenhammar (1998) rapporterade att närvaron av getapel bidrog till en tidigare infektion av havrefält. Angreppet ägde då rum innan vippgång, alltså innan DC 51

(Jordbruksverket, 2014b). Sena angrepp kan tänkas ske runt DC 76, dvs. vid mjölkmodnad (Lerenius, 2000). Enligt Berlin (2012) kan, när urediniosporer inte överlever vintern, närvaron av en mellanvärd göra lokala populationer av svartrost mer permanenta. Detta eftersom livscykeln aldrig avbryts. Detta resonemang bör kunna appliceras även på kronrost.

I en rapport från Jordbruksverket (2004) nämns getapel som en av många viktiga arter för bibehållandet av vildbin (solitärbin och humlor) i jordbrukslandskapet. Busken bidrar där både med nektar och pollen till vildbin och andra insekter men även med bär till fågellivet.

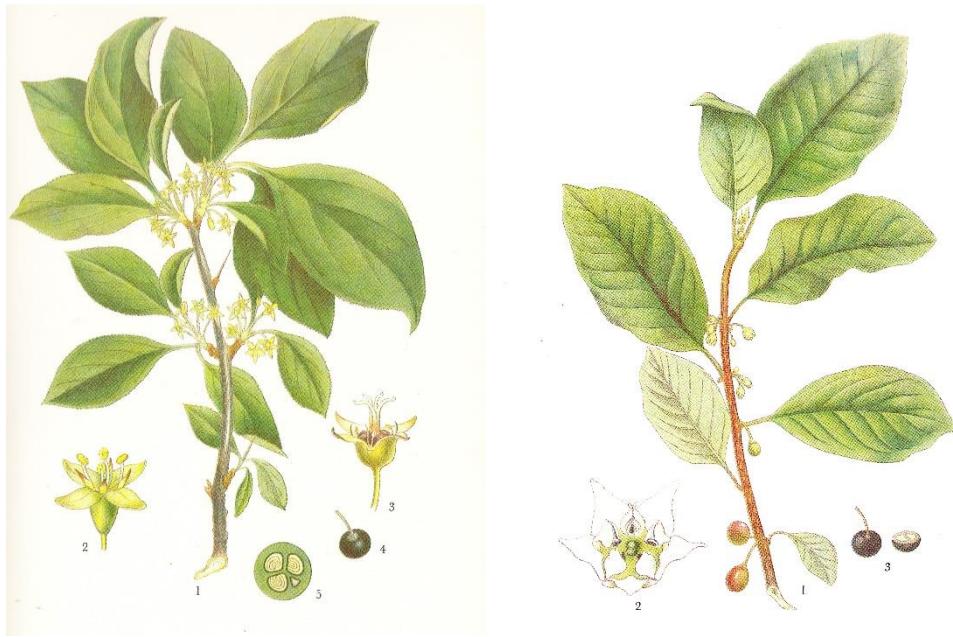


Bild 1. Getapel, *R. cathartica* (Lindman, 1970). Bild 2. Brakved, *R. frangula* (Lindman, 1970).

Populationsbiologi

Populationsbiologi behandlar de processer som påverkar en viss population. Inom växtpatologi är detta intressant eftersom större skador på grödor ofta orsakas av hela populationer av en viss typ av patogen, inte enskilda individer (Macdonald, 2004). Det är därför viktigt att först förstå en organisms populationsbiologi för att sedan kunna bekämpa den. Kopplat till populationsbiologin är också epidemiologin som inom växtpatologin beskriver hur angrepp utvecklas. Fokus ligger på fysiska faktorer såsom hur snabbt populationer blir större och hur de rör sig inom fält, i kronrostens fall via sporer, men även på biologiska processer såsom t.ex. sporproduktion (Macdonald, 2004).

Definition av populationer

Hur en population definieras behöver inte vara helt självklart. Ofta handlar det om individer av samma art inom ett visst geografiskt avgränsat område där en sexuell förökning sker (Freeland *et al.*, 2011). Dock kan det finnas andra faktorer än bara geografiskt avstånd som försvårar fastställandet av olika populationer. Exempel på sådana kan vara att individerna reproducerar sig både sexuellt och asexuellt, dvs. via klonal förökning. Det kan då bli svårt att uppskatta populationens storlek och antalet unika individer. En annan faktor som kan påverka är tiden, då olika individer i en population kan befinna sig i olika stadier i livscykeln kan populationsstorleken feltolkas (Freeland *et al.*, 2011).

Material och metoder

Provtagning

Havreblad infekterade med *P. coronata* insamlades från tre havrefält under augusti månad 2014. Provtagningsplatserna var Ingvasta utanför Uppsala, Gränsbo utanför Sala och Litslena utanför Enköping. Ytterligare en provtagning från fältet i Ingvasta ägde rum redan under sommaren 2009 och samma plats valdes för provtagning även 2014 för att få en tidsaspekt på jämförandet av genotyper (Figur 2).



Figur 2. Sverigekarta över provplatser. (1) Ingvasta 2014; (2) Sala 2014; (3) Enköping 2014; (4) Ingvasta 2009; (5) Klostergården 2009; (6) Söderköping 2009.

Fältet i Ingvasta var 2009 rikligt infekterat. År 2014 var fältet måttligt infekterat men relativt jämnt fördelat över fältet och prover gick att ta i nästan alla provrutor. Provtagningsplatsen utanför Sala var fläckvis måttligt infekterad och vissa provrutor var fria från infektion. I Litslena var infektionen mer begränsad och stora delar av fältet bestod av liggsäd vilket försvårade provtagning avsevärt. I Klostergården 2009 var fältet fläckvis infekterat medan Söderköping saknar data om infektionsgrad.

Provtagning skedde utifrån ett förutbestämt ruttmönster där 3 x 10 punkter provtogs. Avståndet mellan både provrader och provpunkter var 10 m vilket resulterade i ett 300 m² stort provtagningsområde per fält. Vid varje provpunkt togs 1-5 infekterade blad beroende på förekomst. Både uredinio- och teliosporer samlades in eftersom utvecklingen av sjukdomen i de olika fälten var olika långt gången. På vissa provpunkter påträffades inga infekterade plantor och därmed kunde inga prov tas på de punkterna. Blad med pustlar förvarades enskilt i vikta papper för att förhindra kontamination mellan prov.

