

INSTYTUT AGROFIZYKI
IM. BOHDANA DOBRZAŃSKIEGO
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Dominika Siegieda

OPRACOWANIE METOD DETEKCJI WYBRANYCH
PATOGENÓW OWOCÓW MIĘKKICH Z WYKORZYSTANIEM
TECHNIK BIOLOGII MOLEKULARNEJ

*The development of detection methods for selected soft fruit pathogens using
molecular biology techniques*

Rozprawa doktorska
Doctoral thesis

Rozprawa doktorska przygotowana pod kierunkiem
Promotora: prof. dr hab. Magdaleny Frąc
oraz
Promotora pomocniczego: dra inż. Jacka Panka

Lublin 2022

OŚWIADCZENIE PROMOTORA ROZPRAWY

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

data

podpis promotora rozprawy

OŚWIADCZENIE PROMOTORA POMOCNICZEGO ROZPRAWY

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

data

podpis promotora pomocniczego rozprawy

OŚWIADCZENIA AUTORKI ROZPRAWY

Świadoma odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni.

Oświadczam ponadto, że niniejsza rozprawa doktorska jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Oświadczam również, że w dniu 4 września 2021 zmieniłam nazwisko z Malarczyk na Siegieda.

data

podpis autorki rozprawy

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania mojej promotor,
Pani prof. dr hab. Magdalenie Frąc,
za stawianie adekwatnych wymagań,
nieprzerwaną życzliwość,
wsparcie merytoryczne, na które zawsze mogłam liczyć,
oraz rozbudzenie we mnie, swoim przykładem, pasji do zgłębiania zagadnień naukowych.*

*Podziękowania składam również promotorowi pomocniczemu,
drowi Jackowi Pankowi,
za przekazanie tajników laboratoryjnego warsztatu,
oraz nieustanne inspirowanie
do kreatywnego podejścia w poszukiwaniach rozwiązań problemów naukowych.*



Badania finansowane przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju
w ramach programu BIOSTRATEG
numer umowy BIOSTRATEG3/344433/16/NCBR/2018

Tytuł projektu:

*NOWE ROZWIĄZANIA BIOTECHNOLOGICZNE W DIAGNOSTYCE, ZWALCZANIU
I MONITORINGU KLUCZOWYCH PATOGENÓW GRZYBOWYCH W EKOLOGICZNEJ
UPRAWIE OWOCÓW MIĘKKICH*



Streszczenie

Polska jest jednym z kluczowych producentów truskawki na świecie - w 2020 roku powierzchnia pod uprawę tego owocu zajmowała ponad 30 000 hektarów i była mniejsza jedynie od tej w Chińskiej Republice Ludowej. Polska produkuje niemal 200 000 ton owoców truskawek rocznie, ustępując w Europie jedynie Hiszpanii i plasując się zaraz przed Niemcami. Co warto również zauważyć, Polska jest liderem w produkcji ekologicznej truskawki w Europie i na świecie.

Rolnictwo ekologiczne nabiera w ostatnich latach coraz większego znaczenia - Unia Europejska przedstawiła w 2020 roku strategię 'od pola do stołu' (ang. *Farm to Fork Strategy*), która wchodzi w skład Europejskiego Zielonego Ładu (ang. *European Green Deal*). Strategia ta zakłada znaczne zmniejszenie zużycia chemicznych środków ochrony roślin, w tym fungicydów i pestycydów, przy jednoczesnym zwiększeniu udziału rolnictwa ekologicznego. Należy jednak pamiętać, że ekologiczny sposób produkcji żywności wymaga wykluczenia wielu nawozów mineralnych i środków ochrony roślin, co znacznie utrudnia utrzymanie zdrowej plantacji, jak i wysokich plonów. Dodatkowo, owoce truskawki charakteryzują się delikatną ścianą komórkową, która może być w łatwy sposób spenetrowana przez patogeny, co przyczynia się do obniżenia plonów i ich jakości. Dlatego też, niezbędnym działaniem w rolnictwie jest szybkie i skuteczne monitorowanie upraw pod kątem występowania patogennych mikroorganizmów, w celu użycia wycelowanych działań ochronnych, jeszcze przed rozprzestrzenieniem się chorób na plantacji. Dodatkowo, scharakteryzowanie różnic pomiędzy zdrowymi oraz porażonymi plantacjami, pozwoli na opracowanie skutecznych rozwiązań, w tym biopreparatów oraz strategii produkcji, które mogą zwiększyć zdrowotność i produktywność upraw owoców miękkich w zrównoważony sposób.

Klasyczne metody identyfikacji czynnika patogennego atakującego plantacje owoców, skupiają się głównie wokół rozpoznania objawów chorobowych na roślinach, bądź obserwacji cech morfologicznych czystych szczepów wyizolowanych z porażonych części roślin patogenów na pożywkach mikrobiologicznych oraz pod mikroskopem. Co ważne, identyfikacja czynnika chorobotwórczego przeprowadzona w taki sposób, jest czasochłonna oraz w dużej części przypadków niedokładna i może powodować wdrożenie nieodpowiednich środków ochrony plantacji, co niepotrzebnie obciąża środowisko i jest niekorzystne ekonomicznie.

W niniejszej rozprawie doktorskiej zebrano najważniejsze informacje dotyczące charakterystyki, opracowanych wcześniej, obecnych w światowej literaturze naukowej, metod molekularnej detekcji kluczowych patogenów truskawek - grzybów *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *Verticillium* spp. oraz grzybopodobnych lęgniowców z rodzaju *Phytophthora*, oraz zagrożeń dla rolnictwa i produkcji żywności powodowanych przez te fitopatogeny.

W dalszej części badań zoptymalizowano oraz wykazano przydatność molekularnych metod detekcji wymienionych kluczowych patogenów truskawki w celu rozpoznania czynnika chorobotwórczego na plantacjach ekologicznych. W tym celu opracowano oraz zoptymalizowano metody oparte o techniki łańcuchowej reakcji polimerazy z detekcją w czasie rzeczywistym - real-time Polymerase Chain Reaction (real-time PCR) oraz izotermicznej reakcji amplifikacji wykorzystującej zapętlenie - Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP), do których zaprojektowano sekwencje odpowiednich markerów molekularnych, zoptymalizowano stężenia odczynników reakcji oraz profil temperaturowy, zapewniając

optymalny przebieg reakcji i skuteczną detekcję. Metody te zvalidowano na materiale genetycznym pochodzącym zarówno z czystych szczepów patogenów, wyizolowanych z porażonych części roślin truskawki, jak również na całkowitym DNA wyizolowanym z próbek środowiskowych (gleba, części nadziemne roślin oraz owoce). Dla opracowanej reakcji real-time PCR limit detekcji wynosił 39 fg/ μ L dla patogenów z rodzaju *Botrytis* oraz *Verticillium*, natomiast dla *Colletotrichum* spp. - 156 fg/ μ L. Z kolei limit detekcji opracowanej reakcji LAMP wynosił 3 pg/ μ L dla *Phytophthora* spp. oraz 300 fg/ μ L dla *Phytophthora cactorum*, co świadczy o wysokiej czułości zoptymalizowanych metod.

W kolejnym etapie niniejszych badań wykorzystano również sekwencjonowanie następnej generacji Illumina Sequencing-by-Synthesis (SBS) oraz analizy bioinformatyczne przeprowadzone w językach programowania R, Python oraz C++, które pozwoliły na scharakteryzowanie mykobiomu gleby, ryzosfery, korzeni oraz części nadziemnych truskawki oraz na określenie różnic w strukturze mikroorganizmów grzybowych plantacji zdrowych oraz porażonych.

słowa kluczowe: rolnictwo ekologiczne, metody detekcji fitopatogenów, reakcja łańcuchowa polimerazy z detekcją w czasie rzeczywistym, izotermiczna reakcja polimerazy wykorzystująca zapętlanie, sekwencjonowanie Illumina dzięki syntezie, mykobiom

Abstract

Poland is one of the key strawberry producers in the world - in 2020, the area under cultivation of this fruit occupied over 30,000 hectares in the country and was smaller only than the area in China. Poland produces almost 200,000 tonnes of this fruit annually, second only to Spain and just before Germany. It is also worth noting that Poland is the leader in organic strawberry production in Europe and in the world.

Organic farming is becoming more and more important in recent years - the European Union presented in 2020 the *Farm to Fork Strategy*, which is the heart of the *European Green Deal*. The strategy calls for a significant reduction in the use of chemicals including fungicides and pesticides, while increasing the share of organic farming. However, it should be remembered that the organic way of food production requires the exclusion of many mineral fertilizers and plant protection agents, which makes it much more difficult to maintain a healthy plantation and high yields. In addition, strawberry fruits have a delicate cell wall, which can be easily penetrated by pathogens, which contributes to a decrease in yield and quality of fruits. Therefore, it is essential to monitor the crop quickly and effectively for pathogenic microorganisms in order to use targeted protection measures before the spread of diseases in the plantation. In addition, characterizing the differences of microbiome between healthy and diseased crops will lay a foundation for the development of effective solutions, including biopreparations and production strategies that will increase the health and productivity of soft fruit crops in a sustainable way.

Classical methods of identifying the pathogen that attacks fruit plantations centre mainly around the recognition of disease symptoms on plants, or the observation of morphological characteristics of pure strains of the pathogen isolated from symptomatic plants on microbial media and under a microscope. Importantly, identification of the pathogen carried out in this manner is time-consuming and often inaccurate, and may result in the implementation of inappropriate chemical plant protection products, which unnecessarily burdens the environment and is economically disadvantageous.

In the present doctoral thesis, the most important information concerning characterization, molecular detection methods that were developed so far against key pathogens of strawberry - fungi *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *Verticillium* spp. and fungus-like oomycete *Phytophthora* spp. were collected. Moreover, the thesis includes the international scientific literature review concerning threats to agriculture and food production caused by these phytopathogens.

In the further part of the study, the usefulness of molecular methods of detection of the mentioned key pathogens of strawberry was optimized and demonstrated in order to identify the pathogen in organic plantations. For this purpose, methods based on real-time Polymerase Chain Reaction (real-time PCR) and Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) techniques were developed, for which sequences of appropriate molecular markers were designed, reaction reagent concentrations and temperature profile were optimized, ensuring optimal reaction and efficient detection. The methods were tested on genetic material from both, pure pathogen strains isolated from symptomatic strawberry plants, and total DNA isolated from environmental samples (soil, plant parts and fruits). For the developed real-time PCR reaction, the detection limit was 39 fg/ μ L for the pathogens belonging to the genera of *Botrytis* and *Verticillium*, while for *Colletotrichum* spp. - 156 fg/ μ L. On the other hand, the detection

limit of the developed LAMP reaction was 3 pg/μL for *Phytophthora* spp. and 300 fg/μL for *Phytophthora cactorum*, indicating the high sensitivity of the optimized methods.

In the next stage of the present study, Illumina Sequencing-by-Synthesis (SBS) next-generation sequencing and bioinformatical analyses performed in R, Python and C++ programming languages were also used to characterize the mycobiome of soil, rhizosphere, roots, and shoots of strawberry and to determine differences in the fungal microbial structure of healthy and infested plantations.

keywords: organic farming, phytopathogen detection methods, real-time Polymerase Chain Reaction (real-time PCR), Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP), Illumina Sequencing-by-synthesis (Illumina SBS), mycobiome

Spis symboli.....	- 12 -
Lista publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej	- 14 -
1. Wprowadzenie	- 16 -
1.1. Polska jako producent owoców miękkich.....	- 16 -
1.2. Zagrożenia dla produkcji żywności w rolnictwie ekologicznym.....	- 16 -
1.3. Wybrane metody detekcji patogenicznych mikroorganizmów wykorzystywane w rolnictwie	- 17 -
1.3.1. Reakcja łańcuchowa polimerazy z odczytem w czasie rzeczywistym	- 18 -
1.3.2. Metoda izotermicznej reakcji wykorzystującej zapętlanie	- 21 -
1.4. Sekwencjonowanie markerów molekularnych mikroorganizmów wykorzystywane w rolnictwie	- 23 -
1.4.1. Wysokoprzepustowe sekwencjonowanie poprzez syntezę.....	- 25 -
1.4.2. Wybrane metody bioinformatyczne wykorzystywane w analizie danych sekwencjonowania wysokoprzepustowego	- 27 -
2. Hipotezy badawcze oraz cel rozprawy doktorskiej	- 36 -
3. Omówienie wyników publikacji oraz badań uzupełniających	- 38 -
3.1. Publikacja P.1 (Alternative Molecular-Based Diagnostic Methods of Plant Pathogenic Fungi Affecting Berry Crops—A Review).....	- 38 -
3.2. Publikacja P.2 (Triplex Real-Time PCR Approach for the Detection of Crucial Fungal Berry Pathogens— <i>Botrytis</i> spp., <i>Colletotrichum</i> spp. and <i>Verticillium</i> spp..)	- 41 -
3.2.1. Mikroorganizmy fitopatogeniczne.....	- 41 -
3.2.2. Opracowanie sekwencji starterów oraz sond molekularnych.....	- 42 -
3.2.3. Określenie limitu detekcji reakcji	- 42 -
3.2.4. Detekcja w sztucznie kontaminowanych próbkach	- 42 -
3.2.5. Walidacja reakcji na próbkach środowiskowych.....	- 43 -
3.3. Publikacja P.3 (“Shining a LAMP” (Loop-Mediated Isothermal Amplification) on the Molecular Detection of Phytopathogens <i>Phytophthora</i> spp. and <i>Phytophthora cactorum</i> in Strawberry Fields).....	- 43 -
3.3.1. Uzyskanie czystych izolatów patogenów ze środowiska	- 43 -

3.3.2.	Projektowanie starterów oraz optymalizacja warunków reakcji	44 -
3.3.3.	Limit detekcji	44 -
3.3.4.	Podjęcie kolorymetryczne	44 -
3.3.5.	Walidacja metody na próbkach środowiskowych	45 -
3.4.	Badania uzupełniające (Charakterystyka zbiorowisk mikroorganizmów grzybowych na zdrowych i porażonych plantacjach ekologicznej truskawki)	45 -
3.4.1.	Wstęp	45 -
3.4.2.	Materiały i metody	46 -
3.4.3.	Wstępna charakterystyka wyników sekwencjonowania	48 -
3.4.4.	Alfa oraz beta różnorodność zbiorowisk grzybowych	49 -
3.4.5.	Grupy troficzne	51 -
3.4.6.	Mykobiom rdzeniowy	52 -
3.4.7.	Analiza różnicowej liczebności	53 -
3.4.8.	Sieci grzybowych powiązań w mykobiomie zdrowych i porażonych plantacji truskawki	59 -
3.4.9.	Podsumowanie	61 -
4.	Wnioski	63 -
5.	Teksty publikacji	65 -
5.1.	Publikacja P1	65 -
5.2.	Publikacja P2	90 -
5.2.1.	Tekst publikacji	90 -
5.2.2.	Materiały dodatkowe	107 -
5.3.	Publikacja P3	137 -
5.3.1.	Abstrakt graficzny	137 -
5.3.2.	Tekst publikacji	138 -
5.3.3.	Materiały uzupełniające	153 -
5.4.	Manuskrypt publikacji P4	166 -
5.4.1.	Abstrakt graficzny	166 -

5.4.2.	Tekst manuskryptu P4	- 167 -
5.4.3.	Materiały uzupełniające	- 211 -
6.	Bibliografia	- 232 -
7.	Protokoły.....	- 248 -
7.1.	Protokół izolacji DNA.....	- 248 -
7.2.	Protokół potrójnej detekcji real-time PCR.....	- 250 -
7.3.	Protokół detekcji LAMP	- 251 -
8.	Oświadczenia współautorów	- 252 -
9.	Życiorys naukowy.....	- 259 -

Spis symboli

Skrót	Rozwinięcie w języku angielskim	Polskie tłumaczenie
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	Reakcja łańcuchowa polimerazy
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>	Kwas deoksyrybonukleinowy
RNA	<i>ribonucleic acid</i>	Kwas rybonukleinowy
LAMP	<i>Loop-Mediated Isothermal Amplification</i>	Reakcja polimerazy wykorzystująca zapętlanie
SBS	<i>Sequencing-by-Synthesis</i>	Sekwencjonowanie poprzez syntezę
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>	Sekwencjonowanie następnej generacji
HTS	<i>High Throughput Sequencing</i>	Sekwencjonowanie wysokoprzepustowe
QIIME	<i>Quantitative Insights Into Microbial Ecology</i>	Narzędzie bionformatyczne do ilościowej analizy ekologii mikroorganizmów
dNTP	<i>deoxynucleotide triphosphates</i>	trifosforany deoksynukleotydów
dUTP	<i>deoxyuridine triphosphate</i>	trifosforan deoksyurydyny
dATP	<i>deoxyadenosine triphosphate</i>	trifosforan deoksyadenozyny
dTTP	<i>deoxythymidine triphosphate</i>	trifosforan deoksytymidyny
dGTP	<i>deoxyguanosine triphosphate</i>	trifosforan deoksyguanozyny
dCTP	<i>deoxycytidine triphosphate</i>	trifosforan deoksycytydyny
ddNTP	<i>dideoxynucleotide triphosphates</i>	trifosforany dideoksynukleotydów
ddUTP	<i>dideoxyuridine triphosphate</i>	trifosforan dideoksyurydyny
ddATP	<i>dideoxyadenosine triphosphate</i>	trifosforan dideoksyadenozyny
ddTTP	<i>dideoxythymidine triphosphate</i>	trifosforan dideoksytymidyny
ddGTP	<i>dideoxyguanosine triphosphate</i>	trifosforan dideoksyguanozyny
ddCTP	<i>dideoxycytidine triphosphate</i>	trifosforan dideoksycytydyny
SMRT Sequencing	<i>Single Molecule, Real-Time Sequencing</i>	Sekwencjonowanie pojedynczej cząsteczki w czasie rzeczywistym
ONT	<i>Oxford Nanopore Technologies</i>	Technologie Oxford Nanopore
HNB	<i>Hydroxy naphthol blue</i>	błękit hydroksynaftolowy
ENS	<i>Effective Number of Species</i>	Efektywna liczba gatunków
FRET	<i>Förster Resonance Energy Transfer</i>	bezpromienisty rezonansowy transfer energii
UNG	<i>Uracil N-Glycosylase</i>	Uracyl-N-glikozylaza
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>	polimorfizm pojedynczego nukleotydu
PCoA	<i>Principal Coordinate Analysis</i>	analiza głównych współrzędnych
MDS	<i>multidimensional scaling</i>	skalowanie wielowymiarowe
ASV	<i>Amplicon Sequence Variant</i>	Wariant sekwencji amplikonu
OTU	<i>operating taxonomic units</i>	Operacyjne jednostki taksonomiczne
ROX	<i>carboxyrhodamine</i>	Rodamina B
ALDEx2	<i>Analysis Of Differential Abundance Taking Sample Variation Into Account</i>	Analiza obfitości różnicowej z uwzględnieniem zmienności próbki

MaSLin2	<i>Multivariable Association Discovery in Population-scale Meta-omics Studies</i>	Wielozmiennowe odkrywanie asocjacji w badaniach meta-omicznych w skali populacyjnej
edgeR	<i>Empirical Analysis of Digital Gene Expression Data in R</i>	Empiryczna analiza cyfrowych danych o ekspresji genów w R
ANCOM-BC	<i>Analysis of compositions of microbiomes with bias correction</i>	Analiza składu mikrobiomu z korektą błędu systematycznego
DESeq2	<i>Differential gene expression analysis based on the negative binomial distribution</i>	Analiza różnicowej ekspresji genów w oparciu o negatywny rozkład dwumianowy
ITS1	<i>Internal Transcribed Spacer 1</i>	Pierwsza wewnętrzna sekwencja transkrybowana
ITS2	<i>Internal Transcribed Spacer 2</i>	Druga wewnętrzna sekwencja transkrybowana
PERMANOVA	<i>Permutational multivariate analysis of variance</i>	Permutacyjna wieloczynnikowa analiza wariancji
MDS	<i>Multidimensional scaling</i>	Skalowanie wielowymiarowe
PCoA	<i>Principal Coordinates Analysis</i>	Analiza głównych współrzędnych
NMDS	<i>Nonmetric multidimensional scaling</i>	Niemetryczne skalowanie wielowymiarowe

Lista publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej

Niniejsza rozprawa doktorska oparta jest na cyklu trzech recenzowanych publikacji skupiających się wokół poniższej tematyki:

„Opracowanie metod detekcji wybranych patogenów owoców miękkich z wykorzystaniem technik biologii molekularnej”:

P.1: **Malarczyk D.** (obecnie: Siegieda), Panek J., Frąc M., 2019. Alternative Molecular-Based Diagnostic Methods of Plant Pathogenic Fungi Affecting Berry Crops—A Review. *Molecules* 24, 1200.

Czasopismo umieszczone w bazie ISI Journal Citation Reports,

wskaźnik Impact Factor₂₀₁₉: **3,267**;

5-letni Impact Factor₂₀₂₁: **5,110**;

punktacja MEiN: **140** punktów.

P.2: **Malarczyk D.** (obecnie: Siegieda), Panek J., Frąc M., 2020. Triplex Real-Time PCR Approach for the Detection of Crucial Fungal Berry Pathogens—*Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp.. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 8469.

Czasopismo umieszczone w bazie ISI Journal Citation Reports

wskaźnik Impact Factor₂₀₂₀: **5,924**

5-letni Impact Factor₂₀₂₁: **6,628**

punktacja MEiN: **140** punktów.

P.3: **Siegieda D.**, Panek J., Frąc M., 2021. “Shining a LAMP” (Loop-Mediated Isothermal Amplification) on the Molecular Detection of Phytopathogens *Phytophthora* spp. and *Phytophthora cactorum* in Strawberry Fields. *Pathogens* 10, 1453.

Czasopismo umieszczone w bazie ISI Journal Citation Reports

wskaźnik Impact Factor₂₀₂₁: **4,531**

5-letni Impact Factor₂₀₂₁: **4,580**

punktacja MEiN: **100** punktów.

Uzupełnieniem wyników badań przedstawionych w wymienionych publikacjach jest zastosowanie metody sekwencjonowania wysokoprzepustowego Illumina SBS na platformie

MiSeq oraz opracowanie odpowiednich potoków bioinformatycznych do scharakteryzowania struktury mikroorganizmów grzybowych obecnych w ekologicznych plantacjach truskawek w celu określenia kluczowego mykobiomu różnicującego plantacje zdrowe oraz porażone chorobami. Wyniki zostały przygotowywane do publikacji i przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej jako badania uzupełniające obejmujące manuskrypt publikacji zatytułowanej:

P4: **Siegieda D.**, Panek J., Frąc M., Plant and soil health in organic plantations of strawberry - mycobiome biodiversity, fungal trophic modes and networks.

1. Wprowadzenie

1.1. Polska jako producent owoców miękkich

Polska należy do światowych liderów w produkcji owoców, a w szczególności truskawek ("FAOSTAT" 2022). Ponadto, wciąż rosnący popyt na ekologiczne produkty w Europie doprowadził do sytuacji, w której agroekologia nabiera w naszym kraju coraz większego znaczenia (Sahota 2018). Jednakże, należy pamiętać, że ekologiczny system uprawy roślin, a w szczególności owoców miękkich, wiąże się ze zwiększoną podatnością upraw oraz plonów na choroby powodowane przez patogeniczne mikroorganizmy. Ten problem jest związany z faktem, że w rolnictwie ekologicznym do użytku dopuszczonych jest niewiele środków ochrony roślin o zadowalającej skuteczności (Pylak, Oszust, and Frąc 2020). Dodatkowo, owoce miękkie charakteryzują się delikatną ścianą komórkową oraz faktem, że wzrastają w niewielkiej odległości od wilgotnej gleby, która jest siedliskiem wielu patogenów (Cybulska et al. 2022). W związku z tym, choroby powodowane przez mikroorganizmy patogeniczne należą do podstawowych przyczyn zmniejszenia plonów oraz uzyskiwania plonów o niezadawalającej jakości w rolnictwie na świecie (Dean et al. 2012; Prusky 1996).

1.2. Zagrożenia dla produkcji żywności w rolnictwie ekologicznym

Choroby roślin powodowane przez grzyby i grzybopodobne lęgniowce są jednym z najważniejszych problemów w rolnictwie, powodując straty sięgające nawet aż 50% (Mertely et al. 2007; Prokkoła and Kivijärvi 2007). Problem komplikuje fakt, iż objawy tego typu chorób mogą ujawnić się na plantacji na dowolnym etapie produkcji żywności - od wzrostu na polu, poprzez zbiór, przechowywanie w chłodni, wystawę w sklepie, po znalezienie się na stole konsumenta. Wynika to z faktu, że wzrost grzyba/lęgniowca na owocu rozpoczyna się dopiero w momencie napotkania przez niego odpowiednich warunków do rozwoju. Dlatego też, brak widocznych objawów infekcji na plantacji nie może być gwarancją odpowiedniej jakości plonów, wolnych od chorobotwórczych patogenów. Tradycyjne metody identyfikacji mikroorganizmów, wykorzystujące klasyczne hodowle na podłożach agarowych w płytkach Petriego, są długotrwałe i często niejednoznaczne w interpretacji, ponieważ różne gatunki mikroorganizmów mogą posiadać trudne do rozróżnienia cechy morfologiczne w obserwacjach makro- i mikroskopowych (Arbefeville, Harris, and Ferrieri 2017). Z kolei molekularne metody identyfikacji organizmów charakteryzują się znacznie krótszym czasem niezbędnym do uzyskania wyników oraz większą skutecznością w identyfikacji rodzajowej i gatunkowej. Dodatkowo, takie metody pozwalają na wykrycie patogenicznych mikroorganizmów na długo

przed ujawnieniem się objawów choroby na plantacji (Arbefeville, Harris, and Ferrieri 2017). Tylko szybkie i skuteczne zidentyfikowanie czynnika patogenicznego pozwala na wdrożenie odpowiednich, celowanych środków ochrony roślin, które umożliwiają ograniczenie, a nawet wyeliminowanie strat w produkcji roślinnej.

Opracowanie skutecznych metod detekcji i identyfikacji grzybowych oraz grzybopodobnych patogenów obecnych na plantacjach owoców miękkich jest zgodne z założeniami strategii Komisji Europejskiej „od pola do stołu” (ang. *Farm to Fork Strategy*). Projekt ten został przedstawiony 20 maja 2020 roku i jest jednym z kluczowych działań w ramach Europejskiego Zielonego Ładu (ang. *European Green Deal*) (European Commission 2019). Priorytetem tej strategii jest bezpieczeństwo żywnościowe, które może być osiągnięte dzięki zrównoważonej produkcji żywności, oraz poprzez znaczne ograniczenie stosowania pestycydów, środków przeciwdrobnoustrojowych oraz zwiększeniu produkcji ekologicznej. W celu ograniczenia chorób i strat powodowanych przez fitopatogeniczne mikroorganizmy, a co za tym idzie ograniczenia stosowania chemicznych środków ochrony roślin, niezbędne jest skuteczne wykrywanie i identyfikacja patogenów, które mogą stanowić zagrożenie dla upraw, występujących w danym gospodarstwie.

1.3. Wybrane metody detekcji patogenicznych mikroorganizmów wykorzystywane w rolnictwie

Klasyczne metody identyfikacji patogenów występujących na plantacjach roślin uprawnych opierają się o obserwacje widocznych objawów chorobowych na roślinach, bądź na wyizolowaniu czystego szczepu mikroorganizmu patogenicznego, a następnie przyporządkowanie identyfikacji taksonomicznej uzyskanego izolatu na podstawie cech morfologicznych obserwowanych makro- oraz mikro-skopowo. Niestety, takie metody identyfikacji czynnika patogenicznego na plantacjach są niedokładne, a dodatkowo sposób płytkowy jest długotrwały (trwa nawet do kilku tygodni), ponieważ w celu precyzyjnej identyfikacji konieczne jest uzyskanie zarodników i innych struktur tworzonych przez mikroorganizmy, umożliwiających określenie przynależności rodzajowej lub gatunkowej. Niekiedy hodowla mikroorganizmów musi spełnić pewne specyficzne warunki, aby szczepy mogły wytworzyć konidia, co może powodować dodatkowe niedogodności w pracy laboratoryjnej oraz wydłużenie czasu oczekiwania na identyfikację (Narayanasamy 2011; Larkin, Ristaino, and Campbell 1995; Frąc, Jezierska-Tys, and Yaguchi 2015). Rozpoznawanie objawów infekcji wywoływanych przez patogeniczne grzybowe oraz grzybopodobne mikroorganizmy na ich roślinnych żywicielach może być także wykorzystywane do

identyfikacji patogenu, jednak zdecydowana większość gatunków nie jest specyficzna dla gospodarza, a rośliny mogą być zasiedlane przez wiele różnych patogenów, wywołujących podobne objawy chorobowe. Brak specyficznego żywiciela i różnice w objawach między roślinami występującymi na różnych szerokościach geograficznych sprawiają, że jednoznaczna identyfikacja na podstawie jedynie morfologii jest bardzo trudna, lub wręcz niemożliwa. Ponadto, interpretacja morfologii patogenu jest subiektywna i w dużym stopniu zależy od doświadczenia danego specjalisty. Czynniki ludzkie mogą prowadzić do niewłaściwej identyfikacji patogenu, powodując błędne i wręcz szkodliwe działania w zakresie ochrony roślin.

W ostatnich latach molekularne metody detekcji są coraz chętniej wykorzystywane przez badaczy w wielu dziedzinach. Są one również szeroko stosowane w celu identyfikacji chorób powodowanych przez grzybowe oraz grzybopodobne mikroorganizmy, a także w celu charakterystyki i opisu populacji patogenów występujących w danym środowisku. Identyfikacja mikroorganizmów chorobotwórczych jest faktycznie dokładniejsza w przypadku zastosowania markerów molekularnych, w porównaniu do identyfikacji wykonanej jedynie na podstawie cech morfologicznych podczas obserwacji makro- i mikro-skopowych (Arbefeville, Harris, and Ferrieri 2017; Panek and Frąc 2018). Co więcej, zoptymalizowane molekularne metody detekcji mogą być stosowane przez personel laboratoryjny bez specjalistycznej wiedzy taksonomicznej, co znacznie ogranicza wpływ czynnika ludzkiego na interpretację uzyskanych wyników (Capote et al. 2012).

1.3.1. Reakcja łańcuchowa polimerazy z odczytem w czasie rzeczywistym

Łańcuchowa reakcja polimerazy z detekcją w czasie rzeczywistym (real-time PCR) jest zmodyfikowaną techniką opartą na jednej z podstawowych i najczęściej wykorzystywanych metod detekcji patogenów - łańcuchowej reakcji polimerazy (*ang.* Polymerase Chain Reaction). Real-time PCR umożliwia dodatkowo obserwację wyników amplifikacji w czasie rzeczywistym oraz ilościowe oznaczenie materiału genetycznego w próbce (Higuchi et al. 1992, 1993). Ta reakcja ma wiele zalet w porównaniu z klasyczną metodą PCR. Real-time PCR nie wymaga dodatkowej elektroforezy po zakończeniu reakcji w celu odczytania wyniku detekcji, ponieważ zastosowane w niej techniki umożliwiają obserwację przyrostu intensywności sygnału fluorescencyjnego, który jest proporcjonalny do ilości amplifikowanego DNA, co pozwala na pośredni odczyt wyników detekcji i natychmiastową ocenę występowania patogenów w danej próbce. Technika real-time PCR pozwala również na jednoczesną analizę 96, a nawet 384 próbek, ponieważ może być przeprowadzana na płytkach wielodołkowych

(Capote et al. 2012). Co więcej, użycie wielu sond fluoroscencyjnych typu hydrolitycznego w jednej mieszaninie reakcyjnej pozwala na jednoczesne wykrywanie kilku różnych patogenów w tym samym czasie (Livak et al. 1995; Malarczyk, Panek, and Frąc 2020), co dodatkowo ułatwia oraz poszerza diagnostykę i skraca czas uzyskania wyników detekcji wielu różnych patogenów w jednej próbce. Co ważne, porównanie klasycznej metody PCR z real-time PCR przeprowadzone w 2009 roku wykazało, że reakcja real-time PCR jest 100 razy bardziej czuła w porównaniu z PCR, w przypadku gdy zastosowano tę metodę do identyfikacji roślinnych grzybów patogenicznych na owocach truskawki (Garrido et al. 2009).

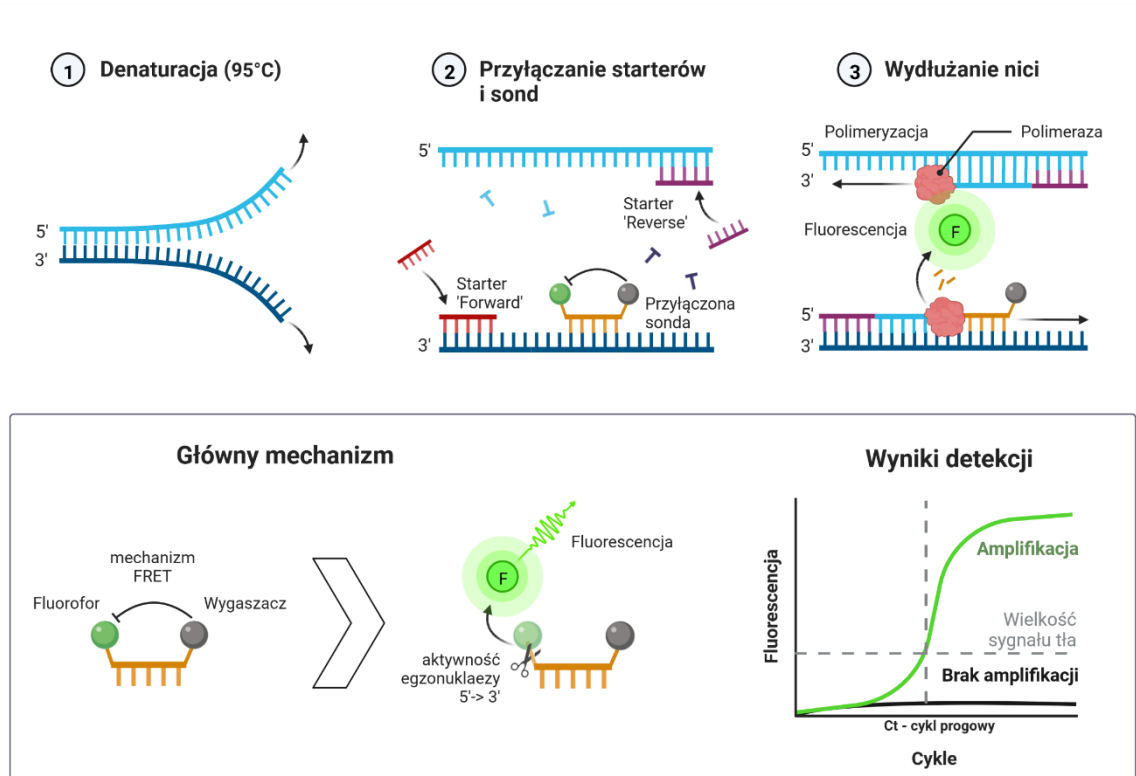
Do techniki real-time PCR wykorzystywana jest mieszanina reakcyjna składników używanych w klasycznej metodzie PCR takich jak: polimeraza DNA, trifosforany deoksyrybonukleozydów (dTTP, dATP, dCTP, dGTP), bufor 10-20 mM Tris-HCl oraz jedno- i dwuwartościowe kationy 50 mM K^+/Na^+ , 1-4 mM Mg^{2+} , jednoniciowa matryca DNA oraz startery oligonukleotydowe (van Pelt-Verkuil, van Belkum, and Hays 2008; Saiki et al. 1988).

Dodatek barwnika fluorescencyjnego bądź specyficznych sond molekularnych z przyłączonymi fluoroforami, które są dodatkowo stosowane w metodzie real-time PCR, pozwala na detekcję produktu reakcji w czasie rzeczywistym. Barwniki fluorescencyjne, które wiążą się do mniejszej bruzdy dwuniciowej helisy DNA (np. SYBR Green, EVA Green) podczas trwania reakcji amplifikacji, mają wielokrotnie większą fluorescencję niż wolny barwnik zawieszony w roztworze (Higuchi et al. 1993, 1992; Schena et al. 2004; Ginzinger 2002). Natomiast sondy molekularne posiadają w swojej strukturze fluorofory oraz wygaszacz, który na drodze FRET wytłumia fluorescencję fluoroforów. Podczas amplifikacji produktów reakcji, polimeraza DNA hydrolizuje sondy molekularne przyłączone do komplementarnego fragmentu amplifikowanego DNA, na skutek aktywności egzonukleazy $5' \rightarrow 3'$, co powoduje zwiększenie odległości pomiędzy fluoroforem a wygaszaczem, a w rezultacie emisję fluorescencji, która jest proporcjonalna do ilości produktu reakcji w mieszaninie reakcyjnej (Förster 1948; Mackay 2004).

Niektóre termocyklery typu real-time, w tym używany w badaniach w niniejszej rozprawie Applied Biosystems 7500 Fast, wymagają dodatku barwnika referencyjnego ROX, który nie zakłóca reakcji amplifikacji, a kompensuje fluktuacje fluorescencji pomiędzy dołkami, wynikające z niedokładności pipet, końcówek do pipet, czy błędu ludzkiego.

Kolejną możliwą modyfikacją reakcji real-time PCR jest użycie mieszaniny reakcyjnej zawierającej dUTP (trifosforan deoksyurydyny), zastępujących częściowo dTTP. Pozwala to na użycie dodatkowego enzymu UNG (uracyl N-glikozylazy), aby zapobiec przenoszeniu zanieczyszczeń z poprzednich reakcji. Enzym ten degraduje zanieczyszczenia w postaci

produktów poprzednich reakcji amplifikacji, poprzez katalizowanie uwalniania uracylu z pojedynczych oraz podwójnych nici DNA, co sprawia, że te fragmenty są podatne na hydrolizę w podwyższonej temperaturze początkowej denaturacji reakcji PCR, w której to enzym jest także inaktywowany.



Rysunek 1. Schematyczny przebieg reakcji real-time PCR, mechanizm fluorescencji sondy molekularnej oraz przykładowy wykres wyników detekcji. Schemat przygotowany z wykorzystaniem oprogramowania BioRender.

Przebieg typowej reakcji PCR składa się z powtarzalnych cykli, o ściśle określonym profilu temperaturowym w każdym z wymienionych etapów trwania reakcji (Rys. 1):

- denaturacja (topnienie) - rozdzielanie podwójnej helisy DNA, które następuje w temperaturze powyżej 80°C, kiedy to wiązania wodorowe pomiędzy nukleotydami ulegają rozpadowi (Breslauer et al. 1986; SantaLucia, Allawi, and Seneviratne 1996);
- annealing (przyłączenie) - hybrydacja starterów oligonukleotydowych, specyficznych do jednoniciowej matrycy DNA, zachodząca w ściśle określonej temperaturze dla danej pary starterów (Owczarzy et al. 1997; Breslauer et al. 1986; Allawi and SantaLucia 1997);
- elongacja (wydłużanie) - synteza dwuniciowego DNA przeprowadzana dzięki polimerazie DNA, czas tego etapu jest zależny od długości amplifikowanego fragmentu, zaś temperatura - od zastosowanej polimerazy (Chien, Edgar, and Trela 1976; Lawyer et al. 1993).

Odczyt fluorescencji w reakcji real-time PCR odbywa się po każdym cyklu reakcji, a jej intensywność jest wprost proporcjonalna do stężenia produktu reakcji w próbce, które w idealnych warunkach podwaja się po każdym cyklu. W początkowych cyklach reakcji sygnał fluorescencji sond lub barwników przyłączonych do produktów reakcji jest niższy niż tło (fluorescencja sondy przyłączonej do sondy lub barwnika zawieszonego w mieszaninie). Dopiero po kilku bądź kilkunastu cyklach reakcji, fluorescencja produktów jest większa od sygnału tła i może być odczytana, a cykl, w którym to następuje, jest nazywany cyklem progowym (Ct). Podstawa do obliczenia wartości Ct różni się w zależności od producenta oprogramowania termocyklera, lecz zwykle opiera się o maksimum drugiej pochodnej funkcji zależności fluorescencji od cyklu reakcji (Ginzinger 2002; Mackay 2004).

1.3.2. Metoda izotermicznej reakcji wykorzystującej zapętlenie

Kolejną metodą wykorzystującą polimerazę DNA, która jest używana do detekcji patogenów występujących w uprawach roślinnych jest izotermiczna amplifikacja wykorzystująca zapętlenie (Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP). Do amplifikacji specyficznych fragmentów DNA wykorzystuje się modyfikowaną polimerazę z aktywnością zamiany nici oraz dwie do trzech par specyficznych starterów oligonukleotydowych (Notomi et al. 2000). LAMP charakteryzuje się czterema głównymi zaletami w porównaniu z innymi technikami molekularnymi stosowanymi do wykrywania patogenów:

- reakcja przebiega w stałej temperaturze i nie wymaga drogiego termocyklera, a do przeprowadzenia detekcji wystarczające jest użycie prostego termobloku;
- w celu wizualizacji wyników reakcji i obserwacji bez specjalistycznego sprzętu ('gołym okiem') możliwe jest dodanie do mieszaniny reakcyjnej barwnika fluorescencyjnego takiego jak SYBR Green lub błękit hydroksy naftolowy (HNB) (Siegieda, Panek, and Frąc 2021);
- LAMP jest 10-100 razy bardziej czuły niż klasyczny PCR (Tomlinson, Dickinson, and Boonham 2010) i wymaga mniejszych ilości wejściowego DNA;
- reakcja jest mało wrażliwa na inhibitory (Kaneko et al. 2007).