Mikrosatelliter

DNA extraherades genom att provrör fylldes med 8 stycken 2 mm glaskulor och en knivsudd diatomaceous earth. Tillsammans med 6 cm torkade havreblad placerades en pustel från *P. coronata* sedan i provröret. Då endast en pustel skulle avlägsnas från ett havreblad användes stor försiktighet för att se till att enbart en individ hamnade i provet. Vidare extraktion skedde med hjälp av OmniPrep-kit (Genotech) enligt tillverkarens instruktioner för extraktion av

svamp-DNA. DNA-koncentration mättes med hjälp av spektrofotometri (ND-1000; NanoDrop) och proven spädades därefter utifrån resultatet till en koncentration av 20 ng/μl.

För att kunna konstatera att proverna innehöll DNA från just *Puccinia* spp. utfördes en PCR-reaktion, Polymerase chain reaction, där rosts specifika primrar användes, ITS1rustF10d och StdLSUR2a (Barnes & Szabo, 2007). PCR-reaktionen utfördes med en master-mix där 2 μl DNA-prov blandades med 8 μl mix (Tabell 1). PCR-programmet som användes var denaturering vid 94°C i 5 minuter, 30 cykler med 94°C i 30 sekunder, 55°C i 30 sek, och 72°C i 30 sek och slutligen 72°C i 7 minuter. Syftet med de specifika primrarna var att säkerställa att DNA:t i proverna kommer från rostsvampar. Fyra olika kronrostprover användes tillsammans med en positiv kontroll, i form av *P. coronata*, och en negativ kontroll i form av svartrost, *Puccinia graminis*. Då svart- och kronrost tillhör samma släkte och båda dessutom angriper havre blir detta en mycket lämplig negativ kontroll.

Tabell 1. Master-mix för PCR för att säkerställa DNA från rost. Slutlig koncentration och volym för komponenterna.

Komponent	Koncentration	Volym
H ₂ O	-	4,5 μl
Dream Taq Buffer	-	1,0 μl
dNTP	0,02 mM	1,0 μl
TS1rustF10d (Primer)	0,2 μM	0,4 μl
StdLSUR2a (Primer)	0,2 μM	0,4 μl
MgCl ₂	2,75 mM	0,6 μl
Dream Taq DNA Polymeras	0,05 U/μl	0,1 μl

En elektrofores utfördes på agarosgel för att kunna konstatera att PCR-reaktionen fungerat och att proverna innehöll DNA ifrån *P. coronata*. Då DNA från kronrost påvisades och den negativa kontrollen inte gav resultat kunde det konstateras att proverna var användbara. Därefter testades flera olika mikrosatelliter utvecklade av Dambroski och Carson (2008).

Markörerna delades upp i par för att storleksskillnaden i baspar skulle vara så stor som möjligt och på så vis underlätta en multiplex-reaktion. Detta innebär att två markörer som analyseras samtidigt, i samma provrör, går att analysera utan att resultaten blir otydliga. Fördelen med detta är att det spar både tid och pengar. Markörerna beställdes infärgade med fluorescenserna FAM respektive HEX. Amplifiering av DNA skedde i en PCR-reaktion där 2 μl prov blandades med 7,75 μl PCR-mix, en så kallad master-mix (Tabell 2).

Tabell 2. Master-mix för PCR för mikrosatellitmarkörerna. Slutlig koncentration och volym för komponenterna.

Komponent	Koncentration	Volym
H ₂ O	-	3,5 μl
Phusion HF Buffer	-	2 μl
dNTP 2mM	0,08 mM	0,4 μl
Primer (forward) 10 pmol/μl	0,5 μM	0,25 μl
Primer (reverse) 10 pmol/μl	0,5 μM	0,25 μl
Bovine serum albumin 10 mg/ml	0,2 μg/μL	1 μl
Phusion Hot Start II Polymeras 2 U/μl	0,2 U	0,1 μl

PCR-programmet som användes var denaturering vid 98°C i 5 min, 32 cykler med 98°C i 30 sekunder, 60°C i 30 sek, och 72°C i 30 sek och slutligen 72°C i 10 minuter.

Samtliga prover analyserades med hjälp av kapillär elektrofores på SciLife Lab i Uppsala i en ABI3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems) för att sedan tolkas med hjälp av mjukvaran PeakScanner (Applied Biosystems). I de fall där resultat från fler än fyra mikrosatelliter saknade resultat från ett prov, har det provet tagits bort från analysen.

Analys

För att försöka få klarhet i om det fanns någon och i så fall hur populationsstrukturen såg ut, analyserades resultatet med flera olika analyser. Innan någon analys genomfördes gjordes dock en kontroll där kloner togs bort från datan för att undvika missvisande analyser. En klon är en genotyp med samma allelstorlekar som en annan genotyp, för samtliga loci. För att undvika att vissa alleler blir överrepresenterade tas en av dessa då bort. Denna kontroll gjordes för fyra olika definitioner av populationer: fält, sort, år och alla individer i samma population.

För att utvärdera hur bra de valda mikrosatelliterna var, analyserades om markörerna var i Hardy-Weinberg ekvilibrium (HWE). Alla prov antogs tillhöra en och samma population och därefter beräknades observerad och förväntad heterozygositet, H_o respektive H_e , samt dess standard error, S.E. Även ett Chi-två-test utfördes och detta i syfte att se om markörerna var i Hardy-Weinberg ekvilibrium, HWE. Analyserna utfördes i Genalex 6.501 (Peakall & Smouse, 2006) vilket är en add-in i Excel.

Proven delades sedan upp efter respektive fält och dessa antogs sedan vara enskilda populationer för resterande analyser. Antalet prov (N) dividerat med antalet genotyper (G) kalkylerades och visade hur stor den genotypiska diversiteten var (Tabell 4). Antalet alleler samt allelfrekvens beräknades vilket ger en uppfattning om diversiteten hos proverna. Även här beräknades H_o , och H_e samt deras standardavvikelse.

Den genetiska skillnaden mellan populationerna bedömdes med hjälp av fixation index, F_{IS} , samt AMOVA, Analysis of molecular variance, vilket säger hur den molekylära variationen ter sig mellan och inom populationerna.

F_{IS} -analys användes för att undersöka om klonal, asexuell, förökning sker och indikerar om antalet heterozygoter minskar i antal.

F_{IS} beräknas:

$$F_{IS} = \frac{H_e - H_o}{H_e}$$

där H_e är den förväntade heterozygositeten och H_o är den observerade heterozygositeten för underpopulationen, i det här fallet fält, under HWE.

Jämförelse av parvisa F_{ST} -värden ger en inblick i hur populationerna skiljer sig åt genetiskt. F_{ST} beräknas:

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_e}{H_T}$$

där H_c är densamma som i F_{IS} -ekvationen och H_T är den förväntade heterozygositeten hos den totala populationen, dvs. alla prov i samma population.

Genetiska mönster visualiserades med hjälp av en PCoA (Principal coordinate analysis) vilken baserades på det beräknade genetiska avståndet mellan populationerna

Ett Manteltest (Diniz-Filho *et al.*, 2013) utfördes för att undersöka om den genetiska skillnaden korrelerar med den geografiska skillnaden, det fysiska avståndet. Testet baseras på den beräknade genetiska skillnaden mellan varje prov och utfördes på proven 2009 för sig, respektive 2014 för sig. Samtliga av dessa analyser utfördes med hjälp av Genalex 6.501.

Slutligen undersöktes om det fanns någon populationsstruktur med hjälp av programmet Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000). Populationerna antogs vara i Hardy-Weinberg ekvilibrium och allelerna oberoende av varandra. En "burn-in" på 300 000 iterationer följt av 500 000 iterationer användes. Antalet kluster (K) som testades var 1 till 12 och varje K upprepades tre gånger. Detta visar antalet genotypgrupper som de olika populationerna härstammar ifrån och på så vis vilka som har gemensamma förfäder.

Tabell 3. Egenskaper hos markörer utvalda för studien (Dambroski & Carson, 2008), antalet funna alleler och dess storleksspann i studien.

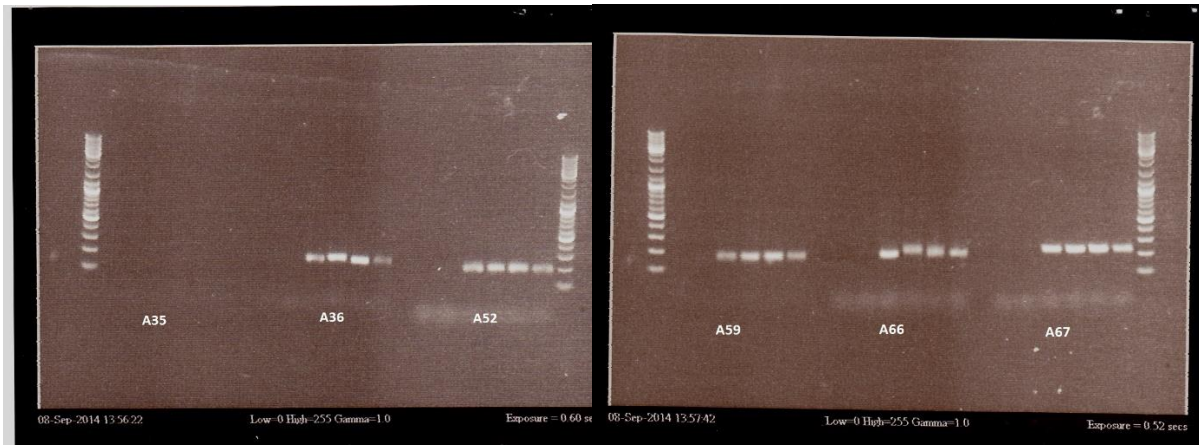
Locus (Genbank #)	Repeats	Primersekvens (5' - 3')	Antal alleler	Storlek (bp)	H _o	H _e	P
PcaSSRA04 (EU056734)	(GA) ₁₈	F: CGGATTGGAGAGTCGGTAGA R: CCTTCAAAGAGGGCACTCAC	7	223–241	0.971	0.734	0.0003
PcaSSRA59 (EU056540)	(CA) ₁₅	F: TTCACAGTCACCCATCAACAA R: TCGAATACTCGTCCGTTTACC	5	143–151	0.914	0.682	0.0034
PcaSSRA66 (EU056541)	(CT) ₁₈	F: TGCTGCTGTACATCCATCGT R: GACCCAGACTGCAAGAGGAA	6	167–191	0.912	0.774	0.0014
PcaSSRA67 (EU056542)	(GT) ₁₂	F: CCACAAGGAGATGAAAGGCTA R: CGAGGGAAGCCGAATACATA	5	188–196	0.771	0.667	0.0002
PcaSSRA73 (EU056543)	(TC) ₉ TGA(TAA) ₄	F: CTTTCAACTCTGTCCGACCA R: TCGAATCGATCGAAAAGGAC	2	150–152	0.000	0.057	0.0155
PcaSSRB02 (EU056546)	(CT) ₁₄ TT(CT) ₆	F: AGAATGCGAGCCAGGACTAA R: ATTGGAGATCGGGCATGATA	3	160–164	0.457	0.430	0.3040
PcaSSRB09 (EU056547)	(CT) ₁₈	F: CCTCTCGTTGTTAGGTTACTCTG R: CCCATCATGAACCACTTCCT	6	145–163	0.943	0.745	0.0000
PcaSSRB25 (EU056553)	(GT) ₁₃	F: CCCCTCCCGAGTCTCTATCT R: ACGGATCATGGAAAATCCAA	5	196–214	0.600	0.523	0.0246
PcaSSRB33 (EU056555)	(GT) ₁₉	F: GTACACCTCGCCGTTGATCT R: GAGGGATGAGCCATCAGGTA	16	189–226	0.848	0.822	0.0000
PcaSSRC26 (EU056563)	(CT) ₁₀	F: CCGAAAACGCTCTCAAGAAG R: AAGGCGAGAGGGAAGAATGT	5	164–196	0.400	0.367	0.6702
PcaSSRC52 (EU056565)	(CT) ₁₃	F: CACCGCTTCTTGTTCAG R: CCCTGGAGTACCGACAGAGA	5	197–207	0.394	0.386	0.0704
PcaSSRC76 (EU056566)	(CA) ₁₇	F: CGCAAGTCTCTGTGTCGTCT R: ACCATCGATGAGTCCAGAAA	9	153–193	0.324	0.734	0.000

H_o, observerad heterozygositet; H_e, förväntad heterozygositet; P, P-värdet från Chi²-test.