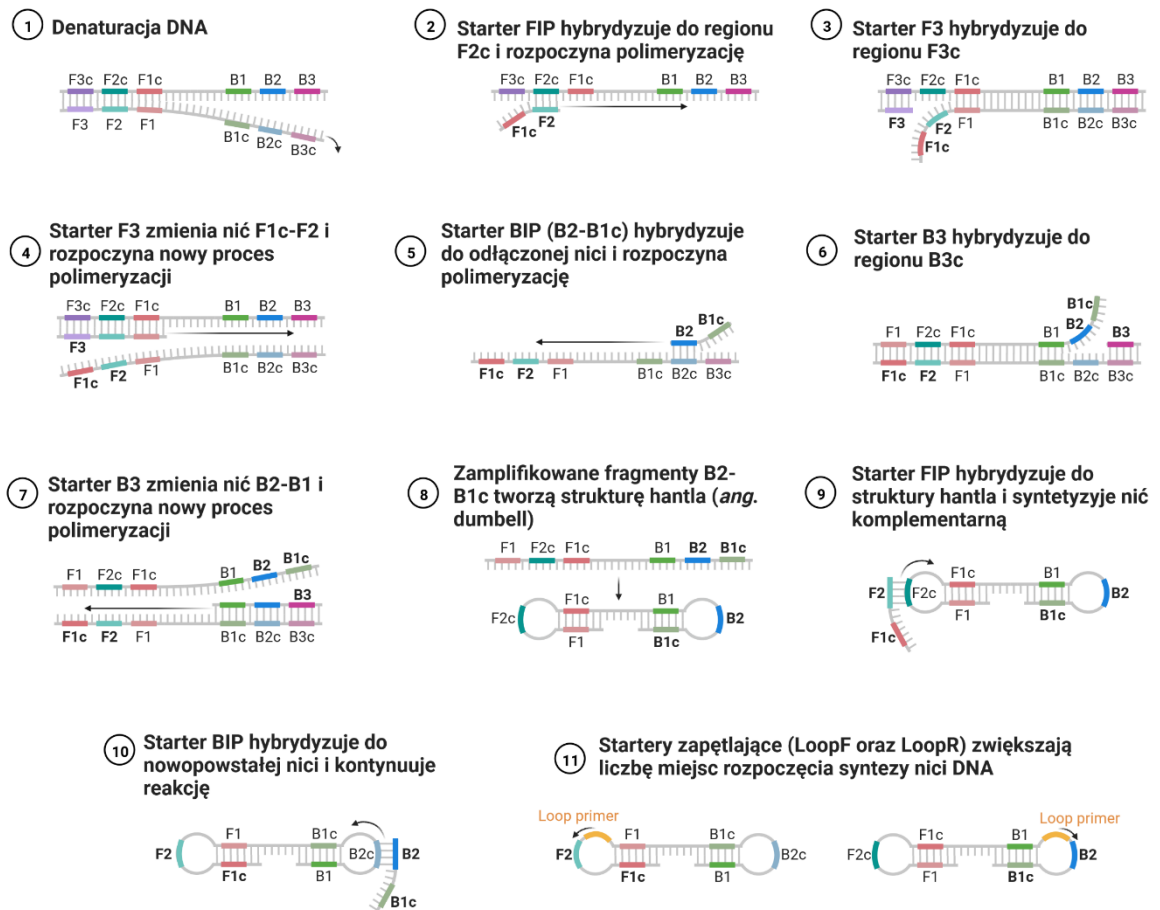
Z drugiej strony, główną wadą tej techniki jest fakt, że zaprojektowanie sekwencji starterów jest skomplikowane, co ogranicza opracowanie i optymalizację metody dla konkretnego patogenu tylko do specjalistów (Le and Vu 2017). Dodatkowo, metoda ta jest mniej uniwersalna niż PCR - produkt reakcji nie może być bezpośrednio zsekwencjonowany, a projektowanie reakcji detekcji dla wielu różnych patogenów (reakcja typu multiplex) jest znacząco utrudnione. Niemniej, technika ta może być z łatwością wykorzystywana przez osoby

niebędące biologami molekularnymi. O przydatności tej techniki świadczy również fakt, że dzięki zastosowaniu prostego termobloku i barwnika fluorescencyjnego, test ten można stosować poza dobrze wyposażonym laboratorium, w tym także w warunkach terenowych (Wilisiani et al. 2019). Metoda LAMP jest wysoce specyficzna dzięki obecności większej liczby starterów niż w przypadku klasycznego PCR, co sprawia, że reakcja jest niewrażliwa na zanieczyszczenie niespecyficznym DNA (Notomi et al. 2000). LAMP może być weryfikowany bezpośrednio poprzez badanie zmiany koloru próbek lub poprzez elektroforezę (Capote et al. 2012), a reakcja nie zawsze wymaga izolacji DNA i może być wykonywana bezpośrednio z próbki środowiskowej (Francois et al. 2011).

Reakcja LAMP zachodzi w stałych warunkach temperaturowych, wynoszących około 65°C, a amplifikacja zachodzi dzięki użyciu 3 par starterów:

- F3 (Forward Primer) oraz B3 (Backward Primer) są komplementarne do zewnętrznych fragmentów markera;
- FIP (Forward Inner Primer) oraz BIP (Backward Inner Primer) są komplementarne do dwóch odległych miejsc markera na nici sensownej i antysensownej;
- LoopF oraz LoopB są komplementarne do regionów struktury startowej pomiędzy regionami F1 i F2 oraz B1 i B2.

Schematyczny przebieg reakcji LAMP przedstawia Rysunek 2.



Rysunek 2. Przebieg reakcji LAMP. Schemat przygotowany z wykorzystaniem oprogramowania BioRender.

1.4. Sekwencjonowanie markerów molekularnych mikroorganizmów wykorzystywane w rolnictwie

Sekwencjonowanie materiału genetycznego mikroorganizmów patogenicznych jest wykorzystywane w rolnictwie najczęściej do jednoznacznej identyfikacji czynnika patogenicznego, powodującego straty na plantacjach. Popularyzacja tego typu metod nastąpiła wraz ze zautomatyzowaniem sekwencjonowania metodą Sangera. Zwykle, identyfikacja taksonomiczna z wykorzystaniem markerów genetycznych jest przeprowadzana po uprzednim pozyskaniu czystego szczepu mikroorganizmu z porażonej rośliny oraz zamplifikowaniu specyficznego identyfikacyjnego markera genetycznego. Następnie, tak otrzymana sekwencja jest porównywana z sekwencjami tego markera obecnymi w bazach bioinformatycznych, co pozwala na skuteczną identyfikację czynnika chorobotwórczego. Taka metoda identyfikacji jest bardziej skuteczna od tych opartych o cechy morfologiczne szczepu, jednak nie pozwala na rozpoznanie dużej części mikroorganizmów, których izolacja na podłożach mikrobiologicznych i hodowla w warunkach laboratoryjnych nie jest możliwa (Arbefeville, Harris, and Ferrieri 2017). Dlatego też, wraz z rozwojem technik pozwalających na

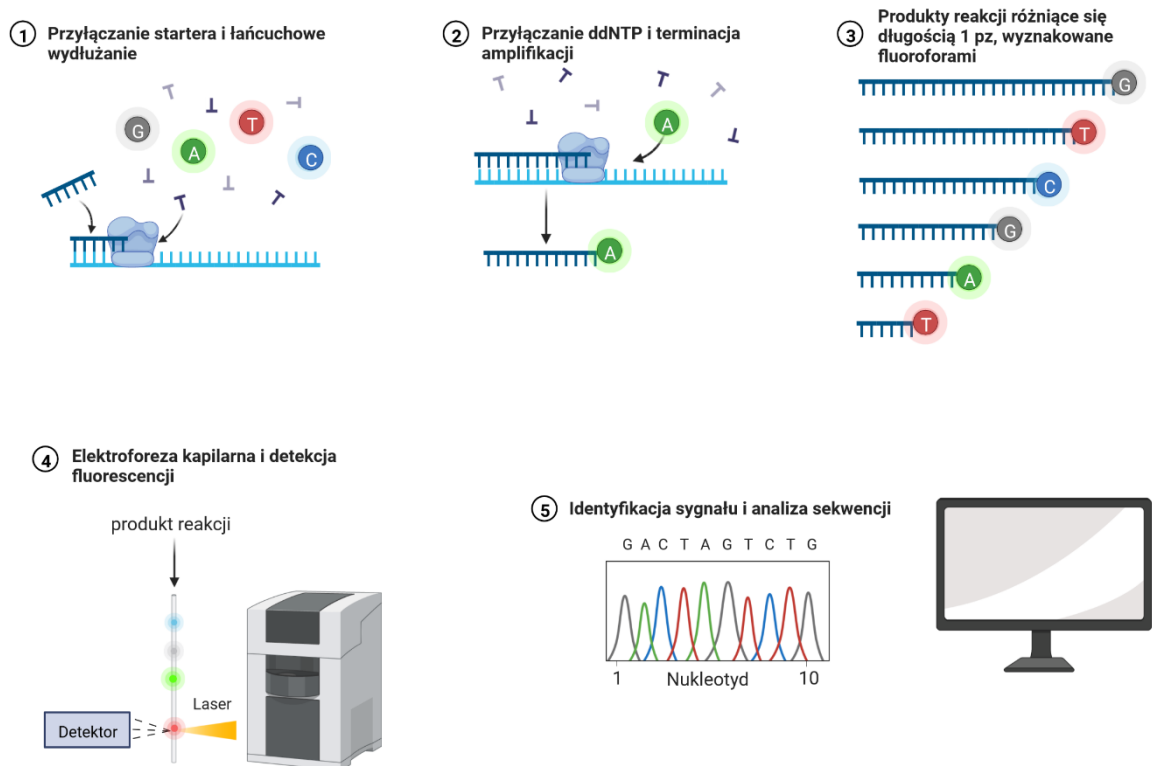
zwielokrotnienie odczytów sekwencji, techniki te są coraz chętniej wykorzystywane do analizy struktury mikroorganizmów w próbkach środowiskowych. Jedną z szeroko wykorzystywanych metod takiego sekwencjonowania, nazywanego często sekwencjonowaniem drugiej generacji, jest metoda Illumina SBS (ang. *Sequencing-by-Synthesis*), która pozwala na otrzymywanie setek tysięcy sekwencji markerów genetycznych w jednej reakcji i dziesiątek tysięcy sekwencji z jednej próbki, co pozwala, po analizach bioinformatycznych, na scharakteryzowanie całego mikrobiomu obecnego w danej próbce. Jednak metoda ta umożliwia odczytywanie jedynie relatywnie krótkich fragmentów materiału genetycznego (technicznie do 2x300 pz, w praktyce do 500 pz), co umożliwia sekwencjonowanie jedynie fragmentów markerów molekularnych (Kulski 2016; Schmidt et al. 2013) i nie pozwala na jednoznaczną identyfikację mikroorganizmów do poziomu gatunku.

Ciągłe doskonalenie i rozwój technik biologii molekularnej pozwolił w ostatnim czasie na rozwój sekwencjonowania trzeciej generacji, do którego należą technologia Oxford Nanopore Technologies (ONT) (Kong et al. 2021) oraz Single Molecule, Real-Time (SMRT) Sequencing (Sekwencjonowanie pojedynczych cząsteczek w czasie rzeczywistym) wdrożone przez PacBio (Dirks and Jackson 2020). Technologie te umożliwiają odczytywanie wielokrotnie dłuższych sekwencji materiału genetycznego niż metody pierwszej oraz drugiej generacji, co pozwala na poznawanie całych sekwencji genów markerowych, a nie jedynie ich fragmentów, dopuszcza dokładniejszą identyfikację mikroorganizmów grzybowych oraz bakteryjnych obecnych w próbkach, nawet do poziomu gatunku. Co ważne, dodatkowo metoda PacBio HiFi Reads, która odczytuje dany łańcuch DNA wielokrotnie dzięki jego zapętleniu, pozwala na rozróżnianie pojedynczych SNP w sekwencji markera (Graf et al. 2021).

Sekwencjonowanie z wykorzystaniem terminacji łańcucha

Sekwencjonowanie metodą Sanger'a zostało opracowane w 1977 roku (Sanger, Nicklen, and Coulson 1977), a po usprawnieniach i automatyzacji jest z powodzeniem wykorzystywane do dzisiaj do celów taksonomicznych, filogenetycznych, diagnostycznych, czy do wykrywania mutacji w materiale genetycznym. Metoda ta opiera się na klasycznej metodzie PCR z wykorzystaniem tylko jednego startera oligonukleotydowego, a przebiega w mieszaninie reakcyjnej zawierającej trifosforany deoksyrybonukleozydów (dNTP) i znakowane fluorescencyjnie trifosforany dideoksyrybonukleozydów (ddNTP), oraz polimerazę umożliwiającą wykorzystanie ddNTP jako substratu reakcji, które przyłączając się do nici DNA, terminują powstawanie produktu. Produkty powstające w wyniku reakcji sekwencjonowania różnią się długością 1 pary zasad, a każdy z 4 rodzajów ddNTP jest wyznakowany innym fluoroforem, który posiada maksimum emisji fluorescencji przy innej

długości fali, co pozwala na rozpoznanie deoskrybonukleotydu oraz na odczyt sekwencji markera po przeprowadzonej elektroforezie kapilarnej w środowisku denaturującego polimeru i wzbudzeniu laserem (Kieleczawa 2006). Oprogramowanie sekwenatora, *basecaller*, pozwala na identyfikację sygnału jako poszczególne deoskrybonukleotydy i złożenie sekwencji markera. Następnie, taka nowo odczytana sekwencja może być porównana z sekwencjami zdeponowanymi w bazach bioinformatycznych, co pozwala na identyfikację mikroorganizmu (Rysunek 3).

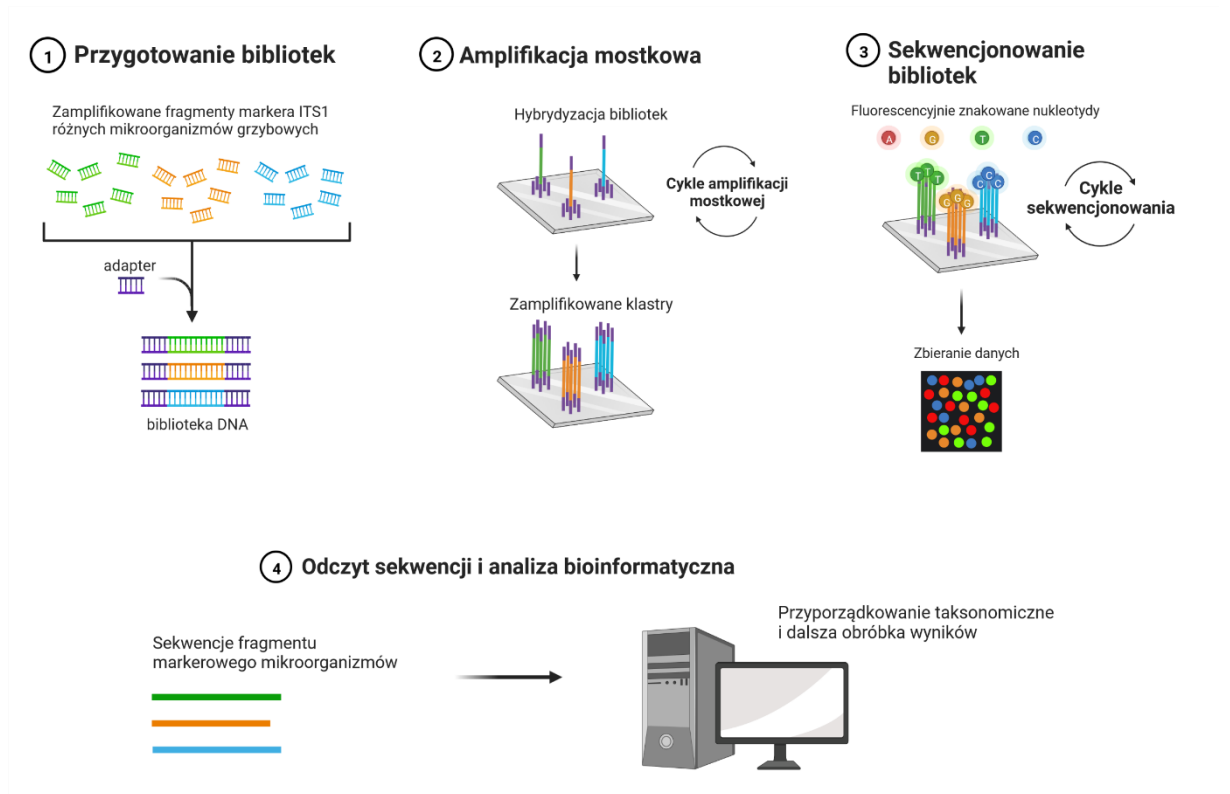


Rysunek 3. Schemat reakcji sekwencjonowania Sangera. Schemat przygotowany z wykorzystaniem oprogramowania BioRender.

1.4.1. Wysokoprzepustowe sekwencjonowanie poprzez syntezę

Opracowanie wysokoprzepustowego sekwencjonowania, często nazywanego sekwencjonowaniem następnej generacji (ang. *Next-Generation Sequencing*), pozwoliło na zwiłokrotnienie zachodzących i odczytywanych reakcji sekwencjonowania w tym samym czasie. Światowym liderem wykorzystującym takie podejście jest firma Illumina, która nabyła wraz z twórcami technologii - firmą Solexa, mechanizm sekwencjonowania poprzez syntezę (ang. *Sequencing-by-Synthesis*) w zastosowaniu zarówno całogenomowym, metataksonomicznym oraz metogenomowym. Technika Illumina SBS pozwala na odczytywanie krótkich fragmentów sekwencji DNA, co umożliwia odczyt setek tysięcy różnych sekwencji nukleotydowych obecnych w próbce i złożenie z fragmentów sekwencji

całego genomu, bądź scharakteryzowanie metataksonomiczne całego mikrobiomu, bądź mykobiomu.



Rysunek 4. Schematyczny przebieg sekwencjonowania metataksonomicznego Illumina MiSeq SBS. Schemat przygotowany z wykorzystaniem oprogramowania BioRender.

W podejściu metataksonomicznym Illumina SBS do sekwencjonowania możemy wyróżnić 4 główne etapy (Rysunek 4):

- przygotowanie bibliotek poprzez amplifikację markera (dla mikroorganizmów grzybowych zwykle jest to region ITS1 bądź ITS2) z użyciem primerów zawierających fragment typu *overhang* - syntetycznego DNA tworzącego fragment komplementarny do sekwencji starterów indeksujących w kolejnym etapie oraz indeksowanie markera, które polega na przyłączeniu adapterów komplementarnych zarówno do uzyskanego w amplikonu, jak i do oligonukleotydów obecnych na komórce przepływowej (ang. *flowcell*), na której zachodzi reakcja sekwencjonowania;
- amplifikacja mostkowa na komórce przepływowej;
- sekwencjonowanie bibliotek;
- odczyt sekwencji oraz analiza bioinformatyczna.

Nieodłącznym, niezwykle istotnym elementem sekwencjonowania metataksonomicznego jest odpowiednia obróbka otrzymanych danych, dalsza analiza bioinformatyczna oraz wizualizacja wyników.

1.4.2. Wybrane metody bioinformatyczne wykorzystywane w analizie danych sekwencjonowania wysokoprzepustowego

Bioinformatyka jest interdyscyplinarną dziedziną nauki, wykorzystującą metody informatyczne potrzebne do zrozumienia obszernych danych biologicznych. Wykorzystywanie technik biologii molekularnej, a w szczególności technik sekwencjonowania drugiej oraz trzeciej generacji sprawiło, że wykorzystywanie oraz opracowywanie metod bioinformatycznych stało się nieodzownym elementem analizy danych. W toku analizy wyników sekwencjonowania metaksonomicznego, często wykorzystywanym sposobem jest opracowywanie niestandardowych potoków danych bioinformatycznych, wykorzystujących ogólnodostępne narzędzia bioinformatyczne na licencji GNU (ang. *General Public License*, pol. Powszechna Licencja Publiczna). Co warto zauważyć, analiza danych bioinformatycznych, która jest opracowywana dla każdego typu próbek indywidualnie, pozwala na bardziej szczegółowe opracowanie wyników.

1.4.2.1. Wstępna obróbka i przygotowanie danych

W wyniku sekwencjonowania metataksonomicznego metodą Illumina SBS otrzymywane są surowe sekwencje fragmentu markerowego wszystkich organizmów obecnych w próbce. Sekwencje te, w kolejnych etapach analizy bioinformatycznej, należy poddać odpowiednim obróbkom, aby wynik analizy był miarodajny. W analizach bioinformatycznych wyników sekwencjonowania metataksonomicznego najczęściej wykorzystywane są komputery o wysokiej wydajności z powłoką uniksową Linux (Bash) oraz środowiska bioinformatyczne QIIME2 (Bolyen et al. 2019), bądź mothur (Schloss et al. 2009). Wstępna obróbka danych sekwencjonowania markerów grzybowych może być podzielona na następujące etapy (na podstawie środowiska QIIME2 oraz analizy przeprowadzonej w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej):

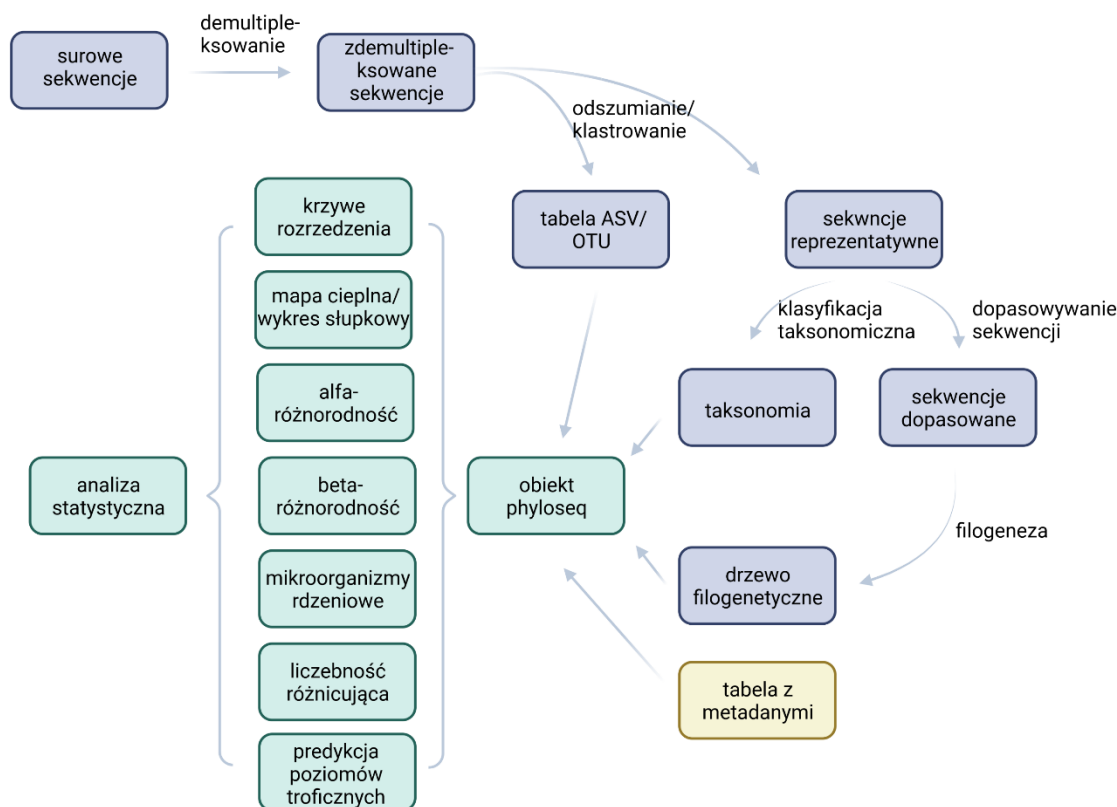
- import surowych danych do środowiska bioinformatycznego
- usunięcie sekwencji starterów
- usuwanie błędów sekwenatora, usuwanie sekwencji chimerowych
- łączenie sekwencji forward oraz reverse
- przyporządkowanie wariantów sekwencji ampliconu (ang. Amplicon Sequence Variant, ASV) lub operacyjnych jednostek taksonomicznych (OTU)
- tworzenie drzewa filogenetycznego (niepolecane przy sekwencjonowaniu markera ITS, jako że charakteryzuje się różną długością tego fragmentu u różnych mikroorganizmów grzybowych) (Bellemain et al. 2010)

- identyfikacja taksonomiczna sekwencji.

W wyniku tak przeprowadzonej obróbki danych, otrzymuje się tabelę z ilością odczytów danego ASV/OTU w poszczególnych próbkach oraz tabelę przyporządkowującą identyfikator ASV/OTU do taksonomii, które wykorzystuje się wraz z tabelą z metadanymi w dalszej analizie wyników.

Taką dalszą analizę i wstępną wizualizację wyników sekwencjonowania można przeprowadzić w środowisku QIIME2, które pozwala np. na przedstawienie składu mikrobiomu za pomocą wykresów słupkowych, analizę α oraz β różnorodności, czy badanie zróżnicowania liczebności przy użyciu metody statystycznej ANCOM (Mandal et al. 2015) (ang. *analysis of composition of microbiomes*, pol. analiza składu mikrobiomu).

Drugim najbardziej popularnym sposobem na analizę wyników jest wykorzystanie języka programistycznego R (R Core Team 2021), które pozwala na większą elastyczność oraz dodatkowe analizy statystyczne. R jest środowiskiem wolnego oprogramowania typu open-source, dostępnym na licencji GNU GPL, znajdujących zastosowanie między innymi w bioinformatyce. Użytkownicy tego języka mogą tworzyć własne, ogólnodostępne pakiety, które rozszerzają jego funkcje i ułatwiają analizy w konkretnych tematykach. Jego zastosowanie w bioinformatyce zostało spopularyzowane dzięki stworzeniu przez Roberta Gentlemana otwartego repozytorium Bioconductor (Gentleman et al. 2004), zbierającego pakiety bioinformatyczne. Schematyczny przebieg przygotowania danych sekwencjonowania metataksonomicznego oraz ich analizy został przedstawiony na Rysunku 5.



Rysunek 5. Schematyczny przebieg analizy danych sekwencjonowania metataksonomicznego, przygotowany na podstawie analiz przeprowadzonych w niniejszej rozprawie. Kolorem fioletowym przedstawiono etapy przeprowadzone w środowisku Qiime2, a kolorem zielonym etapy przeprowadzone w RStudio. Schemat przygotowano w programie BioRender.

1.4.2.2. Analiza wyników sekwencjonowania w języku R

Najczęściej stosowanym przez naukowców narzędziem wykorzystywanym do metod analizy danych sekwencjonowania metataksonomicznego przy pomocy języka R jest pakiet phyloseq (McMurdie and Holmes 2013). Biblioteka ta jest narzędziem pozwalającym na importowanie, przechowywanie, analizowanie i graficzne wyświetlanie skomplikowanych danych sekwencjonowania, które zostały już pogrupowane w ASV/OTU. Pakiet ten umożliwia importowanie danych pochodzących z wielu popularnych środowisk i potoków bioinformatycznych (np. QIIME2, mothur), przeprowadzenie aż 44 analiz podobieństwa i odległości (np. UniFrac, Jensen-Shannon), jak też wykorzystanie pakietu ggplot2 (Wickham 2008) w wizualizacji wykresów przedstawiających skład mikrobiomu. Co ważne, dane są importowane do środowiska R, a następnie tworzony jest obiekt phyloseq, scalający tabelę z metadanymi, tabelę z odczytami danego ASV/OTU w poszczególnych próbkach, tabelę przyporządkowującą ASV/OTU do taksonomii, istnieje również możliwość dołączenia odczytów sekwencji markerowych oraz drzewa filogenetycznego.

1.4.2.3. Krzywa rozrzedzenia

Krzywa rozrzedzenia (rarefakcji) została opracowana w 1968 roku (Sanders 1968) do określenia bogactwa gatunkowego mikroorganizmów w próbkach, jednak obecnie również jest często wykorzystywana w celu weryfikacji, czy proces sekwencjonowania przebiegł pomyślnie i faktyczna różnorodność mikroorganizmów w wystarczającym stopniu została pokryta ilością odczytów sekwencji markerowych. Krzywa ta w takich zastosowaniach jest wykresem liczby ASV/OTU w funkcji liczby próbek. Krzywe rarefakcji na ogół szybko wzrastają na początku, gdy znajdowane są najczęstsze taksony i osiągają plateau kiedy jedynie najrzadsze taksony pozostają w próbkach. W przypadku wypłaszczenia wykresów (osiągnięcia plateau) dla każdej z analizowanych próbek, przyjmuje się, że sekwencjonowanie przebiegło pomyślnie (Heck, van Belle, and Simberloff 1975; McMurdie and Holmes 2014).

Biblioteką języka R, która może być wykorzystana do wizualizacji krzywych rarefakcji jest ‘vegan’ (<https://github.com/vegandevs/vegan>) z poleceniem `rarecurve`.

Ogólny skład taksonomiczny mikroorganizmów

Jedną z podstawowych analiz i sposobów wizualizacji wyników sekwencjonowania metataksonomicznego jest przedstawienie struktury zidentyfikowanych mikroorganizmów za pomocą wykresów słupkowych. Taki sposób przedstawienia wyników pozwala na wstępne zapoznanie się ze składem taksonomicznym mikroorganizmów, jednak należy pamiętać, że wykresy słupkowe mają ograniczoną czytelność w przypadku przedstawienia mikrobiomu składającego się z więcej niż kilku różnych taksonów. Z tego powodu, wykresy takie dla bogatych w mikroorganizmy próbek środowiskowych gleby czy roślin (zawierających w swoim składzie kilkadziesiąt, a nawet kilkaset różnych taksonów) będą czytelne jedynie w przypadku przedstawienia wyników wysokich poziomów taksonomicznych - tj. dla typów bądź klas. Można również przedstawić za pomocą wykresów słupkowych jedynie pewną część (zwykle najbardziej liczną) niższych taksonów w celu zwiększenia czytelności tak przygotowanych wykresów.

Bibliotekami języka R, które mogą być użyte do tego celu są np. ‘MicrobiotaProcess’ (S. Xu and Yu 2022) z poleceniem `ggbartax`, bądź biblioteka ‘phyloseq’ (McMurdie and Holmes 2013) i polecenie `plot_bar`.

Innym sposobem przedstawienia składu mikrobioty, jest wykres cieplny (ang. *heatmap*), w którym to kolory komórek w macierzy odpowiadają liczebności poszczególnego taksonu w danej próbce. Taki sposób przedstawienia liczebności mikroorganizmów nie zmniejsza poważnie czytelności wyników, jak ma to miejsce

w przypadku wykresów słupkowych. Biblioteką, która wykorzystuje obiekt phyloseq do utworzenia mapy cieplnej jest np. pakiet microbiome z poleceniem heat.

1.4.2.4. Alfa różnorodność

W ekologii, alfa różnorodność charakteryzuje różnorodność gatunków w skali lokalnej. Termin ten został zaproponowany przez Whittakera (Whittaker 1972), a Magurran (Magurran 1988) podzieliła miary różnorodności na trzy kategorie: wskaźniki bogactwa gatunkowego; wskaźniki oparte na proporcjonalnej liczebności gatunków, które można podzielić w zależności od tego, czy większy wpływ mają na nie zmiany parzystości czy dominacji; oraz modele liczebności gatunków. Najczęściej wykorzystywanymi wskaźnikami alfa różnorodności w badaniach mikrobiomu są:

- bogactwo gatunków (ang. species richness, S) – liczba taksonów występujących w próbce, która nie bierze pod uwagę liczebności poszczególnych taksonów;
- indeks Shannona-Weinera (H') (Shannon 1948) - miara ilości informacji (entropii) w systemie, wyrażona w ujemnej sumie liczebności każdego ASV/OTU pomnożonej przez logarytm jego proporcjonalnej liczebności; nadaje większą wagę taksonom rzadkim niż pospolitym;
- indeks Simpsona (D) (Simpson 1949) - prawdopodobieństwo, że dwa dowolne osobniki wylosowane z nieskończonego zbiorowiska należą do różnych gatunków; jest silnie ukierunkowany na najliczniejsze gatunki występujące w próbce;
- odwrotny indeks Simpsona ($1/D$) - jest to efektywna liczba rodzajów, którą otrzymuje się, gdy ważona średnia arytmetyczna jest stosowana do ilościowego określenia średniej proporcjonalnej obfitości rodzajów w określonym zbiorze danych;
- współczynnik Giniego - prawdopodobieństwo spotkania międzygatunkowego, tj. prawdopodobieństwo, że dwie jednostki reprezentują różne rodzaje;
- Chao1 (Colwell and Coddington 1994) - nieparametryczny asymptotyczny estymator bogactwa gatunkowego (liczby gatunków w populacji);
- efektywna liczba gatunków (ang. *effective numer of species*) (Jost et al. 2010) - odnosi się do liczby jednakowo obfitych gatunków potrzebnych do tego, aby średnia proporcjonalna obfitość gatunków była równa tej obserwowanej w zbiorze danych będącym przedmiotem zainteresowania (gdzie wszystkie typy mogą nie być jednakowo obfite).

Pakiem języka R, który pozwala na obliczenie alfa różnorodności próbek jest `phyloseq` z poleceniem `estimate.richness`, które tworzy tabelę z indeksami alfa różnorodności, bądź `plot_richness`, które rysuje wykresy z podziałem na grupy.

1.4.2.5. Beta różnorodność

Beta różnorodność to termin wprowadzony przez Whittakera (Whittaker 1972) i wyraża stosunek pomiędzy regionalną a lokalną różnorodnością gatunków. Do obliczenia macierzy dystansów pomiędzy próbkami, najczęściej wykorzystywanymi metodami w badaniach mikrobiologicznych są:

- Bray-Curtis (Bray and Curtis 1957) - statystyka stosowana do ilościowego określenia zróżnicowania składu mikroorganizmów pomiędzy dwoma różnymi miejscami, oparta na sumach w każdym z tych miejsc;
- ważony dystans UniFrac (Lozupone and Knight 2005) - wykorzystuje drzewo filogenetyczne do obliczenia dystansu pomiędzy próbkami, jest metodą ilościową;
- nieważony dystans UniFrac - od ważonego dystansu UniFrac różni się faktem, że jest metodą jakościową;
- indeks Jaccarda (współczynnik podobieństwa Jaccarda) - mierzy podobieństwo pomiędzy skończonymi zbiorami próbek i jest zdefiniowany jako liczba wspólnych gatunków podzielona przez wielkość wszystkich gatunków; przyjmuje wartości od 0 do 1 - im bliżej 0, tym zbiory są od siebie bardziej różne.

Biblioteką języka R, która używa obiektu `phyloseq` do obliczenia dystansów pomiędzy próbkami jest np. `phyloseq` z poleceniem `ordinate`.

Kolejnym etapem analizy jest wizualizacja wyników w dwóch lub w trzech wymiarach za pomocą metod ordynacji, takich jak:

- MDS/PCoA (skalowanie wielowymiarowe/analiza głównych współrzędnych) (Ter Braak and Prentice 1988);
- NMDS (niemetryczne skalowanie wielowymiarowe) (Ter Braak and Prentice 1988).

Metody te pozwalają na sprowadzenie skomplikowanych zależności pomiędzy próbkami do mniejszej liczby wymiarów, co znacznie ułatwia interpretację wyników. Próbki mogą skupiać się w widoczne na wykresie grupy, kiedy istnieje ukryta zmienna kategoryczna. Klastry mogą prowadzić do uproszczenia danych, ale również mogą pojawiać się w wyniku obecności artefaktów, co jest niepożądanym zjawiskiem.

Wykresy PCoA są możliwe do wizualizacji np. za pomocą funkcji `plot_ordination` z pakietu `phyloseq`.

W następnym kroku przeprowadza się analizę statystyczną PERMANOVA, która testuje grupy pod względem lokalizacji centroidu. Jeśli wartość p jest mniejsza od 0,05, możemy wnioskować, że zmienność wewnętrzna grup próbek jest niższa niż zmienność próbek pomiędzy dwoma grupami.

1.4.2.6. Predykcja poziomów troficznych mikroorganizmów grzybowych

Sekwencjonowanie metataksonomiczne pozwala na poznanie struktury niemal wszystkich mikroorganizmów obecnych w danej próbce, jednak naukowcy spotykają trudności w podzieleniu dziesiątek tysięcy zidentyfikowanych mikroorganizmów na grupy o znaczeniu ekologicznym. Pojęcie grupy funkcjonalnej w ekologii zostało zaproponowane w 1902 roku (Schimper and Franz 1902) i oznacza grupę gatunków, spokrewnionych bądź nie, wykorzystujących w podobny sposób tę samą klasę zasobów środowiskowych (Root 1967). Grupowanie mikroorganizmów w grupy troficzne pozwala na porównywanie środowisk nawet w przypadku, kiedy konkretne taksony nie pokrywają się pomiędzy tymi środowiskami.

Narzędziem, które pozwala na przyporządkowanie mikroorganizmów do konkretnych poziomów troficznych w zautomatyzowany sposób jest FUNGuild (Nguyen et al. 2016), gdzie mikroorganizmy grzybowe są podzielone na 3 grupy:

- patotrofy - otrzymujące składniki odżywcze dzięki uszkodzeniu komórek gospodarza (w tym również fagotrofy);
- symbiotrofy - otrzymujące składniki odżywcze poprzez wymianę zasobów z komórkami gospodarza;
- saprotrofy - otrzymujące składniki odżywcze poprzez rozkładanie martwych komórek gospodarza.

Po przyporządkowaniu mikroorganizmów grzybowych do odpowiednich grup troficznych, możliwe są dalsze analizy statystyczne, które pozwalają na zweryfikowanie, czy występują istotne różnice w strukturze grup troficznych pomiędzy grupami próbek.

1.4.2.7. Mikroorganizmy rdzeniowe

Z dużą dozą pewności można stwierdzić, że mikroorganizmy, które są obecne w każdej próbce należącej do danej grupy próbek, analizowanych w doświadczeniu, pełnią ważną rolę w funkcjonowaniu danej grupy. Dlatego też, analizą często wykorzystywaną w sekwencjonowaniu danych metataksonomicznych jest określenie mikroorganizmów rdzeniowych w obrębie danej grupy próbek (Neu, Allen, and Roy 2021).

Wyłonienie mikroorganizmów rdzeniowych może być przeprowadzone na trzy sposoby:

- jedynie na podstawie występowania danego taksonu w próbkach w obrębie danej grupy;
- na podstawie jedynie względnej liczebności danego mikroorganizmu - mikroorganizmy najczęściej występujące w danej grupie próbek;
- na podstawie zarówno występowania oraz liczebności mikroorganizmu w próbkach należących do danej grupy - na początek ustala się minimalną względną liczebność, którą muszą spełniać mikroorganizmy, a następnie procent próbek, w których powinny występować; to podejście jest najbardziej konserwatywne.

W tych analizach nie należy bagatelizować wagi głębokości przeprowadzonego sekwencjonowania (ilości sekwencji odczytanych z jednej próbki). Wiele badań, wykorzystujących głębokie sekwencjonowanie uwypukliło obecność rzadkich mikroorganizmów, które nie były wykryte podczas płytszego sekwencjonowania (Sogin et al. 2006; Gibbons et al. 2013). Dlatego też, należy pamiętać o tym, że maksymalizowanie głębokości sekwencjonowania jest ważnym aspektem w przypadku, kiedy zależy nam na określeniu mikroorganizmów rdzeniowych w danym środowisku.

1.4.2.8. Mikroorganizmy o zróżnicowanej obfitości

Innym z zadań podczas analiz metataksonomicznych może być określenie taksonów, których liczebność pomiędzy grupami różni się istotnie statystycznie. Taka analiza może być przeprowadzona na dowolnym poziomie identyfikacji taksonomicznej i pozwala na wyłonienie biomarkerów. Do tej pory zostało zaproponowanych wiele podejść do wyłonienia mikroorganizmów różnicujących, jednak wciąż nie ma konsensusu, który sposób jest najskuteczniejszy. Pakietami R, które mogą być wykorzystywane do takich analiz są, m.in.:

- ALDEx2 (ang. *Analysis Of Differential Abundance Taking Sample Variation Into Account*, pol. Analiza obfitości różnicowej z uwzględnieniem zmienności próbki) (Fernandes et al. 2013, 2014);
- Limma-Voom (Law et al. 2014; Ritchie et al. 2015);
- MaSLin2 (ang. *Multivariable Association Discovery in Population-scale Meta-omics Studies*, pol. Wielozmiennowe odkrywanie asocjacji w badaniach meta-omicznych w skali populacyjnej) (Mallick et al. 2021);
- edgeR (ang. *Empirical Analysis of Digital Gene Expression Data in R*, pol. Empiryczna analiza cyfrowych danych o ekspresji genów w R) (Robinson, McCarthy, and Smyth 2009);

- ANCOM-BC (ang. *Analysis of compositions of microbiomes with bias correction*, pol. Analiza składu mikrobiomu z korektą błędu systematycznego) (Lin and Peddada 2020);
- DESeq2 (ang. *Differential gene expression analysis based on the negative binomial distribution*, pol. Analiza różnicowej ekspresji genów w oparciu o negatywny rozkład dwumianowy) (Love, Huber, and Anders 2014).
- Duża część metod statystycznych wykorzystywana do wyłonienia mikroorganizmów zróżnicowanych liczebnością była początkowo zaproponowana do analizy danych sekwencjonowania RNA i wyłonienia różnicującej ekspresji genów. Jednak zarówno metody opracowane specjalnie do danych mikrobiologicznych, jak i te opracowane dla danych z RNA-seq mogą być z powodzeniem wykorzystywane do wyszukiwania mikroorganizmów różniących się liczebnością.

2. Hipotezy badawcze oraz cel rozprawy doktorskiej

Hipotezy badawcze

1. Wykorzystanie techniki biologii molekularnej – real-time PCR pozwala na opracowanie skutecznych metod detekcji patogenów grzybowych należących do rodzajów: *Botrytis*, *Colletotrichum* i *Verticillium*, będących kluczowymi patogenami upraw truskawek.
2. Możliwe jest opracowanie metody potrójnej detekcji real-time PCR, pozwalającej na wykrywanie trzech patogenów truskawek z rodzajów *Botrytis*, *Colletotrichum* oraz *Verticillium* w tym samym czasie w jednej mieszaninie reakcyjnej.
3. Wykorzystanie techniki biologii molekularnej – LAMP pozwala na opracowanie skutecznych metod detekcji grzybopodobnych lęgniowców: *Phytophthora* spp. oraz *Phytophthora cactorum*, które należą do kluczowych patogenów upraw truskawek.
4. Wykorzystanie wysokoprzepustowej metody sekwencjonowania metodą Illumina MiSeq pozwoli na detekcję kluczowych patogenów grzybowych znajdujących się na ekologicznych plantacjach truskawek.
5. Na ekologicznych plantacjach truskawek występuje zróżnicowanie pomiędzy mykobiomem gleby i rośliny plantacji zdrowych oraz chorych.
6. Alfa-różnorodność porażonych roślin truskawki jest istotnie niższa niż alfa-różnorodność roślin zdrowych.
7. Rośliny truskawki z widocznymi objawami choroby różnią się ogólnym składem mikrobiomu od zdrowych truskawek, a głównymi czynnikami są grzyby należące do trybu troficznego patotrofów.