Resultat

Mikrosatellitmarkörer

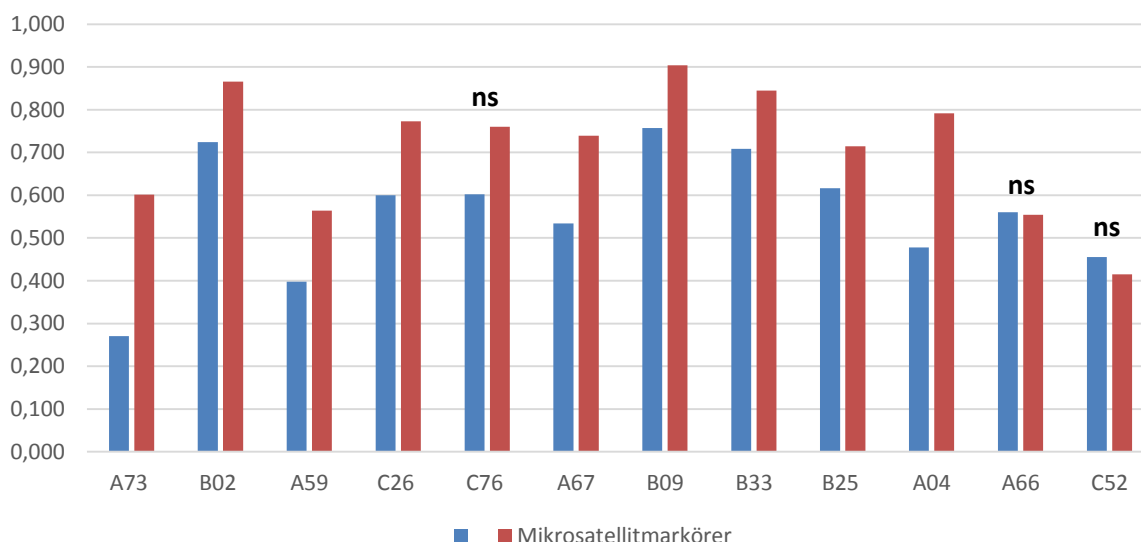
Av totalt 37 markörer gav 26 mer eller mindre tydliga produkter och 12 valdes ut för studien (Tabell 3). Bild 1 och 2 visar resultaten från tester av sex olika markörer. På Bild 1 syns tre markörer testade på 6 prov vardera där primer PcaSSRA35 misslyckats medan PcaSSRA36 och PcaSSRA52 lyckats för fyra av sex prov. Primer PcaSSRA52 användes i studien. På Bild 2 ses positiva resultat för samtliga primrar i fyra av sex prov och dessa tre användes alla i studien.



Figur 3. Del av resultat från agarosgel vid test av olika markörer. Den vänstra bilden visar två av tre potentiella markörer för arbetet medan den högra bilden visar tre av tre. Samtliga primrar testades med sex olika prov, från vänster till höger: negativ kontroll, positiv kontroll och därefter fyra insamlade prover till studien.

Den positiva kontrollen fungerade för de tidigare testade, rosts specifika primrarna (Barnes & Szabo, 2007). Dock fungerade den inte för någon av de utvalda primrarna i huvudstudien (Dambroski & Carson, 2008). Detta kan bero på att provet med den positiva kontrollen kontaminerats eller förstörts på något vis under processens gång. Alternativt att primrarna utvecklade för amerikanska isolat inte fungerar på just detta prov.

För att kunna utvärdera den metod som använts för analys undersöktes om markörerna var i Hardy-Weinberg ekvilibrium (Figur 3). För 10 av de 12 markörerna var den förväntade heterozygositeten, H_e , större än den observerade, H_o . De övriga två, PcaSSRA66 och PcaSSRC52 samt PcaSSRC76 hade ett P-värde över 0.05 och var därför icke-signifikanta, ns. Primrar PcaSSRA73, PcaSSRB02, PcaSSRA59, PcaSSRC26, PcaSSRA67, PcaSSRB09, PcaSSRB33, PcaSSRB25 och PcaSSRA04 var alla i HWE.



Figur 3. Observerad (blå) och förväntad (röd) heterozygositet för utvalda markörer.

Provresultat

Totalt undersöktes DNA ifrån 137 pustlar med 12 olika primerpar, dvs. 12 loci. Vid klonkorrigering hittades inga kloner (dvs. upprepningar av samma multilocus genotyper). Multilocus genotyper skapades genom att lägga samma resultat för varje individ. Då genotyper med fler än fyra saknade allelpar tagits bort från studien återstod 108 prover som användes för alla analyser.

Antalet genotyper dividerat med antalet prov visar att den genotypiska diversiteten är hög då samtliga populationer har ett värde av 1 (Tabell 4) och antalet genotyper var således 108 stycken.

Det totala antalet alleler uppgick till 186 stycken. Antalet alleler per loci varierade mellan 2 och 16 och samtliga loci var polymorfa, vilket också är en förutsättning för att kunna använda mikrosatelliter (Freeland *et al.*, 2011). Ett fåtal alleler dominerar, samtidigt som många unika alleler påträffades i låg frekvens. Den alleliska diversiteten, alltså antalet alleler dividerat med antalet loci, var 15.

Tabell 4 visar olika egenskaper för populationerna, som här delats in efter respektive fält. Antalet prov (N) skiljer sig eftersom det inte påträffades infekterade plantor i samtliga provrutor. Den genomsnittliga observerade heterozygositeten (H_o) var lägre än den förväntade (H_e) för samtliga fält. Standardavvikelsen visade även att värdena var signifikant skilda ifrån varandra.

Tabell 4. Egenskaper för populationer.

<i>Plats</i>	<i>Insamlingsdatum</i>	<i>N</i>	<i>G/N</i>	<i>H_o</i>	<i>S.E</i>	<i>H_e</i>	<i>S.E</i>
<i>Ingvasta, Alunda</i>	2009-08-05	21	1	0,581	0,062	0,691	0,046
<i>Klostergården- Prästgården Dala</i>	2009-08-07	28	1	0,511	0,063	0,680	0,057
<i>Söderköping</i>	2009-08-17	7	1	0,430	0,080	0,638	0,050
<i>Ingvasta, Alunda</i>	2014-08-18	13	1	0,549	0,065	0,631	0,059
<i>Sala, Gränsbo</i>	2014-08-20	20	1	0,601	0,037	0,678	0,036
<i>Enköping, Litslena</i>	2014-08-21	19	1	0,583	0,062	0,653	0,044

N, antal prov; G/N, antal prov genom antalet genotyper; H_o, observerad heterozygositet; S.E, standardavvikelse; H_e, förväntad heterozygositet.