Cel rozprawy doktorskiej

Głównym celem badawczym rozprawy doktorskiej jest opracowanie molekularnych metod detekcji czterech fitopatogenicznych grzybów i grzybopodobnych lęgniowców, występujących na ekologicznych plantacjach truskawek.

Cele szczegółowe rozprawy doktorskiej obejmują:

1. Opracowanie metody wielokrotnej reakcji łańcuchowej polimerazy z detekcją w czasie rzeczywistym (multiplex real-time PCR) do wykrywania grzybów z rodzaju: *Botrytis*, *Colletotrichum* i *Verticillium*;
2. Opracowanie metody izotermicznej amplifikacji wykorzystującej zapętlanie (LAMP) do detekcji patogenów *Phytophthora* spp. i *Phytophthora cactorum*;
3. Charakterystykę zbiorowisk grzybów, występujących na ekologicznych plantacjach truskawek, w tym określenie zróżnicowania mykobiomu gleby, ryzosfery, części nadziemnych i korzeni roślin, plantacji zdrowych oraz z objawami chorobowymi, z wykorzystaniem wysokoprzepustowego sekwencjonowania technologią Illumina SBS za pomocą aparatu MiSeq,

3. Omówienie wyników publikacji oraz badań uzupełniających

W publikacjach P1, P2, P3 oraz materiałach uzupełniających P4 podjęto próbę scharakteryzowania głównych fitopatogenów grzybowych oraz grzybopodobnych, jak również zebrania informacji dotyczących opracowanych do tej pory oraz obecnych w międzynarodowej literaturze naukowej metod molekularnej detekcji (PCR, real-time PCR, LAMP) kluczowych patogenów grzybowych oraz grzybopodobnych (*Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *Verticillium* spp. oraz *Phytophthora* spp.), które powodują największe straty na plantacjach ekologicznych truskawek. Na podstawie tego zestawienia wyselekcjonowano do opracowania w dalszych etapach prac dwie metody detekcji - real-time PCR oraz LAMP, do których opracowano sekwencje starterowe, stężenia składników mieszanin reakcyjnych oraz profile temperaturowe, pozwalające na skuteczną detekcję głównych fitopatogenów, występujących na polskich plantacjach truskawek. Metody te opracowano w taki sposób, aby była możliwa jednoczesna detekcja 3 patogenów: *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp., oraz *Verticillium* spp. w jednej mieszaninie reakcyjnej w tym samym czasie za pomocą metody real-time PCR z próbek środowiskowych. Dodatkowo, metoda LAMP została zoptymalizowana w taki sposób, aby możliwe było jej wykorzystanie w prostym termobloku oraz z barwnikiem pozwalającym na interpretację wyników bez użycia specjalistycznego sprzętu, czyli 'gołym okiem'.

Ważnym aspektem niniejszej pracy było również scharakteryzowanie mykobiomu 4 typów próbek (gleba, gleba ryzosferowa, korzeń, części nadziemne roślin) oraz określenie kluczowych różnic w ich strukturze pomiędzy plantacjami zdrowymi oraz z widocznymi objawami chorób, przy wykorzystaniu metody sekwencjonowania amplikonów Illumina SBS oraz analiz bioinformatycznych z wykorzystaniem środowiska QIIME2 oraz za pomocą skryptów bioinformatycznych, napisanych w języku R.

3.1. Publikacja P.1 (Alternative Molecular-Based Diagnostic Methods of Plant Pathogenic Fungi Affecting Berry Crops—A Review)

Malarczyk D. (obecnie: Siegięda), Panek J., Frąc M., (2019). Alternative Molecular-Based Diagnostic Methods of Plant Pathogenic Fungi Affecting Berry Crops—A Review. Molecules 24, 1200

Celem pierwszej publikacji przeglądowej było szczegółowe zebranie i podsumowanie wyników dotychczas przeprowadzonych na świecie badań dotyczących charakterystyki, występowania, właściwości, zagrożenia dla rolnictwa ekologicznego oraz opracowanych metod wykrywania kluczowych grzybowych i grzybopodobnych patogenów, atakujących plantacje owoców miękkich, głównie truskawek, należących do rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Verticillium* oraz *Phytophthora*. Szczegółowy przegląd literatury w zakresie molekularnych metod detekcji wymienionych organizmów patogenicznych dotyczył technik:

- PCR,
- real-time PCR,
- multiplex real-time PCR,
- LAMP,
- dodatkowo, zebrano również informacje dotyczące liczby zsekwencjonowanych całych genomów poszczególnych patogenów, należących do opisywanych rodzajów (na rok 2019).

Popularność rolnictwa ekologicznego na świecie nieustannie rośnie, a niemal jedna czwarta światowej powierzchni wykorzystywanej w tym celu, należy do centralnej części Europy. Co warto również zaznaczyć, Europa produkuje połowę światowej produkcji truskawek, jagód oraz malin. W 2016 roku, niemal 20% owoców miękkich było produkowane metodą ekologiczną, a rynek rolnictwa ekologicznego również nieustannie wzrasta w ostatnich latach. Polska, wraz z Węgrami, posiadają relatywnie niewielkie rynki, jednak charakteryzują się dużą produkcją żywności ekologicznej, co czyni je ważnymi eksporterami.

Uprawy roślinne, a szczególnie te, na których stosowana jest uprawa ekologiczna, są szczególnie narażone na patogeniczne mikroorganizmy, z powodu ograniczenia stosowania na nich chemicznych środków ochrony roślin. Co więcej, Europa Centralna charakteryzuje się ciepłym i wilgotnym klimatem, a owoce miękkie, takie jak truskawki posiadają cienką ścianę komórkową oraz wznoszą się w bliskiej odległości od gleby, która często jest siedliskiem chorobotwórczych mikroorganizmów. Te wszystkie fakty sprawiają, że zagrożenie upraw ekologicznych owoców miękkich, a szczególnie truskawek, zlokalizowanych w Europie, spowodowanych przez fitopatogeny jest realnym problemem, poważnie obniżającym plony oraz jakość płodów rolnych.

Najczęstszymi mikroorganizmami patogenicznymi, powodującymi straty w uprawach truskawki są grzyby - *Verticillium* spp., *Botrytis cinerea* oraz *Colletotrichum acutatum* oraz grzybopodobne lęgniowce *Phytophthora* spp.

Różne fitopatogeniczne gatunki grzybów należące do rodzaju *Verticillium* nie są specyficzne dla roślinnego gospodarza, powodując chorobę zwaną werciliozą (ang. Verticillium Wilt). Jej objawy różnią się pomiędzy roślinami-gospodarzami, co utrudnia identyfikację czynnika chorobotwórczego sposobami klasycznymi. Mikroorganizm jest z łatwością przenoszony z zakażonym materiałem roślinnym, glebę oraz narzędzia, a w glebie potrafi przetrwać nawet ponad 25 lat. Patogen degraduje ściany komórkowe gospodarza, wykorzystując do tego celu wiele różnych enzymów, które produkuje, a jednym z nich jest poligalakturonaza, której wielkość produkcji jest związany ze stopniem patogenności grzyba. Najskuteczniejszym sposobem zwalczania choroby jest eliminacja zakażonych roślin z pola, dlatego szybka i skuteczna identyfikacja patogenu jest niezbędna w celu uzyskania plonów o satysfakcjonującej jakości.

Botrytis cinerea, powodujący szarą pleśń, atakuje nie tylko truskawki i maliny, ale również ponad 500 różnych gatunków roślin, co czyni ją drugim najpoważniejszym patogenem w biologii molekularnej w 2012 roku. Co ważne, grzyb może rozprzestrzeniać się na owocach w temperaturach poniżej zera, co jest poważnym problemem przechowywania chłodniczego. Zakażenie plantacji bądź plonów patogenem może pozostać bezobjawowe, aż do pojawienia się odpowiednich warunków środowiskowych, sprzyjających rozwojowi grzyba, co szczególnie utrudnia zabiegi zapobiegawcze.

Colletotrichum acutatum powoduje chorobę zwaną antraknozą, która może powodować straty plonów nawet do 100%. Rozprzestrzenianie się konidiów w uprawie może sięgać nawet niemal 2 metrów, co jest możliwe dzięki rozchłapywaniu wody, a sprawia, że choroba szybko dotyczy całej plantacji. Grzyb jest zdolny do zimowania w glebie przez co najmniej dwa sezony z temperaturą plusującą się poniżej 0°C, co umożliwia rozwinięcie się choroby w uprawie nawet w kolejnych latach po jej wykryciu.

Lęgniowce z rodzaju *Phytophthora* atakują truskawki, powodując skórzastą zgniliznę oraz zgniliznę korony truskawki. Objawy choroby na roślinach są często mylone z tymi powodowanymi przez *Colletotrichum acutatum* oraz *Verticillium dahliae*, co utrudnia skuteczną identyfikację patogenu. Podczas izolacji czystych szczepów ze środowiska, używa się dodatku antybiotyku do podłoża, aby zahamować wzrost bakterii konkurujących o substancje odżywcze.

W pracy omówiono oraz wymieniono wyzwania stojące przed metodami detekcji patogenów, które są wykorzystywane w rolnictwie. Klasyczne metody identyfikacji mikroorganizmów chorobotwórczych są czasochłonne i niejednokrotnie niejednoznacznie identyfikują czynnik chorobotwórczy, dlatego coraz szerzej wykorzystywane do tego celu są

metody molekularne, takie jak omówione w niniejszej pracy PCR, real-time PCR, multiplex real-time PCR oraz LAMP.

W niniejszej pracy zebrano informacje dotyczące molekularnych metod detekcji oraz dotychczas wykorzystywanych markerów molekularnych, które zostały do tej pory zastosowane w metodach PCR, real-time PCR, multiplex real-time PCR oraz LAMP, ich zalet w wykorzystywaniu w rolnictwie oraz ograniczeń.

3.2. Publikacja P.2 (Triplex Real-Time PCR Approach for the Detection of Crucial Fungal Berry Pathogens—*Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp..)

Malarczyk D. (obecnie: Siegieda), Panek J., Frąc M., (2020). Triplex Real-Time PCR Approach for the Detection of Crucial Fungal Berry Pathogens—Botrytis spp., Colletotrichum spp. and Verticillium spp.. International Journal of Molecular Sciences 21, 8469

Celem przeprowadzonych i opisanych w publikacji P.2 badań, było opracowanie metody real-time PCR do wykrywania fitopatogenicznych grzybów *Botrytis* spp, *Colletotrichum* spp. oraz *Verticillium* spp. z wykorzystaniem nowo zaprojektowanych uniwersalnych starterów amplifikujących różne fragmenty rDNA - regionu D2 dużej podjednostki rybosomalnego DNA. Dodatkowym celem było również zaprojektowanie trzech multipleksowalnych sond hydrolizujących typu TaqMan, specyficznych dla wybranych grzybów w tym regionie oraz przetestowanie opracowanej metody na próbkach środowiskowych.

W publikacji P.2 przedstawiono wyniki przeprowadzonej w trakcie badań izolacji czystych szczepów patogenów grzybowych oraz grzybopodobnych z ekologicznych plantacji truskawek, z wykorzystaniem szeregu metod mikrobiologicznych.

3.2.1. Mikroorganizmy fitopatogeniczne

Pierwszy etap badań obejmował izolację patogenicznych szczepów grzybowych oraz grzybopodobnych z ekologicznych plantacji truskawek. Izolacja fitopatogenów została przeprowadzona na podłożu PDA, a fragmenty porażonych korzeni oraz liści były inkubowane w 22°C przez 10 dni. Identyfikacja mikroorganizmów została przeprowadzona za pomocą sekwencjonowania markera D2LSU, po izolacji materiału genetycznego zestawem PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Wykazano, że patogeny należące do rodzajów *Botrytis*, *Colletotrichum*,

Verticillium oraz *Phytophthora* tworzyły grupę 44% rodzajów mikroorganizmów grzybów oraz łęgniowców, wyizolowanych z symptomatycznych roślin truskawek z plantacji ekologicznych. Pozostałe zidentyfikowane mikroorganizmy należały do rodzajów: *Alternaria* (9%), *Fusarium* (8%), *Pilidium* (6%), *Mucor* (5%), *Phialophora* (4%), *Gnomoniopsis* (3%), *Pestalotiopsis* (3%), *Cladosporium* (2%), *Phoma* (2%), *Mycosphaerella* (2%) oraz do innych rodzajów (12%).

3.2.2. Opracowanie sekwencji starterów oraz sond molekularnych

Na potrzeby zaprojektowania sekwencji starterów oraz sond molekularnych, użyto odczytanych sekwencji D2LSU rDNA 38 patogenów, należących do rodzajów *Botrytis*, *Colletotrichum* oraz *Verticillium*. Startery zaprojektowano w taki sposób, aby były komplementarne do sekwencji wszystkich trzech patogenów, natomiast 3 różne sondy molekularne były specyficzne do każdego z patogenów indywidualnie, zapewniając możliwość wykorzystania sond w reakcji typu multipleks.

W celu walidacji specyficzności reakcji, każda z sond została przetestowana na pozostałych dwóch patogenach, gdzie nie uzyskano amplifikacji, co potwierdza specyficzną hybrydyzację sond jedynie do zaplanowanych celów detekcji.

3.2.3. Określenie limitu detekcji reakcji

Publikacja obejmuje również określenie czułości metody w oparciu o czyste szczepy grzybów. W tym celu przygotowano DNA wyizolowane z czystych szczepów fitopatogenów o stężeniu 5 pg/ μ L, które następnie zostało seryjnie rozcieńczane dwukrotnie, aż do stężenia 39 fg/ μ L. Reakcje były powtarzane trzykrotnie, wraz z negatywną próbą, do której zamiast rozcieńczeń DNA użyto wody wolnej od nukleaz. Czułość opracowanych metod detekcji została ustalona na poziomie 39 fg/ μ L dla grzybów *Botrytis* spp. oraz *Verticillium* spp., natomiast dla grzyba *Colletotrichum* spp. wynosiła 156 fg/ μ L.

3.2.4. Detekcja w sztucznie zakażonych próbkach

Opracowaną reakcję przetestowano na sztucznie zakażonych próbkach gleby oraz owoców truskawki. W tym celu zostały przygotowane wodne roztwory zarodników grzybów w ilości 10000, 5000, 1000 oraz 500 na 1 ml wody, które zostały dodane do 1 grama gleby, a DNA zostało wyizolowane po 24 oraz 48 godzinach. Natomiast 1 gram owoców truskawki został zakażony 1 ml wody, zawierającej 100000, 10000, 1000 oraz 100 zarodników *Botrytis* sp., a DNA wyizolowano natychmiast po zakażeniu oraz po 72 godzinach. Izolację przeprowadzono zestawem FastDNA Spin Kit for Feces (MP Biomedicals, Solon, OH, USA), a reakcja multiplex wykazała obecność materiału genetycznego grzybów *Botrytis* spp. oraz

Verticillium spp. we wszystkich testowanych próbkach po 24 oraz 48 godzinach. Obecność *Colletotrichum* spp. wykazano w dwóch testowanych próbkach.

3.2.5. Walidacja reakcji na próbkach środowiskowych

Opracowaną metodę multiplex real-time PCR przetestowano również na 244 próbkach środowiskowych ryzosfery, gleby, korzeni, owoców oraz części nadziemnych roślin które zebrano na ekologicznych plantacjach truskawek. Osiem różnych odmian truskawki było uprawianych na różnych typach gleby. Detekcja wykazała, że *Botrytis* spp. znajdowały się we wszystkich próbkach przebadanych owoców, ponadto były najliczniejsze we wszystkich typach testowanych próbek. *Colletotrichum* spp. zostały wykryte w 2% próbek korzeni oraz 19% próbek owoców, natomiast *Verticillium* spp. w 3% próbek owoców.

3.3. Publikacja P.3 (“Shining a LAMP” (Loop-Mediated Isothermal Amplification) on the Molecular Detection of Phytopathogens *Phytophthora* spp. and *Phytophthora cactorum* in Strawberry Fields)

*Siegieda D., Panek J., Frąc M., (2021). “Shining a LAMP” (Loop-Mediated Isothermal Amplification) on the Molecular Detection of Phytopathogens *Phytophthora* spp. and *Phytophthora cactorum* in Strawberry Fields. Pathogens 10, 1453*

Publikacja P.3 dotyczyła opracowania oraz optymalizacji metod detekcji *Phytophthora* spp. oraz *Phytophthora cactorum* z użyciem LAMP. Sposób wykrywania patogenów objął badania na materiale genetycznym wyizolowanym z czystych szczepów mikroorganizmów, z wykorzystaniem termocyklera pozwalającego na interpretację wyników w czasie rzeczywistym. Dodatkowo w tej publikacji zvalidowano opracowane techniki na prostym termobloku z dodatkiem odczynnika pozwalającego na odczytanie wyników gołym okiem.

3.3.1. Uzyskanie czystych izolatów patogenów ze środowiska

Pierwszym etapem przeprowadzonych badań było uzyskanie czystych izolatów fitopatogenicznych lęgniowców *Phytophthora*. Porażone części roślin truskawek, uprawianych metodą ekologiczną były wykładane na podłoże CA oraz PDA oraz użyto również metody pułapki jabłkowej. W celu identyfikacji szczepów, DNA wyizolowano zestawem PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), oraz przeprowadzono sekwencjonowanie markera D2LSU metodą Sangera.

3.3.2. Projektowanie starterów oraz optymalizacja warunków reakcji

W celu opracowania metody detekcji dla *Phytophthora cactorum* oraz *Phytophthora* spp., markerem wybranym do identyfikacji został gen EF1 α , a sekwencje 3 par starterów zostały wytypowane przy pomocy programu LAMP Designer v. 1.13. Startery zewnętrzne Psp_Ef1a_F3 oraz Psp_Ef1a_B3 zostały użyte do obydwu celów - *Phytophthora cactorum* oraz *Phytophthora* spp.

Opracowany skład mieszaniny reakcyjnej zawierał: po 0,2 μ M starterów F3 oraz B3, 0,8 μ M starterów FIP oraz BIP i 0,4 μ M starterów LoopB i LoopF, a reakcja została przeprowadzana w 65°C.

Aby upewnić się co do specyficzności detekcji dla wybranych celów, obydwa zestawy starterów zostały przetestowane z użyciem DNA wyizolowanym z 19 szczepów *Phytophthora* spp., oraz na 5 szczepach *Botrytis* spp, 5 izolatach DNA pozyskanych z czystych kultur *Colletotrichum* spp. oraz 5 izolatach uzyskanych z *Verticillium* spp. Reakcje zostały przeprowadzone w termocyklerze typ real-time, a odczyt fluorescencji był przeprowadzany po każdej minucie reakcji.

Nie wykazano amplifikacji w próbkach, gdzie do mieszaniny reakcyjnej znajdowało się DNA wyizolowane z mikroorganizmów, które nie były celem detekcji, co potwierdziło specyficzność reakcji.

3.3.3. Limit detekcji

Kolejnym etapem badań było określenie limitu detekcji opracowanych metod - w tym celu przygotowano 10-krotne rozcieńczenia DNA czystych szczepów *Phytophthora* spp., o stężeniach 300 pg/ μ L, 30 pg/ μ L, 3 pg/ μ L, 300 fg/ μ L, 30 fg/ μ L oraz 3 fg/ μ L. Odczyt fluorescencji podczas trwania reakcji w termocyklerze typu real-time był przeprowadzony po każdej minucie reakcji, następnie przeprowadzono również elektroforezę na żelu agarozowym.

Czułość opracowanych metod detekcji wynosiła 3 pg/ μ L dla reakcji zaprojektowanej dla *Phytophthora* spp. oraz 300 fg/ μ L dla reakcji detekcji *Phytophthora cactorum*.

3.3.4. Podejście kolorymetryczne

W celu przetestowania użyteczności reakcji poza laboratorium biologii molekularnej, przeprowadzono również reakcję detekcji na prostym termobloku, z dodatkiem barwnika SYBR-Green I. Wyniki detekcji zostały również zobrazowane w świetle lampy UV oraz na żelu agarozowym. Po 30 minutach w 65°C, do eppendorfów dodano po 1,5 μ L barwnika SYBR Green I, a reakcje pozytywne natychmiastowo zmieniły zabarwienie z pomarańczowego na

żółty, skuteczność reakcji została również potwierdzona na żelu agarowym, gdzie w pozytywnych reakcjach widoczne były charakterystyczne wzory przypominające drabinę.

3.3.5. Walidacja metody na próbkach środowiskowych

W ostatnim etapie, przetestowano opracowane metody, wykonując reakcje detekcji na 348 próbkach środowiskowych ryzosfery, gleby, korzeni oraz liści truskawek, które były uprawiane na plantacjach ekologicznych. Obecność patogenu *Phytophthora cactorum* wykryto w 13 próbkach, a *Phytophthora* spp. w 1% testowanych próbek.

3.4. Badania uzupełniające (Charakterystyka zbiorowisk mikroorganizmów grzybowych na zdrowych i porażonych plantacjach ekologicznej truskawki)

3.4.1. Wstęp

Jak wielokrotnie udowodniono, rośliny z pewnością nie są organizmami jałowymi (Fotios et al. 2021; De Souza et al. 2016; C. Xiong et al. 2021; J. Xu et al. 2018), a mikrobiom zasiedlający zarówno wewnętrzną, jak i zewnętrzną powierzchnię organów roślinnych odgrywa ważną rolę w zapewnieniu równowagi pomiędzy rośliną a środowiskiem, oddziałując na gospodarza na wiele sposobów (Busby et al. 2017; Lazcano et al. 2021). Wpływ bakterii i grzybów na rośliny rolnicze był już badany dla wielu ważnych gatunków (Hannula et al. 2021; Neupane et al. 2021), a niektóre z badań sugerują, że struktura mykobioty - społeczności grzybów oddziałujących z rośliną - może być dobrym predyktorem zdrowia roślin (Frąc et al. 2018, 2021; Schlatter et al. 2022). Niestety, zrozumienie wpływu grzybów na rośliny było badane tylko w minimalnym stopniu w porównaniu z bakteriami w naukach rolniczych, co może być spowodowane faktem, że protokoły sekwencjonowania 16S udostępniono już w 2010 roku (Gilbert, Jansson, and Knight 2014), a dla ITS - wiele lat później, w 2018 (Smith et al. 2018), a naukowcy w większości przypadków tego typu badań korzystają z gotowych rozwiązań.

Postawiono hipotezy, że (1) alfa-różnorodność porażonych roślin truskawki jest istotnie niższa niż alfa-różnorodność roślin zdrowych, (2) rośliny truskawki z widocznymi objawami choroby różnią się ogólnym składem mikrobiomu od zdrowych truskawek, a głównymi czynnikami są grzyby należące do trybu troficznego patotrofów. Zbadano 3 odmiany (Aprica, Dipred, Honeoye) zdrowych i symptomatycznych ekologicznych plantacji truskawek, założonych na różnych typach gleb (płowa, ciężka mada nadsańska, gleba piaszczysta zwięzła, piaszczysta luźna i brunatna) i w różnych lokalizacjach (13 plantacji). Plantacje podzielono

również na różne systemy uprawy: na zagonach podwyższonych z agrowłókniną oraz metodą sadzenia na płask w gruncie bez agrowłókniny i z mulczem ze słomy oraz plantacje, które były wyposażone w automatyczny system nawadniania oraz bez takiego systemu. Do oceny składu zbiorowiska grzybów wykorzystane zostało wysokoprzepustowe sekwencjonowanie ampliconowe regionu ITS1 na platformie Illumina MiSeq oraz narzędzia bioinformatyczne takie jak QIIME2 i analizy statystyczne przeprowadzone w RStudio.

3.4.2. Materiały i metody

Zebrano próbki gleby, ryzosfery, korzeni oraz części nadziemnych roślin pochodzących z ekologicznych plantacji truskawek zlokalizowanych w południowo-wschodniej Polsce. Plantacje, na których widoczne były objawy chorobowe, tj. zażółcenie i usychanie roślin, były zakwalifikowane do plantacji porażonych, a te, gdzie nie były widoczne takie objawy - do plantacji zdrowych. Próbki części roślinnych oraz gleby do czasu izolacji całościowego DNA przechowywano w temperaturze -75°C .

Izolację DNA z próbek przeprowadzono zmodyfikowaną metodą izolacji DNA (rozdział 10), wykorzystującą zestaw FastDNA Spin Kit for Feces kit (MP Biomedicals, Solon, OH, USA), natomiast biblioteki przygotowano w oparciu o zmodyfikowany protokół Fungal Metagenomic Sequencing Demonstrated Protocol (Illumina 2019). Zamplifikowano grzybowy marker ITS1 z wykorzystaniem starterów zawierających sekwencje “overhangowe” będące syntetycznym – sztucznie wprowadzonym DNA, które stanowi komplementarną matrycę dla starterów indeksujących wykorzystanych w dalszych etapach. Następnie przeprowadzono reakcję indeksowania, która miała na celu zintegrowanie z ampliconami unikalnych syntetycznych sekwencji, które umożliwią identyfikację bioinformatyczną sekwencjonowanych próbek. Ponadto, na tym etapie, do ampliconów dołączane były fragmenty komplementarne do oligonukleotydów naniesionych na komórkę przepływową używaną podczas sekwencjonowania oraz do starterów używanych podczas sekwencjonowania. Do indeksowania sekwencji wykorzystano zestaw Nextera XT Index Kit v2, zaś sekwencjonowanie wykonano zestawem MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycle).

Następnie, otrzymane sekwencje ampliconów przetworzono w środowisku QIIME2 - na początku usunięto sekwencje starterów z wykorzystaniem ITSxpress (Rivers et al. 2018), usunięto artefakty oraz chimery i przyporządkowano warianty sekwencji ampliconu z wykorzystaniem dada2 (Callahan et al. 2016). W końcowym etapie przyporządkowano taksonomię w oparciu o bazę UNITE 8.2 (Nilsson et al. 2019; Kõljalg et al. 2020)

z wykorzystaniem `classify-sklearn` (Pedregosa et al. 2011). Dodatkowo, użyto również narzędzia `FunGuild` w celu taksonomicznego podziału grzybów na gildie ekologiczne.

Do dalszej analizy tak przygotowanych danych w języku R (wersja 4.1.2) (R Core Team 2021) w programie RStudio (wersja 2021.09.2) użyto biblioteki `phyloseq`, z wykorzystaniem której utworzono specyficzny obiekt typu `phyloseq`, który zintegrował następujące dane: tabelę liczebności ASV, tabelę przyporządkowującą poszczególne ASV do odpowiednich poziomów taksonomicznych oraz tabelę zbierającą metadane poszczególnych próbek. Obliczono oraz porównano alfa bioróżnorodność pomiędzy zdrowymi i porażonymi próbkami za pomocą odpowiednich testów statystycznych, w oparciu o wskaźnik ENS (Effective Number of Species, *pol.* Efektywna liczba gatunków). Następnie obliczono, czy indeks ten różni się pomiędzy zdrowymi i porażonymi próbkami dla wszystkich typów próbek i każdego typu próbki (gleba, ryzosfera, korzenie, części nadziemne roślin) indywidualnie. Dla grup, w których wartość ENS próbek zdrowych i porażonych charakteryzował się rozkładem normalnym (weryfikowanym testem Shapiro-Wilka) i brakiem różnic w wariancjach (test F) (wszystkie próbki razem, korzenie, próbki gleby), zastosowano niesparowany dwupunktowy test T. Dla próbek z ryzosfery, gdzie założenie o równych wariancjach ENS pomiędzy próbkami zdrowymi i porażonymi zostało naruszone, wykonano test ANOVA. Natomiast, dla próbek części nadziemnych, gdzie nie stwierdzono rozkładu normalnego w obrębie zdrowych i porażonych próbek, zastosowano test Wilcoxon. Gdy ostateczny wynik wartości $p < 0,05$, stwierdzono istotne różnice pomiędzy wartością ENS w próbkach zdrowych i porażonych patogenami.

Następnie, użyto analizy głównych współrzędnych/skalowania wielowymiarowego w oparciu o przygotowaną macierz odmienności Bray-Curtisa do analizy beta różnorodności oraz odpowiednich testów statystycznych. Przeprowadzono permutacyjną wielowymiarową analizę wariancji (PERMANOVA) z 9999 permutacjami, aby ocenić różnice beta-różnorodności pomiędzy typem próbki a stanem zdrowia dla wszystkich typów próbek zbiorczo oraz każdego typu próbki osobno. Zbadano homogeniczność wariancji pomiędzy grupami oraz przeprowadzono test PERMANOVA parami (9999 permutacji, metodą korekcji jednoczesnego testowania wielu hipotez Benjaminiego oraz Hochberga) (Benjamini and Hochberg 1995) do ujawnienia różnic między każdą parą typów próbek.

Następnie porównano mediany liczebności trybów troficznych pomiędzy zdrowymi oraz porażonymi grupami dla wszystkich typów próbek łącznie, jak również dla każdego typu próbki indywidualnie za pomocą testu Kruskala-Wallisa i skorygowano wartości p metodą Benjaminiego & Hochberga.

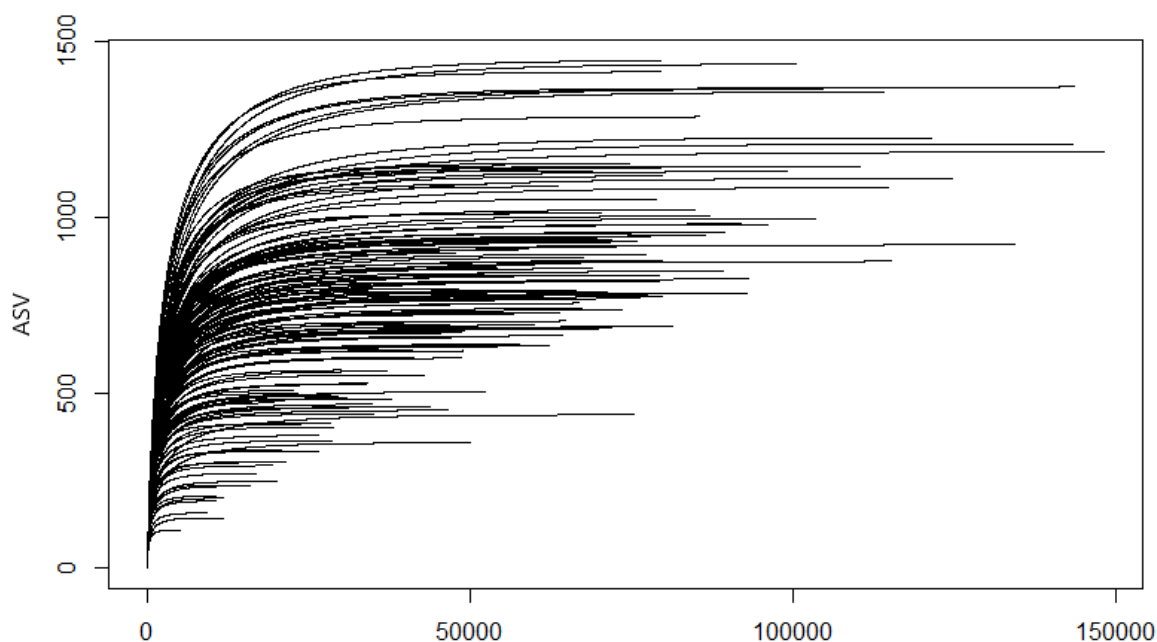
Do wykrywania taksonów różnie obfitych w oparciu o rozkład ujemny dwumianowy (Gamma-Poisson) wykorzystano pakiet DESeq2 z testami istotności Wald i parametrycznym typem dopasowania dyspersji do średniej intensywności.

W celu wykrycia gatunków rdzeniowych dla próbek zdrowych i niezdrowych w każdym typie próbki wykorzystano obiekt phyloseq zagregowany do poziomu gatunku oraz polecenie 'core_memebers' z pakietu microbiome z detekcją ustawioną na 0,001 i prewalencją na 95%.

Wyniki

3.4.3. Wstępna charakterystyka wyników sekwencjonowania

Otrzymane po sekwencjonowaniu oraz wstępnej obróbce bioinformatycznej tabele ASV, taksonomii oraz metadane zaimportowano do RStudio oraz utworzono obiekt phyloseq, na którym przeprowadzono kolejne analizy. Po usunięciu odczytów zidentyfikowanych do innych królestw niż Grzyby oraz kłady Stramenopiles dwóch próbek, w których otrzymano mniej niż 1 000 odczytów, otrzymano 9 085 062 odczytów (średnio: 60 164,5 odczytów na próbkę oraz 607 412 odczytów na ASV), zebranych 14 957 ASV w 151 próbkach. Plateau krzywych rozrzedzenia został osiągnięty we wszystkich próbkach, co sugeruje, że różnorodność grzybów została pokryta w wystarczającym stopniu (Rysunek 6).



Rysunek 6. Krzywe rozrzedzenia utworzone dla wszystkich sekwencjonowanych próbek.

Generalnie mykobiom badanych próbek składał się głównie z przedstawicieli typu Ascomycota (średnia: 69,22% zakres: 34,6% - 93,53%) i Basidiomycota (średnia: 22,43%, zakres: 3,53% - 63,27%), co było zgodne z wynikami uzyskanymi przez inne zespoły (Huang i in., 2018; Mirmajlessi i in., 2018). Za tymi dwoma dominującymi typami uplasowały się

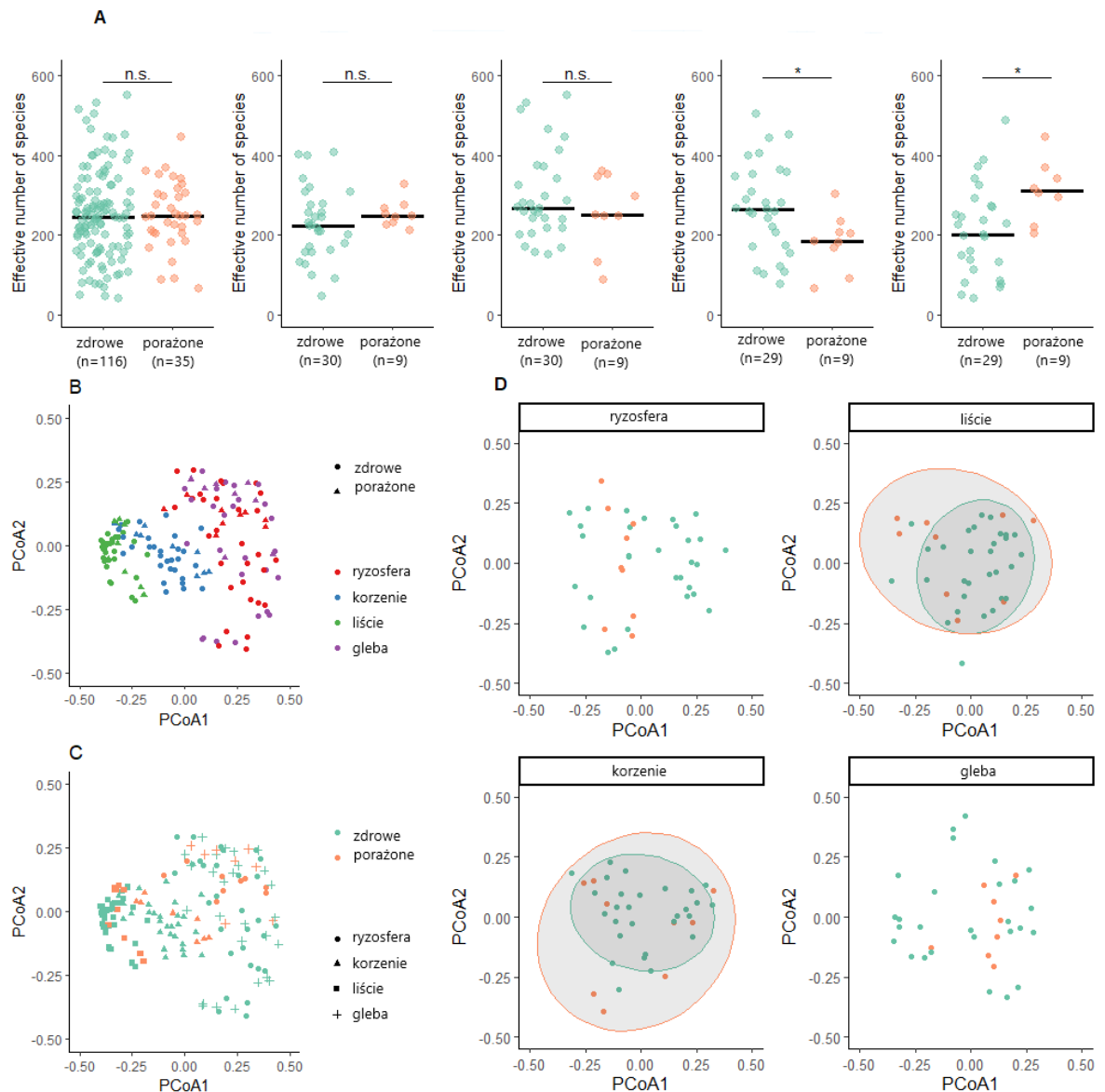
Morteriellomycota (średnia: 5,53%, zakres: 0% - 24,58%), grzyby należące do niezidentyfikowanego typu (średnia: 1,9%, zakres: 0% - 12,79%), Chytridiomycota (średnia: 0,41%, zakres: 0% - 4,64%) i Mucoromycota (średnia: 0,22%, zakres: 0% - 5,24%), a pozostałe typy, które stanowiły 4,29% względnej liczebności w analizowanych próbkach to: Rozellomycota, Glomeromycota, Zoopagomycota, Oomycota, Kickxellomycota, Basidiobolomycota, Olpidiomycota, Aphelidiomycota, Monoblepharomycota, Blastocladiomycota, Entomophthoromycota, niesklasyfikowane Stramenopiles i Ochrophyta.

3.4.4. Alfa oraz beta różnorodność zbiorowisk grzybowych

Niektóre badania sugerują, że wysoka różnorodność mikrobiologiczna poprawia stabilność zbiorowiska (Delgado-Baquerizo et al. 2016; Lefcheck et al. 2015). W niniejszych badaniach do określenia różnorodności mikrobiologicznej wykorzystano miarę efektywnej liczby gatunków (ang. *Effective Number of Species*-ENS), gdyż najczęściej stosowane w mikrobiologii glebowej indeksy charakteryzują się istotną wadą - są to entropie, a nie zróżnicowania, a ich matematyczne zachowanie zwykle nie odpowiada teoretycznej lub intuicyjnej koncepcji różnorodności wśród biologów (Jost 2006).

Sprawdzono, jak status zdrowotny truskawki wpływa na różnorodność mikrobiologiczną, porównując ENS we wszystkich próbkach i w każdym typie próby niezależnie (Rysunek 7A). Analiza statystyczna wykazała, że status zdrowotny nie miał wpływu na alfa różnorodność zbiorowisk grzybów, gdy wszystkie próbki były rozpatrywane razem ($p > 0,05$), jak również dla próbek ryzosfery ($p > 0,05$) i części nadziemnych ($p > 0,05$) (nawet jeśli objawy choroby były widoczne na roślinie) i te wyniki były spójne z wynikami badań przeprowadzonych na zdrowej i chorej ryzosferze pomidora (W. Xiong et al. 2020). Niemniej, miara α różnorodności była istotnie niższa w próbkach porażonych korzeni ($p < 0,05$). Co zaskakujące, alfa różnorodność była istotnie wyższa w porażonych próbkach gleby (Rysunek 7 $p < 0,05$), co jest przeciwieństwem tego, co stwierdzono w uprawie arbuza zaatakowanego przez *Fusarium* (Wang et al. 2019). Kiedy wszystkie próbki były rozpatrywane łącznie w analizie beta-różnorodności, wykres PCoA oraz analiza PERMANOVA parami ujawniły, że próbki ryzosfery i gleby zgrupowały się w jeden klaster odpowiadający typom próbek (gleba ryzosferowa oraz gleba, korzenie i części nadziemne roślin) (Rysunek 7B). Co ważne, wykres PCoA nie ujawnił wyraźnych zgrupowań pod kątem zdrowotności próbek (Rysunek 7C). Następnie, oceniono istotność statystyczną obserwowanego składu zbiorowości za pomocą analizy PERMANOVA. W rezultacie potwierdzono statystyczną różnicę pomiędzy typami próbek i stanem zdrowia, które wyjaśniały odpowiednio 24,7% i 4,9% wariacji danych.

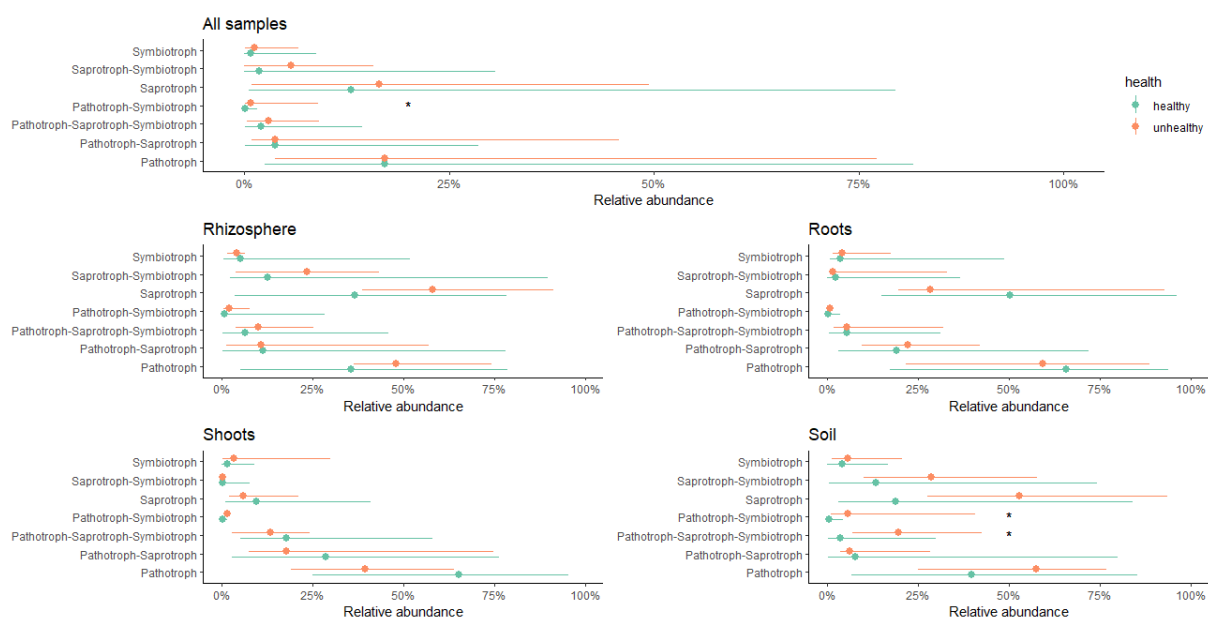
Następnie wykonano wykresy PCoA dla każdego typu próbki indywidualnie, według stanu zdrowia. Analiza PERMANOVA wykazała, że we wszystkich grupach próbek - w glebie ryzosferowej, częściach nadziemnych, korzeniach i glebie pozaryzosferowej, skład zbiorowiska grzybów różnił się pomiędzy zdrowymi i porażonymi próbkami i wyjaśniał odpowiednio 4,7%, 4,9%, 3,6% i 5,2% zmienności próbki. Jednak tylko próbki pędów i korzeni wykazywały jednorodne dyspersje grupowe pomiędzy stanem zdrowotnym (Rysunek 7D).