Populationsanalyser

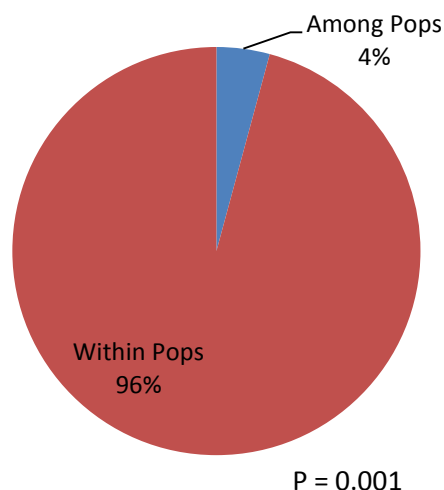
Det finns en liten, men signifikant genetisk skillnad mellan populationerna (Tabell 5). F_{ST}-värden mellan 0-0,05 indikerar låg genetisk variation medan värden mellan 0,05 – 0,25 pekar på måttlig genetisk variation (Freeland *et al.*, 2011). Medelvärden för F_{IS} varierade mellan 0,178 och 0,194.

Tabell 5. F_{ST}-värden under diagonalen och deras signifikans.

	Ingvasta 2014	Sala 2014	Enköping 2014	Ingvasta 2009	Klostergården 2009	Söderköping 2009
Ingvasta 2014		***	***	***	***	**
Sala 2014	0,053		***	***	***	**
Enköping 2014	0,048	0,035		**	***	***
Ingvasta 2009	0,060	0,033	0,019		***	**
Klostergården 2009	0,064	0,049	0,042	0,038		**
Söderköping 2009	0,072	0,039	0,043	0,033	0,020	

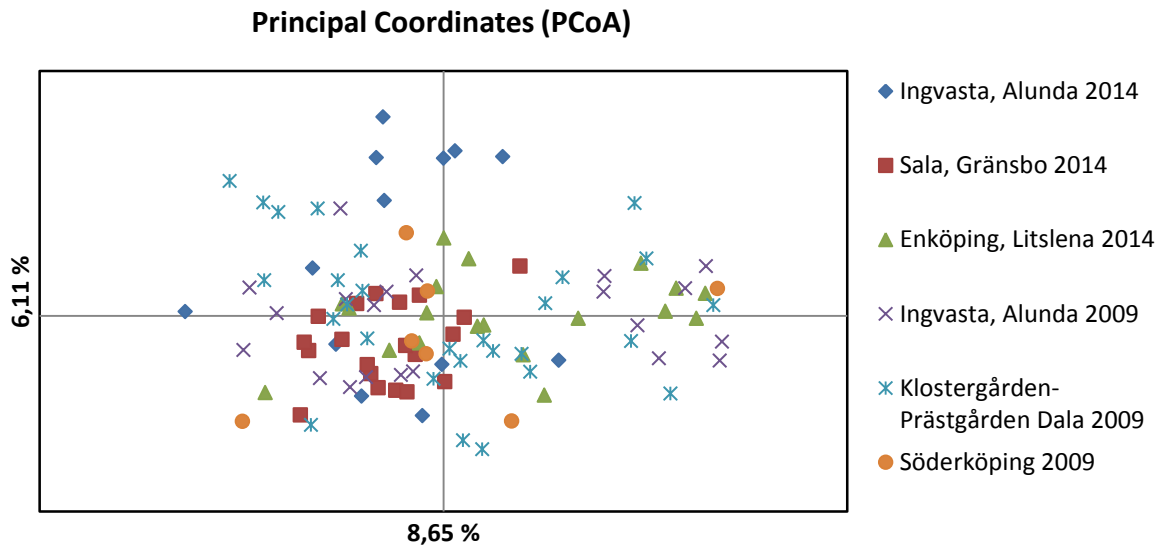
(P < 0,001: ***, P < 0,01: **, P < 0,05)

En AMOVA-analys visade att 96 % av variationen i fält fanns inom populationerna medan endast 4 % variation fanns mellan dem (Figur 4). För både år och sort var endast 2 % av variationen mellan populationer medan 98 % var inom populationerna. P-värde för samtliga AMOVA-analyser var 0,001.



Figur 4. Resultat från AMOVA-test. Variation inom och mellan populationer baserade på fält.

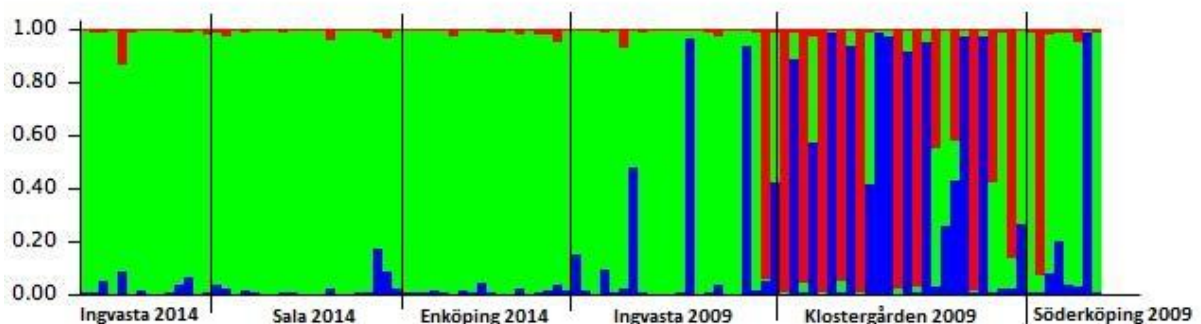
Resultat från PCoA visar att endast 8,65 % av variationen mellan populationerna kunde förklaras av första axeln och 6,11 % av andra axeln (Figur 5). En tendens till differentiering gick att uttyda 2014 för fälten. 2009 års prover visade dock inte på någon tendens till mönster i figuren.



Figur 5. PCoA som visar genetiska mönster mellan populationerna.

Manteltesterna visade att korrelationen mellan det genetiska och geografiska avståndet mellan populationerna år 2009 inte var signifikant ($P = 0,080$), medan det var signifikant för 2014 ($P=0,010$). Detta tyder på att det inte finns något signifikant samband mellan genetiskt och geografiskt avstånd för fälten 2009, men för 2014.

I Structureanalysen var antal kluster (K) med högst sannolikhet 3. Analysen visade gemensamma förfäder för samtliga fält som provtogs 2014. Fältet i Ingvasta hade mellan 2009 och 2014 gått miste om en viss genotypgrupp (blå färg Figur 6). Fältet i Klostergården delade delvis härkomst med resterande fält från 2009 men skiljde sig avsevärt från fälten 2014. En genotypgrupp dominerade tydligt fem av de sex studerade populationerna (grön färg Figur 6).