Rysunek 7. Alfa oraz β różnorodność zbiorowisk grzybowych badanych próbek. A - α -różnorodność (wyrażona w efektywnej liczbie gatunków) pomiędzy zdrowymi i porażonymi plantacjami truskawek razem dla wszystkich próbek i dla 4 typów próbek osobno. Zielone i czerwone kropki wskazują próbki, poziome linie wskazują mediany w obrębie grup; zmienność próbek na osi x jest losowa i dodana w celu wizualizacji rozkładu wszystkich próbek; n.s.: nieistotne statystycznie, *: istotne statystycznie na poziomie istotności $p < 0,05$. B-D - Wykresy PCoA mykobiomu plantacji truskawek, w zależności od typu próbki i statusu zdrowotnego (zdrowy vs porażony) oraz typu próbki dla wszystkich próbek łącznie i kolejnych typów próbek. Wykresy wykonano przy użyciu pakietów vegan, phyloseq i microbiome w RStudio.

3.4.5. Grupy troficzne

Następnie zbadano różnice w medianach względnych obfitości mikroorganizmów grzybowych przypisanych do 6 trybów troficznych: symbiotrof, saprotrof-symbiotrof, saprotrof, patotrof-symbiotrof, patotrof-saprotrof-symbiotrof, patotrof-saprotrof i patotrof pomiędzy zdrowymi i porażonymi próbkami truskawek (Rysunek 8), wykorzystując bazę danych FUNGuild (Nguyen et al. 2016). Z analizy odrzucono wszystkie ASV, do których nie udało się przyporządkować poziomu troficznego i użyto tylko ASV, które zostały zaliczone do kategorii prawdopodobne (*Probable*) i wysoce prawdopodobne (*Highly Probable*), zgodnie z zaleceniami twórcy bazy danych.



Rysunek 8. Skład trybów troficznych zbiorowisk grzybów pomiędzy zdrowymi i porażonymi próbkami gleby, ryzosfery, korzeni oraz części nadziemnych truskawek. Kropki oznaczają mediany liczebności, a poziome linie pokazują 0,95 przedziały ufności. Istotne różnice pomiędzy stanem zdrowia w obrębie grup oznaczono gwiazdką (p. skorygowane < 0,05). Wykres został wykonany za pomocą pakietu tidyverse w RStudio.

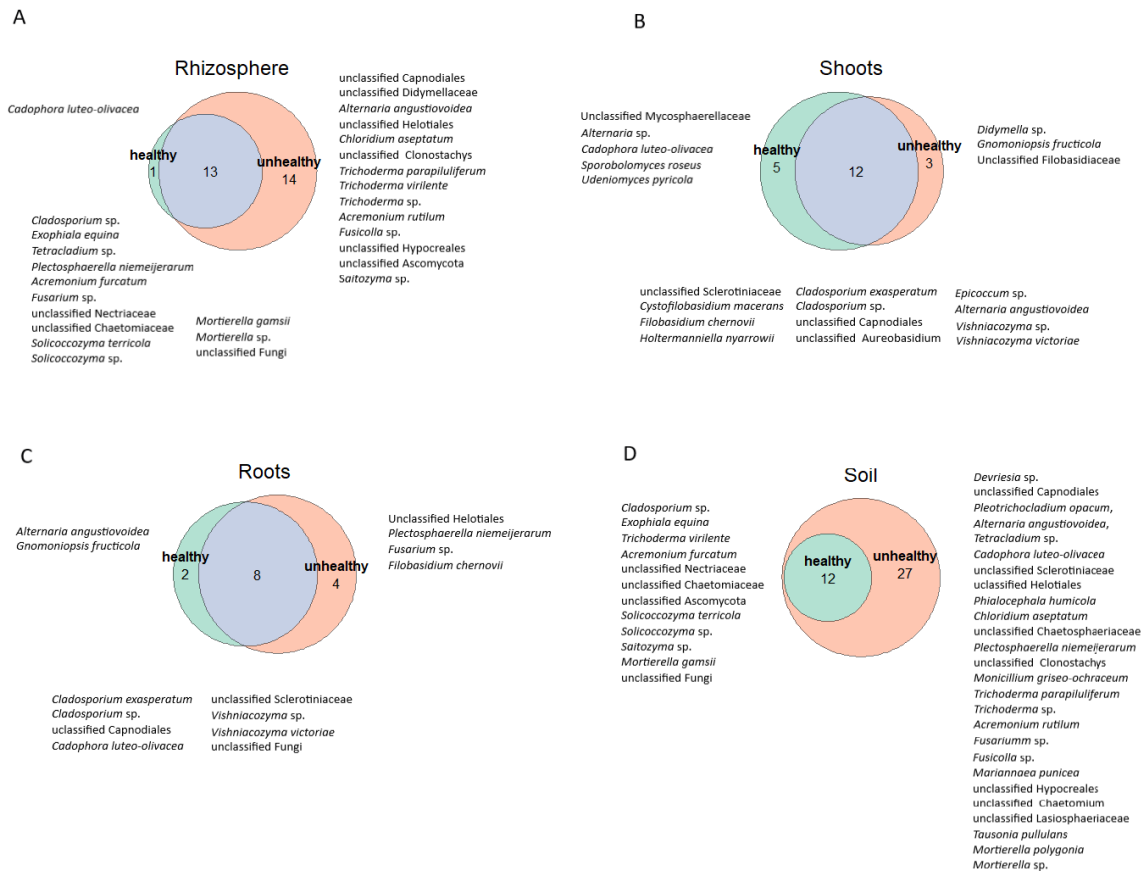
Kiedy wszystkie typy próbek były brane pod uwagę łącznie, tylko mediana względnej liczebności taksonów patotrofów-symbiotrofów była niższa w próbkach zdrowych (p-value < 0,05). W przypadku próbek ryzosfery, korzeni i liści nie odnotowano istotnych różnic pomiędzy próbkami zdrowymi i porażonymi. W próbkach gleby zdrowej taksony zaklasyfikowane jako patotrof-symbiotrof i patotrof-saprotrof-symbiotrof były mniej liczne w porównaniu z próbkami gleby porażonej (p-value < 0,05). Stwierdzono, że sytuacja ta była spowodowana większą liczebnością mieszanych trybów troficznych grzybów: patotrof-symbiotrof i patotrof-saprotrof-symbiotrof w porażonych próbkach gleby. Jest prawdopodobne, że te mikroorganizmy działały głównie jako patotrofy w tych próbkach gleby.

3.4.6. Mykobiom rdzeniowy

Ustalenie rdzeniowych taksonów grzybów w skomplikowanych zbiorowiskach mikrobiomu roślin jest kluczowe dla lepszego zrozumienia krytycznych składników tych zbiorowisk. W ramach przeprowadzonych badań zidentyfikowano rdzeń mikrobiomu grzybowego zdrowych i porażonych próbek każdego typu (gleba, ryzosfera, korzenie, części nadziemne) indywidualnie. Gatunki rdzeniowe zdefiniowano jako gatunki obecne w co najmniej 95% próbek i tworzące 0,1% względnej liczebności w próbce. Dla próbek ryzosfery zidentyfikowano 1, 14 oraz 13 ASV zaklasyfikowanych do poziomego gatunku, charakterystycznych odpowiednio dla próbek zdrowych, porażonych oraz wspólnych dla próbek zdrowych i porażonych (Rysunek 9). W próbkach części nadziemnych zdrowych roślin truskawki występowało 5 gatunków wspólnych, 3 gatunki w roślinach porażonych i 12 wspólnych gatunków dla zdrowych i niezdrowych roślin. Ponadto, w próbach zdrowych korzeni występowały 2 wspólne gatunki grzybów, w porażonych 4, a 8 gatunków było wspólnych dla zdrowych i porażonych plantacji. W próbach gleby nie zidentyfikowano gatunków rdzeniowych na plantacjach zdrowych, niemniej jednak 27 gatunków było typowych dla plantacji porażonych, a 12 stanowiło taksony wspólne dla zdrowych i porażonych plantacji.

Stwierdzono, że porażone próbki ryzosfery, korzeni, gleby i wszystkie próbki łącznie miały więcej taksonów należących do społeczności rdzeniowej, podobnie jak w badaniach przeprowadzonych na grochu (Hossain et al. 2021). Poprzednie badania wykazały, że taksony rdzeniowe są zgodne z taksonami dominującymi w zbiorowiskach mikrobiomu (Yang et al. 2020), ale badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej sugerują, że nie jest tak w przypadku mikrobiomu grzybowego truskawki. Mimo, że część taksonów najliczniej występujących należała do taksonów rdzeniowych, nie dotyczyło to niektórych mikroorganizmów, co sugeruje, że mniej obfite grzyby są również bardzo ważnymi czynnikami kształtującymi zbiorowiska grzybowe i nie mogą być pomijane przy ich analizie. Z drugiej strony, ważny takson stanowią grzyby należące do rodzaju *Cladosporium*, który był jednym z 20 najobficiej występujących gatunków i taksonem podstawowym zarówno na plantacjach zdrowych, jak i porażonych oraz w każdym typie próbki. Co warto zauważyć, takson ten został również odnotowany jako grzyb rdzeniowy innych gatunków roślin (Hamonts et al. 2018), co sugeruje, że jest on kluczowym członkiem mykobiomu roślin. Jeśli chodzi o różne taksony rdzeniowe, zidentyfikowano również szereg grzybów, które nie mogły być przypisane do niższych poziomów taksonomicznych - mikrobiom truskawki składał się zarówno z taksonów

dobrze znanych, jak i taksonów słabo scharakteryzowanych lub nawet nieznanymi, co jest zgodne z wynikami badań literaturowych (De Souza et al. 2016; Hamonts et al. 2018).



Rysunek 9. Wykresy Venna przedstawiające taksony rdzeniowe dla każdego typu próbek z osobna, dla próbek zdrowych i porażonych. Wykres został wykonany przy użyciu pakietów phyloseq, microbiome, metagMisc i eulerr w RStudio.

3.4.7. Analiza różnicowej liczebności

Po określeniu mykobiomu rdzeniowego, przeprowadzono analizę różnicową obfitości pomiędzy zdrowymi i porażonymi plantacjami dla każdego typu próbki indywidualnie (Rysunek 10). W próbkach ryzosfery zidentyfikowanych zostało 19 różnych rodzajów, które różniły się liczebnością pomiędzy zdrowymi i porażonymi próbkami. Osiem z nich zostało scharakteryzowanych jako patotrofy (*Conocybe* sp., *Lecanicillium* sp., *Acremonium* sp., *Coniochaeta* sp., *Mucor* sp., *Paraphaeospora* sp., *Trichoderma* sp., *Pseudozyma* sp.), 16 było liczniejszych w próbach zdrowych, a 3 w porażonych. Zidentyfikowany został również jeden takson, który w literaturze rozpoznawany jest jako typowy patogenem truskawki - *Mucor* sp. (Feliziani and Romanazzi 2016), ale był on bardziej liczny w zdrowych próbach. Te wyniki mogą sugerować, że grzyb ten może być odpowiedzialny za kolonizację korzeni truskawek jako pożyteczny grzyb endofityczny, którego oddziaływanie z rośliną zostało potwierdzone w badaniach interakcji między *Arabidopsis thaliana* i *Mucor* sp. (Rozpądek et al. 2018).

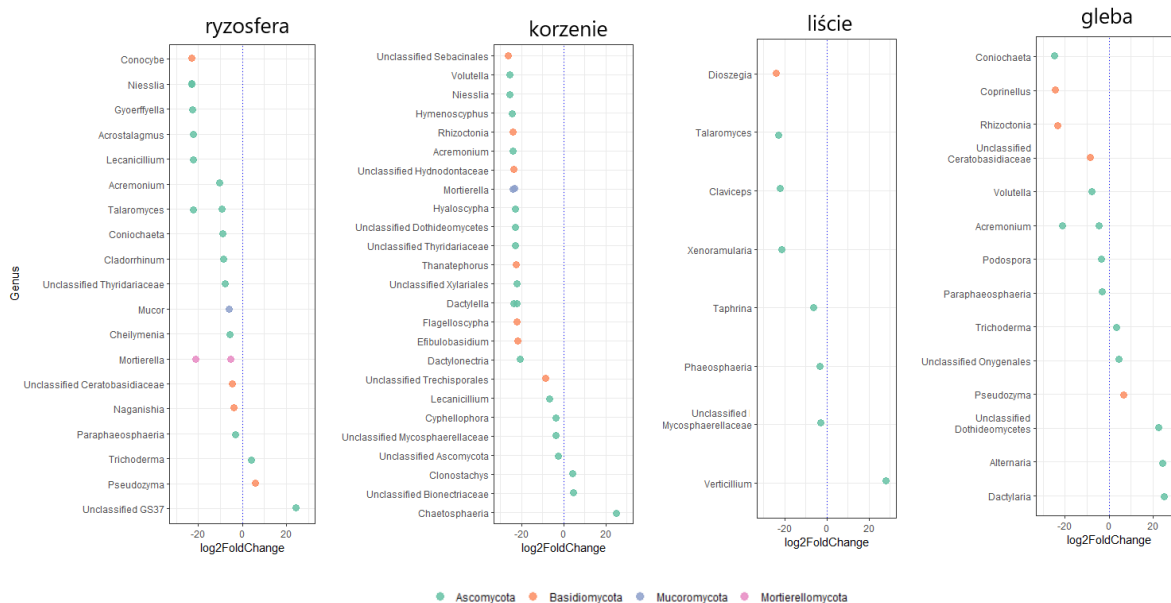
Stwierdzono, że rodzaje *Niesslia* i *Gyoeerfyella*, które uczestniczą w rozkładzie materii organicznej (Gams et al. 2019; Purahong et al. 2016) były znacznie mniej liczne w próbkach pochodzących z plantacji porażonych. Odnotowano również szereg rodzajów, które są znane jako grzyby antagonistyczne wobec patogenów roślinnych i były mniej obfite w próbkach z plantacji porażonych. Naukowcy donoszą, że *Acrostalagmus luteoalbus* ma aktywność przeciwgrzybiczą wobec *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* i *Phytophthora drechsleri* (Lv et al. 2019). Szereg gatunków należących do rodzaju *Talaromyces* jest znana jako mikroorganizmy antagonistyczne przeciwko patogenom grzybowym roślin (Thambugala et al. 2020), ale również gatunki odporne na ciepło, jak *T. flavus*, które mogą stanowić istotne zagrożenie dla produkcji żywności (Panek and Frąc 2018). Z kolei grzyby z rodzaju *Cladorrhinum*, wykorzystywane jako czynniki biokontrolne, znane są ze zdolności znacząco ograniczających fuzariozę pomidora (Martin et al. 2019). Przeprowadzone badania wykazały również, że dwa gatunki z rodzaju *Mortierella*, które są gatunkami promującymi wzrost roślin (Ozimek and Hanaka 2021) były również mniej obfite w roślinach porażonych. Analiza wyników wykazała, że przedstawiciele rodzaju *Naganishia* były mniej obfite w porażonej ryzosferze truskawki, co potwierdza rezultaty dotyczące gleb, w których rozwinęła się choroba zgnilizny korzeni jabłoni, wskazujące na bardziej obfite występowanie tych grzybów (Yang et al. 2020).

W korzeniach truskawek zidentyfikowano taksony różniące się liczebnością, które należały do 25 różnych rodzajów i należały do typów Ascomycota, Basidiomycota i Mucoromycota. 22 gatunki były mniej liczne w próbkach porażonych niż zdrowych, a 3 były bardziej liczne w próbkach porażonych. Podobnie jak w ryzosferze, zidentyfikowano jeden takson będący typowym patogenem truskawki - *Rhizoctonia* sp., oraz 8 innych taksonów należących do patotrofów (*Volutella* sp., *Acremonium* sp., *Thanatephorus* sp., *Flagelloscypha* sp., *Lecanicillium* sp., *Cyphellophora* sp., *Clonostachys* sp.). Porażone korzenie truskawek miały mniejszą liczebność *Sebacinales*, a przeprowadzone badania (Lee and Hawkes 2021) sugerują, że *Sebacinales* mogą być komplementarne do grzybów mykoryzowych występujących w korzeniach roślin. Inne rodzaje grzybów, które były mniej liczne w korzeniach porażonych roślin truskawki, a które wydają się odgrywać ważną rolę w utrzymaniu zdrowotności i rozwoju roślin to przedstawiciele *Hymenoscyphus*, które z jednej strony są potencjalnie patogeniczne dla maliny (Oszust and Frąc 2021), ale także uznane są za czynnik kontrolny przeciwko zgniliznie korzeni powodowanej przez *Pythium* m.in. *Hyaloscypha* sp., *H. variabilis* (Marian et al. 2022), oraz wykazują mechanizmy antagonistyczne przeciwko nicieniom m.in. *Dactylella* sp. (Topalović, Hussain, and Heuer

2020). Przeprowadzone badania wykazały również, że *Chaetosphaeria*, które potencjalnie pełnią ważną rolę w rozwoju roślin i tolerancji na choroby trzciny cukrowej (Tayyab et al. 2021), były bardziej obfite w porażonych korzeniach truskawek.

Co ciekawe, w próbkach części nadziemnych roślin truskawki zidentyfikowano najmniejszą liczbę taksonów różniących się liczebnością - tylko 7 rodzajów było bardziej obfitych w próbkach zdrowych, a jeden, który jest typowym patogenem truskawki - *Verticillium* sp. był bardziej obfity w próbkach pochodzących z plantacji porażonych. Ponadto, 3 kolejne taksony zostały zaklasyfikowane jako patotrofy (*Claviceps* sp., *Xenoramularia* sp., *Taphrina* sp.).

W próbkach gleby zidentyfikowano 14 różnych rodzajów, które charakteryzowały się zróżnicowaną obfitością pomiędzy zdrowymi i porażonymi próbkami, z których 8 było bardziej obfitych w zdrowych próbkach, a 6 było bardziej obfitych w próbkach porażonych, 10 było patotrofami (*Coniochaeta* sp, *Coprinellus* sp., *Volutella* sp., *Acremonium* sp., *Paraphaeoshaeria* sp., *Trichoderma* sp., *Pseudozyma* sp., *Dactylaria* sp.), a 2 - *Rhizoctonia* sp. i *Alternaria* sp. należały do typowych patogenów truskawki (Garrido et al. 2011). Mniej obfite w porażonych częściach nadziemnych roślin truskawki drożdże saprotroficzne *Dioszegia* sp. odnotowano również w liściach roślin poddanych działaniu fungicydów (Karlsson et al. 2014). Również mniej obfite grzyby z rodzaju *Talaromyces* odnotowano jako organizmy antagonistyczne wobec patogenów grzybowych roślin (Thambugala et al. 2020). Przeprowadzone badania wykazały, że przedstawiciele *Phaeosphaeria* były mniej obfite w próbkach pochodzących z plantacji porażonych, a rezultaty innych naukowców pokazały, że były również negatywnie skorelowane z występowaniem gatunków grzybów produkujących aflatoksynę w ryżu w Chinach, dlatego mogłyby mieć potencjalne zastosowanie w kontrolowaniu obfitości toksynotwórczych patogenów grzybowych (Qi et al. 2022).



Rysunek 10. Analiza różnicowa gatunków występujących na zdrowej i porażonej plantacji truskawek. Każdy takson został zidentyfikowany do poziomu rodzaju. Pokazano tylko wyniki istotne, z p. skorygowanym <0,05. Wykres został wykonany przy użyciu pakietów phyloseq i DESeq2 w RStudio.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że populacje niektórych taksonów rdzeniowych dla próbek pochodzących ze zdrowych lub porażonych plantacji charakteryzowały się różną obfitością między próbkami o różnym statusie zdrowotnym. W szczególności - *Acremonium* sp. był taksonem rdzeniowym dla zdrowych i porażonych próbek gleby i ryzosfery, a jednocześnie był znacząco mniej liczny w próbkach ryzosfery, korzeni i gleby pochodzących z plantacji porażonych. W innych badaniach wykazano również, że takson ten jest potencjalnym czynnikiem hamującym rozwój chorób (Liu et al. 2021). Różne badania wykazały również, że grzyby z rodzaju *Acremonium* promują wzrost roślin, ponieważ opierają się patogenom przenoszonym przez glebę (Breen 1994; Zheng et al. 2017). Grzyby z rodzaju *Mortierella* również były identyfikowane jako taksony rdzeniowe zdrowych i porażonych próbek ryzosfery i gleby, a także należały do najbardziej obfitych w tych dwóch typach próbek. Co więcej, odkryto, że takson ten był mniej liczny w zdrowych próbkach ryzosfery i korzeni. Grzyby te zostały również opisane jako ważne mikroorganizmy promujące wzrost roślin, co podkreśla ich znaczenie w kształtowaniu zdrowego mykobiomu (Ozimek and Hanaka 2021; Qin et al. 2017; Toju, Tanabe, and Sato 2018), który może również brać udział w kontroli nicieni (Topalović, Hussain, and Heuer 2020). Co ciekawe, jeśli chodzi o próbki korzeniowe, stwierdzono, że jeden z najobficiej występujących taksonów, który był również znacznie mniej liczny w próbkach porażonych - *Dactylonectria* sp., powodujący czarną zgniliznę korzeni truskawki w Chinach (Chen et al. 2021), jest również patogenem winorośli (Bleach et al. 2021) i wykazał negatywną korelację ze wzrostem roślin truskawki w różnych

badaniach (Soppelsa et al. 2021). Wyniki uzyskane w niniejszej rozprawie doktorskiej są odmienne i mogą być spowodowane faktem, że w korzeniach truskawek *Dactylonectria* sp. może funkcjonować jako niepatogenny endofit, występujący również w trawach i winorośli (Gramaje et al. 2020). Ważnym taksonem wydaje się być również ASV należący do rzędu Trechisporales, który został zidentyfikowany jako jeden z najliczniejszych taksonów, znacznie mniej liczny w próbach korzeni pochodzących z roślin porażonych. Również w częściach nadziemnych roślin truskawki zidentyfikowano ważny, ale słabo rozpoznany takson, który był jednym z najliczniejszych, również w grupie rdzeniowych mikroorganizmów zdrowych próbek - niesklasyfikowany do rodzaju ASV należący do rodziny Mycosphaerellaceae. Obecność tych dwóch słabo rozpoznanych taksonów przypomina, że niektóre mikroorganizmy, które są ważnymi czynnikami zdrowia roślin, są niewystarczająco opisane. Dalsza analiza danych wykazała, że w glebie występowały dwa bardzo ważne grzyby, które kształtowały zbiorowisko i należały do najliczniejszych taksonów - *Acromonium* sp. i *Alternaria* sp., które również były odpowiednio mniej i bardziej liczne w próbach pochodzących z plantacji porażonych. Drugi takson również należał do taksonów rdzeniowych próbek gleby pobranych z plantacji porażonych i jest znany jako patogen truskawki (Dwiastuti et al. 2021; Nishikawa and Nakashima 2019).

Określenie różnie obfitych taksonów grzybów pomiędzy roślinami zdrowymi a porażonymi może pomóc wskazać główne czynniki powodujące występowanie chorób roślin. Badane próbki pochodzące z ekologicznych plantacji truskawek posiadały taksony zdefiniowane jako mniej obfite w porażonych próbkach, co kontrastuje z badaniami zespołu Hossaina przeprowadzonymi na grochu, w których zdrowe próbki charakteryzowały się większą obfitością taksonów wskaźnikowych niż porażone (Hossain et al. 2021). Przeprowadzone badania wykazały obecność we wszystkich rodzajach próbek szeregu grzybów patogennych dla roślin, w tym typowych patogenów truskawki. Jednakże tylko rodzaj *Verticillium* był bardziej obfity w próbkach roślinnych. Chociaż grzyby z rodzaju *Alternaria*, atakujące uprawy truskawki występowały liczniej w próbkach gleby z plantacji porażonych, to były również jednym z najliczniejszych taksonów w próbkach ryzosfery, korzeni i części nadziemnych roślin, w tym należały do głównych taksonów ryzosfery i korzeni pochodzących z plantacji porażonych. Jednocześnie obfitość przedstawicieli tego rodzaju w częściach nadziemnych roślin truskawki była wysoka, co mogło być spowodowane faktem, że atakują one system korzeniowy, powodując stopniowe zamieranie całych roślin. Badania wykazały, że w przeciwieństwie do grzybów z rodzaju *Verticillium* sp., które prosperowały w próbkach liści, obfitość innych typowych patogenów truskawki, należących do rodzaju *Mucor* (Feliziani and

Romanazzi 2016) i *Rhizoctonia* (Avilés et al. 2019; Guarnaccia et al. 2022) była mniejsza w próbkach części nadziemnych porażonych roślin truskawek, co może wskazywać na konkurencję między grzybami z rodzaju *Verticillium* i tymi patogenami.

Mikroorganizmy występujące najliczniej a mikroorganizmy rdzeniowe oraz różnicujące

W wyniku przeprowadzonych badań ostatecznie ustalono 20 najliczniej występujących rodzajów we wszystkich typach próbek i połączono te informacje z taksonami rdzeniowymi oraz analizą różnicową liczebności (Tabela 1). W ryzosferze stwierdzono obecność rodzaju *Acremonium* i 2 ASV należące do rodzaju *Mortierella*, które również należały do taksonów rdzeniowych stwierdzonych w próbkach pobranych z plantacji zdrowych i porażonych. W korzeniach występowały przedstawiciele rodzaju *Dactylonectria* i niesklasyfikowane do rodzaju taksony reprezentujące rząd Trechisporales. W częściach nadziemnych roślin truskawki stwierdzono obecność niesklasyfikowanych do rodzaju przedstawicieli rodziny Mycosphaerellaceae (również występujących w mykobiomie rdzeniowym zdrowych plantacji); a w glebie przedstawiciele rodzaju *Acremonium* (charakteryzującego się różną liczebnością w próbkach pochodzących z plantacji zdrowych i porażonych) i *Alternaria*, wchodzących w skład mykobiomu rdzeniowego próbek pochodzących z plantacji porażonych.

Tabela 1. Dwadzieścia najliczniejszych ASV (zidentyfikowanych do rodzaju) we wszystkich próbkach łącznie i w każdym typie próbki indywidualnie. Czarnym kółkiem (●) zaznaczono rodzaje, które były różnie obfite w każdym typie próbek pomiędzy plantacjami zdrowymi i porażonymi. Zielonym trójkątem (▶) zaznaczono rodzaje, które stanowiły mykobiom rdzeniowy dla zdrowych plantacji w każdym typie próbek. Czerwonym kwadratem (■) zaznaczono rodzaje, które były głównym składnikiem mikrobiomu grzybowego dla próbek porażonych w każdym typie próbki. Brak symbolu wskazuje na rodzaje, które nie były zróżnicowane pod względem liczebności w obu typach próbek, ani nie należały do taksonów rdzeniowych dla plantacji zdrowych i porażonych.

ryzosfera	korzenie	części nadziemne	gleba
<i>Cadophora</i> sp. ▶	<i>Cadophora</i> sp. ▶ ■	<i>Cadophora</i> sp. ▶	<i>Cadophora</i> sp. ■
nieskl. Nectriaceae ■	<i>Cadophora</i> sp. ▶ ■	nieskl. Mycosphaerellaceae ▶ ●	nieskl. Nectriaceae ▶ ■
<i>Fusarium</i> sp. ▶	<i>Dactylonectria</i> sp. ●	<i>Gnomoniopsis</i> sp. ■	<i>Fusarium</i> sp. ■
<i>Exophiala</i> sp. ▶ ■	<i>Fusarium</i> sp. ■	<i>Plectosphaerella</i> sp. ▶ ■	<i>Exophiala</i> sp. ▶ ■
nieskl. Chaetomiaceae ▶ ■	<i>Gnomoniopsis</i> sp. ▶	<i>Alternaria</i> sp. ▶ ■	nieskl. Chaetomiaceae ▶ ■
<i>Botryotrichum</i> sp. ▶ ■	<i>Plectosphaerella</i> sp. ■	nieskl. Capnodiales ▶ ■	<i>Acremonium</i> sp. ●
<i>Acremonium</i> sp. ▶ ■ ●	<i>Alternaria</i> sp. ▶	<i>Cladosporium</i> sp. ▶ ■	<i>Alternaria</i> sp. ■ ●
<i>Alternaria</i> sp. ■	nieskl. Capnodiales ▶ ■	<i>Cladosporium</i> sp. ▶ ■	nieskl. Capnodiales ▶ ■
nieskl. Capnodiales ▶ ■	<i>Cladosporium</i> sp. ▶ ■	<i>Filobasidium</i> sp. ▶ ■	<i>Cladosporium</i> sp. ▶ ■
<i>Cladosporium</i> sp. ▶ ■	<i>Cladosporium</i> sp. ▶ ■	<i>Sporobolomyces</i> sp. ▶	<i>Cladosporium</i> sp. ▶ ■
<i>Cladosporium</i> sp. ▶ ■	nieskl. Grzyb	<i>Symmetrospora</i> sp.	nieskl. Grzyb

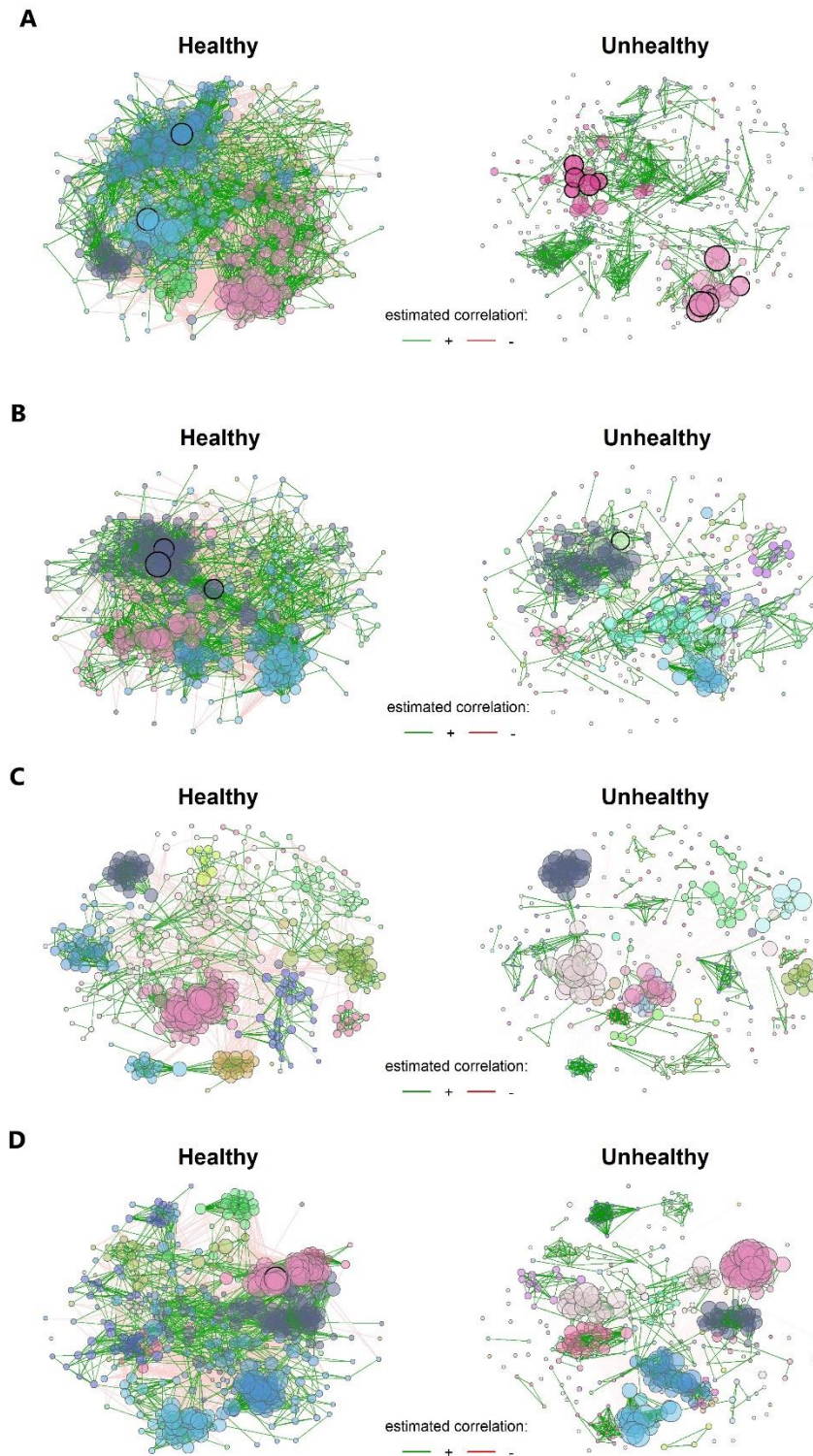
nieskl. Grzyb	nieskl. Ceratobasidiaceae	<i>Vishniacozyma</i> sp. ▶ ■	<i>Tausonia</i> sp. ■
<i>Tausonia</i> sp.	<i>Vishniacozyma</i> sp.	<i>Vishniacozyma</i> sp. ▶ ■	<i>Saitozyma</i> sp. ▶ ■
<i>Saitozyma</i> sp. ■	nieskl. Trechisporales ●	<i>Didymella</i> sp. ■	<i>Solicoccozyma</i> sp. ▶ ■
<i>Solicoccozyma</i> sp. ▶ ■	<i>Didymella</i> sp.	<i>Epicoccum</i> sp. ▶ ■	<i>Solicoccozyma</i> sp. ▶ ■
<i>Solicoccozyma</i> sp. ▶ ■	nieskl. Didymellaceae	nieskl. Didymellaceae	nieskl. Didymellaceae
<i>Mortierella</i> sp. ▶ ■ ●	nieskl. Sclerotiniaceae ▶ ■	<i>Paraphoma</i> sp.	<i>Mortierella</i> sp. ▶ ■
<i>Mortierella</i> sp. ▶ ■ ●	nieskl. Helotiales ■	nieskl. Chaetomellaceae	<i>Mortierella</i> sp. ▶ ■
nieskl. Sclerotiniaceae	<i>Dactylaria</i> sp.	<i>Podosphaera</i> sp.	nieskl. Sclerotiniaceae ■
<i>Tetracladium</i> sp. ▶	<i>Tetracladium</i> sp.	nieskl. Sclerotiniaceae ▶ ■	<i>Tetracladium</i> sp.

3.4.8. Sieci grzybowych powiązań w mykobiomie zdrowych i porażonych plantacji truskawki

Mikroorganizmy grzybowe, które żyją w bezpośredniej bliskości roślin ważnych z punktu widzenia rolnictwa, tworzą skomplikowane sieci zależności między innymi grzybami, ale również z gospodarzem roślinnym. Zrozumienie tych zależności, które są charakterystyczne nie tylko dla ryzosfery, gleby pozaryzosferowej, korzeni i części nadziemnych roślin, ale także dla zdrowych i porażonych chorobowo plantacji, może przybliżyć nas do wypracowania nowych rozwiązań dla zrównoważonego rolnictwa.

Badania obejmowały porównanie sieci powiązań, które tworzą grzyby na zdrowych i chorych plantacjach truskawek, po zsekwencjonowaniu regionu ITS1 na platformie Illumina MiSeq. Uzyskana taksonomia grzybów, oparta na bazie danych UNITE 8.3, została przetworzona z wykorzystaniem bibliotek phyloseq oraz NetCoMi w programie RStudio, co pozwoliło na analizę sieci powiązań grzybowych i różnic między nimi.

Wykazano, że próbki pochodzące z porażonych chorobowo plantacji charakteryzowały się bardziej rozproszonymi klastrami w obrębie sieci i wykazywały mniej negatywnych korelacji pomiędzy nimi. Natomiast, w próbkach pobranych ze zdrowych plantacji wykazano więcej połączeń między klastrami i wytrzymałość sieci, co wskazuje, że sieci grzybów ze zdrowej gleby, ryzosfery, korzeni i części nadziemnych ekologicznej truskawki są bardziej stabilne niż sieci grzybowe plantacji porażonych chorobowo (Rysunek 11).



Rysunek 11. Sieci różnicowe zdrowych i niezdrowych próbek gleby truskawek, zebranych z plantacji ekologicznych próbek gleby (A), ryzosfery (B), korzeni (C) i części nadziemnych roślin (D). Kolory węzłów reprezentują skupiska, kolory krawędzi reprezentują oszacowaną korelację Pearsona pomiędzy ASV - zielony pozytywną, czerwony negatywną. Pokazano tylko taksony, których suma odczytów wynosi co najmniej 200. Wykresy wykonano za pomocą pakietów phyloseq, genefilter i NetCoMi w RStudio.

3.4.9. Podsumowanie

Zrozumienie interakcji zachodzących w zbiorowiskach grzybów na plantacjach zdrowych i porażonych oraz rozpoznanie taksonów grzybowych, które najbardziej wpływają na zdrowotność upraw truskawek, otwiera możliwości opracowania ekologicznych rozwiązań, takich jak biostymulanty, biopreparaty i inokula mikrobiologiczne zawierające starannie wyselekcjonowane mikroorganizmy, które w naturalny sposób stymulują odpowiedź roślin na patogeny i uodporniają je na choroby. Ponadto, poznanie mykobiomu gleby, na której występują zdrowe i porażone rośliny jest bardzo ważne i może doprowadzić do opracowania strategii produkcji owoców począwszy od etapu zakładania plantacji, dając wskazówki praktyczne, dotyczące zdrowotności danego siedliska. W konsekwencji może to pomóc w rozwoju zrównoważonego rolnictwa z wykluczeniem chemicznych pestycydów oraz przyczyni się do zachowania różnorodności mikrobiologicznej, tak ważnych w uprawie roślin. Co ciekawe, zgodnie z postawioną w niniejszej pracy hipotezą, wykazano, że alfa różnorodność zbiorowisk grzybów była niższa tylko w próbkach korzeni w odpowiedzi na infekcję roślin, ale wyższa w glebie. Ta wyższa różnorodność w glebie była związana z większą liczbą mieszanych patogenicznych trybów troficznych grzybów obecnych w tych próbach. Przeprowadzone badania wykazały również, że liczba taksonów wchodzących w skład mykobiomu rdzeniowego w próbach pochodzących z plantacji zdrowych i porażonych pokrywała się, ale więcej mikroorganizmów należało do taksonów rdzeniowych w pochodzących z porażonych plantacji próbach ryzosfery, korzeni, gleby i wszystkich próbach łącznie. Najbardziej obfite taksony zidentyfikowane w testowanych próbkach były ważnymi komponentami mikrobiomu grzybowego, ponieważ należały również do rdzenia taksonów różnicowo obfitych. Co jednak istotne, nie tylko taksony charakteryzujące się największą obfitością, rdzeniowe i różnicujące kształtowały mikrobiom grzybowy. Uzyskane wyniki sugerują, że rzadkie mikroorganizmy są również ważnymi członkami społeczności i nie można pominąć ich roli w kształtowaniu środowiska wzrostu roślin.

Chociaż w niniejszej pracy rozróżniono zdrowy i porażony chorobowo mikrobiom w ekologicznych uprawach truskawek, na zdrowie rośliny wpływa nie tylko jeden takson grzybów, ale wiele mikroorganizmów, które tworzą skomplikowane sieci wspólnych powiązań. Niestety, klasyczne metody identyfikacji biologicznego markera zdrowia roślin w uprawie, takie jak znalezienie kluczowych mikroorganizmów i identyfikacja taksonów obficie występujących w zdrowych i porażonych roślinach, nie mogą prowadzić do wyboru jednego biomarkera. Do przewidywania, czy dana gleba może być odpowiednia do założenia nowej

plantacji, warto przetestować nowoczesne metody bioinformatyczne, takie jak techniki uczenia maszynowego. Przeprowadzone analizy bioinformatyczne uzyskanych wyników dowiodły, że mykobiom plantacji porażonych chorobowo charakteryzował się bardziej rozproszonymi klastrami w obrębie sieci, natomiast dla zdrowych plantacji wykazywał więcej połączeń między klastrami i wytrzymałość sieci. Uzyskane rezultaty wskazują, że sieci grzybów ze zdrowej gleby, ryzosfery, korzeni i części nadziemnych ekologicznej truskawki są bardziej stabilne niż sieci grzybowe plantacji porażonych chorobowo, co może wyjaśniać ich większą odporność na infekcje. Wdrożenie nie tylko najnowocześniejszych technik sekwencjonowania mikrobiomu, aby najpierw scharakteryzować mikroorganizmy obecne w plantacjach, ale następnie również zastosowanie nowoczesnych statystycznych metod modelowania w ustalaniu najbardziej odpowiedniej gleby dla danej rośliny, przybliży nas do zrównoważonego rolnictwa o obniżonej zawartości pestycydów.

4. Wnioski

W świetle przedstawionych wyników badań, opublikowanych w czasopiśmie tematycznie związanych z problematyką występowania fitopatogenów grzybowych i grzybobodobnych na plantacjach ekologicznych truskawki, hipotezy badawcze założone na wstępie niniejszej rozprawy zostały zwalidowane. Na podstawie wyników przeprowadzonych badań, można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Opracowane metody detekcji real-time PCR mogą być wykorzystywane w celu detekcji patogenów grzybowych należących do rodzajów *Botrytis*, *Colletotrichum* i *Verticillium*, będących kluczowymi patogenami truskawek.
2. Opracowane metody detekcji real-time PCR dla kluczowych patogenów truskawek mogą być wykonywane w tym samym czasie, tworząc detekcję potrójnej real-time PCR, co znacząco skraca czas otrzymania wyników.
3. Opracowana metoda potrójnej detekcji real-time PCR może być wykonywana na materiale genetycznym wyizolowanym wprost z próbek środowiskowych (gleba, części rośliny), co znacząco skraca czas oczekiwania na wyniki detekcji.
4. Opracowana metoda detekcji wykorzystująca technikę LAMP do wykrywania patogenów z rodzaju *Phytophthora* może być wykorzystywana na materiale genetycznym wyizolowanym wprost z próbek środowiskowych.
5. Opracowana metoda detekcji wykorzystująca technikę LAMP do wykrywania patogenu *Phytophthora cactorum* może być przeprowadzana na DNA wyizolowanym wprost ze środowiska (gleba, części roślin).
6. Wykorzystanie wysokoprzepustowej metody sekwencjonowania metodą Illumina MiSeq pozwala na określenie składu taksonomicznego mikroorganizmów i detekcję kluczowych patogenów grzybowych znajdujących się na ekologicznych plantacjach truskawek.
7. Na ekologicznych plantacjach truskawek występuje zróżnicowanie pomiędzy mykobiomem gleby i rośliny plantacji zdrowych oraz chorych.
8. Alfa-różnorodność korzeni roślin truskawki jest statystycznie większa w roślinach zdrowych, a mniejsza w próbkach gleby.
9. Pomędzy alfa-różnorodnością wyrażoną w efektywnej liczbie gatunków w ryzosferze i częściach nadziemnych roślin chorych i zdrowych nie występują różnice istotne statystycznie.

10. Ilość mikroorganizmów należących do mieszanych poziomów troficznych patotrofów (patotrof-symbiotrof oraz patotrof-saprotrof-symbiotrof) w próbkach pobranych z plantacji chorych jest statystycznie większa w glebie.
11. Nie wykazano różnic statystycznych w ilości występowania mikroorganizmów należących do poszczególnych trybów troficznych w badanych próbkach ryzosfery, korzeni oraz części nadziemnych roślin pochodzących z plantacji ekologicznej truskawki pomiędzy próbkami zebranymi z plantacji zdrowych oraz chorych.
12. Wiele taksonów stanowiących mykobiom rdzeniowy dla próbek pochodzących ze zdrowych i porażonych plantacji pokrywało się, jednak więcej mikroorganizmów należało do mykobiomu rdzeniowego w chorych próbkach ryzosfery, korzeni, gleby i wszystkich próbek łącznie.
13. Mykobiom plantacji porażonych chorobowo charakteryzował się bardziej rozproszonymi klastrami w obrębie sieci, natomiast dla zdrowych plantacji wykazywał więcej połączeń między klastrami i wytrzymałość sieci, wskazując na ich większą stabilność w porównaniu do plantacji porażonych chorobowo, co może wyjaśniać ich większą odporność na infekcje.

5. Teksty publikacji

5.1. Publikacja P1



Review

Alternative Molecular-Based Diagnostic Methods of Plant Pathogenic Fungi Affecting Berry Crops—A Review

Dominika Malarczyk , Jacek Panek * and Magdalena Frąć

Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, 20-290 Lublin, Poland; d.malarczyk@ipan.lublin.pl (D.M.); m.frac@ipan.lublin.pl (M.F.)

* Correspondence: j.panek@ipan.lublin.pl; Tel.: +48-81-744-5061 (int. 207)

Academic Editors: Jacek Namieśnik and Justyna Plotka-Wasyłka

Received: 13 February 2019; Accepted: 23 March 2019; Published: 27 March 2019



Abstract: Increasing consumer awareness of potentially harmful pesticides used in conventional agriculture has prompted organic farming to become notably more prevalent in recent decades. Central European countries are some of the most important producers of blueberries, raspberries and strawberries in the world and organic cultivation methods for these fruits have a significant market share. Fungal pathogens are considered to be the most significant threat to organic crops of berries, causing serious economic losses and reducing yields. In order to ameliorate the harmful effects of pathogenic fungi on cultivations, the application of rapid and effective identification methods is essential. At present, various molecular methods are applied for fungal species recognition, such as PCR, qPCR, LAMP and NGS.

Keywords: *Colletotrichum acutatum*; *Verticillium* spp.; *Phytophthora* spp.; *Botrytis cinerea*; PCR; qPCR; molecular identification; phytopathogenic fungi; strawberry; organic agriculture

1. Introduction

Organic fruit production has been increasing constantly in recent decades and has also increased its market share in the production of food worldwide. Strawberry, blueberry and raspberry fruits are important products of Central Europe and increasing consumer demand to introduce organic methods of fruit cultivation is a major reason to seek alternative ways to reduce losses. The main concerns of food producers are diseases caused by fungi, these pathogens attack plants and fruits from the early stages of sowing to the moment of market sale, thereby causing the unpredictable spoilage of products. The crucial plant pathogens discussed in this review are those from the genera *Verticillium* and *Phytophthora* as well as species such as *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea*.

For many years, morphological methods of identification have been applied for the purposes of recognizing the causal agents of soil-borne diseases. However, these traditional methods are time consuming, error-prone and occasionally inaccurate. Because of these disadvantages, more efficient methods, such as adopting analytical techniques which function at the molecular level are being used more frequently. Polymerase chain reaction (PCR) based methods allow for the multiplication of targeted fragments of DNA over a short periods of time in order to obtain enough genetic material for further research. The purpose of this review is to gather together the most important information concerning the molecular methods of identifying important berry pathogens.

2. Organic Plantations and Fungal Pathogens

The area of land under organic cultivation worldwide has increased fivefold since 1999. Since then, this area has increased from 11 to nearly 58 billion hectares in 2016, and the area has increased in

every continent. As of 2016, Central Europe had more than a billion hectares increase in organic arable land area in comparison to 2007 which is [1]. Almost one-quarter of the organic lands on the globe [1]. Europe has nearly half of the worlds harvesting area of strawberry, blueberry and raspberry fruit [2] and Central European countries produce big share of those fruits with 335,000, 113,500 and 30,000 tones berries produced in 2017, respectively. What is more, this region holds quarter of the world's raspberry harvesting area [2]. Europe noted 320% increase in production of strawberries, blueberries and raspberries from 2007 to 2016 [2]. Eleven percent of worlds strawberry farmlands in 2016 was organic and what is more, in European Union, nearly 20% of berries were grown in organic agricultures [3]. In addition to an increase in the land area of organic farming activity in Europe, the sales market for organic farm produce is also growing significantly. The enlargement of the market in the years 2000–2015 was more than 300% in both areas. The main reason for the higher sales indicator from 2005 to 2014, was the constant increase in the consumption of ecological foods [4]. Poland and Hungary, as two Central European countries, have relatively small markets. Yet, they produce a large share of the organic crops in the free trade area and that makes them important exporters of ecological products [5]. Poland alone was the 3rd biggest exporter of prepared fruits in the world with 429,600 tonnes of fruits exported in 2015. Strawberries and fruit juices are also important export products with 16,500 and 79,000 tonnes, respectively, being exported in 2015. In 2016, Poland was also the 3rd biggest fruit exporter in the world [2].

Fields cultivated using organic methods are particularly exposed to pathogens due to the exclusion of chemical spraying for the purposes of disease management. Central Europe countries have a relatively warm and humid climate [6], which are ideal conditions for the development of fungal diseases. Berries are especially vulnerable to the harmful effects of fungal pathogens due to their thin cell walls, growth close to the wet soil surface and exposure to rainfall. Fungal diseases can lower the yields even down to 50%, even with application of appropriate chemical sprayings [7,8]. The optimal treatment is even more difficult due to the fact that diseases can remain dormant even for many years, waiting for optimal conditions to attack their hosts [9–12]. The pathogens which repeatedly attack cultivations of soft fruits, as well the fruit harvest in cold storage, are typically various species of fungi. The most common and threatening fungi in Central Europe are those of the *Verticillium* and *Phytophthora* genera, as well as *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum acutatum* that are involved in yield and quality losses of soft berry fruits. The abandonment of conventional fungicides creates the need for early and effective detection methods of causal agents of plant diseases to prevent the spread of disease to the entire crop during current and future growing seasons.

3. Fungal Pathogens—Characteristics, Occurrence, Properties and Threats to Organic Farming

3.1. *Verticillium* spp.

Fungi belonging to *Verticillium* spp. attack various species of fruits, vegetables, flowers and forest trees, including many species of soft fruits. Theirs host range includes: strawberry (*Fragaria × ananassa* Duchesne), red raspberry (*Rubus idaeus*), black raspberry (*Rubus occidentalis*), thimbleberry (*Rubus parviflorus*) and some cultivars of blackberry (*Rubus ursinus*). Only 5 families of plants, such as: *Cactaceae*, *Gramineae*, *Gymnospermae*, *Monocotyledoneae* and *Polypodiaceae*; are reported to be resistant or immune to soil-borne disease called Verticillium wilt [13–15]. *V. dahliae* and *V. albo-atrum* are two species with the most significant pathogenicity amongst the 10 which have been distinguished recently: *V. albo-atrum*, *V. alfalfa*, *V. dahliae*, *V. isaacii*, *V. klebahnii*, *V. longisporum*, *V. nonalfalfae*, *V. nubilum*, *V. tricorpus* and *V. zaregamsianum* [16]. Most of *Verticillium* species are not host-specific, and symptoms of infection vary between carriers, thus there are no universal signs of the disease on the plant. Some of the species of the genus may easily be distinguished by the shape of their microsclerotia and the length of the conidia they form on hosts and potato dextrose agar (PDA) [16]. Hyaline colonies formed on agar plates are whitish, turning darker with time (Figure 1), and they produce bountiful conidia [17–20]. The fungus degrades the cell walls of the host with several enzymes, which causes necrosis and other

symptoms [21]. One of these enzymes is polygalacturonase [22] and its production level is related to the degree of fungus pathogenicity [23]. Moreover, *Verticillium* wilts are easily spread via contaminated plant material, soil and equipment. The conidia-producing specimen—*V. albo-atrum* is spread via air currents. When the wilt is securely situated in soil, it can survive for more than 25 years [9,15]. As a result of infection, the probability of the infected plant producing fruit is vastly reduced [15]. The plant often becomes infected through wounds in the roots [24]. The most effective way to control the disease is through the elimination of contaminated plants from the field [21], thus the rapid and efficient identification of the pathogen is obligatory.

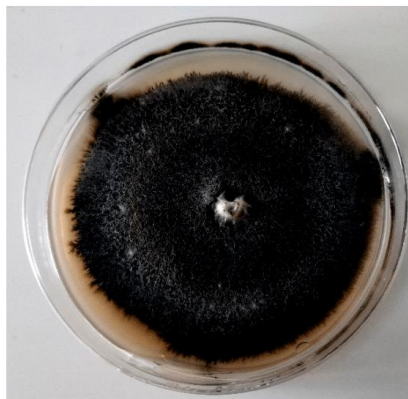


Figure 1. *Verticillium* sp. isolated on PDA medium from ecological strawberry plantation after 10 days of incubation in 22 °C.

3.2. *Phytophthora* spp.

The *Phytophthora* genus includes at least 124 described species [25]. The pathogen infects a wide variety of plants worldwide, and its introduction to a new continent can damage the whole ecosystem. In Victoria, Australia, *Phytophthora cinnamomi*, as well as 13 other species in the taxa is a leading pathogen which has been discovered in the soil. The fungus is an important threat to native plants on the continent and can harm fruit plantations [26]. European and American strawberry and raspberry plantations are also attacked by *Phytophthora*, causing crown and leather rot, resulting in the dieback of plants and severe harvest reduction. Fungi occurring in the soil, belonging to the *Phytophthora* spp., are not host specific, and are a threat for both, strawberry and red raspberry. Disease manifestations on fruits are similar to those caused by *Colletotrichum acutatum* or *Verticillium dahliae* and are often misdiagnosed. In a study from 2018, Wilcox's team proved that the main raspberry pathogen present in soil was *Phytophthora rubi* and that it was the main causative late-summer symptom of disease [27–30]. The selective media utilized for *Phytophthora* sp. isolation are V8 juice agar (V8) and cornmeal agar (CMA) with the addition of various antibiotics. Antibiotics and specific antifungal agents are added to inhibit the development of bacteria and other than *Phytophthora* sp. fungi competing for resources. The morphological identification of colonies may be difficult because random mutations and the different growth conditions present in nature may lead to a variability in the phenotype of the species. An overlap of morphological features of the genus also impedes accurate identification. Nevertheless, the size of the sporangium and papilla, as well as the appearance of sporangia are commonly considered for the classification of the fungus (Figure 2) [31].

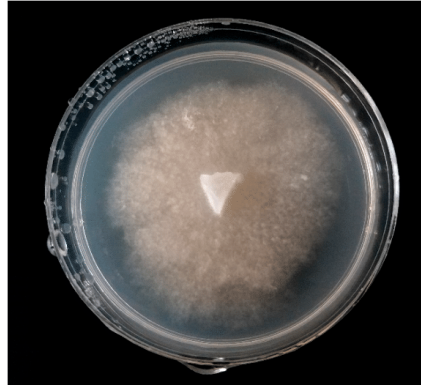


Figure 2. *Phytophthora* sp. isolated on PDA medium from ecological strawberry plantation after 10 days of incubation in 22 °C.

3.3. *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea, which causes gray mold, is an important necrotrophic fungus infecting more than five hundred species of plants [32–35], including strawberry and raspberry [10,34,36,37]. When considering the impact of fungus on fruit production, it took second place in the list of top ten fungal pathogens of molecular plant biology in 2012 [38]. The susceptibility of strawberry plants to the fungus is known to severely decrease harvests, even down to 50% [36]. The presence of the pathogen may remain hidden. In that case necrotrophic disease may be triggered by outside conditions, such as rainfall, a relative humidity higher than 80% for at least 4 hours, and an appropriate ambient temperature of 2–28 °C [10,11,35,39]. The pathogen can propagate on harvested strawberry, raspberry, blueberry and blackberry fruits at temperatures above freezing, which is a significant problem for the cold storage of soft fruits [40]. The disease may occur on fruits at any time from seedling to sale, what makes it difficult to predict and effectively counteract [38,41]. However, it is known that ripe fruits are most susceptible to infection [42]. In order to infect the host, spores are produced and spread, mainly conidia distributed by wind, rain and insects [43,44]. Fungus germ tubes and appresorias may produce an extracellular matrix, which helps them to attach to the cell walls of hosts and degrades them with enzymes [45]. In some cases, pathogens may penetrate the cuticle without the secretion of enzymes [46]. Invasions through wounds and blossoms are also often detected [40,47]. Pollinating insects such as honey bees have the potential to disperse disease in a similar fashion [48]. *B. cinerea* colonies grown for 7 days at room temperature on a PDA medium produces abundant whitish mycelium, which becomes darker with time (Figure 3). However, some of the isolates may have diminutive mycelium and produce a yellow pigment on PDA, which is undeveloped on other commonly used medias [49,50]. Conidia, ovoid or ellipsoid and one-celled, are on average 8–13 µm in length and 4–7 µm in width and are dispersed by the air [50].



Figure 3. *Botrytis cinerea* isolated on PDA medium from ecological strawberry plantation after 10 days of incubation in 22 °C.

3.4. *Colletotrichum acutatum*

Anthrachnose is a disease caused by *Colletotrichum acutatum*. The fungus attacks a wide range of plant species around the world [51] and is known mainly as a pathogen of strawberries. *Colletotrichum* spp. have been evaluated as the 8th most important fungal pathogen in plant biology [38]. Infection may remain dormant until the fruit is stored, and then cause losses of up to 100% [37]. The fungus is necrotrophic lifestyle, and causes black spots to form on strawberry fruits, additionally attacking roots, crowns and leaves [52–55]. The colonies of the pathogen isolated on PDA are whitish at first, becoming gray with time and the reverse of the Petri dish is pink or pale orange (Figure 4). Conidia, observed under a light microscope, are $8\text{--}16 \times 2.5\text{--}4 \mu\text{m}$ in size, one-celled, straight, but pointed at the end (fusiform). Conidial appresoria are grey and globular in shape [54,56]. The fungus is mainly dispersed by rain, and can enter the host via any plant tissue. Dispersal of conidia can reach as far as 1.75 m through splashing and the infection of one plant in the field by the pathogen proceeds to the whole cultivation [57]. Most frequently *C. acutatum* infects strawberries through the crown, as there is a humid microclimate [58]. The fungus is capable of wintering in the soil for at least two winters with temperatures falling below 0 °C, this causes anthracnose to develop in subsequent years [12,59]. This is the reason why optimal treatment for the disease is necessary not only for the harvest in the current year, but also for consecutive seasons.



Figure 4. *Colletotrichum acutatum* isolated on PDA medium from ecological strawberry plantation after 10 days of incubation in 22 °C.

4. Detection Methods of Plant Pathogenic Fungal Species

4.1. Traditional Methods

Traditional methods of fungal pathogen identification include experienced scientists studying their morphological attributes such as colony appearance and the production of asexual structures on microbiological media or on the host. Samples isolated on adequate agar media may be observed using a light microscope to track the presence of the slightest structures. This method is time consuming and only mature colonies may be evaluated. Occasionally colonies have to meet certain conditions to produce conidia and this may cause inconvenience in laboratory work-flow [60–62]. Selective medias have been proposed and used for identification, for example Botrytis Selective Media (BSM) for *Botrytis cinerea* [63]. The recognition of external infection symptoms induced by fungi on their hosts can also be used to verify the pathogen, although most species are not host specific and plants may be inhabited by many fungi. The lack of carrier specificity and symptom differences between plant populations at different latitudes makes an accurate identification based only on the morphology of the colonies very difficult or even impossible. Furthermore, interpretations of the pathogen's morphology are subjective and highly reliant on one's experience. The human factor may lead to an incorrect identification of the pathogen, causing misguided plant protection activities.

4.2. Molecular Methods

In recent years, molecular methods are being more and more willingly used by researchers in many fields. They are also widely applied in order to identify fungal diseases or for recognition of new fungal species and the description of pathogen populations. The identification of fungi is in fact more accurate when molecular markers are applied, compared with assignment to the species based only on morphology [64,65] and the technique may be used by personnel without specific taxonomic expertise [66].

The polymerase chain reaction (PCR) process includes the in-vitro amplification of targeted genes from previously isolated DNA [67]. After the reaction, an electrophoresis is performed on the agarose gel of the fragments produced which are stained with EtBr (Ethidium bromide) or SYBR Green. The occurrence of a fragment of specific length confirms the presence of a pathogen. Further sequencing of the products may also be performed to ensure the specificity of the obtained amplicon.

The modification of the method, allowing the observation of the amplification results in real-time and the quantification of the genetic material in the sample is quantitative PCR (qPCR) [68,69]. An assay has many advantages in comparison with PCR. The reaction does not require further electrophoresis, as the analytical techniques used in the reaction allows for the observation of the size of the fluorescent signal which is proportional to the amount of amplified DNA. The qPCR technique also allows for the analysis of from 96 to 386 samples simultaneously as it is performed on plates [66]. A comparison of PCR with qPCR by Garrido's team demonstrated that the qPCR reaction is 100 times more sensitive compared with PCR when it is applied to the identification of plant pathogenic fungi on strawberry fruit [70].

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is another method utilizing DNA polymerase, with the distinction of a constant temperature throughout the whole reaction and the utilization of two or three sets of primers. The assay is highly specific due to the presence of a larger number of primers in comparison with PCR. For the same reason, the reaction is insensitive to contamination with non-specific DNA [71]. LAMP can be verified directly through the examination of a color change in the samples or by electrophoresis [66]. What is more, *Bst* polymerase which are often used in the reaction are less susceptible to inhibitors compared with *Taq* polymerase. Therefore, LAMP does not always require DNA isolation and may be performed directly from the environmental sample [72]. Also, due to the constant temperature character of the reaction LAMP doesn't require specialist equipment such as a thermocycler [73].

Next-generation sequencing (NGS) belongs to the methods that were developed after automated Sanger assays—'first generation' for sequencing genetic material. The most important advantage of NGS is the ability to sequence billions of nucleotides during one run, thus sequencing whole genomes has become available for academic uses [74,75]. Table 1 presents the data concerning genome assemblies of fungal pathogens described in this paper. Although most of the genomes have already been deposited in the international bioinformatics database, the information is not sufficient to describe all features and functions of these organisms and still there are a lot of work to get to know them well.

Table 1. Sequenced genomes of fungal pathogens from NCBI genome database.

Targeted Organism	Number of Genome Assemblies	Median Total Length (Mb)	Median Protein Count	Median GC%
<i>Verticillium dahliae</i>	11	33.2952	10393	55.6
<i>Verticillium alfalfae</i>	2	32.7521	10237	55.4
<i>Verticillium tricorpus</i>	2	35.5915	nd	57.4
<i>Verticillium nonalfalfae</i>	2	32.9671	9431	54.8
<i>Verticillium albo-atrum</i>	1	36.4685	nd	56.5
<i>Verticillium longisporum</i>	2	99.8546	20932	53.05
<i>Verticillium isaacii</i>	1	35.6909	nd	57.5
<i>Verticillium zaregamsianum</i>	1	37.1319	nd	57.5
<i>Verticillium klebahnii</i>	1	36.0824	nd	57.6
<i>Verticillium nubilum</i>	1	37.9116	nd	53.7
<i>Phytophthora infestans</i>	2	190.329	17797	36.9
<i>Phytophthora capsici</i>	7	56.0343	nd	49.9
<i>Phytophthora ramorum</i>	23	40.7668	nd	54
<i>Phytophthora nicotianae</i>	3	71.414	13910	50.2
<i>Phytophthora cactorum</i>	2	63.5331	24172	49.65
<i>Phytophthora rubi</i>	2	76.9186	nd	53.15
<i>Phytophthora fragariae</i>	2	76.4756	nd	53.2
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	4	58.3834	nd	54
<i>Phytophthora parasitica</i>	9	54.2899	27003	49.6
<i>Phytophthora kernoviae</i>	11	38.1112	9990	50.3
<i>Phytophthora lateralis</i>	5	49.0253	nd	53.3
<i>Phytophthora palmivora</i>	1	107.773	24271	48.7
<i>Phytophthora sojae</i>	1	82.5976	26489	54.4
<i>Phytophthora litchii</i>	1	38.2009	nd	49.2
<i>Phytophthora colocasiae</i>	1	56.5926	nd	nd
<i>Phytophthora agathidicida</i>	2	37.2895	nd	52.6
<i>Phytophthora pluvialis</i>	2	53.178	nd	54.2
<i>Phytophthora multivora</i>	2	40.1961	nd	51.9
<i>Phytophthora pinifolia</i>	1	94.6173	nd	54.9
<i>Phytophthora cryptogea</i>	1	63.8393	nd	51.9
<i>Phytophthora cambivora</i>	1	230.616	nd	52.9
<i>Phytophthora plurivora</i>	1	40.4412	nd	51.7
<i>Phytophthora megakarya</i>	1	101.505	34804	48.7
<i>Phytophthora x alni</i>	1	236	nd	51.3
<i>Phytophthora pisi</i>	1	58.8567	nd	54.6
<i>Botrytis cinerea</i>	4	41.8726	13703	42.26
<i>Colletotrichum acutatum</i>	2	48.5246	nd	50.8

nd.—no data present.

It is known that inter- and intra-specific variability are likely widespread in fungi. This fact has implications for research on fungal taxonomy, phylogenetics, evolution, and population genetics. However, described methods can be successfully used to portray intra- and inter-specific variability of microorganisms occurring in the environment, in particular pathogenic fungi, but also the other fungi. More specific approaches have been already developed, such as: Restriction Fragments Length Polymorphism (RFLP), Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD), Terminal Restriction Fragments Length Polymorphism (tRFLP) and Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). When planning the experiment, it is important to remember to take into account native strains of fungi that are present in the habitat, as intra-specific variability can affect the analysis [76–78]. It is also important to highlight that detection limits of the fungi reported in this work can only be treated as

guidelines and not certainty, as those limits are dependent on numerous factors, including the type of medium, age of the culture or isolation methods.

4.2.1. *Verticillium* spp.

Many studies have utilized a comparison with the *ITS* region in the phylogenetic analysis of *Verticillium* spp. [19,79]. Some of protein-coding genes were also used for distinguishing species, such as: cytochrome c oxidase III (*COX3*), NADH dehydrogenase subunit I (*NAD1*), actin (*ACT*), elongation factor 1- α (*EF*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GPD*) and tryptophan synthase (*TS*) [16,19]. The detection of *V. dahliae*, *V. tricorpus* and *V. albo-atrum* in strawberry fields was performed using five simplex loci, including *ACT*, *EF*, *GPD*, *TS* genes and *ITS* region. The discrimination between the species was performed using multiplex PCR with listed markers with an irrefutable outcome [79]. The *ITS* region sequencing was again successfully used for the confirmation of *V. dahliae* as an olive tree pathogen [20]. However, Yu's team was not able to distinguish between *V. dahliae* and *V. longisporum* based only on the analysis of the *ITS1*-5.8S marker, thus *COX3* and *NAD1* genes were also included in the study to make the analysis more specific [19].

Lievens' team developed a real-time PCR assay for the identification and quantification of 3 species linked to *Verticillium* wilt on tomato plants. The targeted marker was the *ITS1* region. Primers were specific to all three targeted species, those being *V. albo-atrum*, *V. dahliae* and *V. tricorpus*, and the amplification did not occur with any of the additionally tested fungi [80]. The marker gene was also used in a similar study to estimate the number of strawberry pathogens in the soil samples, including *Verticillium* spp. The method was able to detect 17.7 pg of the *V. dahliae* DNA [81]. The *ITS* marker was also applied in the quantification of *V. dahliae* in affected strawberry roots and soil. The detection limit for the fungus genetic material was 0.93/ μ L pg and the lowest amount of *V. dahliae* detected in soil equaled 10.48 pg/ μ L [82]. A different study, demonstrating differentiation between *V. dahliae* and *V. longisporum* and the identification of *V. tricorpus* by qPCR was published in 2011. The amplification of the *ITS* region of *V. tricorpus* was performed with specific primers and was able to detect 0.1 microsclerotia/g of soil. *V. dahliae* and *V. longisporum* were distinguished based on the sequence of the β -*tubulin* gene, and the assay was able to track as little as 0.5 fungus microsclerotia/g of soil [83,84]. An analysis of the abovementioned β -*tubulin* primers, with the addition of an *ITS* marker, were also used for the identification of *V. longisporum* oilseed rape in qPCR. The β -*tubulin* primers were specific for the targeted specimen, however they did not detect 3 of the isolates. This may confirm that the new taxonomy of fungi proposed by Inderbitzin is correct [16]. The *ITS* marker was also highly specific to the genus, and detected 0.56 fg of fungal DNA. Despite that, the marker was not able to distinguish *V. longisporum* from other species in the *Verticillium* genus used in the study. Another disadvantage of the *ITS* primers was that they were also specific for *B. cinerea* and a few *Alternaria* isolates [85]. The quantification of *V. dahliae* in lettuce leaves was successfully performed by Klosterman. The assay amplified the β -*tubulin* targeted gene and was able to detect 2.5 fg of fungal DNA 21 days after the inoculation of the pathogen on the plant [86]. Another marker successfully used in qPCR was an intergenic spacer of genomic DNA (*IGS*). The reaction was performed to identify *V. dahliae* and *V. tricorpus* pathogens on various plants, including strawberry. Two pairs of created primers were specific only to *V. dahliae* and *V. tricorpus*, and none of the non-targeted species were amplified. Bilodeau's team succeeded in detecting as little as 3 fg of fungus DNA with the assay. Also, they estimated the number of copies of *IGS* in the pathogen genome, comparing the amplification of the aforementioned region with the single-copy genes such as: endochitinase, β -*tubulin* and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*G3PD*). They averaged the number of the *IGS* region in different isolates to 46 copies in the haploid genome with the qPCR assay. In the study, an additional specific primer pair of *IGS* for *V. albo-atrum* was designed, however, in an initial examination only *V. dahliae* was apparent in the samples. This is why only the first pair of primers was used in further stages of research [87]. Another gene targeted for the detection of *V. dahliae* in potato crops was an extracellular trypsin protease (*VTP1*). The PCR technique detected 25 pg of fungal DNA, but primers

were also specific for *V. longisporum*. The qPCR technique was 10 times more sensitive than the PCR technique with the same primers. Also, the duplex qPCR technique additionally targeting the potato actin gene was developed and was able to detect as little as 0.25 pg of *V. dahliae* DNA [88]. The multiplex approach was further investigated with the *VTP1* gene of *V. dahliae* and the internal control actin gene (*ACT*) of *Solanum tuberosum*. The assay was performed in field conditions with remarkable reliability [89]. The quantification of soil-borne diseases on strawberry fruit was performed with the application of *ITS1* primers as described previously by Lieven's team [80,81]. In agreement with their discoveries, in the Ozylmaz study, the marker was specific for at least 5 of the *Verticillium* species. The reaction detected 0.6 pg of pathogen DNA [81]. The identification of *Verticillium* species in soil was also performed by the Tzelepis' team using a qPCR assay with newly designed primers for *V. dahliae*, *V. longisporum*, *V. tricorpus* and *V. albo-atrum*. The detection level equaled 5 and 6 fg DNA/g of soil for *V. longisporum* and *V. dahliae*, respectively, and the last two fungi were not detected in the soil samples [90]. The most important information described above are summarized in Table 2.

Table 2. Selected primers designed for molecular analysis of *Verticillium* spp.

Targeted Organism (Number of Strains Analyzed)	Assay	Marker	Primers Sequences 5'-3'	Primers Authors	Primers Used in			
<i>V. albo-atrum</i> (5) <i>V. tricorpus</i> (7)	multi-plex PCR	<i>ITS</i> ¹	CCGGTCCATCAGTCTCTCTG CTGTGCGCCCTCACTCG	[79]	[79]			
<i>V. longisporum</i> (42)			AAGTGGAGCCCGTATCTTGAAT CAACTGGCAACAGGCTTGAAT					
<i>V. isaacii</i> (14)		CGATGTCGGATGACCTCG CGGCAGCCTCTAAACATGG						
<i>V. klebahnii</i> (7)		ACATCCTGAGGCTGCTGAGA CGGCAGCCTCTAAACATGG						
<i>V. zaregam-sianum</i> (10)		GGTTTCCTCCCTCACAGC CCACCTTGATGTGGCGGA						
<i>V. longisporum</i> (42)		CCCCGGCCTTGGTCTGAT TGCCGGCATCGACCTGG						
<i>V. alfalfae</i> (7)		TCATGCCCTTTGTCATCGAT TGCCGGCAICGACCTTGG						
<i>V. albo-atrum</i> (5)		GGCCTCGATAGCATCGCC CTGGATGGAGACGTAGAAGGC						
<i>V. tricorpus</i> (5)		CGTGTCTTCCGTAAGTTTG CTGGATGGAGACGTAGAAGGC						
<i>V. nonalfalfae</i> (9)		CCTCGAAAAATCCACCAGCTCTA GTGGTTGAGATCCTCACGCTTC						
<i>V. nubilum</i> (4)		GGTCCCTCTGTTCAATCAATC GTGGTTGAGATCCTCACGCTTC						
<i>V. dahliae</i> (10) <i>V. longisporum</i> (10)		PCR	<i>ITS</i> ¹			GGA AGTAAAAGTCGTAACAAGG TCCTCCGCTIATGATATGC	[91]	[19]
			<i>COX3</i> ⁶			TGATTTAGAGATST AATATCAGAAG CCGTGGAAACCTGTSCCAAATA	[19]	
			<i>NAD1</i> ⁷			ATGGCSAGTATGCAAAGAAGA GCATGTC TGTCATAAASCCACTAAC	[92]	
<i>Verticillium</i> spp. (7)	qPCR	<i>ITS</i> ¹	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA AAAGTTTTAATGGTTCGCTAAGA	[80]	[80]			
<i>V. tricorpus</i> (4)	qPCR	<i>ITS</i> ¹	CCGGTGTGGGATCTACT GTAGGGGTTTAGAGGCTG	[91]	[83]			
<i>V. dahliae</i> (9) + <i>V. longisporum</i>		<i>β-tubulin</i>	GGCCAGTGCGTAAGTATTCT ATCTGGTACCCCTGTTTCATCC	[84]				
<i>V. longisporum</i> (11)		<i>β-tubulin</i>	GCAAAACCCTACCGGTTATG AGATATCCATCGGACTGTTCGTA	[84]				
<i>V. dahliae</i> (1) + <i>V. longisporum</i> (1)	qPCR	<i>ITS</i> ¹	CAGCGAAACGGGATATGTAG GGCTGTAGGGGTTTAGA	[93]	[93]			

Table 2. Cont.

Targeted Organism (Number of Strains Analyzed)	Assay	Marker	Primers Sequences 5'-3'	Primers Authors	Primers Used in
<i>V. dahliae</i> (44)	qPCR	IGS ⁸	CGTTTCCCGTTACTCTTCT GGATTTCGGCCAGAAACT	[87]	[87]
<i>V. tricorpus</i> (13)		endochitinase	TAGTAGAATACTAGATARCTAG AGCCTAGGTCCTTATAGCTAG		
<i>V. dahliae</i>			CTCGGAGGTGCCATGACTG ACTGCCTGGCCAGGTTTC		
<i>V. dahliae</i>		β -tubulin	GCGACCTAACCCCTCGTT CCTGGCTGGTCAGAGGA		
		G3PD ⁹	CACGGCGTCTCAAGGGT CAGTGGACTCGACGACGTAC		
<i>V. dahliae</i>	VTP1 ¹⁰	GCGGTGGCTGGTTCATCAAC CAACGACTTCGCCATCGGAAG			
<i>V. albo-atrum</i> group 1 (isolation from soil)	qPCR	actin	GCCCTCTCCAGCCCTCCGTTCTC TCGGCTGGTTTGTGGTGAG	[87]	[94]
<i>V. albo-atrum</i> group 2 (isolation from soil)	qPCR	IGS ⁸	CGTGTTAGTGTATTTACCCTTG TCGAGAGTAGTACGATTTCTC	[94]	
<i>V. longisporum</i> (isolation from soil)	qPCR		CGAGGAGTGAAGAAAACGGTTA CGCGCCGAGGCTAGTCAC	[90]	[90]
<i>V. dahliae</i> (5)			TCCTAGGCAGGCGAGCAG TAGGGCTGTCTGCGGTGA		
<i>V. albo-atrum</i> (4)		not explained in the study	TTTCACGACCGATGAAAGCG CACATCGCGGAGGATCTGTC		
<i>V. tricorpus</i> (4)			CACCCCTGGGCACACCAATA TCCGTGGAGGTTGAGCGCTAT		
<i>V. longisporum</i> (4)			CGAGGAGTGAAGAAAACGGTTA CGCGCCGAGGCTAGTCAC		

¹ internal transcribed spacer, ² elongation factor 1- α , ³ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, ⁴ actine, ⁵ tryptophan synthase, ⁶ cytochrome oxidase subunit III, ⁷ NADH dehydrogenase subunit 1, ⁸ intergenic spacer of genomic DNA, ⁹ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, ¹⁰ extracellular trypsin protease.

A LAMP assay with newly designed primers for the selection of previously established random amplified polymorphic DNA (RAPD) makers was performed by Moradi's team. The reaction was able to detect as little as 50 fg DNA from *V. dahliae* isolates, which was 10,000 times more sensitive than that conducted by the team nested-PCR. What is more, none of non-targeted species were amplified in the reaction, including other soil-borne pathogens and other *Verticillium* species [95].

The phylogenetic analysis of *Verticillium dahliae* with the application of NGS was completed in 2013. The team also acquired a draft genome sequence of the fungus [96]. As a continuation of the study, Faino's team assembled a complete and gapless genome of the pathogen [75,97]. Further genome sequencing of *V. dahliae* genetic material obtained from strawberry pathogenic strands resulted from c. 33 Mb assembly with 44–80-fold coverage [98]. With the *de novo* genome sequencing of *V. nonalfalfae*, Jelen's team additionally identified the mitochondrial genome of the fungus. The size of the acquired mitochondrial sequence averaged 27% GC content and close to 26 kb of nucleotides [99]. The complete *V. longisporum* genome assembly acquired in 2018 was estimated at 70 Mb, and the mitochondrial genome equaled c. 27 kb [100].

4.2.2. *Phytophthora* spp.

In order to identify species in the *Phytophthora* genus, *ITS1* and *ITS2* were amplified using PCR and sequenced. The variability of *ITS2* was less significant in comparison with *ITS1*, but both of the markers were useful in species identification within the genus [101]. Ristaino's team developed an assay for rapid identification within the genus. They amplified the *ITS* region, and for species recognition, employed restriction enzymes. Additionally, they developed a specific primer for *P. capsici* (*PCAP*) [102]. Cooke's team analyzed the *ITS* marker of various *Phytophthora* species, containing red raspberry and strawberry pathogens for phylogenetic purposes [103]. Also, they designed genus-specific primers for the *Phytophthora* spp. with the application of the cytochrome oxidase I (*COX1*) gene with high specificity. In order to establish a greater distinction between *P. ramorum*, *P. nemorosa*, and

P. pseudosyringae, they used nested PCR with species-specific primers. The primers amplified targeted species sufficiently and did not produce a sequence with any of the non-targeted species added in the study [104]. The *ITS* marker was also used for the identification of the *Phytophthora* pathogen causing rot of cranberry [105]. Further, the multilocus approach for the phylogenetic analysis of the genus was developed by Blair's team. In the study, 27 loci were targeted, and 7 loci were successfully amplified: 28S ribosomal DNA, 60S ribosomal protein L10, β -tubulin, elongation factor 1 α , enolase, heat shock protein 90 and the *TigA* gene fusion protein. The first two markers were both amplified within the genus, but the second one was not long enough (496 bp) to deliver sufficient phylogenetic information. β -tubulin, enolase and *TigA* loci provided satisfactory phylogenetic information among the *Phytophthora* genus. Next, heat shock protein 90 and elongation factor 1 α produced a moderate level of information among most clades [106]. In a continuation of the cited study, Martin's team provided an additional analysis of 4 mitochondrial loci within the genus. The markers used in the report: cytochrome c oxidase subunit II (*COX2*), NADH dehydrogenase subunit IX (*NAD9*), 40S ribosomal protein S10 (*RPS10*) and protein translocase subunit SecY (*SECY*) loci, and the phylogenetic tree was comparable with the one constructed in the former study [25,106]. In a paper published in 2014, an analysis of the *ITS* marker was once more applied to the identification of *Phytophthora* spp. obtained from nursery plants, irrigation water, and potting media. Sixteen species within the genus were identified, then isolates from *P. citricola* complex were additionally sequenced with β -tubulin primers to ensure the specificity of the obtained products [107].

The first employment of the qPCR assay for monitoring *Phytophthora* spp. in different host tissues showed that the method may in fact be successfully used for this purpose. The assay contained the design of new primers for *P. infestans* and *P. citricola*: specific GC rich nuclear satellite DNA with unknown function, and *ITS1*, respectively. The reaction was able to detect 1 μ g of *P. infestans* and 10 ng of *P. citricola* through template DNA in the sample [108]. The detection of *Phytophthora* spp., as well as the species-specific identification of *P. ramorum* was also further performed. Both pairs of primers were targeted for the *ITS* gene. Also, primers for the detection of false-negatives were used with the implementation of the *COX* gene. The genus-specific primers amplified all of the *Phytophthora* species in the study, however, non-targeted isolates of *Pythium* were also amplified [109]. *P. cactorum* was one of the targeted species in the qPCR assay used for the identification of strawberry pathogens in the soil. The fungus was successfully detected in the amount of 8.6 fg/ μ L through the amplification of the *ITS* region with specific primers [81]. The *ITS* marker was also used for the identification of strawberry soil-borne pathogens. The qPCR assay detected 1 pg of *P. cactorum*'s DNA per 1 g of soil [110]. The identification of the pathogen causing late-summer disease symptoms on raspberry fruit was performed by Weiland's team with the application of qPCR. Even though the disease was first connected to the presence of *Verticillium dahliae*, diagnostic tests produced conflicting results. Ultimately, qPCR indicated that the main cause of the late-summer symptoms of disease was *Phytophthora rubi* [29]. The multilocus approach was performed for the identification of *P. colcasiae* with the application of 3 markers: RAS-related protein (*YPT1*), G protein alpha-subunit (*GPA1*) and phosphoribosylanthranilate isomerase (*TRP1*) genes. All of the amplifications were successful, thus the best sensitivity was demonstrated by *YPT1*, with the detection of 12.5 fg of fungal DNA. The pathogen was amplified using a qPCR assay 15 hours after the artificial infection of the plant; 3 hours earlier than in PCR [111]. The simultaneous detection of two pathogens, *P. nicotianae* and *P. cactorum* from strawberry tissues in the qPCR assay was also performed. The primers designed for the *ITS* region and the *YPT1* gene were utilized with sufficient results. The assay was able to detect 10 fg and 1 pg of targeted DNA from *P. nicotianae* and *P. cactorum*, respectively [112]. The triple approach of detecting *Malus Miller* pathogens using qPCR was also verified in a recent study. Three pairs of primers for enolase (*ENOL*), ras-like protein *YPT1* and *HSP90* gene sequences were designed for *P. hibernalis*, *P. cambivora* and *P. syringae*. The primers were capable of simultaneously detecting 20 pg of the two first species and 0.2 pg of the third fungus genomic DNA [113]. Table 3 summarizes selected facts containing the primer sequences used in the above-described papers.

Table 3. Selected primers designed for molecular analysis of *Phytophthora* spp.