Figur 6. Structure-analys med prov indelade efter populationer på endast en linje.

Diskussion

Överlag tyder resultaten på att populationerna av *P. coronata* har en mycket stor genetisk diversitet. Det stora antalet unika alleler och genotyper visar på en stor genpool som måste ha skapats via en sexuell reproduktion. Eftersom denna reproduktion slutförs på getapel för kronrost (Simons, 1979; Dracatos *et al.*, 2010) indikerar detta att getapeln finns närvarande i dessa områden och omgivningar. Den höga genotypiska diversiteten (Tabell 4) tyder på att infektionen i fält sker från många, unika individer. Hade istället den genotypiska diversiteten varit låg skulle detta indikerat att ett färre antal individer infekterat fältet för att sedan kunna reproducera sig klonalt.

Det stora antalet alleler samt den relativt jämna fördelningen över alla loci tyder på, inte bara stor genetisk diversitet, utan även att diversiteten är stor i de olika områdena där provtagningen skett. Dock bör det noteras att allelisk diversitet är känsligt för antalet prov som analyseras och inte ett lika säkert mått som H_e (Freeland *et al.*, 2011).

Den genomsnittliga observerade heterozygositeten (H_o) var lägre än den förväntade (H_e) vilket kan tyda på inavel (Tabell 4). Medelvärdena för F_{IS} varierar mellan 0,178 och 0,194 (fält, sort och år) kan dessutom indikera att antalet heterozygoter minskar i antal. Detta kan ske dels via inavel eller genom andra effekter såsom naturligt urval eller till följd av viss struktur hos subpopulationer i en större population, s.k. Wahlund-effekt (Freeland *et al.*, 2011). Trots den stora genetiska diversiteten tyder alltså analyserna på att viss inavel, dvs. förlust av den genetiska variationen, sker. Detta indikerar att lokala populationer förekommer och lokala alleler rekombineras samtidigt som mindre genetiskt material kommer utifrån.

Variationen inom populationerna var betydligt större än mellan populationerna. Detta pekar på att populationerna inte skiljer sig märkvärdigt mellan varken fält, sort eller år. Dock finns en stor variation inom samtliga populationer. PCoA bekräftade att det finns en tendens till populationsstruktur mellan de olika fälten från 2014 (Figur 5) men inte från 2009. Detta kan bero på flera olika faktorer såsom t.ex. provtagningstid eller havresort. Parvisa F_{ST} -värden visade på en liten men signifikant genetisk skillnad mellan populationerna (Tabell 5). Detta stärks av AMOVA-analysen (Figur 4) där endast 4 % av variationen finns mellan olika fälts populationer. Även Structure-analysen (Figur 6) visade att populationerna har ett stort genetiskt samband då man ser till hur genotypgrupperna ser ut. Analysen visade även att det genetiska materialet inom fältet i Ingvasta har förändrats över en femårsperiod. Där det 2009 fanns spår av åtminstone två genotypgrupper fanns 2014 endast en dominerande genotypgrupp kvar. Detta indikerar att en genotypgrupp med större fitness, evolutionär framgång, konkurrerat ut andra grupper från fältet. Dock krävs studier över flera år för att helt säkert kunna dra en sådan slutsats och för att kunna konstatera att det inte bara är någon tillfällighet som orsakat detta under de studerade åren.

Då populationer kan definieras på många olika sätt: fält, sort, år eller alla individer i en och samma population (Freeland *et al.*, 2011), finns alltid risken för feltolkningar i resultaten. Studien har genomförts med antagandet att alla fält är enskilda populationer även om analys på sorter och olika år även har gjorts. Det resultaten pekar på är dock att varje enskilt fält inte nödvändigtvis är en enskild population. Det finns stor genetisk variation inom varje fält men desto mindre mellan dem. Fälten ser ut att ha liknande genotypgrupper som deras förfäder med undantag för Klostergården som skiljde sig från de andra i Structure-analysen. Eftersom fältet ligger i västra delen av landet jämfört med övriga fält som finns i den östra delen (Figur 2) kan detta helt enkelt bero på att populationerna skiljer sig åt mellan västra och östra Sverige. Samtidigt visade manteltestet inget signifikant samband mellan genetisk och geografiskt avstånd för fälten från 2009. Ett litet men betydande samband fanns dock för de provtagna fälten 2014. Detta är tecken på lokala populationer.

För att under analysarbetet kunna konstatera att de insamlade proverna innehöll DNA från rost användes rosts specifika primrar. Dessa gav ett positivt resultat både för den negativa, *P. graminis*, och positiva kontrollen, *P. coronata*. När markörerna sedan skulle testas gav ingen av dessa utslag på varken den negativa eller positiva kontrollen. Att svartrostsporer inte gav något resultat minskar risken för att fel rost analyseras i studien av misstag. Dock hade ett positivt resultat för den positiva kontrollen varit fördelaktigt för att kunna konstatera att det till 100 % rör sig om kronrostsporer. Det negativa resultatet kan bero på att provet kontaminerats eller att fel rost extraherats som positiv kontroll.

Närvaron av kronrostens mellanvärd getapel kan enligt Berlin (2012) göra lokala populationer mer permanenta då livscykeln alltid kan fullföljas. Detta förutsatt att urediniosporer inte kan överleva vintern. Studien behandlar egentligen svartrost och dess mellanvärd berberis men samma antagande bör kunna appliceras för kronrost och getapel. Dock kan vindburna urediniosporer från varmare platser direkt infektera de svenska fälten och detta kan ske i princip när som helst under växtsäsongen om sådana vindar förekommer. Detta skulle i så fall innebära mindre tendenser till lokala populationer.

Sexuellt reproducerande patogener kan enligt (McDonald & Linde, 2002) i större grad konkurrera med nya varieteter av värdväxten. Då den sexuella rekombinationen av genotyper sker bildas nya kombinationer med både högre, och lägre fitness. De genotyper med högst fitness är sedan de som överlever bäst, genom att vara mest aggressiva, och kan på så vis spridas vidare klonalt. För gulrost, *P. striiformis*, antas den klonala förökningen dominera i Sverige och de genotyper som finns är mycket aggressiva. Gulrosten kan överleva i de södra delarna av landet och på så vis infektera fälten redan innan några sexuellt reproducerade sporer spridits. Då sporer från mellanvärd sprids kan dessa få svårt att konkurrera med de redan etablerade, och mer aggressiva sporer som spridits klonalt (Hovmøller *et al.*, 2002; Berlin, 2012).

Avlägsnandet av getapel bör kunna minska användningen av bekämpningsmedel i havre. Eftersom basidiosporerna måste infektera getapel för att kunna fullfölja livscykeln blir detta ett stopp i cykeln. Kronrosten kan därför inte längre angripa havren lika tidigt på säsongen då mängden inokulum minskar kraftigt. Ofta blir kronrostangrepp heller inte så allvarliga eftersom angreppen sker sent på säsongen (Jordbruksverket, 2015), timing är därför viktigt för skadegörarens framgång. Trots det finns alltid risken för vindburna infektion via sporer som blåser in från varmare platser redan tidigt på säsongen. Ett liknande fall är svartrosten vars mellanvärd är berberis, *Berberis vulgaris*. Den sexuella reproduktionen slutförs på busken och detta innebär även att mängden inokulum hos svartrosten ökar då berberisbuskar finns närvarande (Jin, 2011). I Sverige har man därför gjort rekommendationen att avlägsna berberisbuskar i närheten av fält (Djurle & Teikari, 2004). Detta förhindrar dock inte att infektion sker från vindburna sporer som spridits på längre avstånd (Berlin, 2012). Samtidigt finns problematiken med getapel som nyttoväxt i jordbrukslandskapet där den fungerar som en källa till både nektar och bär. Skulle arten försvinna finns risken att många vildbin och fåglar går miste om en viktig födokälla. Däremot finns det ett stort urval av andra växter som möjligtvis kan fylla samma funktion som getapeln (Pettersson *et al.*, 2004). Dessutom bör ett totalt undanröjande av getapel bli omöjligt med tanke på de många naturreservat som finns i Sverige där avverkande av getapel inte lär tillåtas (Naturvårdsverket, 2014).

I slutändan handlar det om den ekonomiska förtjänsten med att avlägsna getapel i områden där havre odlas mycket. Avlägsnas getapel så minskar kronrostens möjlighet att överleva lokalt, svampens genetiska diversitet och på så vis dess chanser att stadigt utvecklas som patogen. Visserligen kan havrefält fortfarande infekteras av vindburna sporer från andra platser (Nagarajan & Singh, 1990) men det krävs att urediniosporerna hittar havrefält på vägen där de kan infektera och producera nya sporer (Elander & Pettersson, 2000). En god förutsättning för en friskare gröda bör alltså vara att sådden inte är alltför sen då rostangreppen tenderar att komma mot slutet av växtsäsongen (Jordbruksverket, 2012a).

I dagsläget finns inga tydliga studier kring de *formae speciales* som angriper brakved och om de även infekterar havre. Om en diskussion kring getapeln och dess eventuella avlägsnande ska kunna föras bör ytterligare forskning göras kring betydelsen av brakved och dess relevans för havreodlingen i Sverige. Risken finns annars att kronrost fortsätter vara lika effektiv som patogen på havre om det visar sig att någon *formae specialis* på brakved även infekterar havre. Den genetiska poolen hos *P. coronata* skulle då kunna fortsätta att diversifieras via en sexuell reproduktion på brakved.

Det vore intressant att utföra samma studie igen efter ytterligare ett femårsintervall för att se hur populationsstrukturen eventuellt förändrats. Det skulle dessutom ge mer underlag för att kunna dra slutsatser angående vad som sker över tid med populationerna.

Slutsatser

Frågeställningar som skulle besvaras i arbetet var:

1. Är getapel viktig för den genetiska variationen av *Puccinia coronata*, svampen som orsakar kronrost på havre, i Sverige?
2. Skiljer sig populationer av *P. coronata* åt i olika delar av mellansverige?
3. Hur skiljer sig populationen åt på ett fält efter en femårsperiod?

Getapel är mycket viktig för att bibehålla och utöka den genetiska variationen av *P. coronata* genom att möjliggöra sexuell reproduktion och fullbordande av livscykel. Avlägsnandet av getapel kring havrefält skulle minska andelen lokalt inokulum och på så vis motverka dess framgång som växtpatogen. Dock endast till en viss grad då vindburna sporer fortfarande kan nå fälten utifrån.

Baserat på data om de olika individernas gemensamma förfäder kan slutsatsen dras att det finns vissa skillnader i olika delar av mellansverige. Samtidigt finns många likheter då det kommer till vilka olika genotyper som finns i fälten i dagsläget. Slutsatsen blir därför ja och nej. Populationerna skiljer sig delvis åt i olika fält vilket indikerar lokala populationer men de är också lika. Migration mellan fält sker antagligen samtidigt som genotyper från lokala getapelindivider infekterar fält i närheten.

I den här studien skilde sig populationen på samma fält åt efter en femårsperiod. Analyser tyder på att en viss genotypgrupp med hög fitness konkurrerat ut andra typer.

För att vara helt säker på att den typ av *formae specialis* som angriper havre inte värdväxlar med brakved bör detta studeras ytterligare innan detta kan uteslutas helt. Detta för att ett eventuellt avlägsnande av getapel inte skall vara förgäves.

Betydelsen av getapel för fåglar och pollinerare bör också utredas vidare för att kunna utesluta att det finns insekter, fåglar eller andra arter som getapeln är livsnödvändig för.

Tackord

Stort tack till alla på Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi som hjälpt mig med laborationsarbetet då det behövts. Ett extra stort tack till min handledare Anna Berlin på SLU för vägledning genom hela arbetets gång, många goda råd och för hjälp med insamling av prover. Tack även till Marcus Eriksson på Hushållningssällskapet i Uppsala, Lina Norrlund på Växtskyddscentralen och Erik Bertholtz, mark/växtagronom för hjälp med att hitta provtagningsplatser.