Targeted Organism (No. of Strains Analyzed)	Assay	Marker	Primers Sequences 5'-3'	Primer Authors	Primers Used in
<i>Phytophthora</i> spp. (15 in [101]; 14 in [102])	PCR	ITS ¹	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG TCCTCCGCTTATGATATGC	[91]	[101,102]
<i>Phytophthora</i> spp. (51)	PCR	COXI ²	GCGTGGACCTGGAATGACTA AGGTTGTATTAAGTTCGATCG		
		COX2 ³	AAAAAGAGAAGGTGTTTTATGGA GCAAAAGCACTAAAAATTAATATAA		
<i>P. ramorum</i>	nested PCR	Spacer sequences between the COX 2 and COX1 gene	GTATTTAAAATCATAGGTGAATTG TGGTTTTTTAATTTATATATCAATG	[114]	[114]
<i>P. nemorosa</i>			AATAAAATTAATTTAATATATAATTAG TATGTTTAAATCTGTAATAATAG		
<i>P. pseudo-syringae</i>			CAGTTTCATTAGAAGATTATTTAC AAAATTGTTGATTTTATTAAGTATC		
<i>Phytophthora</i> spp. (82)	PCR	60S ribosomal protein L10	GCTAAGTGTACCGTTTCCAG ACTTCTTGGAGCCAGCAC	[106]	[106]
		β -tubulin	GCCAAGTCTGGGARGTSAT GCCAAGTCTGGGARGTSAT		
		Enolase	CTTTGACTCGCGTGCCAAC CCTCTCAATACGMAGAAGC		
		Heat shock protein 90	GCTGGACACGGACAAGAACC CGTGTCTACAGCAGCCAGA		
		<i>tigA</i> gene fusion	TTCTGGGGCGYAACTGG TCGTGGGGCGYAACTGGAA GCCTACATCAGCGAGCARA TCGCYATCAACGGMTTCGG CCGAAKCGTTGATRCGA GCCCCACTCRITGTCRTACCAC		
		EF ⁴	GGTCACCTGATCTACAAGTGC CCTTCTTGTTCACCGACTTG		
<i>P. infestans</i> (1)	qPCR	GC-rich nuclear satellite DNA with unknown function	GCCAT CAAGACGTGGCAGA GCAGGGATTCCGGCATA	[108]	[108]
<i>P. citricola</i> (1)		ITS ¹	TCAACCCCTTTAGTTGGGGTTC TTTAAAAAAGCTACTAGCCAGAC		
<i>Phytophthora</i> spp. (71)	qPCR	ITS ¹	TGCGGAAAGGATCATTACACACC CGGAGCTAGACATCCACTG	[109]	[109]
<i>P. colocasiae</i> (49)	qPCR	<i>YPT1</i> ⁵	GGTGTGACTTTGTGAGTTTCAG AAGGGAGTTGGCAACAACCATT	[111]	[111]
		<i>TRP1</i> ⁶	AGCGCCTTAACGTCCTT GAGCCCTTGAACCACTTGGG		
		<i>GPA1</i> ⁷	TTGGTGGCGTGTAGTCTGTG AGCTTCCGGTGTGATGGTAGC		
<i>Phytophthora</i> spp. (15)	qPCR	<i>YPT1</i> ⁴	ATGAACCCGAATAGTRCGTGC TGTTTACGTTCTRCAGGCG	[115]	[115]
		<i>TRP1</i> ⁶	GAGGAGATCGCGCCAGCG GCCACATRCGGAGVTTGTG		
		<i>GPA1</i> ⁷	GGAATCTGTGCGTCCAGATG ATAATTGGTGTGAGTGCCTG		
<i>P. nicotianae</i> (7)	qPCR	ITS ¹	CCTATCAAAAAAAGGCGAACG TACACGGAAGGAAGAAAGTCAAG	[112]	[112]
<i>P. cactorum</i> (7)		<i>YPT1</i> ⁵	CATGGCATTATCGTGGTGA GCTCTTTCCGTCGGC		

¹ internal transcribed spacer, ² cytochrome oxidase subunit I, ³ cytochrome oxidase subunit II, ⁴ Elongation factor 1- α , ⁵ RAS-related protein, ⁶ phosphoribosylanthranilate isomerase, ⁷ G protein α -subunit.

The *ITS* marker in the LAMP assay was used for the detection of *P. ramorum* in plants. Despite the lower sensitivity of LAMP compared to qPCR with the same marker, the reaction was successfully used to detect small amounts of the pathogen's DNA in the sample [116]. The *YPT1* gene was used in order to compare it to the effectiveness of the nested PCR and LAMP assays to identify *P. melonis*. Consequently, both assays were c. 1 000 times more specific than PCR. The LAMP reaction was able to detect 10 fg of fungal DNA, thus it may be utilized in the early stages of infection [117]. Si Ammour's team confirmed this thesis, as they detected *P. infestans* with LAMP 24 hours after the artificial inoculation of potato plants [118]. The efficiency of the marker in LAMP for *P. infestans* identification

was reinforced by Khan's team study. The team compared PCR with nested PCR, qPCR and LAMP with the application of the *YPT1* gene marker. LAMP was in fact the most sensitive reaction, being 10 times more sensitive than nested PCR and 100 times more sensitive than qPCR. What is more, the team detected the pathogen as soon as one hour after inoculation on the plant [119]. Taking under account the above mentioned results the detection limits of *Phytophthora* sp. was ranged from 1 µg to 10 fg depending on selected method and tested species.

Whole genome sequencing of a few *Phytophthora* species has already been performed. In 2006, a draft of the genome sequences of *P. sojae* and *P. ramorum* were obtained. The genetic material of the fungi had a 9-fold coverage of the 95 Mb and a 7-fold coverage of the 65 Mb of *P. sojae* and *P. ramorum* genomes, respectively. The identification of a number of SNPs for both species was also achieved [120]. *P. infestans* whole-genome sequencing was also achieved with a 9-fold coverage assembly spanning 229 Mb of the pathogen's genome [121]. Both of the abovementioned studies utilized a shot-gun approach, and the application of the Illumina platform was utilized for *P. rubi* and *P. fragariae*. The pathogen genetic material sequencing resulted in a 76-fold coverage of 5.88 Mb for *P. fragariae* and a 92-fold coverage of 6.96 Mb for *P. rubi* [122].

4.2.3. *Botrytis Cinerea*

Rigotti's team proposed specific primers for a RAPD assay in PCR for the detection of 13 strains of *Botrytis cinerea* in fields of symptomless strawberry plants. They proved that the presence of 0.2 pg of fungal DNA in the sample is enough for pathogen detection with this method [123]. The application of the SCAR assay was applied for the development of a specific marker for the detection of *B. cinerea*, *B. fabae*, and *B. fabiopsis*. The proposed primers were capable of distinguishing species from each other, as well as detecting 400 pg of *B. cinerea* in the reaction [124]. The markers mentioned above with the addition of the *ITS* region, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*G3PDH*), heat-shock protein 60 gene (*HSP60*) and DNA-dependent RNA polymerase subunit II gene (*RPB2*) markers were used for the identification of the strawberry pathogen. An analysis of the sequenced fragments showed that the disease was caused by *B. cinerea* [125]. In 2016, Kim's team proposed *ITS* region amplification for the identification of pathogens causing grey mould on red raspberry. The reaction identified the pathogen as *B. cinerea*. However, for further investigation the sequencing of *G3PDH*, *HSP60*, and *RPB2* was performed. Those three protein-coding markers were also 100% identical with those of *B. cinerea*, confirming the identification of the fungus [126]. The *ITS* marker was also applied for the identification of the pathogen causing gray mould on economically important crops, including strawberry fruit. The analysis was also executed in connection with morphology identification and BIOLOG application. As a result, all of the methods confirmed that the pathogen was in fact *B. cinerea* [127]. Furthermore, the *ITS* region was also used for the identification of the strawberry postharvest pathogen in Pakistan. The method identified the fungus as *B. cinerea* [128]. Also, the amplification of the marker with PCR confirmed the presence of the fungus on *H. bracteatum* [129]. Another study published in 2018 included a phylogenetic analysis of *B. cinerea* isolates obtained from strawberry cultivations. The sequences used in the study were 4 microsatellite markers and they contained enough phylogenetic information for the analysis [35].

The application of β -tubulin and actin gene-specific markers were utilized for the quantification of *B. cinerea* on the *Arabidopsis thaliana* plant via a qPCR assay. Ten ng of fungal DNA was detectable for both of the markers [130]. Also, a different protein-coding gene marker—cutinase A gene was useful for the detection and quantification of *B. cinerea* from infected plants. The assay was capable of successfully detecting 16.7 ng of the genomic DNA of the pathogen [131]. Furthermore, Suarez's team designed primers for *IGS*, the β -tubulin gene and the species-specific sequence-characterized amplified region (*SCAR*) genes of the fungus. Those regions were analyzed before and after the manifestation of the disease in order to detect and quantify the pathogen on strawberry plants. The application of the *IGS* and *SCAR* primers resulted in a high degree of specificity. What is more, the amplification of the *IGS* gene was the most sensitive method, detecting 20 fg of fungal DNA [132]. Furthermore,

Reich's team proved *IGS* primers to be useful in multiplex qPCR reactions for discrimination between *B. cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* [133]. Multiplex qPCR for the simultaneous detection of the resistance of *B. cinerea* to benzimidazoles, dicarboximides, SDHIs, and SBIs was utilized in a recent study. The assay included the design of 4 specific pairs of primers for SNPs in genes responsible for the fungicide resistance, which are *β-tubulin*, succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit (*SdhB*), putative osmosensor histidine kinase (*BcOS1*) and 3-ketoreductase (*erg27*) genes. The assay was capable to simultaneously detect all of the alleles when the concentration of genomic DNA was higher than 0.1 ng [134]. Primer sequences as well as the information of authors and targeted markers are described below in Table 4.

Table 4. Selected primers designed for molecular analysis of *Botrytis* spp.

Targeted species (No. of Strains Analyzed)	Assay	Marker	Primers Sequences 5'-3'	Primer Authors	Primers Used in
<i>Botrytis</i> spp. (1)	PCR	<i>ITS</i> ¹	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG TCCTCCGCTTAATGATATGC	[91]	[125]
<i>B. cinerea</i> (13)	PCR	<i>ITS</i> ¹	ACCCGCACCTAATTCGTCAAC GGTCTTCGATACGGGAGAA	[123]	[123]
<i>B. cinerea</i> (29)	PCR	RAPD ² marker	CAGGAAACACTTTTGGGGATA GAGGACAAGAAAATCGACTAA	[124]	[124]
<i>B. fabae</i> (8)		<i>NEP1</i> ³	TCACGGTTTCTGTCCATCC TCGGGGCTGTACTCTTCAT		
<i>B. fabiopsis</i> (8)	PCR	RAPD ² marker	TCCTTTCTATCCTCGCTGCC CTGGTGGTTGTAAAAGCTGC	[135]	[135]
<i>Botrytis</i> spp. (52)		<i>RPB2</i> ⁴	GATGATCGTGATCATTTCGG CCCATAGCTTGCTTACCCAT		
<i>B. cinerea</i> (39 in [49]; 273 in [35])	PCR	<i>G3PDH</i> ⁵	ATTGACATCGTCGCTGTCACGA ACCCACTCGTTGTCGTACCA	[49]	[35]
		<i>HSP60</i> ⁶	CAACAATTGAGATTTGCCACAAG GATGGATCCAGTGGTACCGAGCAT		
<i>B. cinerea</i> (117 in [136])	PCR	microsatellite marker	ACCCGCACCTAATTCGTCAAC GGTCTTCGATACGGGAGAA	[136]	[35]
		microsatellite marker	AAGCCCTTCGATGCTTGGGA ACGGATTCGGAACCTAAGTAA		
		microsatellite marker	AGGGAGGGTATGAGTGTGTA TTGAGGAGGTGGAAGTTGTA		
		microsatellite marker	CATACACGTATTTCTCCAA TTTACGAGTGTTTTGTITAG		
		microsatellite marker	GGATGAATCAGTTGTTTGTG CACCTAGGTATTTCTCGGTA		
		microsatellite marker	CATCTTCGGGAACGCACAT ATCCACCCCAACGATTGT		
<i>B. cinerea</i> (75 in [137])	PCR	microsatellite marker	CGTTTTCCAGCATTTCAAAGT CAITCATATTCGTTCCCTCA	[137]	[35]
		microsatellite marker	ACTAGATTTCGAGATTCAGTT AAGGTGGTATGAGCGGTTTA		
		microsatellite marker	CCAGTTTCGAGGAGGTCAC GCCTTAGCGGATGTGAGGTA		
		microsatellite marker	CTCGTCATAACCACGCAGAT GCAAGGTCTCGATGTCGATC		
		microsatellite marker	TCCTCTCCCTCCCATCAAC GGATCTGCGTGGTTATGACG		
		microsatellite marker	CCGTCATGTCGGGTGTACCAC CGACCGTTACGGAAATCGGAAG		
<i>B. cinerea</i> (1)	qPCR	<i>β-tubulin</i>	TGGAGATGAAGCCAATCCAA AAGCGTAAAGGGAGGACGG	[130]	[130]
<i>B. cinerea</i> (1)	qPCR	<i>actin</i>	AGCCTTATGTCCTTCCCTTGGC GAAGAGAAATGGAATGGTGAG	[131]	[131]
<i>B. cinerea</i> (24)	qPCR	<i>β-tubulin</i>	GTTACTTGACATGCTGCCATT CACGGTACAGAAAGTGTCTTCTACAA	[132]	[132]
		<i>IGS</i> ⁷	FGCTGTAATTTCAATGTCAGAATCC GGAGACAATAATCGCAITTC		
<i>B. cinerea</i> (24)	qPCR	<i>SCAR</i> ⁸ marker	TTCGTGATTATCACCTGGGTIG GCTCTAGAACGTACGCCACA	[123]	

Table 4. Cont.

Targeted species (No. of Strains Analyzed)	Assay	Marker	Primers Sequences 5'-3'	Primer Authors	Primers Used in
<i>B. cinerea</i> (11)	multi-plex qPCR	<i>β-tubulin</i>	GTCGTCCCATCGCCAAAGGT ACGGTGACAGCACGGAAAGA	[134]	[134]
		<i>SdhB</i> ⁹	ACACCGACCCAGCACCAGA TTAGCAATAACCGCCCAA		
		<i>BcOS1</i> ¹⁰	AGGTCACCCGCTAGCAAAGA TGCTTGATTTCACCTTACA		
		<i>erg27</i> ¹¹	GCGTGGAGAAGCTAAATCGG AGTGTAAAGCTTGATGATGC		

¹ internal transcribed spacer, ² random amplification of polymorphic DNA, ³ necrosis-and ethylene-inducing protein 1, ⁴ DNA-dependent RNA polymerase subunit II gene, ⁵ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene, ⁶ heat-shock protein 60 gene, ⁷ intergenic spacer of genomic DNA, ⁸ sequence characterized amplified region, ⁹ succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit, ¹⁰ putative osmosensor histidine kinase, ¹¹ 3-ketoreductase.

In 2010, the first LAMP reaction with *IGS* primers for *B. cinerea* detection was designed, and it resulted in a high level of efficiency. The assay was capable of detecting 65 pg of pathogen DNA in the sample, but for some of the reactions even an amount 10 times smaller was sufficient to detect the pathogen. The reaction also amplified only the closest related specimen, *Botrytis pelargonii*. What is more, detection was possible only 15 minutes after the start of the reaction [138]. Duan's team proved the usefulness of the mitogen-activated protein kinase gene (*Bcos5*) which is an analysis designed to discriminate between *B. cinerea* on strawberry and tomato and 8 other plant pathogens in LAMP [139]. Also, LAMP assays for the detection of fungicide-resistant *B. cinerea* mutants have been developed [140–142]. Based on the presented above results concerning the detection limits of *B. cinerea* it was observed that depending on selected method and tested isolates the detection was within the limits between 17 ng and 20 fg.

The first genome sequencing of *B. cinerea* was obtained using Sanger technology, with the result of low coverage [143], which was a reason to search for more cost-effective and thorough methods. In 2012, Staats and van Kan employed Illumina technology to build an assembly with a size of c. 41 Mb, and a GC content of 42.5% [144]. Furthermore, a complete pathogen genome was accomplished with the final length of 43.5 Mb [145].

4.2.4. *Colletotrichum acutatum*

Colletotrichum acutatum on berries has been identified with the application of a wide range of markers used in PCR reactions. In a study from 2009, cranberry fruit pathogens were detected with the application of the *ITS* region, which contained *ITS1*, 5.8S ribosomal RNA gene and *ITS2*. Also, an analysis of the partial sequence of the 28S ribosomal RNA gene—*LSU* was utilized. An analysis of the second marker resulted in an improved phylogeny for the species [146]. However, with strawberry pathogens the sequencing of the *ITS* region produced sufficient results for the differentiation of the fungus from *C. gleosporide* [52]. Additionally, the identification of strawberry pathogens in Belgium with the aforementioned marker was sufficient to distinguish between *C. acutatum*, *C. gleosporioides* and *C. coccodes* [147]. Also, an analysis of a different marker—the *IGS* region, for 31 isolates of strawberry pathogens, as well the utilization of species-specific primers in PCR for *C. acutatum* was carried by Xie's team. In agreement with the conclusions of Garrido and van Hemelrijck, the method was capable of identifying three species from the *Colletotrichum* genus, including *C. acutatum* [148]. A different approach, utilizing a restriction fragments length polymorphism (RFLP) protocol with glutamine synthetase (*GS*) introne marker also prevailed for the purpose of differentiating between both species [149]. The *ITS* region with the addition of the *β-tubulin* gene was also considered for the identification of the fungus isolated from different hosts. The *β-tubulin* based phylogeny tree had a higher resolution compared to that constructed with *ITS*, but both [150]. An extended number of markers were utilized for the identification of the causes of strawberry anthracnose in China. The application of primers directed for fragments of actin (*ACT*), *β-tubulin*, glyceraldehyde-3-phosphate

dehydrogenase (*GPDH*), and chitin synthase (*CHS-1*) were satisfactory for distinguishing between *C. acutatum* and *C. gleosporide* [151]. The cytochrome b (*cytb*) gene was also utilized to reveal the fungicide resistance of the strawberry attacking pathogens [152].

The first application of *ITS* region and β -*tubulin* gene in a qPCR assay for the detection of *Colletotrichum acutatum* proved the specificity of the method. In the fungus genome the β -*tubulin* region exists only in one copy, in contrast with the multiple copies of the *ITS* region. Therefore, the method based on *ITS* marker was c. 66 times more sensitive and detected 50 fg of genomic DNA [153]. Furthermore, a duplex qPCR assay for the simultaneous detection of *C. godetiae* and *C. acutatum* was developed by Schena's team. The method included the design of 2 pairs of specific primers, based on 2 markers: β -*tubulin* and *histone H3* genes. The presence of 10 pg of genomic DNA in the sample was enough to detect both species [154]. A summary of the most important information containing markers, primers sequences and authors of the assays is given in Table 5.

Table 5. Selected primers designed for molecular analysis of *Colletotrichum* spp.

Targeted species (No. of Strains Analyzed)	Assay	Marker	Primers Sequences 5'-3'	Primer Authors	Primers Used in
<i>C. acutatum</i> (16 in [146])	PCR	<i>ITS</i> ¹	GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG TCCTCCGCTTATGATATGC	[91]	[146]
<i>C. acutatum</i> (16 in [146])	PCR	<i>LSU</i> ²	ATCCTGAGGGAAACTTC AGATCTTGGTGGTAGTA	[155]	[146]
<i>Colletotrichum</i> spp. (29)	PCR	<i>ITS</i> ¹	AACCCCTTTGTGAACTACCTA TTACTACGCAAAGGAGGCT	[156]	[156]
<i>Colletotrichum</i> spp. (100 in [151])	PCR	<i>GPDH</i> ³	TCCCATCAAGGTCCGATCA ACCTTGCCGACAGCCTTGG	[157]	[151]
		<i>CHS-1</i> ⁴	GATGCCGTGGAAGAAGATTGTCGT GTCTCGCCAGTAGCCGACTTGAC		
		<i>CAL</i> ⁵	GAATTCAAGGAGGCCTTCTC CTTCTGCATCATGAGCTGGAC		
<i>C. acutatum</i> (181)	PCR	<i>Cytb</i> ⁶	GAAGAGGTATGACTACGGTTCATATAG TAGCAGCTGGAGTTTGCATAG	[152]	[152]
<i>C. acutatum</i> (23 in [70])	qPCR	<i>ITS</i> ¹	CGGAGGAAACCAAACCTTATTACA CCAGAACCAAGAGATCCGTTG	[91]	[70]
<i>C. acutatum</i> (6)	qPCR	<i>ITS</i> ¹	GGATCATTACTGAGTTACCGC GCCACGAGAGGCTTC	[153]	[153]
		β - <i>tubulin</i>	CGTCTACTTCAACGAAGTTTGTATCC GAGGCCCTGGTGGGTGAG		
<i>C. acutatum</i> (15)	qPCR	<i>histone H3</i>	TCCAGCGTCTGGTAAGTTGAGAA AGAAGTGTAGCCGATGCGGATT	[154]	[154]

¹ internal transcribed spacer, ² partial sequence of the 28S ribosomal RNA gene, ³ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, ⁴ chitin synthase, ⁵ calmoduline, ⁶ cytochrome b.

The LAMP reaction was also used for the rapid identification of pathogens from different hosts, including strawberry and raspberry plants. Zhang's team utilized previously designed primers for the *ITS* region and β -*tubulin 2* gene, with a greater specificity of the second marker. Nevertheless, the *ITS* marker was more sensitive, but it amplified the fragment for *C. acutatum*, *C. gleosporioides* and *C. fragariae* [158].

The whole-genome sequence for *C. acutatum* has already been attained in 2016 by Han's team. The team utilized NGS technology, and the final assembly was longer than 52 Mb, with a GC content of c. 51.5% [159].

5. Summary and Future Challenges

Soil-borne diseases are a serious threat to organic berry plantations, severely reducing crop yields. Until recently, the most effective way to prevent the spread of pathogenic fungi in the field was to immediately remove infected plants from the cultivation. Thus, fast and correct pathogen identification is essential for the eradication of the disease in time [12,21,160]. The accurate identification of pathogens can be problematic, as fungi attacking berries from the *Phytophthora* and *Verticillium* genera, as well *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum acutatum* species cause similar symptoms on different plants and

fruits. Identification based only on the morphology of the colonies is time-consuming and prone to misinterpretations, as it is based on human experience. These circumstances have led to the intense development of molecular techniques which allow for pathogen recognition and quantification [161]. Despite the fact that various molecular methods to detect fungi described in this review have already been established, they all have some disadvantages. These methods are only sensitive for a given region, also the majority of the assays are designed for pure strains. Those pure strains of fungi are more suitable for DNA isolation and recognition because the samples do not contain other closely related nor competitive microorganisms and their secretions, which often inhibit reactions. Therefore it is necessary to develop molecular methods that are more sensitive, specific and work under different soil and climatic conditions. Additionally, most of the pathogens causing agricultural losses cannot be grown in artificial cultures due to their specific environmental requirements, thus identification methods that do not necessitate the cultivation of pure cultures also have to be established.

Author Contributions: Conceptualization M.F., J.P., and D.M.; Literature review, D.M., J.P. and M.F.; Writing-Original Draft Preparation, D.M., J.P. and M.F.; Figures, J.P. and D.M.; Tables, D.M.; Writing-Review & Editing, D.M., J.P. and M.F.; Revisions & Final editing, D.M., J.P. and M.F.

Funding: This paper was financed by The National Centre for Research and Development in frame of the project BIOSTRATEG, contract number BIOSTRATEG3/344433/16/NCBR/2018.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Willer, H.; Lernoud, J.; Kemper, L. The world of organic agriculture 2018: Summary. In *The World of Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends 2018*; FiBL: Frick, Switzerland, 2018; pp. 22–33.
2. FAOSTAT. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (accessed on 7 November 2018).
3. Lenroud, J.; Willer, H. Current statistics on organic agriculture worldwide: Area, operators and market. In *The World of Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends 2018*; FiBL: Frick, Switzerland, 2018; pp. 34–125.
4. Brągiel, E.; Ślusarczyk, B. Tendencje na europejskim rynku żywności ekologicznej. *Zesz. Nauk. Szk. Głównej Gospod. Wiej. Warszawie, Probl. Rol. Światowego* **2017**, *17*, 29–38. [[CrossRef](#)]
5. Sahota, A. The global market for organic food and drink. In *The World of Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends 2018*; FiBL: Frick, Switzerland, 2018; pp. 146–150.
6. Palter, J.B. The role of the gulf stream in European climate. *Ann. Rev. Mar. Sci.* **2015**, *7*, 113–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Mertely, J.C.; Chandler, C.K.; Xiao, C.L.; Legard, D.E. Comparison of Sanitation and Fungicides for Management of Botrytis Fruit Rot of Strawberry. *Plant Dis.* **2007**, *84*, 1197–1202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Prokkola, S.; Kivijärvi, P. Effect of biological sprays on the incidence of grey mould, fruit yield and fruit quality in organic strawberry production. *Agric. Food Sci.* **2007**, *16*, 25–33. [[CrossRef](#)]
9. Spitzer, T.; Matušinsky, P. Detecting pathogens of Verticillium wilt in winter oilseed rape using ELISA and PCR-Comparison of the two methods and with visual stand evaluation. *Acta Univ. Agric. Silv. Mendelianae Brun.* **2017**, *65*, 205–210. [[CrossRef](#)]
10. Boff, P.; Kastelein, P.; de Kraker, J.; Gerlagh, M.; Kohl, J. Epidemiology of grey mould in annual waiting-bed production of strawberry. *Eur. J. Plant Pathol.* **2001**, *107*, 615–624. [[CrossRef](#)]
11. Wilcox, W.F.; Seem, R.C. Relationship between strawberry gray mold incidence, environmental variables, and fungicide applications during different periods of the fruiting season. *Phytopathology* **1994**, *84*, 264–270. [[CrossRef](#)]
12. Lilja, A.T.; Parikka, P.; Pääskynkivi, E.A.; Hantula, J.I.; Vainio, E.J.; Vartiamäki, H.A.; Lemmetty, A.H.; Vestberg, M.V. Phytophthora cactorum and Colletotrichum acutatum: Survival and detection. *Agric. Consp. Sci.* **2006**, *71*, 121–128.
13. McCain, A.H.; Raabe, R.D.; Wilhelm, S. *Plants Resistant or Susceptible to Verticillium Wilt*; University of California: Oakland, CA, USA, 1981.
14. Bhat, R.G.; Subbarao, K.V. Host range specificity in *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* **1999**, *89*, 1218–1225. [[CrossRef](#)]

15. Osbourn, A.E. Verticillium wilt of strawberry. *PNAS* **2001**, *98*, 14187–14188. [[CrossRef](#)]
16. Inderbitzin, P.; Bostock, R.M.; Davis, R.M.; Usami, T.; Platt, H.W.; Subbarao, K.V. Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e28341. [[CrossRef](#)]
17. Goud, J.K.C.; Termorshuizen, A.J.; Gams, W. Morphology of *Verticillium dahliae* and *V. tricorpus* on semi-selective media used for the detection of *V. dahliae* in soil. *Mycol. Res.* **2003**, *107*, 822–830. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Goud, J.K.C.; Termorshuizen, A.J. Quality of methods to quantify microsclerotia of *Verticillium dahliae* in soil. *European J. Plant Pathol.* **2003**, *109*, 523–534. [[CrossRef](#)]
19. Yu, J.M.; Cafarov, I.H.; Babadoost, M. Morphology, molecular identity, and pathogenicity of *Verticillium dahliae* and *V. longisporum* associated with internally discolored horseradish roots. *Plant Dis.* **2016**, *100*, 749–757. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Özer, G.; Bayraktar, H. First report of *Verticillium dahliae* causing verticillium wilt on Goji berry in Turkey. *J. Plant Pathol.* **2016**, *98*, 682.
21. Fradin, E.F.; Thomma, B.P.H.J. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Mol. Plant Pathol.* **2006**, *7*, 71–86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Huang, L.; Mahoney, R.R. Purification and characterization of an endo- polygalacturonase from *Verticillium albo-atrum*. *J. Appl. Microbiol.* **1999**, *86*, 145–156. [[CrossRef](#)]
23. Carder, J.H.; Hignett, R.C.; Swinburne, T.R. Relationship between the virulence of hop isolates of *Verticillium albo-atrum* and their in vitro secretion of cell-wall degrading enzymes. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **1987**, *31*, 441–452. [[CrossRef](#)]
24. Barnes, E.H. *Verticillium* wilt. In *Atlas and Manual of Plant Pathology*; Plenum Press: New York, NY, USA, 1979; pp. 244–249.
25. Martin, F.N.; Blair, J.E.; Coffey, M.D. A combined mitochondrial and nuclear multilocus phylogeny of the genus *Phytophthora*. *Fungal Genet. Biol.* **2014**, *66*, 19–32. [[CrossRef](#)]
26. Dunstan, W.A.; Howard, K.; Stj Hardy, G.E.; Burgess, T.I. An overview of Australia's *Phytophthora* species assemblage in natural ecosystems recovered from a survey in Victoria. *IMA Fungus* **2016**, *7*, 47–58. [[CrossRef](#)]
27. Meszka, B.; Michalecka, M. Identification of *Phytophthora* spp. isolated from plants and soil samples on strawberry plantations in Poland. *J. Plant Dis. Prot.* **2016**, *123*, 29–36. [[CrossRef](#)]
28. Wilcox, W.F.; Scott, P.H.; Hamm, P.B.; Kennedy, D.M.; Duncan, J.M.; Brasier, C.M.; Hansen, E.M. Identity of a *Phytophthora* species attacking raspberry in Europe and North America. *Mycol. Res.* **1993**, *97*, 817–831. [[CrossRef](#)]
29. Weiland, J.E.; Benedict, C.; Zasada, I.A.; Scagel, C.R.; Beck, B.R.; Davis, A.; Graham, K.; Peetz, A.; Martin, R.R.; Dung, J.K.S.; et al. Late-summer disease symptoms in western Washington red raspberry fields associated with co-occurrence of *Phytophthora rubi*, *Verticillium dahliae* and *Pratylenchus penetrans*, but not raspberry bushy dwarf virus. *Plant Dis.* **2018**, *102*, 938–947. [[CrossRef](#)]
30. Gigot, J.; Walters, T.W.; Zasada, I.A. Impact and Occurrence of *Phytophthora rubi* and *Pratylenchus penetrans* in commercial red raspberry (*Rubus ideaus*) fields in Northwestern Washington. *Int. J. Fruit Sci.* **2013**, *13*, 357–372. [[CrossRef](#)]
31. Martin, F.N.; Abad, Z.G.; Balci, Y.; Ivors, K. Identification and detection of *Phytophthora*: Reviewing our progress, identifying our needs. *Plant Dis.* **2012**, *96*, 1080–1103. [[CrossRef](#)]
32. Dewey (Molly), F.M.; Yohalem, D. Detection, quantification and immunolocalisation of *Botrytis* species. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 2007; pp. 181–194.
33. Elad, Y.; Williamson, B.; Tudzynski, P.; Delent, N. *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems—An introduction. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 2007; pp. 1–6.
34. Choquer, M.; Fournier, E.; Kunz, C.; Levis, C.; Pradier, J.-M.; Simon, A.; Viaud, M. *Botrytis cinerea* virulence factors: New insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiol. Lett.* **2007**, *277*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Rasiukevičiūtė, N.; Rugienius, R.; Šikšnianienė, J.B. Genetic diversity of *Botrytis cinerea* from strawberry in Lithuania. *Zemdirbyste-Agric.* **2018**, *105*, 265–270. [[CrossRef](#)]

36. Blanco, C.; De Los Santos, B.; Romero, F. Relationship between concentrations of *Botrytis cinerea* conidia in air, environmental conditions, and the incidence of grey mould in strawberry flowers and fruits. *Eur. J. Plant Pathol.* **2006**, *114*, 415–425. [[CrossRef](#)]
37. Prusky, D. Pathogen quiescence in postharvest diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* **1996**, *34*, 413–434. [[CrossRef](#)]
38. Dean, R.; Van Kan, J.A.L.; Pretorius, Z.A.; Hammond-Kosack, K.E.; Di Pietro, A.; Spanu, P.D.; Rudd, J.J.; Dickman, M.; Kahmann, R.; Ellis, J.; et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* **2012**, *13*, 414–430. [[CrossRef](#)]
39. Elad, Y. Responses of plants to infection by botrytis cinerea and novel means involved in reducing their susceptibility to infection. *Biol. Rev.* **1997**, *72*, 381–422. [[CrossRef](#)]
40. Droby, S.; Lichter, A. Post-harvest *Botrytis* infection: Etiology, development and management. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 2007; pp. 349–368.
41. Kozhar, O.; Peever, T.L. How does *Botrytis cinerea* infect red raspberry? *Phytopathology* **2018**, *108*, 1287–1298. [[CrossRef](#)]
42. Xu, X.; Wedgwood, E.; Berrie, A.M.; Allen, J.; O'Neill, T.M. Management of raspberry and strawberry grey mould in open field and under protection. A review. *Agron. Sustain. Dev.* **2012**, *32*, 531–543. [[CrossRef](#)]
43. Fitt, B.D.L.; Creighton, N.F.; Bainbridge, A. Role of wind and rain in dispersal of *Botrytis fabae* conidia. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **1985**, *85*, 307–312. [[CrossRef](#)]
44. Louis, C.; Girard, M.; Kuhl, G.; Lopez-Ferber, M. Persistence of *Botrytis cinerea* in its vector *Drosophila melanogaster*. *Phytopathology* **1996**, *86*, 934–939. [[CrossRef](#)]
45. Doss, R.P. Composition and enzymatic activity of the extracellular matrix secreted by germlings of *Botrytis cinerea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 404–408. [[PubMed](#)]
46. Nelson, K.E. Effect of humidity on infection of table grapes by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **1951**, *41*, 859–864.
47. Holz, G.; Coertze, S.; Williamson, B. The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 2007; pp. 9–28.
48. Elmer, P.A.G.; Michailides, T.J. Epidemiology of *Botrytis cinerea* in orchard and vine crops. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 2007.
49. Rigotti, S.; Viret, O.; Gindro, K. Two new primers highly specific for the detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. *Phytopathol. Mediterr.* **2006**, *45*, 253–260.
50. Khazaeli, P.; Zamanizadeh, H.; Morid, B.; Bayat, H. Morphological and molecular identification of *Botrytis cinerea* causal agent of gray mold in rose greenhouses in central regions of Iran. *Int. J. Agric. Sci. Res.* **2010**, *1*, 20–24.
51. Whitelaw-Weckert, M.A.; Curtin, S.J.; Huang, R.; Steel, C.C.; Blanchard, C.L.; Roffey, P.E. Phylogenetic relationships and pathogenicity of *Colletotrichum acutatum* isolates from grape in subtropical Australia. *Plant Pathol.* **2007**, *56*, 448–463. [[CrossRef](#)]
52. Garrido, C.; Carbú, M.; Fernández-Acero, F.J.; Vallejo, I.; Manuel Cantoral, J. Phylogenetic relationships and genome organisation of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose in strawberry. *Eur. J. Plant Pathol.* **2009**, *125*, 397–411. [[CrossRef](#)]
53. Freeman, S.; Katan, T. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. *Phytopathology* **1997**, *87*, 516–521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Sonavane, P.; Venkataravanappa, V.; Reddy, M.K. First report of *Colletotrichum acutatum* associated with anthracnose disease in malayan apple from India. *Plant Dis.* **2017**, *5*, 465–472.
55. Wagner, K.; Springer, B.; Pires, V.P.; Keller, P.M. Molecular detection of fungal pathogens in clinical specimens by 18S rDNA high-throughput screening in comparison to ITS PCR and culture. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 6964. [[CrossRef](#)]
56. Liu, F.; Tang, G.; Zheng, X.; Li, Y.; Sun, X.; Qi, X.; Zhou, Y.; Xu, J.; Chen, H.; Chang, X.; et al. Molecular and phenotypic characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease in peppers from Sichuan Province, China. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–17. [[CrossRef](#)]
57. Debode, J.; van Hemelrijck, W.; Xu, X.M.; Maes, M.; Creemers, P.; Heungens, K. Latent entry and spread of *Colletotrichum acutatum* (species complex) in strawberry fields. *Plant Pathol.* **2015**, *64*, 385–395. [[CrossRef](#)]
58. Madden, L.V.; Yang, X.; Wilson, L.L. Effects of rain intensity on splash dispersal of *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology* **1996**, *86*, 864–874. [[CrossRef](#)]

59. Eastburn, D.M.; Gubler, W.D. Strawberry anthracnose: Detection and survival of *Colletotrichum acutatum* in soil. *Plant Dis.* **1990**, *74*, 161–163. [[CrossRef](#)]
60. Narayanasamy, P. Detection of fungal pathogens in plants. In *Microbial Plant Pathogens—Detection and Disease Diagnosis: Fungal Pathogens*; Springer Science + Business Media B.V.: Berlin, Germany, 2011; Volume 1, pp. 5–199. ISBN 9789048197682.
61. Larkin, R.P.; Ristaino, J.B.; Campbell, L.C. Detection and quantification of *Phytophthora capsici* in soil. *Am. Phytopathol. Soc.* **1995**, *85*, 1057–1063. [[CrossRef](#)]
62. Frac, M.; Jezierska-Tys, S.; Yaguchi, T. Occurrence, detection, and molecular and metabolic characterization of heat-resistant fungi in soils and plants and their risk to human health. *Adv. Agron.* **2015**, *132*, 161–204.
63. Edwards, S.G.; Seddon, B. Selective media for the specific isolation and enumeration of *Botrytis cinerea* conidia. *Lett. Appl. Microbiol.* **2001**, *32*, 63–66. [[CrossRef](#)]
64. Arbefeville, S.; Harris, A.; Ferrieri, P. Comparison of sequencing the D2 region of the large subunit ribosomal RNA gene (MicroSEQ®) versus the internal transcribed spacer (ITS) regions using two public databases for identification of common and uncommon clinically relevant fungal species. *J. Microbiol. Methods* **2017**, *140*, 40–46. [[CrossRef](#)]
65. Panek, J.; Frac, M. Development of a qPCR assay for the detection of heat-resistant *Talaromyces flavus*. *Int. J. Food Microbiol.* **2018**, *270*, 44–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Capote, N.; Pastrana, M.A.; Aguado, A.; Sanchez-Torres, P. Molecular tools for detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance. In *Plant pathology*; IntechOpen: London, UK, 2012.
67. Saiki, R.K.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B.; Erlich, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **1988**, *239*, 487–491. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Higuchi, R.; Dollinger, G.; Walsh, S.P.; Griffith, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Nat. Biotechnol.* **1992**, *10*, 413–417. [[CrossRef](#)]
69. Higuchi, R.; Fockler, C.; Dollinger, G.; Watson, R. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Nat. Biotechnol.* **1993**, *11*, 1026–1030. [[CrossRef](#)]
70. Garrido, C.; Carbú, M.; Fernández-Acero, F.J.; Boonham, N.; Colyer, A.; Cantoral, J.M.; Budge, G. Development of protocols for detection of *Colletotrichum acutatum* and monitoring of strawberry anthracnose using real-time PCR. *Plant Pathol.* **2009**, *58*, 43–51. [[CrossRef](#)]
71. Notomi, T.; Okayama, H.; Masubuchi, H.; Yonekawa, T.; Watanabe, K.; Amino, N.; Hase, T. Loop mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, e63. [[CrossRef](#)]
72. Francois, P.; Tangomo, M.; Hibbs, J.; Bonetti, E.J.; Boehme, C.C.; Notomi, T.; Perkins, M.D.; Schrenzel, J. Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2011**, *62*, 41–48. [[CrossRef](#)]
73. Niessen, L. Current state and future perspectives of loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based diagnosis of filamentous fungi and yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *99*, 553–574. [[CrossRef](#)]
74. Metzker, M.L. Sequencing technologies the next generation. *Nat. Rev. Genet.* **2010**, *11*, 31–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Faino, L.; Thomma, B.P.H.J. Get your high-quality low-cost genome sequence. *Trends Plant Sci.* **2014**, *19*, 288–291. [[CrossRef](#)]
76. Panek, J.; Frac, M.; Bilińska-Wielgus, N. Comparison of chemical sensitivity of fresh and long-stored heat resistant *Neosartorya fischeri* environmental isolates using Biolog Phenotype MicroArray system. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0147605. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Diguta, C.F.; Vincent, B.; Guilloux-Benatier, M.; Alexandre, H.; Rousseaux, S. PCR ITS-RFLP: A useful method for identifying filamentous fungi isolates on grapes. *Food Microbiol.* **2011**, *28*, 1145–1154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Krupa, P. Identification by PCR-RFLP of a fungus isolated from mycorrhizal roots of a distinguishable birch growing in areas disturbed by industry. *Polish J. Environ. Stud.* **1999**, *8*, 161–163.
79. Inderbitzin, P.; Davis, R.M.; Bostock, R.M.; Subbarao, K.V. Identification and differentiation of *Verticillium* species and *V. longisporum* lineages by simplex and multiplex PCR assays. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e65990. [[CrossRef](#)]
80. Lievens, B.; Brouwer, M.; Vanachter, A.C.R.C.; Cammue, B.P.A.; Thomma, B.P.H.J. Real-time PCR for detection and quantification of fungal and oomycete tomato pathogens in plant and soil samples. *Plant Sci.* **2006**, *171*, 155–165. [[CrossRef](#)]

81. Ozyilmaz, U.; Benlioglu, K.; Yildiz, A.; Benlioglu, H.S. Effects of soil amendments combined with solarization on the soil microbial community in strawberry cultivation using quantitative real-time PCR. *Phytoparasitica* **2016**, *44*, 661–680. [[CrossRef](#)]
82. Mirmajlessi, S.M.; Larena, I.; Mänd, M.; Loit, E. A rapid diagnostic assay for detection and quantification of the causal agent of strawberry wilt from field samples. *Acta Agric. Scand. Sect. B — Soil Plant Sci.* **2016**, *66*, 619–629. [[CrossRef](#)]
83. Debode, J.; van Poucke, K.; França, S.C.; Maes, M.; Höfte, M.; Heungens, K. Detection of multiple *Verticillium* species in soil using density flotation and real-time polymerase chain reaction. *Plant Dis.* **2011**, *95*, 1571–1580. [[CrossRef](#)]
84. O'Donnell, K.; Cigelnik, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.* **1997**, *7*, 103–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Knüfer, J.; Lopisso, D.T.; Koopmann, B.; Karlovsky, P.; von Tiedemann, A. Assessment of latent infection with *Verticillium longisporum* in field-grown oilseed rape by qPCR. *Eur. J. Plant Pathol.* **2017**, *147*, 819–831. [[CrossRef](#)]
86. Klosterman, S.J. *Real-Time PCR for the Quantification of Fungi in Planta*; Springer: Berlin, Germany, 2012; Volume 835, pp. 121–132. ISBN 9781617795008.
87. Bilodeau, G.J.; Koike, S.T.; Uribe, P.; Martin, F.N. Development of an assay for rapid detection and quantification of *Verticillium dahliae* in soil. *Phytopathology* **2012**, *102*, 331–343. [[CrossRef](#)]
88. Pasche, J.S.; Mallik, I.; Anderson, N.R.; Gudmestad, N.C. Development and validation of a real-time PCR assay for the quantification of *Verticillium dahliae* in potato. *Plant Dis.* **2013**, *97*, 608–618. [[CrossRef](#)]
89. Pasche, J.S.; Thompson, A.L.; Gudmestad, N.C. Quantification of field resistance to *Verticillium dahliae* in eight russet-skinned potato cultivars using real-time PCR. *Am. J. Potato Res.* **2013**, *90*, 158–170. [[CrossRef](#)]
90. Tzelepis, G.; Bejai, S.; Sattar, M.N.; Schwelm, A.; Ilbäck, J.; Fogelqvist, J.; Dixelius, C. Detection of *Verticillium* species in Swedish soils using real-time PCR. *Arch. Microbiol.* **2017**, *199*, 1383–1389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protoc. A Guid. to Methods Appl.* **1990**, *18*, 315–322.
92. Pantou, M.P.; Mavridou, A.; Typas, M.A. IGS sequence variation, group-I introns and the complete nuclear ribosomal DNA of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*: Excellent tools for isolate detection and phylogenetic analysis. *Fungal Genet. Biol.* **2003**, *38*, 159–174. [[CrossRef](#)]
93. Eynck, C.; Koopmann, B.; Grunewaldt-Stoecker, G.; Karlovsky, P.; von Tiedemann, A. Differential interactions of *Verticillium longisporum* and *V. dahliae* with *Brassica napus* detected with molecular and histological techniques. *Eur. J. Plant Pathol.* **2007**, *118*, 259–274. [[CrossRef](#)]
94. Borza, T.; Beaton, B.; Govindarajan, A.; Gao, X.; Liu, Y.; Ganga, Z.; Wang-Pruski, G. Incidence and abundance of *Verticillium dahliae* in soil from various agricultural fields in Prince Edward Island, Canada. *Eur. J. Plant Pathol.* **2018**, *151*, 825–830. [[CrossRef](#)]
95. Moradi, A.; Almasi, M.A.; Jafary, H.; Mercado-Blanco, J. A novel and rapid loop-mediated isothermal amplification assay for the specific detection of *Verticillium dahliae*. *J. Appl. Microbiol.* **2014**, *116*, 942–954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. De Jonge, R.; Bolton, M.D.; Kombrink, A.; van Den Berg, G.C.M.; Yadeta, K.A.; Thomma, B.P.H.J. Extensive chromosomal reshuffling drives evolution of virulence in an asexual pathogen. *Genome Res.* **2013**, *23*, 1271–1282. [[CrossRef](#)]
97. Faino, L.; Seidl, M.F.; Datema, E.; van den Berg, G.C.M.; Janssen, A.; Wittenberg, A.H.J.; Thomma, B.P.H.J. Single-molecule real-time sequencing combined with optical mapping yields completely finished fungal genome. *MBio* **2015**, *6*, e00936-15. [[CrossRef](#)]
98. Fan, R.; Cockerton, H.M.; Armitage, A.D.; Bates, H.; Cascant-Lopez, E.; Antanaviciute, L.; Xu, X.; Hu, X.; Harrison, R.J. Vegetative compatibility groups partition variation in the virulence of *Verticillium dahliae* on strawberry. *PLoS ONE* **2018**, *13*, 1–21. [[CrossRef](#)]
99. Jelen, V.; De Jonge, R.; van De Peer, Y.; Javornik, B.; Jakše, J. Complete mitochondrial genome of the *Verticillium* wilt causing plant pathogen *Verticillium nonalfalfae*. *PLoS ONE* **2016**, *11*. [[CrossRef](#)]
100. Fogelqvist, J.; Tzelepis, G.; Bejai, S.; Ilbäck, J.; Schwelm, A.; Dixelius, C. Analysis of the hybrid genomes of two field isolates of the soil-borne fungal species *Verticillium longisporum*. *BMC Genom.* **2018**, *19*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

101. Cooke, D.E.L.; Duncan, J.M. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on ITS1 and ITS2 sequences of the ribosomal RNA gene repeat. *Mycol. Res.* **1997**, *101*, 667–677. [[CrossRef](#)]
102. Ristaino, J.B.; Madritch, M.; Trout, C.; Parra, G. PCR amplification of ribosomal DNA for species identification of *Phytophthora*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 948–954. [[PubMed](#)]
103. Cooke, D.E.L.; Drenth, A.; Duncan, J.M.; Wagels, G.; Brasier, C.M. A molecular phylogeny of phytophthora and related oomycetes. *Fungal Genet. Biol.* **2000**, *30*, 17–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Martin, F.N.; Tooley, P.W.; Blomquist, C. Molecular detection of *Phytophthora ramorum*, the causal agent of sudden oak death in California, and two additional species commonly recovered from diseased plant material. *Phytopathology* **2004**, *94*, 621–631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Polashock, J.J.; Vaiciunas, J.; Oudemans, P.V. Identification of a new *Phytophthora* species causing root and runner rot of cranberry in New Jersey. *Phytopathology* **2005**, *95*, 1237–1243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Blair, J.E.; Coffey, M.D.; Park, S.-Y.; Geiser, D.M.; Kang, S. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genet. Biol.* **2008**, *45*, 266–277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Bienapfl, J.C.; Balci, Y. Movement of *Phytophthora* spp. in Maryland's Nursery Trade. *Plant Dis.* **2014**, *98*, 134–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Böhm, J.; Hahn, A.; Schubert, R.; Bahnweg, G.; Adler, N.; Nechwatal, J.; Oehlmann, R.; Oßwald, W.F. Real-time quantitative PCR: DNA determination in isolated spores of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and monitoring of *Phytophthora infestans* and *Phytophthora citricola* in their respective host plants. *Phytopathology* **1999**, *147*, 409–416. [[CrossRef](#)]
109. Kox, L.F.F.; Van Brouwershaven, I.R.; Van De Vossenbergh, B.T.L.H.; Van den Beld, H.E.; Bonants, P.J.M.; de Gruyter, J. Diagnostic values and utility of immunological, morphological, and molecular methods for in planta detection of *Phytophthora ramorum*. *Phytopathology* **2007**, *97*, 1119–1129. [[CrossRef](#)]
110. Pastrana, A.M.; Basallote-Ureba, M.J.; Aguado, A.; Capote, N. Potential inoculum sources and incidence of strawberry soilborne pathogens in Spain. *Plant Dis.* **2017**, *101*, 751–760. [[CrossRef](#)]
111. Nath, V.S.; Hegde, V.M.; Jeeva, M.L.; Misra, R.S.; Veena, S.S.; Raj, M.; Unnikrishnan, S.K.; Darveekaran, S.S. Rapid and sensitive detection of *Phytophthora colocasiae* responsible for the taro leaf blight using conventional and real-time PCR assay. *FEMS Microbiol. Lett.* **2014**, *352*, 174–183. [[CrossRef](#)]
112. Li, M.; Inada, M.; Watanabe, H.; Suga, H.; Kageyama, K. Simultaneous detection and quantification of *Phytophthora nicotianae* and *P. cactorum*, and distribution analyses in strawberry greenhouses by duplex real-time PCR. *Microbes Environ.* **2013**, *28*, 195–203. [[CrossRef](#)]
113. Liao, F.; Zhang, Y.; Zhu, L.-H.; Cao, B.; Lv, D.; Luo, J.-F.; Li, G.-R. Triplex real-time PCR detection of three quarantine *Phytophthora* pathogens infecting *Malus Miller*. *J. Plant Dis. Prot.* **2018**, *125*, 325–330. [[CrossRef](#)]
114. Martin, F.N.; Tooley, P.W. Phylogenetic relationships among *Phytophthora* species inferred from sequence analysis of mitochondrially encoded cytochrome oxidase I and II genes. *Mycologia* **2003**, *95*, 269–284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Ios, R.; Andrieux, A.; Marçais, B.; Frey, P. Genetic characterization of the natural hybrid species *Phytophthora alni* as inferred from nuclear and mitochondrial DNA analyses. *Fungal Genet. Biol.* **2006**, *43*, 511–529. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Tomlinson, J.A.; Barker, I.; Boonham, N. Faster, simpler, more-specific methods for improved molecular detection of *Phytophthora ramorum* in the field. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 4040–4047. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Chen, Q.; Li, B.; Liu, P.; Lan, C.; Zhan, Z.; Weng, Q. Development and evaluation of specific PCR and LAMP assays for the rapid detection of *Phytophthora melonis*. *Eur. J. Plant Pathol.* **2013**, *137*, 597–607. [[CrossRef](#)]
118. Si Ammour, M.; Bilodeau, G.J.; Tremblay, D.M.; van der Heyden, H.; Yaseen, T.; Varvaro, L.; Carisse, O. Development of real-time isothermal amplification assays for on-site detection of *Phytophthora infestans* in potato leaves. *Plant Dis.* **2017**, *101*, 1269–1277. [[CrossRef](#)]
119. Khan, M.; Li, B.; Jiang, Y.; Weng, Q.; Chen, Q. Evaluation of different PCR-based assays and LAMP method for rapid detection of *Phytophthora infestans* by targeting the *Ypt1* gene. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

120. Tyler, B.M.; Tripathy, S.; Zhang, X.; Dehal, P.; Jiang, R.H.Y.; Aerts, A.; Arredondo, F.D.; Baxter, L.; Bensasson, D.; Beynon, J.L.; et al. *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science* **2006**, *313*, 1261–1266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Haas, B.J.; Kamoun, S.; Zody, M.C.; Jiang, R.H.Y.; Handsaker, R.E.; Cano, L.M.; Grabherr, M.; Kodira, C.D.; Raffaele, S.; Torto-Alalibo, T.; et al. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature* **2009**, *461*, 393–398. [[CrossRef](#)]
122. Tabima, J.F.; Kronmiller, B.A.; Press, C.M.; Tyler, B.M.; Zasada, I.A.; Grünwald, N.J. Whole genome sequences of the raspberry and strawberry pathogens *Phytophthora rubi* and *P. fragariae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2017**, *30*, 767–769. [[CrossRef](#)]
123. Rigotti, S.; Gindro, K.; Richter, H.; Viret, O. Characterization of molecular markers for specific and sensitive detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) using PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* **2002**, *209*, 169–174. [[CrossRef](#)]
124. Fan, X.; Zhang, J.Z.; Yang, L.; Wu, M.; Chen, W.; Li, G. Development of PCR-based assays for detecting and differentiating three species of *Botrytis* infecting broad bean. *Plant Dis.* **2015**, *99*, 691–698. [[CrossRef](#)]
125. Kamaruzzaman, M.; Hao, F.; Wu, M.; Li, G. Gray mold of strawberry (*Fragaria ananassa*) caused by a rare pink-colored isolate of *Botrytis cinerea* in China. *Australas. Plant Pathol.* **2018**, *47*, 587–589. [[CrossRef](#)]
126. Kim, J.Y.; Aktaruzzaman, M.; Afroz, T.; Kim, B.S.; Shin, H.D. First report of gray mold caused by *Botrytis cinerea* on red raspberry (*Rubus idaeus*) in Korea. *Plant Dis.* **2016**, *100*, 533. [[CrossRef](#)]
127. Wang, H.C.; Li, L.C.; Cai, B.; Cai, L.T.; Chen, X.J.; Yu, Z.H.; Zhang, C.Q. Metabolic phenotype characterization of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1–9. [[CrossRef](#)]
128. Alam, M.W.; Gleason, M.L.; Malik, A.U.; Amin, M.; Fiaz, M.; Ali, S.; Rosli, H.; Rehman, A. First report of *Botrytis* spp. as a postharvest pathogen of strawberry in Pakistan. *J. Plant Pathol.* **2017**, *99*, 287–304.
129. Garibaldi, A.; Bertetti, D.; Ortega, S.F.; Pensa, P.; Gullino, M.L. First report of Botrytis blight caused by *Botrytis cinerea* on *Helichrysum bracteatum* in Italy. *J. Plant Pathol.* **2018**, *99*, 287–304.
130. Brouwer, M.; Lievens, B.; van Hemelrijck, W.; van Den Ackerveken, G.; Cammue, B.P.A.; Thomma, B.P.H.J. Quantification of disease progression of several microbial pathogens on *Arabidopsis thaliana* using real-time fluorescence PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, *228*, 241–248. [[CrossRef](#)]
131. Gachon, C.; Saindrenan, P. Real-time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected by *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol. Biochem.* **2004**, *42*, 367–371. [[CrossRef](#)]
132. Suarez, M.B.; Walsh, K.; Boonham, N.; O'Neill, T.M.; Pearson, S.; Barker, I. Development of real-time PCR (TaqMan®) assays for the detection and quantification of *Botrytis cinerea* in planta. *Plant Physiol. Biochem.* **2005**, *43*, 890–899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Reich, J.D.; Alexander, T.W.; Chatterton, S. A multiplex PCR assay for the detection and quantification of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *Lett. Appl. Microbiol.* **2016**, *62*, 379–385. [[CrossRef](#)]
134. Zhang, X.; Xie, F.; Lv, B.; Zhao, P.; Ma, X. Suspension array for multiplex detection of eight fungicide-resistance related alleles in *Botrytis cinerea*. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Staats, M.; van Baarlen, P.; van Kan, J.A.L. Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Mol. Biol. Evol.* **2005**, *22*, 333–346. [[CrossRef](#)]
136. Fournier, E.; Levis, C.; Fortini, D.; Leroux, P.; Giraud, T.; Brygoo, Y. Characterization of Bc-hch, the *Botrytis cinerea* homolog of the *Neurospora crassa* het-c vegetative incompatibility locus, and its use as a population marker. *Mycologia* **2003**, *95*, 251–261. [[CrossRef](#)]
137. Fournier, E.; Giraud, T.; Loiseau, A.; Vautrin, D.; Estoup, A.; Solognac, M.; Cornuet, J.M.; Brygoo, Y. Characterization of nine polymorphic microsatellite loci in the fungus *Botrytis cinerea* (Ascomycota). *Mol. Ecol. Notes* **2002**, *2*, 253–255. [[CrossRef](#)]
138. Tomlinson, J.A.; Dickinson, M.J.; Boonham, N. Detection of *Botrytis cinerea* by loop-mediated isothermal amplification. *Lett. Appl. Microbiol.* **2010**, *51*, 650–657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Duan, Y.B.; Ge, C.Y.; Zhang, X.K.; Wang, J.X.; Zhou, M.G. Development and evaluation of a novel and rapid detection assay for *Botrytis cinerea* based on loop-mediated isothermal amplification. *PLoS ONE* **2014**, *9*. [[CrossRef](#)]
140. Duan, Y.B.; Yang, Y.; Li, M.X.; Li, T.; Fraaije, B.A.; Zhou, M.G. Development and application of a simple, rapid and sensitive method for detecting moderately carbendazim-resistant isolates in *Botrytis cinerea*. *Ann. Appl. Biol.* **2018**, *172*, 355–365. [[CrossRef](#)]

141. Duan, Y.B.; Yang, Y.; Wang, J.X.; Chen, C.J.; Steinberg, G.; Fraaije, B.A.; Zhou, M.G. Simultaneous detection of multiple benzimidazole-resistant β -tubulin variants of *Botrytis cinerea* using loop-mediated isothermal amplification. *Plant Dis.* **2018**, *102*, 2016–2024. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Hu, X.R.; Dai, D.J.; Wang, H.D.; Zhang, C.Q. Rapid on-site evaluation of the development of resistance to quinone outside inhibitors in *Botrytis cinerea*. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–9. [[CrossRef](#)]
143. Amselem, J.; Cuomo, C.A.; van Kan, J.A.L.; Viaud, M.; Benito, E.P.; Couloux, A.; Coutinho, P.M.; de Vries, R.P.; Dyer, P.S.; Fillinger, S.; et al. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genet.* **2011**, *7*, e1002230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Staats, M.; van Kan, J.A.L. Genome update of *Botrytis cinerea* strains B05.10 and T4. *Eukaryot. Cell* **2012**, *11*, 1413–1414. [[CrossRef](#)]
145. van Kan, J.A.L.; Stassen, J.H.M.; Mosbach, A.; van Der Lee, T.A.J.; Faino, L.; Farmer, A.D.; Papanotiropoulos, D.G.; Zhou, S.; Seidl, M.F.; Cottam, E.; et al. A gapless genome sequence of the fungus *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* **2017**, *18*, 75–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Polashock, J.J.; Caruso, F.L.; Oudemans, P.V.; McManus, P.S.; Crouch, J.A. The North American cranberry fruit rot fungal community: A systematic overview using morphological and phylogenetic affinities. *Plant Pathol.* **2009**, *58*, 1116–1127. [[CrossRef](#)]
147. van Hemelrijck, W.; Debode, J.; Heungens, K.; Maes, M.; Creemers, P. Phenotypic and genetic characterization of *Colletotrichum* isolates from Belgian strawberry fields. *Plant Pathol.* **2010**, *59*, 853–861. [[CrossRef](#)]
148. Xie, L.; Zhang, J.Z.; Wan, Y.; Hu, D. Identification of *Colletotrichum* spp. isolated from strawberry in Zhejiang Province and Shanghai City, China. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **2010**, *11*, 61–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
149. Liu, B.; Louws, F.J.; Sutton, T.B.; Correll, J.C. A rapid qualitative molecular method for the identification of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. *Eur. J. Plant Pathol.* **2012**, *132*, 593–607. [[CrossRef](#)]
150. Shivas, R.G.; Tan, Y.P. A taxonomic re-assessment of *Colletotrichum acutatum*, introducing *C. fioriniae* comb. *stat. nov.* and *C. simmondsii* sp. *nov.* *Fungal Divers.* **2009**, 111–122.
151. Han, Y.C.; Zeng, X.G.; Xiang, F.Y.; Chen, F.Y.; Gu, Y.C. Distribution and characteristics of *Colletotrichum* spp. associated with anthracnose of strawberry in Hubei, China. *Plant Dis.* **2016**, *100*, 996–1006. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Forcelini, B.B.; Seijo, T.E.; Amiri, A.; Peres, N.A. Resistance in strawberry isolates of *Colletotrichum acutatum* from Florida to quinone-outside inhibitor fungicides. *Plant Dis.* **2016**, *100*, 2050–2056. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Debode, J.; van Hemelrijck, W.; Baeyen, S.; Creemers, P.; Heungens, K.; Maes, M. Quantitative detection and monitoring of *Colletotrichum acutatum* in strawberry leaves using real-time PCR. *Plant Pathol.* **2009**, *58*, 504–514. [[CrossRef](#)]
154. Schena, L.; Abdelfattah, A.; Mosca, S.; Li Destri Nicosia, M.G.; Agosteo, G.E.; Cacciola, S.O. Quantitative detection of *Colletotrichum godetiae* and *C. acutatum sensu stricto* in the phyllosphere and carposphere of olive during four phenological phases. *Eur. J. Plant Pathol.* **2017**, *149*, 337–347. [[CrossRef](#)]
155. Vilgalys, R.; Hester, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J. Bacteriol.* **1990**, *172*, 4238–4246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Martinez-Culebras, P.V.; Querol, A.; Suarez-Fernandez, M.B.; Garcia-Lopez, M.D.; Barrio, E. Phylogenetic relationships among *Colletotrichum* pathogens of strawberry and design of PCR primers for their identification. *J. Phytopathol.* **2003**, *151*, 135–143. [[CrossRef](#)]
157. Weir, B.S.; Johnston, P.R.; Damm, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Stud. Mycol.* **2012**, *73*, 115–180. [[CrossRef](#)]
158. Zhang, X.; Harrington, T.C.; Batzer, J.C.; Kubota, R.; Peres, N.A.; Gleason, M.L. Detection of *Colletotrichum acutatum sensu lato* on strawberry by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Plant Dis.* **2016**, *100*, 1804–1812. [[CrossRef](#)]
159. Han, J.H.; Chon, J.K.; Ahn, J.H.; Choi, I.Y.; Lee, Y.H.; Kim, K.S. Whole genome sequence and genome annotation of *Colletotrichum acutatum*, causal agent of anthracnose in pepper plants in South Korea. *Genomics Data* **2016**, *8*, 45–46. [[CrossRef](#)]

160. Fraç, M.; Hannula, S.E.; Belka, M.; Jędryczka, M. Fungal biodiversity and their role in soil health. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1–9. [[CrossRef](#)]
161. Mirmajlessi, S.M.; Destefanis, M.; Gottsberger, R.A.; Mänd, M.; Loit, E. PCR-based specific techniques used for detecting the most important pathogens on strawberry: A systematic review. *Syst. Rev.* **2015**, *4*, 9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

5.2. Publikacja P2

5.2.1. Tekst publikacji



International Journal of
Molecular Sciences



Article

Triplex Real-Time PCR Approach for the Detection of Crucial Fungal Berry Pathogens—*Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp.

Dominika G. Malarczyk, Jacek Panek  and Magdalena Frać *

Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin, Poland; d.malarczyk@ipan.lublin.pl (D.G.M.); j.panek@ipan.lublin.pl (J.P.)

* Correspondence: m.frac@ipan.lublin.pl; Tel.: +48-81-744-5061

Received: 30 September 2020; Accepted: 8 November 2020; Published: 11 November 2020



Abstract: Phytopathogens cause undeniably serious damage in agriculture by harming fruit cultivations and lowering harvest yields, which as a consequence substantially reduces food production efficiency. Fungi of the *Botrytis*, *Colletotrichum* and *Verticillium* genera are a main concern in berry production. However, no rapid detection method for detecting all of these pathogens simultaneously has been developed to date. Therefore, in this study, a multiplex real-time PCR assay for this purpose was established. Universal fungal primers for the D2 region of the large subunit ribosomal DNA and three multiplexable fluorogenic probes specific for the chosen fungi were designed and deployed. The triplex approach for the molecular detection of these fungi, which was developed in this study, allows for the rapid and effective detection of crucial berry pathogens, which contributes to a more rapid implementation of protective measures in plantations and a significant reduction in losses caused by fungal diseases.

Keywords: D2LSU; *Botrytis* spp.; *Colletotrichum* spp.; *Verticillium* spp.; real-time PCR; strawberry pathogens; rapid detection

1. Introduction

Fungal pathogens cause severe destruction in the food industry. Phytopathogenic diseases induce economic losses by reducing yield and also by decreasing fruit survival rates in cold storage. Some exceedingly harmful fungi which cause food spoilage not only in Europe, but also in Australia and America are species belonging to the *Botrytis*, *Colletotrichum* and *Verticillium* genera [1–7]. In recent years an increase of both the demand and production of organic fruit has been observed. The increase in fruit production is connected with the problem of lowering quality of crops, caused by the occurrence of fungal diseases in soft fruits plantations [5,6].

The early detection of soil-borne diseases is very important for both economic reasons and nature protection. However, traditional methods of fungal identification are time consuming and often inaccurate [8]. Additionally, they require trained and experienced staff for precise identification, as fungal pathogens often attack a wide range of plants; moreover, they frequently have an ambiguous appearance on their hosts. In contrast, molecular techniques allow for the detection of crucial pathogens with a high degree of precision, without specific molecular knowledge, and even before the manifestation of disease [8]. Moreover, only quick and accurate identification of the pathogen guarantees the timely implementation of suitable plants protection against pathogenic agent and reduction of losses for farmers or other manufacturers and fruit processing companies [5,6].

The molecular technique most frequently used for the identification of microorganisms is the Polymerase Chain Reaction (PCR). However, the final results of the analysis are not obtained

immediately after the reaction, as the method requires further steps, such as an electrophoresis and the sequencing of the obtained amplicons, in order to interpret the results. Another disadvantage of the reaction is that the assay requires specific thermal conditions provided by thermocyclers [9].

For those reasons, various modifications of the method, designed to omit the inconvenient steps mentioned above, have already been developed. Quantitative PCR (qPCR) allows for the quantification of the amplified genetic material in real time [9–11]. The exclusion of many laboratory steps, used to obtain the final results of the analysis, considerably shortens the time for detection. This allows for a more rapid implementation of the relevant protective measures in the plantation. The hybridization of multiple fluorogenic probes with TaqMan chemistry [12] in the same reaction tube allows for the simultaneous detection of multiple targets in one reaction [13], which additionally decreases the time required in the laboratory for the acquisition of final results.

Isothermal methods of PCR, such as Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [14], Polymerase spiral reaction (PSR) [15], Rolling circle amplification (RCA) [16] and Cross-priming amplification (CPA) [17], have likewise been used more frequently in recent years. These methods are simpler and cheaper to deploy, as the use of a water bath or thermoblock is sufficient to carry out the reaction. Nevertheless, they require a larger number of specific enzymes and a greater amount of primers; moreover, they are troublesome to develop and multiplex.

Fragments of nuclear ribosomal DNA (rDNA) are commonly used for molecular identification and phylogenic purposes for different fungal microorganisms [18]. Primers covering Internal Transcribed Spacer (ITS) and Intergenic Spacer (IGS) regions are for the most part routinely taken into consideration [7,19–21]. These markers are commonly applied in qPCR assays [13,22–26]. Likewise, the LSU rDNA D1-D2 sequences have been used in the purpose of identification of fungal species many times [8,27–30].

The aim of this study was to develop the real-time PCR method for the detection of *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp. using newly designed universal primers which amplify different fragments of rDNA—the D2 region of the large subunit ribosomal DNA. Additionally, we designed three multiplexable TaqMan-type hydrolysis probes, specific for the chosen fungi within this region, and tested the developed method on environmental samples.

2. Results

2.1. Phytopathogenic Microorganisms

A wide range of fungal pathogen isolates, derived from organic strawberry plantations located in Poland, were included in this study (Figure 1, Supplementary Table S1). Within this group of isolates, 28% of them (7 *Botrytis* spp., 19 *Colletotrichum* spp., 12 *Verticillium* spp.) were fungi selected for the design of primers and fluorogenic probes for novel multiplex real-time PCR. After that, four isolates, one representative of each genus, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Verticillium*, and one strain of *Phytophthora* sp., as a control organism that should not be detected, were selected for the development of the multiplex real-time PCR detection approach, in order to evaluate the specificity and the detection limit of the real-time PCR assays for target pathogens. The non-fungal *Phytophthora* sp. pathogen was selected as a control group due to the fact that those four microorganisms (*Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp., *Verticillium* spp. and *Phytophthora* spp.) often cooccur in the fruit plantations, as in our experimental fields we retrieved strains from. The neighbor-joining tree of the 39 tested strains, based on the phylogenetic analysis of DNA sequences of the D2 LSU region, have indicated that the strains belonging to the genus *Colletotrichum* were clustered together in a monophyletic clade, supported by high bootstrap values. Similarly, the *Botrytis* spp. strains clustered together, and *Verticillium* spp. isolates were grouped in a separate cluster.

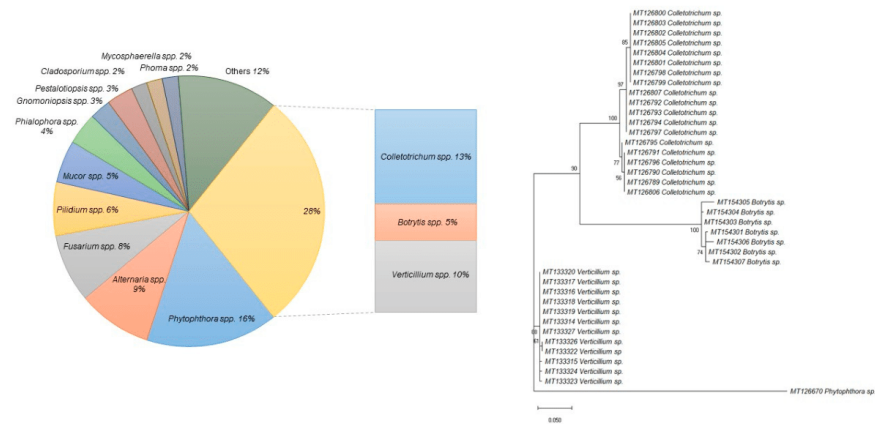


Figure 1. A pie chart representing the percentage of different fungi in the whole group of microorganisms isolated from organic plantations of strawberry in the course of this study. The evolutionary history of the four phytopathogens chosen for the development of the multiplex real-time PCR was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Tamura-Nei model [31]. The tree with the highest log likelihood (−1545.8023) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa are clustered together are shown next to the branches. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying the Maximum Parsimony method. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 39 nucleotide sequences. There was a total of 527 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 [32].

2.2. Specificity of the Fluorogenic Probes

Each of the three of the designed fluorogenic probes were only specific to the organism it was designed for and did not hybridize with the DNA of the remaining fungi (Figure 2a–c). The use of designed oligonucleotide primers and molecular probes to carry out the polymerase chain reaction with real-time detection under strictly defined conditions enabled the amplification of the product and the detection of *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp. fungi, respectively. The specific detection of the obtained amplification products was carried out by noting fluorescence at 520 nm (Filter 1 of 7500 Fast system), 576 nm (Filter 2) and 667 nm (Filter 3), after excitation with light at 495 nm, 544 nm and 643 nm, for the abovementioned fungal plant pathogens, respectively (Table 1).

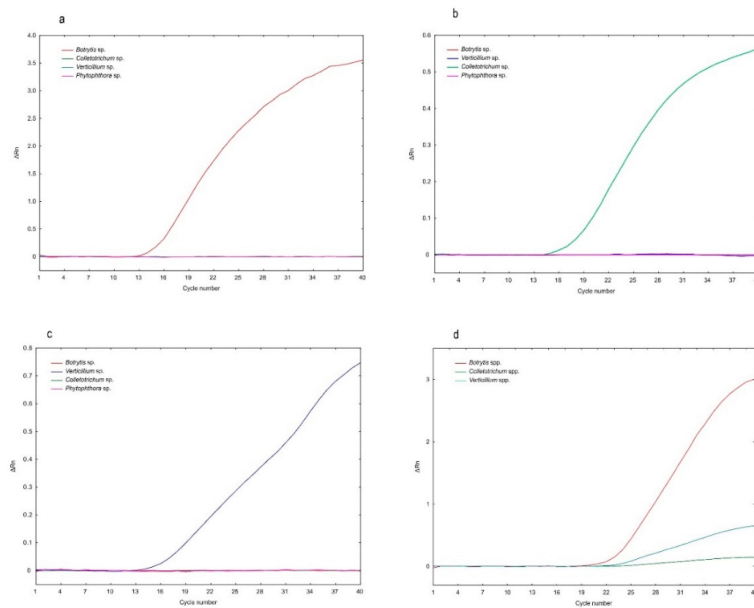


Figure 2. Amplification plots of designed singleplex and multiplex real-time PCR. (a–c): Specificity of the fluorogenic probes in singleplex reactions, carried out on DNA isolated from pure strain cultures. The amplification plots were created as mean values of ΔRn after each cycle of three biological repeats for the reaction ($n = 3$). (d) Multiplex reaction carried out with the DNA extracted from an environmental sample 245/19 (strawberry fruit).

Table 1. Sequences of primers and probes, product size of the obtained amplicons for each fungal pathogen and the excitation and fluorescent readings of the probes of the designed oligonucleotides for the detection of selected plant pathogenic fungi in real-time PCR (Patent application P.431988); “N/A” means not applicable.

Primer or Probe Name	Sequence	Product Size (bp)	Excitation/Fluorescence Reading (nm)
D2LSU_F	5'-AGACCGATAGCGmACAAG-3'	N/A	N/A
D2LSU_R	5'-CTTGGTCCGTGTTCAAG-3'	N/A	N/A
Botr-6FAM	5'-6FAM-TCAGGGTCTCGTACCCTGTGTA CT-BHQ1-3'	322	495/520
Coll-Tamra	5'-Tamra(R)-TGTGACCAGACTGCGTCCGGTGAA-BHQ2-3'	321	544/576
Vert-Cy5	5'-Cy5-TGGTTCAACCAGTCCATGACCT-BHQ2-3'	320	643/667

In singleplex real-time PCR (Figure 2a–c), the amplification curve analysis revealed the primer pair with each specific molecular probe (Table 1) and amplified a single product for its target genus and no product for the other three fungal genus, thereby indicating the specificity of the molecular probes to detect their corresponding to the *Botrytis*, *Colletotrichum* and *Verticillium* genus.

When the primer pair and the three probes were mixed together for multiplex real-time PCR, the amplification curve of each tested fungal genus (*Botrytis*, *Colletotrichum* and *Verticillium*) was visible, thereby indicating that all three fungal pathogens were detectable in one reaction (Figure 2d).

Neither false positive nor false negative reactions were observed in the real-time PCR assays. The triplex real-time PCR assay with developed fungal pathogens specific probes for *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp. detected all 7, 19 and 12 fungal isolates, respectively (Figure 3). The assay also did not cross-react with DNA from the other pathogens, including non-specific organisms.

It means that the developed probe labeled with 6FAM dye for detection of *Botrytis* spp. detected only these pathogens, but DNA of *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp. was not amplified with using this specific probe. High specificity of the fluorogenic probes labeled with Tamra and Cy5 for the detection of *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp., respectively, was also noted. Likewise, the real-time PCR assay for the tested pathogens produced negative results for non-template control (NTC) without DNA. The results indicated that the fluorogenic probes developed in this study appeared to be specific to the three target fungal pathogens (Figure 3), and moreover, according to in silico analysis, appeared to not be specific to the diverse fungal and oomycete representatives (Table S2).

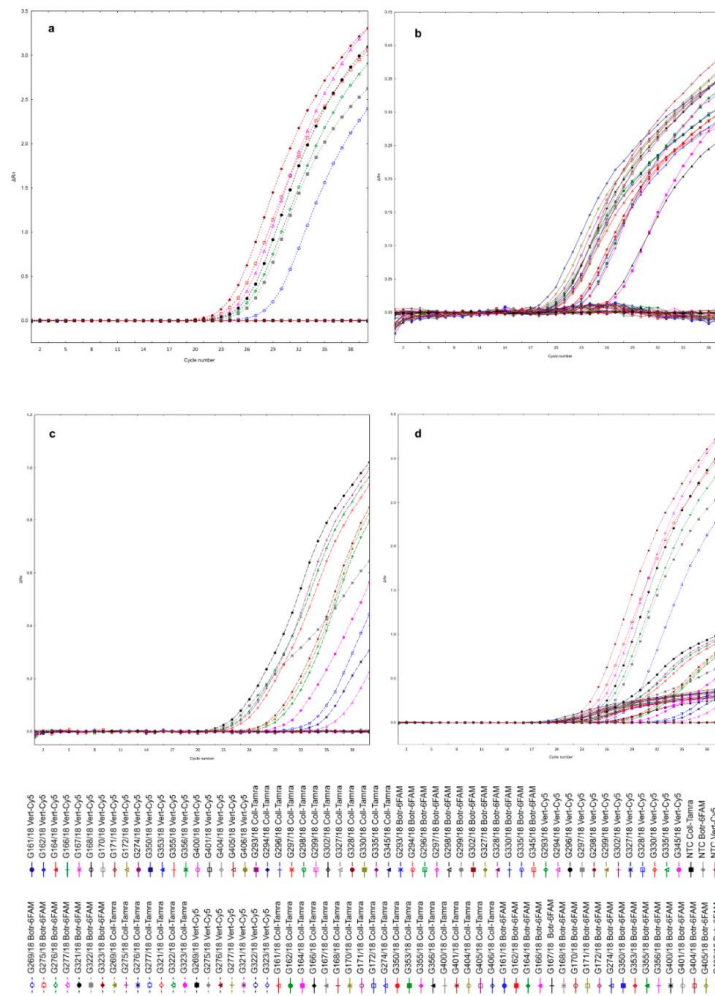


Figure 3. Amplification plots of designed triplex real-time PCR. Specificity of the fluorogenic probes (Botr-6FAM, Coll-Tamra, Vert-Cy5) in triplex reactions, carried out on DNA isolated from pure strain cultures of: (a) *Botrytis* spp. (7 isolates); (b) *Colletotrichum* spp. (19 isolates); (c) *Verticillium* spp. (12 isolates); (d) All tested isolates of *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp., *Verticillium* spp. (38 isolates). Explanations: NTC—non-template control.

2.3. Optimization of Multiplex Real-Time PCR

In order to optimize multiplex real-time PCR and evaluate whether the sensitivity of the detection was associated with the concentrations of probes and primers for selected fungal strawberry pathogens, the mean Cq values for each concentration of each probes and primers were determined and the results are presented in Table 2.

Table 2. Mean Cq and SD values of the optimization reactions for the developing concentration of the primers and fluorogenic probes in the real-time PCR ($n = 3$); “–” means lack of amplification.

Conc. of Fluorogenic Probes	<i>Botrytis</i> spp. (G277/18)		<i>Colletotrichum</i> spp. (G171/18)		<i>Verticillium</i> spp. (G296/18)	
	Cq _{mean}	SD	Cq _{mean}	SD	Cq _{mean}	SD
0.1 µM	14.343	0.268	18.925	0.482	17.749	0.512
0.15 µM	14.084	0.377	19.286	0.152	18.235	0.417
0.2 µM	12.792	0.895	18.576	0.329	16.942	0.440
0.25 µM	13.930	0.615	18.921	0.733	16.838	0.590
0.3 µM	14.093	0.533	18.814	0.185	20.576	5.697
0.35 µM	13.569	0.455	18.832	0.431	14.898	–
Conc. of Primers	Cq _{mean}	SD	Cq _{mean}	SD	Cq _{mean}	SD
0.1 µM	21.421	4.103	–	–	–	–
0.2 µM	15.451	0.095	18.915	0.467	17.459	1.398
0.3 µM	16.478	0.172	18.777	0.142	16.565	0.146
0.4 µM	15.178	0.090	19.067	0.104	17.654	0.487
0.5 µM	15.315	0.321	18.740	0.164	16.872	0.846
0.6 µM	15.389	0.215	18.633	0.040	15.994	0.909
0.7 µM	15.795	0.205	18.821	0.264	19.326	–
0.8 µM	14.963	0.364	18.718	0.233	21.984	10.268

The first stage of this study included the optimization of the fluorogenic probes concentration with standard concentration of primers (0.4 µM). The results indicated the most stable positive signal of amplification for 0.15 µM of fluorogenic probes concentration, exhibiting the following values of Cq ± SD cycles 14.084 ± 0.377, 19.286 ± 0.152 and 18.235 ± 0.417 for *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp., respectively (Table 2). Even though higher probe concentrations often showed lower Cq values, in most cases the variation in the Cq signal for all of the tested fungal pathogens was excessive with a maximal SD of 0.895, 0.733 and 5.697 cycles for *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp., respectively (Table 2).

In the following step, various concentrations of primers were tested with probes concentration (0.15 µM) selected in the first phase of the experiment. The lowest primers concentration (0.1 µM) was less sensitive across all fungal pathogens, compared with the higher concentrations of primers, and it was also associated with a higher degree of variability (Table 2, Supplementary Figure S1). This primers' concentration yielded the highest Cq values along with an unacceptably SD value (21.421 ± 4.103) for *Botrytis* spp.; moreover, for the other two fungi (*Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp.), the Cq values were not calculated and detection was not possible. Higher concentrations of primers were more sensitive, yielding lower Cq values for all tested fungal pathogens. However, different primer concentrations exhibited different degrees of variation in SD for triplicate measurements across the various fungal pathogens. Across all tested primers concentrations, 0.3 µM yielded a mean Cq ± SD ($n = 3$) of 16.478 ± 0.172, 18.777 ± 0.142 and 16.565 ± 0.146 for *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp., respectively. These results were the least variable. For the other higher primer concentrations, even if the Cq values were lower, the SD values increased drastically, especially for *Verticillium* spp., indicating a lower reproducibility of amplification.

Within the tested combinations of primers and fluorogenic probes concentrations, the most stable amplifications results were provided by the 0.15 μ M probes and the 0.3 μ M primers mixture for all of the tested fungal pathogens (Table 2).

2.4. Detection Limit of Multiplex Reaction

The evaluation was performed by diluting the DNA samples of the *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp. isolated from pure strain cultures. Serial 2-fold dilutions of 5 pg/ μ L to 39 fg/ μ L of the DNA of each of the target strawberry pathogens were used to test the sensitivity of the multiplex real-time PCR assays. The detection limit was defined as the lowest amount of the targeted DNA that it was possible to detect with the method. The Cq values for 5 pg/ μ L DNA from each of the three target pathogens were 28.222 (SD \pm 1.659), 31.144 (SD \pm 1.106) and 30.659 (SD \pm 0.902) for *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp., respectively. The results indicated that the Cq values increased for higher DNA dilutions of the tested samples, but SD decreased, indicating a higher stability of strawberry pathogens detection (Table 3). Positive results with the lowest DNA dilution (39 fg/ μ L) for the *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp. were visible at the amplification plots. However, Cq values were calculated for 39 fg/ μ L template DNA from *Botrytis* spp. (33.276 \pm 0.286) and *Verticillium* spp. (36.267 \pm 0.610), but for *Colletotrichum* spp. Cq values (36.892 \pm 0.731) were obtained for 156 fg/ μ L template DNA, and for lower DNA amounts, Cq values were not obtained. Therefore, the detection threshold for two of the pathogens was set at 39 fg/ μ L for *Botrytis* spp. and *Verticillium* spp., and at 156 fg/ μ L for *Colletotrichum* spp. (Table 3).

Table 3. Mean Cq and SD values for the detection limit of the real-time PCR assay ($n = 3$); “–” means lack of amplification.