Referenslista

- Agrios, G. N. (2004). *Plant pathology*. Amsterdam; Boston: Elsevier Academic Press. ISBN 0120445654 9780120445653.
- Barnes, C. W. & Szabo, L. J. (2007). Detection and identification of four common rust pathogens of cereals and grasses using real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 97(6), pp 717–727.
- Berlin, A. (2012). *Population Biology of Puccinia graminis - Implications for the Epidemiology and Control of Stem Rust*. Diss. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet.
- Dambroski, H. R. & Carson, M. L. (2008). Development and characterization of novel, polymorphic microsatellite markers for oat crown rust, *Puccinia coronata*. *Molecular Ecology Resources*, 8(6), pp 1395–1398.
- Diniz-Filho, J. A. F., Soares, T. N., Lima, J. S., Dobrovolski, R., Landeiro, V. L., Telles, M. Rangel, T. F. & Bini, L. M. (2013). Mantel test in population genetics. *Genetics and Molecular Biology*, 36(4), pp 475–485.
- Djurle, A. & Teikari, N. (2004). Faktablad om Växtskydd - Svartrost. Roland Sigvald. Available from: http://www.slu.se/Global/externwebben/nl-fak/ekologi/V%C3%A4xtskydd/faktablad/Faktablad_om_vaxtskydd_122J.pdf. [Accessed 2014-12-17].
- Dracatos, P. M., Cogan, N. O. I., Keane, P. J., Smith, K. F. & Forster, J. W. (2010). Biology and genetics of crown rust disease in ryegrasses. *Crop Science*, 50(5), p 1605.
- Elander, C. & Pettersson, B. (2000). *Puccinia coronata Corda, kronrost på havre och gräs*. Diss. Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för ekologi och växtproduktionslära. Available from: http://www.vaxteko.nu/html/sll/slu/ex_arb_ekologi_vaxtproduktion/EEV17/EEV17.H TM. [Accessed 2014-12-16].
- Freeland, J., Kirk, H. & Petersen, S. (2011). *Molecular ecology* [online]. Chichester, West Sussex, UK; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell. Available from: <http://public.eblib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=792463>. [Accessed 2014-12-06].
- Hovmøller, M. S., Justesen, A. F. & Brown, J. K. M. (2002). Clonality and long-distance migration of *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* in north-west Europe. *Plant Pathology*, 51(1), pp 24–32.
- Impey, L. (2014). Sow your winter oats with care. Available from: <http://www.fwi.co.uk/arable/sow-your-winter-oats-with-care.htm>. [Accessed 2015-02-16].
- Jarne, P. & Lagoda, P. J. L. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(10), pp 424–429.
- Jin, Y. (2011). Role of *Berberis* spp. as alternate hosts in generating new races of *Puccinia graminis* and *P. striiformis*. *Euphytica*, 179(1), pp 105–108.
- Jordbruksverket. *Tjänsten Växtskyddsinfo - Kronrost Havre*. [online] (2012a). Available from: <http://www.jordbruksverket.se/etjanster/etjanster/odling/vaxtskyddsinfo.4.35974d0d12179bec28580002425.html>. [Accessed 2014-12-16].
- Jordbruksverket. *Tjänsten Växtskyddsinfo - Svartrost Havre*. [online] (2012b). Available from: <http://www.jordbruksverket.se/etjanster/etjanster/odling/vaxtskyddsinfo.4.35974d0d12179bec28580002425.html>. [Accessed 2014-12-18].
- Jordbruksverket. *Integrerat växtskydd – IPM*. [online] (2014a). Available from: <http://www.jordbruksverket.se/ipm>.

- Jordbruksverket. *Utvecklingsstadier - stråsåd*. [online] (2014b) (Jordbruksverket). Available from: <http://www.jordbruksverket.se/amnesomraden/odling/jordbruksgrodor/vete/utvecklingsstadier.4.510b667f12d3729f91d80005849.html>. [Accessed 2015-02-16].
- Jordbruksverket. *Skadegörare i havreodling*. [online] (2015-02) (Jordbruksverket). Available from: <http://www.jordbruksverket.se/amnesomraden/odling/jordbruksgrodor/havre/skadegorare.4.3229365112c8a099bd980002530.html>. [Accessed 2015-02-16].
- Larsson, S. (2013). *Sortvalstabeller 2013* [online]. Sortprovningen SLU.
- Lerenius, C. (2000). *Kronrost - erfarenheter från västra Sverige* [online]. Skara.
- Lindman, C. A. (1970). *Bilder ur Nordens Flora*. Stockholm: Wahlström & Widstrand.
- Liu, M. & Hambleton, S. (2013). Laying the foundation for a taxonomic review of *Puccinia coronata* s.l. in a phylogenetic context. *Mycological Progress*, 12(1), pp 63–89.
- McDonald, B. A. (2004). Population genetics of plant pathogens. *The Plant Health Instructor* [online]. Available from: <http://www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/PopGenetics/Pages/default.aspx>. [Accessed 2015-02-24].
- McDonald, B. A. & Linde, C. (2002). Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 40(1), pp 349–379.
- Melhus, I. E. & Durrel, L. W. (1919). *Studies on the crown rust of oats*. Ames, Iowa. (Research Bulletin; No. 49).
- Mellqvist, E. (2007). *Svampsjukdomar i havre* [online]. Skara. (Försöksrapport 2006 för mellansvenska försökssamarbetet).
- Nagarajan, S. & Singh, D. V. (1990). Long-distance dispersion of rust pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 28(1), pp 139–153.
- Naturvårdsverket. *Naturreservat – vanlig och stark skyddsform*. [online] (2014) (Naturvårdsverket). Available from: <http://www.naturvardsverket.se/Var-natur/Skyddad-natur/Naturreservat/>. [Accessed 2014-12-18].
- Olsson, Y. (2015). *Jordbruksmarkens användning 2014* [online]. (JO 10 SM 1501).
- Peakall, R. & Smouse, P. E. (2006). Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6(1), pp 288–295.
- Pettersson, M. W., Cederberg, B. & Nilsson, A. L. (2004). *Grödor och vildbin i Sverige* [online]. Uppsala: Artdatabanken, SLU & Avdelningen för Växtekologi, Uppsala Universitet.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), pp 945–959.
- Qaderi, M. M., Clements, D. R. & Cavers, P. B. (2009). The biology of Canadian weeds. 139. *Rhamnus cathartica* L. *Canadian Journal of Plant Science*, 89(1), pp 169–189.
- Simons, M. D. (1979). Pathogenicity of *Puccinia coronata* from buckthorn and from oats adjacent to and distant from buckthorn. *Phytopathology*, 69(2), p 156.
- Szabo, L. J. & Aime, M. C. *Pucciniales*. [online] (2008-02-21) (Tree of Life web project). Available from: <http://tolweb.org/Pucciniales/51277>. [Accessed 2014-11-25].
- Wallenhammar, A.-C. (1998). Faktablad om Växtskydd - Rostsvampar på stråsåd. Available from: http://pub.epsilon.slu.se/4926/1/Faktablad_om_vaxtskydd_88J.pdf. [Accessed 2014-12-01].