DNA Conc.	<i>Botrytis</i> spp. (G277/18)		<i>Colletotrichum</i> spp. (G171/18)		<i>Verticillium</i> spp. (G296/18)	
	Cq _{mean}	SD	Cq _{mean}	SD	Cq _{mean}	SD
5 pg/ μ L	28.222	1.659	32.144	1.106	30.659	0.902
2.5 pg/ μ L	28.076	0.543	31.955	0.155	30.888	0.196
1.25 pg/ μ L	29.278	0.691	33.200	0.859	31.969	0.817
625 fg/ μ L	30.668	0.852	34.470	1.659	32.628	0.056
312 fg/ μ L	31.600	0.950	35.028	1.072	34.037	0.938
156 fg/ μ L	32.841	–	36.699	0.731	36.391	0.223
78 fg/ μ L	33.750	2.542	34.012	–	35.219	1.524
39 fg/ μ L	33.276	0.286	–	–	36.267	0.610

2.5. Detection of Fungal Pathogens in Artificially Infested Environmental Samples

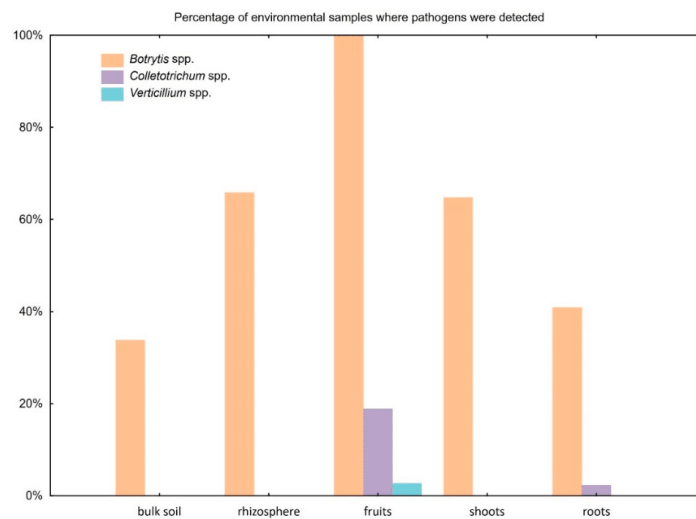
In the conditions of our study, the FastDNA Spin Kit for Feces (MP Biomedicals, Solon, OH, USA) was the most effective DNA isolation method for the detection of fungal strawberry pathogens from environmental samples. The real-time PCR assay detected *Botrytis* spp. and *Verticillium* spp. in all eight infested soil samples. The presence of *Colletotrichum* spp. was confirmed in two infested soil samples, when contamination was at the level of 5000 and 10,000 spores after 24- and 48-incubation hours, respectively (Table 4). There was no amplification of *Colletotrichum* spp. DNA from the soil samples inoculated with 1000 and 500 spores per 1 g. The Cq values ranged from 22.491 to 28.166 for the detection of *Verticillium* spp., and *Botrytis* spp. in artificially infested soil after 24-incubation hours, respectively. However, the Cq values for the detection of *Colletotrichum* spp. were at a level of 24.936 and 24.320 for soil samples inoculated with a 5000 and 10,000 spore suspension, respectively (Table 4). The Cq values obtained from strawberry fruits inoculated with 100, 1000, 10,000 and 100,000 spores per 1 g ranged from 15.977 to 21.672 for the detection of *Botrytis* spp. after 72- and 0-incubation hours, respectively. The results suggested that the real-time PCR assay could be used for soil and fruits samples assessment in order to detect the important soil-borne fungal pathogens of strawberry.

Table 4. Cq values of the triplex approach for the detection of artificially infested environmental samples (soil and strawberry); “–” means lack of amplification.

Time of Incubation	Spores per 1 g of Soil	<i>Botrytis</i> spp. (G277/18)	<i>Colletotrichum</i> spp. (G171/18)	<i>Verticillium</i> spp. (G296/18)
24 h	500	25.513	–	27.732
	1000	24.980	–	26.673
	5000	24.278	24.936	24.306
	10,000	28.166	–	22.491
48 h	500	24.731	–	27.004
	1000	24.642	–	26.356
	5000	24.790	–	24.479
	10,000	25.684	24.320	23.261
Time of Incubation	Spores per 1 g of Strawberry	<i>Botrytis</i> spp. (G277/18)		
0 h	100	21.672		
	1000	19.289		
	10,000	20.106		
	100,000	19.242		
72 h	100	15.980		
	1000	19.810		
	10,000	21.032		
	100,000	19.597		

2.6. Validation Assay in Environmental Samples

The validation of the method with environmental samples showed that fungi belonging to the *Botrytis* spp. were present within the group of analyzed samples, and were the most abundant in the following groups: bulk soil, roots, shoots, rhizosphere and fruits, with 34%, 41%, 65%, 66% and 100%, respectively (Figure 4). The *Colletotrichum* spp. was detected in 2% of root samples and 19% of fruit samples. Lastly, *Verticillium* spp. was only detected in 3% of fruit samples.

**Figure 4.** Group column chart representing the percentage of pathogens detected with the developed methodology for each type of environmental samples.

It is worth to mention that the developed pathogens detection method is suitable for different soil types and plants varieties, as pathogens were detected in acrisol, cambisol, chernozem, fluvisol and regosol and positive detection of pathogens was observed in soil under cultivation of Aprica, Dipred and Honeoye strawberry. However, detection of pathogens in rhizosphere soil included mainly fluvisol soil type for Aprica, Dipred and Honeoye variety, but also cambisol and chernozem for Honeoye and Aprica, respectively. Pathogens were also detected in the rhizosphere of Faith, Marmolada and Rumba strawberries. The pathogens were detected in fruits from organic and conventional plantations, especially in Honeoye variety of strawberry, in shoots of Allegro, Dipred, Honeoye and Rumba, and in roots of Malwina and Marmolada (Table S3).

3. Discussion

Most genera of fungi are ubiquitous and cosmopolitan in soil, and some of them are plant diseases agents. In fungal communities, *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp. are found as one of the most significant pathogenic agent for many plants, including strawberry [33]. The identification of plant pathogenic fungi at the genus level by conventional morphological methods requires long-term isolation and incubation for maturation, as it is based on the formation of various structures, such as conidia, sclerotia or ascospores, and also on the differentiation of their microstructure [34]. The rapid detection of phytopathogenic fungi has been the main concern of agriculture for many years, because rapid and efficient methods for the identification of diseases allow for faster and more suitable protective measures in plantations and nurseries. Accordingly, the real-time PCR approach may act as a very useful tool for the detection of phytopathogenic fungi [35]. Thus, the purpose of this study was to develop a method of detection for the three abovementioned phytopathogenic fungal genera in one reaction of real-time PCR.

Thus far, many real-time and multiplex real-time PCR assays for the identification of fungal pathogens in food plantations have been developed. *Verticillium* spp. identification and quantification assays for hop [36] tomato [37], olive [38], strawberry [39] and soil [40] have already been reported. The multiplex reaction has also been researched [35,41,42]. For the *Botrytis* spp., qPCR was used for various plants [25], and a multiplex approach was researched for alfalfa [13]. Lastly, a method for the detection of *Colletotrichum* spp. in strawberry with quantitative PCR has been developed [26,43], as well as duplex [44] and multiplex [45] approaches for olive and soybean, respectively. However, to date, no triplex assay has been developed for three of the phytopathogenic fungi within the same region.

In the presented study, we designed primers and molecular probes and optimized multiplex qPCR reaction for the identification of three important berry pathogens in one run: *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp. A new pair of universal fungal primers and three new genus-specific fluorogenic probes were developed for the selected fungi. Multiplex qPCR was optimized and the detection limits for the reaction were also distinguished with DNA isolated from pure strain cultures. The designed assay was specific to all of the chosen fruit pathogens. The detection limit of the reaction was equal to 39 fg/ μ L for *Botrytis* spp. and *Verticillium* spp. and 156 fg/ μ L for *Colletotrichum* spp. The research included experiments with mixtures of different strains, but also with samples of soil and fruits artificially contaminated by fungi. We also validated developed detection methods on naturally infested samples of rhizosphere, soil, fruit, roots and shoots of strawberry plants. The results indicate that the method is highly reliable, even in cases of contamination with different types of fungi. Similar results for the PCR method were obtained by Yaguchi et al. (2012) [46] and Pertile et al. (2020) [47] for heat resistant fungi causing food spoilage. Moreover, Feng et al. (2014) [35] indicated that the qPCR assay is useful in the spinach seed industry to detect and quantify the fungal seedborne pathogens of spinach.

In conclusion, a rapid method was developed for detecting *Botrytis*, *Colletotrichum* and *Verticillium* species, which are important diseases-causing organisms in strawberry production.

4. Materials and Methods

4.1. Phytopathogenic Organisms

Fungal cultures of *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp., *Verticillium* spp. and *Phytophthora* spp., along with other phytopathogenic strains of fungi (Figure 2, Table S1), which were characterized by different morphotypes observed at in vitro cultures, were isolated from organic plantations of strawberries in Poland. In order to isolate the fungal strains, a number of microbiological methods were used, including: (i) direct isolation on different culture media through surface sowing from serial dilutions on the media: potato dextrose agar (PDA), multi-vegetable juice agar (V8), malt extract agar (MEA) and nutrient solution with Bengal rose and antibiotics (Martin medium); (ii) isolation using apple traps, through inoculating green apples of the Granny Smith variety with fragments of infected plant tissues; (iii) isolation consisting of laying strawberry root, shoot and fruit fragments with visible disease symptoms on selective media; (iv) isolation using a trap technique with strawberry leaves, which was based on the arrangement that the root fragments were lined into cuvettes and flooded with water, and the leaves were covered with foil and incubated for 3–5 days. Then, the leaves with necrotic spots were lined on PDA medium. For each method, fungal isolates were finally cultivated on the PDA and incubated at 22 °C for 10 days. Most of the isolated fungi were identified on genus level and some of them on species level (Table S1) based on DNA extraction, with subsequent amplification of the D2 large subunit region of the fungal rDNA [30] and sequencing as described by Fraç et al. (2014) [48] with minor modifications.

4.2. Isolation of DNA

4.2.1. DNA Isolation from Pure Culture of Fungi

The DNA used for the identification purposes, as well as specificity of the developed assay derived from the pure strains of the microorganisms, was isolated with the PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Fragments of mycelia, gathered with the microbiological loops from the pure strains grown on Potato Dextrose Agar (PDA), were diluted in 100 µL of the reagent. Samples were then vortexed for 30 s and heated for 10 min in 100 °C in thermoblock. Next, after 2 min at room temperature, the samples were centrifuged for 2 min in 20,000× g. Finally, the samples were diluted 10 times and frozen until used.

For DNA isolation purposes, all fungi chosen for the assay optimization were grown in 15 mL conical flasks with 5 mL of Potato Dextrose Broth (PDB) at 22 °C for 10 days. Then, the probes were centrifuged for 15 min at 4500× g, the medium was disposed of and the supernatant was washed with sterile water and centrifuged two times more. The mycelium was then transferred in sterile conditions into 2 mL tubes filled with 0.5 g and 0.25 g glass beads of 3.15 mm and 1.4 mm diameter, respectively. Each tube with mycelium and glass beads also contained 400 µL Lyse F buffer (EURx, Gdańsk, Poland). The samples were then homogenized in the FastPrep-24 instrument (MP Biomedicals) at 4 m/s for 10 s (*Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp.), while for the *Botrytis* spp., homogenization was conducted for 20 s, as those pathogens produced rigid sclerotia in in vitro cultures. Thereafter, genomic DNA isolation with a Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURx, Gdańsk, Poland) was performed following the manufacturer's instruction. Finally, the derived DNA was suspended in 100 µL of Tris-HCl buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5). The quantity and quality of the obtained genetic material was determined electrophoretically in 2% agarose gel, spectrophotometrically with the NanoDrop 2000 instrument (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and fluorometrically with QuantusFluor®DNA dsDNA reagents on a Quantus fluorometer (Promega, Madison, WI, USA). Samples of the DNA were then stored at –22 °C until used.

4.2.2. DNA Isolation from Environmental Samples

DNA extractions from artificially infested soils and fruits were performed using commercially available DNA extraction kits. DNA from the soil samples was extracted with EURx GeneMATRIX Soil DNA Purification KIT (EURx, Gdańsk, Poland), Qiagen DNeasy PowerSoil (Qiagen, Hilden, Germany)

and Macherey-Nagel NucleoSpin Soil (MACHEREY-NAGEL, Düren, Germany) kits, using 0.5 g of soil according to the manufacturer's protocol. Extractions with MP Biomedicals FastDNA Spin Kit for Feces (MP Biomedicals, Solon, OH, USA) were performed according to the protocol of the producer with the modification described below. The same protocol was used for DNA extraction from environmental samples collected from organic plantations of strawberry including roots, shoots, fruits, bulk soil and rhizosphere. Primarily, 0.25 g of plant tissue or 0.5 g of soil were introduced into 2 mL tubes containing a matrix of 1.4 mm ceramic beads, 0.1 mm silica balls and one glass ball 4 mm in diameter. The samples were then washed in sodium phosphate buffer (825 µL) with PLS reagent (275 µL). The samples were centrifuged (5 min, 14,000× g) and the supernatant was drained. Sodium phosphate buffer (978 µL) and MT buffer (122 µL) were added, after which the samples were homogenized in a FastPrep24 instrument under the following conditions: 40 s, 6 m/s. The samples were then centrifuged (15 min, 14,000× g) and the supernatant was transferred into new tubes containing PPS buffer (250 µL). Then, the samples were mixed by inversion and incubated (10 min at 4 °C). The mixture was centrifuged (2 min, 14,000× g) and then the supernatant was transferred to a new 5 mL tube containing Binding Matrix Solution (1 mL). The samples were then mixed on a rotator (5 min), centrifuged (2 min, 14,000× g) and the supernatant was drained. The pellet was washed with wash buffer (Wash Buffer 1, 1 mL). The resulting suspension was transferred to a separation column (SPIN Filter) twice, centrifuged (1 min, 14,000× g) and the filtrate was discarded. The filter was then washed with a second wash buffer (Wash Buffer 2500 µL), centrifuged (2 min, 14,000× g) and the filtrate was discarded. Then, the filter was centrifuged again (2 min, 14,000× g), after which the filtrate was transferred into a new tube. Elution buffer (TES, 100 µL) was pipetted onto the filter and centrifuged (2 min, 14,000× g). The resulting filtrate, containing extracted DNA, was diluted 10-fold with nuclease-free deionized water. For DNA isolation from strawberry fruits, an EURx GeneMATRIX Soil DNA Purification Kit (EURx, Gdańsk, Poland) and MP Biomedicals FastDNA Spin Kit for Feces (MP Biomedicals, Solon, OH, USA) kits with an input of 0.25 g of strawberry fruit tissue were used.

4.3. Oligonucleotide Primers and Probes Design

In order to design primers and probes, 7, 19 and 12 nucleotide sequences of *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp., respectively, isolated from an organic plantation of strawberries, were used. The fungi were previously identified through the Sanger sequencing of the D2 region of the large subunit of the rRNA gene (D2 LSU rDNA), and then the sequences were deposited in the NCBI database (Supplementary Table S1). In order to determine the genus-specific and conserved sequences of each pathogen for the primers and probes design, the obtained sequences were aligned with a Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation (MUSCLE) algorithm [29,31] and compared with the NCBI GenBank sequence database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [49–53]. After that, Primer3Plus software was used for the oligonucleotide probes design [54]. The experimental design for multiplex quantitative PCR is more complicated than for single reactions. The fluorogenic probes were designed to be highly specific within the genus for the D2 region. The probes used to detect individual targets must contain unique reporter dyes with distinct spectra; therefore, when we had chosen dyes with appropriate excitation wavelengths, we were looking for the dyes which have different emission spectra without their overlapping. Three molecular probes targeting *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp. were labeled with 6-carboxyfluorescein (6FAM), carboxytetramethylrhodamine (Tamra) and cyanine (Cy5) fluorescent dyes at the 5'-end, respectively, and Black Hole Quencher-1 (BHQ1), Black Hole Quencher-2 (BHQ2) and BHQ2 as non-fluorescent quenchers at the 3'-end, respectively (Table 1). The specificity of the newly designed probes was further tested in silico using the BLAST algorithm to avoid cross-homology with other microorganisms. Moreover, in order to confirm the specificity of the designed primers, in silico analysis based on sequences from NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) was performed, which included targeted sequences of *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp. as well as the other non-targeted fungal sequences of Sclerotiniaceae, Glomerellaceae and Plectosphaerellaceae

representatives as outgroups (Table S2). Results were presented as a BLAST Score, E-value and Identities/Query (which corresponds to the number of exact matches in the search and length of the query). The BLAST (alignment) score was calculated by assigning a value of +2 for each aligned pair and -3 for each mismatch and then summing these values. The sequences of the primers and the fluorogenic probes designed for this study are summarized in Table 1. All of the oligonucleotides were synthesized by Genomed S.A. (Warsaw, Poland). Additionally, the positioning of all of the designed fluorogenic probes within the aligned sequences of the chosen fungi are shown in Figure 5.

```

>>>>D2LSU F>>>>
1 AGACCGATAGCGMACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTGGAAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATT
1 TCTGGCTATCGCTTGTTCATCTCACTAGCTTTCTACTTTTCGTGAACCTTCTCTCAATTGTGTCACATTTAA
>>>>>>Botrytis>>>>>>
76 GTTGAAGGGAAGCGCTTGAATCAGACTTGCACCTGGTGTTCACAGGGTGTGTAAGGTTGTA- CATCAA
76 CAACCTTTCCTTCGCGAACGTTAGTCTGAACGTGAACCCAAAGTAGTCCCAGAGCATGGGACACATGAAGTAGTT

151 GTTCAGGCCAGCATCAGTTGAGTGGTTAGATAAAGGCTTAGAGAATGTGGCCCTCTTCGGGGGGTGTATTAGCT
151 CAAGTCCGGTGTAGTGAACCTCACCATCTAATTCGGAATCTTTACACGGGGAAGCCCCCACAAATTCGA

226 CTAGGTGCAATGTAGCTACTTGGACTGAGGACCGCGCTTCGGTAGGATGCTGGCGTAATGGTGTAAAGCGACC
226 GATCCAGCTTACATCGGATGAACCTGACTCTGGCGGAAGCCGATCTACGACCGCATACCAACATTTCGCTGG
<<<<<<D2LSU R<<<<<<
298 CGTCTTGAACACGGACCAAG
298 GCAGAACTTTGTGCTGGTTC

>>>>D2LSU F>>>>
1 AGACCGATAGCGMACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTGAAGAAGAGGGTTAAACAGCAGTGAAT
1 TCTGGCTATCGCTTGTTCATCTCACTAGCTTTCTACTTTTCGTGAACCTTCTCTCAATTGTGTCACATTTAA
>>>>>>Colletotrichum>>>>>>
76 TGTAAAAGGGAAGCGCTTGTGACCAAGCTTCCGTCGGTGAATCACCAGCTCTCGGGCTGGGCACTTCGC
76 ACAATTTTCCTTCGCGAACACTGGTCTGAACGCGAGCCACTAGTGGGTCGAGAGCGCCGACCCCGTGAAGCG

151 CGGCACAGGCCAGCATCAGCTTCCGTCGGGGCAAAAAGCTTCAGGAAGCTGGCTCCCTTCGGGGAGTGTATTAG
151 GCGGTGTCGGTGTAGTGAACGCGAGCCCTGTTTCGAAAGTCTTCACCGGAGGAGCCCTCACAAATTC

226 CTTGTTGCATAATACCCTTCGGCGGGCTGAGGTACGCGCTCCGCAAGGATGCTGGCGTAATGGTATCAGCGACC
226 GGACACGTTATTATGGGAAGCCCGCCGACTCCATGCGCGAGGCGTTCCTACGACCGCATTACCAAGTAGTTCGCTGG
<<<<<<D2LSU R<<<<<<
301 CGTCTTGAACACGGACCAAG
301 GCAGAACTTTGTGCTGGTTC

>>>>D2LSU F>>>>
1 AGACCGATAGCGMACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGTACTTTGAAGAAGAGTCAACAGCAGCTGAAT
1 TCTGGCTATCGCTTGTTCATCTCACTAGCTTTCTACTTTTCATGAACCTTCTCTCAATTGTGTCACATTTAA
>>>>>>Verticillium>>>>>>
76 TGTAAAAGGGAAGCGCTCGCTACCAGAGTGGGTTCCGTGGTTCACACAGTCCATGACCTGGGGCACTCCGCC
76 ACAATTTTCCTTCGCGAGCGATGCTGCACCCAAAGCCACCAAGTGTGTCAGGTAATGGACCCCGTGAAGCGG

151 GSCCCAGGCCAGCATCAGCTTCCGTCGGGGCAAAAGCGTCCGGAATGTGGCTCTCTTCGGGGAGTGTATTATA
151 CCGGGTCCGGTGTAGTGAAGGCGAGCCCGCTTCCGAGCCCTTACACGAGAGGAAGCCCCCTACAATAT

226 GCCGTCGCGTCATACCCTTCGGGGGGCTGAGGTACGCGCTCCGCAAGGATGCTGGCGTAATGGTATGATGAC
226 CCGGCGAGCGCATATGGGAAGCCCGCCGACTCCATGCGCGAGGCGTTCCTACGACCGCATTACCAATGATCACTG
<<<<<<D2LSU R<<<<<<
299 CGTCTTGAACACGGACCAAG
299 GSCAGAACTTTGTGCTGGTTC

```

Figure 5. Positioning and orientation of primers (marked as yellow) and fluorogenic probes designed for the real-time PCR within the nucleotide sequence of the D2 region of the large subunit of the rRNA gene for *Botrytis* spp. (marked as red), *Colletotrichum* spp. (marked as pink) and *Verticillium* spp. (marked as blue) (accession #: MT154304.1, MT126802.1 and MT133320.1, respectively).

4.4. Development of the Multiplex Real-Time PCR Assay

All of the real-time PCR reactions were carried out in a 7500 Fast thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The reaction mixture consisted of: 10 µL MP qPCR Master Mix (2x) (EURx, Gdańsk, Poland), 0.8 µL (0.4 µM) of each Forward and Reverse primers, 0.2 µL (final concentration 0.1 µM) of fluorogenic probe(s), 25U of thermolabile uracil-N-glycosylase (UNG), 0.25 µL (final concentration 0.31 µM) ROX (EURx, Gdańsk, Poland), 6.35 µL of nuclease-free water (EURx, Gdańsk, Poland) and 2 µL of the template DNA (5 ng/µL); with a total volume of the reaction mix of 20 µL. The real-time PCR conditions were optimized and established as follows: 2 min at 37 °C incubation for UNG activation, one cycle at 95 °C for 12 min for a hot start polymerase activation, then 40 cycles

at 95 °C for 5 s and 60 °C for 2 min. All of the reactions were performed in biological triplicates, and a non-template control probe (NTC) was performed with sterilized DirectQ water.

4.4.1. Specificity of the Fluorogenic Probes

In order to determine the specificity of the fluorogenic probes, four selected strains of *Botrytis* sp. (G277/18), *Colletotrichum* sp. (G171/18), *Verticillium* sp. (G296/18) and *Phytophthora* sp. (G408/18)—as a non-specific control pathogen—were selected and tested in a singleplex and then in a multiplex real-time PCR assay. *Phytophthora* species, as a control not-target organism, were included into the study, due to the fact that representatives of this pathogen are very often present in soil together with *Verticillium* pathogenic fungi, and sometimes it is difficult to distinguish early disease symptoms caused by these two pathogens. The template DNA of the strains was first diluted to 5 ng/μL. Each reaction mix consisted of the reagents mentioned above, the DNA mixture of all tested fungal pathogens and a separate molecular probe specific for the detection of the desired microorganism with a singleplex PCR approach or the DNA mixture of fungal pathogens and a mixture of fluorogenic probes at an equal amount of 0.2 μL (final concentration 0.1 μM) as the multiplex assay. Additionally, for the assessment of the specificity of the developed probes, the assay was conducted with the use of the DNA isolated from the pure strains of the identified pathogens. In order to evaluate the specificity of each real-time assay, each group of pathogens was tested with each set of primers and probe. The reaction was conducted on the 19 strains of the *Colletotrichum* spp. (G161/18, G162/18, G164/18, G166/18, G167/18, G168/18, G170/18, G171/18, G172/18, G274/18, G350/18, G353/18, G355/18, G356/18, G400/18, G401/18, G404/18, G405/18, G406/18), 7 strains of *Botrytis* spp. (G269/18, G275/18, G276/18, G277/18, G321/18, G322/18, G323/18) and 12 *Verticillium* spp. strains (G293/18, G294/18, G296/18, G297/18, G298/18, G299/18, G302/18, G327/18, G328/18, G330/18, G335/18, G345/18) (Figure 3).

4.4.2. Optimization of the Multiplex Real-Time PCR

For the optimization of the multiplex real-time PCR assay for *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp., multiple concentrations of probes (final concentrations 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35 μM) and primers (final concentrations 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 μM) were tested. The reaction mixture consisted of: 10 μL MP qPCR Master Mix (2x) (EURx, Gdańsk, Poland), which was the tested concentration of primers and fluorogenic probes, 0.25 μL (final concentration 31 μM) ROX (EURx, Gdańsk, Poland) and 4 μL of the pathogen DNA mix (each of the pathogens' DNA was diluted to 5 ng/μL and combined), and probes were filled with 20 μL of nuclease-free water (EURx, Gdańsk, Poland). The reaction was performed in biological triplicates and the non-template control probe (NTC) was prepared with sterilized DirectQ water.

4.5. Detection Limit of Multiplex Reactions

For the determination of the detection limit in the multiplex reaction, a mixture of the three pathogens with an equal DNA concentration of 5 pg/μL was obtained. Then, serial 2-fold dilutions of the mixture were performed and tested, to the lowest concentration of 39 fg/μL. Therefore, in this experiment the following DNA concentrations were tested: 5 pg/μL; 2.5 pg/μL; 1.25 pg/μL; 625 fg/μL; 312 fg/μL; 156 fg/μL; 78 fg/μL and 39 fg/μL. The reaction was performed in biological triplicates and the non-template control probe (NTC) was prepared with sterilized DirectQ water. All designed fluorogenic probes were mixed and used in the same reaction. To show and underline the differences in the detection limit for each tested pathogen, the results are presented as filtered data for *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp. (Supplementary Figure S2).

4.6. Detection of Fungal Pathogens in Artificially Infested Environmental Samples

The assessment of fungal detection in artificially infested samples was conducted with DNA isolated from the soil and strawberry fruits contaminated with the dilutions of pathogen spores with a specified concentration. The spores were acquired from liquid (*Verticillium* spp.) and solid cultures

(*Botrytis* spp. and *Colletotrichum* spp.) and counted in a Thoma counting chamber. Environmental samples including soil and strawberry fruits were inoculated with the appropriate spore suspension. One gram of the soil was contaminated with 1 mL of suspension with a known spore concentration separately for each fungal pathogen: 10,000, 5000, 1000 and 500. One gram of strawberry fruits was artificially infected with 1 mL containing 100,000, 10,000, 1000 and 100 spore suspensions of *Botrytis* spp., as the *Botrytis* spp. is the main concern for strawberry fruits. The pathogen DNA was isolated with the described methods, and the real-time PCR with specific fluorogenic probe and primers was performed to evaluate the detection level of fungal pathogens in artificially contaminated environmental samples.

4.7. Validation Assay in Environmental Samples

The usefulness of the new multiplex real-time PCR assay was evaluated using 244 environmental samples (Supplementary Table S3). Environmental samples used in the real-time PCR assays were provided by farmers who cultivate organic strawberry plantations with different varieties of strawberry plants cultivated on various soil types. Forty-one environmental samples were collected from strawberries rhizosphere and 68 samples were obtained from bulk soil. The origins of the remaining 135 samples were as follows: 37 were collected from strawberries fruits, including 4 samples of fruits from conventional plantations, 44 were roots samples and 54 were shoots of plants samples. Environmental samples were analyzed from naturally infected hosts plants or soil collected in 2018 and 2019 from plantations of strawberries in Poland. Plantations were located at different soil types including fluvisol, chernozem, regosol, acrisol and cambisol with various varieties of strawberry, such as Rumba, Marmolada, Honeoye, Dipred, Aprica, Allegro, Malwina and Faith (Table S3).

4.8. Software, Data Collection and Analysis

All real-time PCR fluorescence data was collected and analyzed with 7500 software v 2.0.5 of the 7500 Fast Real-Time PCR System (Foster City, CA, USA). The same software was used to calculate the C_q values. Charts were prepared with STATISTICA v 13.1 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) and Microsoft Excel 2013 software (Redmond, WA, USA). Genetic analyses, alignments and phylogenetic analyses were performed with MEGA 7.0.18 software (University Park, PA, USA).

4.9. Data Availability

All of the obtained nucleotide sequences are deposited in the GenBank repository (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (the accession numbers are grouped together in the Supplementary Materials).

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/22/8469/s1>. Table S1. List of fungal isolates used in this study and obtained from organic plantations of strawberry, with the accession number of the obtained amplicons in the GenBank. Explanations: * LMEM—Laboratory of Molecular and Environmental Microbiology, Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences (IA PAS) Sample codes in bold are the isolates selected for development of multiplex real-time PCR detection method. Table S2. Specificity of Botr-6FAM Probe (Minimum 3 hits). Results of in silico specificity test of Botr-6FAM probe with megablast search versus NCBI nt database. Search Included Leotiomycetes fungi. Only organisms with 3 or more hits are shown. Query length of this search was 24, while Maximum BLAST score for this probe is 48.1. The BLAST (alignment) score is calculated by assigning a value of +2 for each aligned pair and -3 for each mismatch and then summing these values. Specificity of Coll-Tamra Probe (Minimum 3 hits). Results of in silico specificity test of Coll-Tamra Probe with megablast search versus NCBI nt database. Search Included Sordariomycetes fungi. Only organisms with 3 or more hits are shown. Query length of this search was 25, while Maximum BLAST score for this probe is 50.1. The BLAST (alignment) score is calculated by assigning a value of +2 for each aligned pair and -3 for each mismatch and then summing these values. Specificity of Vert-Cy5 Probe (Minimum 3 hits). Results of in silico specificity test of Vert-Cy5 Probe with megablast search versus NCBI nt database. Search Included Sordariomycetes fungi. Only organisms with 3 or more hits are shown. Query length of this search was 23, while Maximum BLAST score for this probe is 46.1. The BLAST (alignment) score is calculated by assigning a value of +2 for each aligned pair and -3 for each mismatch and then summing these values. Table S3. Table gathering information on tested environmental samples. Explanations of color marked samples numbers: yellow—detection of *Botrytis* spp., green—detection of *Colletotrichum* spp., pink—detection of *Botrytis* spp. and *Colletotrichum* spp., red—detection of *Botrytis* spp. and *Verticillium* spp., blue—detection of *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp., samples without any color (black)—lack of pathogens detection. Figure S1. C_q values of primer and probe concentration optimisation reactions. Box represents

standard error, whiskers represent ranges of values (min-max), and the horizontal line in the middle represents mean values ($n = 3$). Figure S2. Detection limit of the phytopathogenic fungi—*Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp. The reaction was performed as a multiplex approach in three repeats. Each amplification plot is a mean of three repeats. To show and underline differences in the detection limit for each tested pathogen, the results were presented as filtered data for *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp.

Author Contributions: Conceptualization, M.F. and J.P.; methodology, J.P. and M.F.; software, J.P. and D.G.M.; investigation, D.G.M. and J.P.; writing—original draft preparation, D.M.; writing—review and editing, D.G.M., J.P. and M.F.; visualization, D.G.M.; supervision, M.F.; project administration, M.F.; funding acquisition, M.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by The National Centre for Research and Development within the framework of the project BIOSTRATEG, grant number BIOSTRATEG3/344433/16/NCBR/2018.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Osbourn, A.E. Verticillium wilt of strawberry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 14187–14188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Blanco, C.; De Los Santos, B.; Romero, F. Relationship between concentrations of *Botrytis cinerea* conidia in air, environmental conditions, and the incidence of grey mould in strawberry flowers and fruits. *Eur. J. Plant Pathol.* **2006**, *114*, 415–425. [[CrossRef](#)]
- Droby, S.; Lichter, A. Post-harvest *Botrytis* infection: Etiology, development and management. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control*; Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., Delen, N., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2007; pp. 349–368.
- Kozhar, O.; Peever, T.L. How does *Botrytis cinerea* infect red raspberry? *Phytopathology* **2018**, *108*, 1287–1298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Dean, R.; Van Kan, J.A.L.; Pretorius, Z.A.; Hammond-Kosack, K.E.; Di Pietro, A.; Spanu, P.D.; Rudd, J.J.; Dickman, M.; Kahmann, R.; Ellis, J.; et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* **2012**, *13*, 414–430. [[CrossRef](#)]
- Prusky, D. Pathogen quiescence in postharvest diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* **1996**, *34*, 413–434. [[CrossRef](#)]
- Polashock, J.J.; Caruso, F.L.; Oudemans, P.V.; McManus, P.S.; Crouch, J.A. The North American cranberry fruit rot fungal community: A systematic overview using morphological and phylogenetic affinities. *Plant Pathol.* **2009**, *58*, 1116–1127. [[CrossRef](#)]
- Arbefeville, S.; Harris, A.; Ferrieri, P. Comparison of sequencing the D2 region of the large subunit ribosomal RNA gene (MicroSEQ[®]) versus the internal transcribed spacer (ITS) regions using two public databases for identification of common and uncommon clinically relevant fungal species. *J. Microbiol. Methods* **2017**, *140*, 40–46. [[CrossRef](#)]
- Saiki, R.K.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B.; Erlich, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **1988**, *239*, 487–491. [[CrossRef](#)]
- Higuchi, R.; Fockler, C.; Dollinger, G.; Watson, R. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Nat. Biotechnol.* **1993**, *11*, 1026–1030. [[CrossRef](#)]
- Higuchi, R.; Dollinger, G.; Walsh, S.P.; Griffith, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Nat. Biotechnol.* **1992**, *10*, 413–417. [[CrossRef](#)]
- Livak, K.J.; Flood, S.J.A.; Marmaro, J.; Giusti, W.; Deetz, K. Oligonucleotides with Fluorescent Dyes at System Useful for Detecting PCR Product and Nucleic Acid Hybridization. *PCR Methods Appl.* **1995**, *4*, 357–362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Reich, J.D.; Alexander, T.W.; Chatterton, S. A multiplex PCR assay for the detection and quantification of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *Lett. Appl. Microbiol.* **2016**, *62*, 379–385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Notomi, T.; Okayama, H.; Masubuchi, H.; Yonekawa, T.; Watanabe, K.; Amino, N.; Hase, T. Loop mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, e63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Liu, W.; Dong, D.; Yang, Z.; Zou, D.; Chen, Z.; Yuan, J.; Huang, L. Polymerase Spiral Reaction (PSR): A novel isothermal nucleic acid amplification method. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 12723. [[CrossRef](#)]

16. Banér, J.; Nilsson, M.; Mendel-Hartvig, M.; Landegren, U. Signal amplification of padlock probes by rolling circle replication. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 5073–5078. [[CrossRef](#)]
17. Fang, R.; Li, X.; Hu, L.; You, Q.; Li, J.; Wu, J.; Xu, P.; Zhong, H.; Luo, Y.; Mei, J.; et al. Cross-priming amplification for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens. *J. Clin. Microbiol.* **2009**, *47*, 845–847. [[CrossRef](#)]
18. White, T.J.; Bruns, T.D.; Lee, S.B.; Taylor, J.W.; Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J. PCR Protoc. A Guid. to Methods and Applications. In *Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics*; Academic Press Inc.: London, UK, 1990; pp. 315–322.
19. Yu, J.M.; Cafarov, I.H.; Babadoost, M. Morphology, molecular identity, and pathogenicity of *Verticillium dahliae* and *V. longisporum* associated with internally discolored horseradish roots. *Plant Dis.* **2016**, *100*, 749–757. [[CrossRef](#)]
20. Özer, G.; Bayraktar, H. First report of *Verticillium dahliae* causing verticillium wilt on Goji berry in Turkey. *J. Plant Pathol.* **2016**, *98*, 682.
21. Wurzbacher, C.; Larsson, E.; Bengtsson-Palme, J.; Van den Wyngaert, S.; Svantesson, S.; Kristiansson, E.; Kagami, M.; Nilsson, R.H. Introducing ribosomal tandem repeat barcoding for fungi. *Mol. Ecol. Resour.* **2019**, *19*, 118–127. [[CrossRef](#)]
22. Lievens, B.; Brouwer, M.; Vanachter, A.C.R.C.; Lévesque, C.A.; Cammue, B.P.A.; Thomma, B.P.H.J. Design and development of a DNA array for rapid detection and identification of multiple tomato vascular wilt pathogens. *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, *223*, 113–122. [[CrossRef](#)]
23. Knüfer, J.; Lopisso, D.T.; Koopmann, B.; Karlovsky, P.; von Tiedemann, A. Assessment of latent infection with *Verticillium longisporum* in field-grown oilseed rape by qPCR. *Eur. J. Plant Pathol.* **2017**, *147*, 819–831. [[CrossRef](#)]
24. Bilodeau, G.J.; Koike, S.T.; Uribe, P.; Martin, F.N. Development of an assay for rapid detection and quantification of *Verticillium dahliae* in soil. *Phytopathology* **2012**, *102*, 331–343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Suarez, M.B.; Walsh, K.; Boonham, N.; O'Neill, T.M.; Pearson, S.; Barker, I. Development of real-time PCR (TaqMan[®]) assays for the detection and quantification of *Botrytis cinerea* in planta. *Plant Physiol. Biochem.* **2005**, *43*, 890–899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Debode, J.; van Hemelrijck, W.; Baeyen, S.; Creemers, P.; Heungens, K.; Maes, M. Quantitative detection and monitoring of *Colletotrichum acutatum* in strawberry leaves using real-time PCR. *Plant Pathol.* **2009**, *58*, 504–514. [[CrossRef](#)]
27. Pertile, G.; Panek, J.; Oszust, K.; Siczek, A.; Fraç, M. Intraspecific functional and genetic diversity of *Petriella setifera*. *PeerJ* **2018**, *6*, e4420. [[CrossRef](#)]
28. Issakainen, J.; Jalava, J.; Hyvönen, J.; Sahlberg, N.; Pirness, T.; Campbell, C.K. Relationships of *Scopulariopsis* based on LSU rDNA sequences. *Med. Mycol.* **2003**, *41*, 31–42. [[CrossRef](#)]
29. Brown, S.P.; Rigdon-Huss, A.R.; Jumpponen, A. Analyses of ITS and LSU gene regions provide congruent results on fungal community responses. *Fungal Ecol.* **2014**, *9*, 65–68. [[CrossRef](#)]
30. Rozynek, P.; Gilges, S.; Brüning, T.; Wilhelm, M. Quality test of the microseq D2 LSU fungal sequencing kit for the identification of fungi. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2004**, *207*, 297–299. [[CrossRef](#)]
31. Tamura, K.; Nei, M. Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions in the Control Region of Mitochondrial DNA in Humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* **1993**, *10*, 512–526.
32. Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* **2016**, *33*, 1870–1874. [[CrossRef](#)]
33. Malarczyk, D.; Panek, J.; Fraç, M. Alternative molecular-based diagnostic methods of plant pathogenic fungi affecting berry crops—A review. *Molecules* **2019**, *24*, 1200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Fraç, M.; Jezierska-Tys, S.; Yaguchi, T. Occurrence, detection, and molecular and metabolic characterization of heat-resistant fungi in soils and plants and their risk to human health. *Adv. Agron.* **2015**, *132*, 161–204.
35. Feng, C.; Mansouri, S.; Bluhm, B.H.; du Toit, L.J.; Correll, J.C. Multiplex real-time PCR assays for detection of four seedborne spinach pathogens. *J. Appl. Microbiol.* **2014**, *117*, 472–484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Maurer, K.A.; Radišek, S.; Berg, G.; Seefelder, S. Real-time PCR assay to detect *Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae* in hops: Development and comparison with a standard PCR method. *J. Plant Dis. Prot.* **2013**, *120*, 105–114. [[CrossRef](#)]

37. Lievens, B.; Brouwer, M.; Vanachter, A.C.R.C.; Cammue, B.P.A.; Thomma, B.P.H.J. Real-time PCR for detection and quantification of fungal and oomycete tomato pathogens in plant and soil samples. *Plant Sci.* **2006**, *171*, 155–165. [[CrossRef](#)]
38. Ceccherini, M.T.; Luchi, N.; Pantani, O.L.; Ascher, J.; Capretti, P.; Pietramellara, G. Upward movement of *Verticillium dahliae* from soil to olive plants detected by qPCR. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *29*, 1961–1967. [[CrossRef](#)]
39. Ozyilmaz, U.; Benlioglu, K.; Yildiz, A.; Benlioglu, H.S. Effects of soil amendments combined with solarization on the soil microbial community in strawberry cultivation using quantitative real-time PCR. *Phytoparasitica* **2016**, *44*, 661–680. [[CrossRef](#)]
40. Tzelepis, G.; Bejai, S.; Sattar, M.N.; Schwelm, A.; Ilbäck, J.; Fogelqvist, J.; Dixelius, C. Detection of *Verticillium* species in Swedish soils using real-time PCR. *Arch. Microbiol.* **2017**, *199*, 1383–1389. [[CrossRef](#)]
41. Pasche, J.S.; Mallik, I.; Anderson, N.R.; Gudmestad, N.C. Development and validation of a real-time PCR assay for the quantification of *Verticillium dahliae* in potato. *Plant Dis.* **2013**, *97*, 608–618. [[CrossRef](#)]
42. Atallah, Z.K.; Bae, J.; Jansky, S.H.; Rouse, D.I.; Stevenson, W.R. Multiplex Real-Time Quantitative PCR to Detect and Quantify *Verticillium dahliae* Colonization in Potato Lines that Differ in Response to *Verticillium* Wilt. *Phytopathology* **2007**, *97*, 865–872. [[CrossRef](#)]
43. Garrido, C.; Carbú, M.; Fernández-Acero, F.J.; Boonham, N.; Colyer, A.; Cantoral, J.M.; Budge, G. Development of protocols for detection of *Colletotrichum acutatum* and monitoring of strawberry anthracnose using real-time PCR. *Plant Pathol.* **2009**, *58*, 43–51. [[CrossRef](#)]
44. Schena, L.; Abdelfattah, A.; Mosca, S.; Li Destri Nicosia, M.G.; Agosteo, G.E.; Cacciola, S.O. Quantitative detection of *Colletotrichum godetiae* and *C. acutatum* sensu stricto in the phyllosphere and carposphere of olive during four phenological phases. *Eur. J. Plant Pathol.* **2017**, *149*, 337–347. [[CrossRef](#)]
45. Yang, H.-C.; Haudenschild, J.S.; Hartman, G.L. Multiplex Real-time PCR Detection and Differentiation of *Colletotrichum* Species Infecting Soybean. *Plant Dis.* **2015**, *99*, 1559–1568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Yaguchi, T.; Imanishi, Y.; Matzuzawa, T.; Hosoya, K.; Hitomi, J.; Nakayama, M. Method for Identifying Heat-Resistant Fungi of the Genus *Neosartorya*. *J. Food Prot.* **2012**, *75*, 1806–1813. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Pertile, G.; Fraç, M.; Fornal, E.; Oszust, K.; Gryta, A.; Yaguchi, T. Molecular and metabolic strategies for postharvest detection of heat-resistant fungus *Neosartorya fisheri* and its discrimination from *Aspergillus fumigatus*. *Postharvest Biol. Technol.* **2020**, *161*, 111082. [[CrossRef](#)]
48. Frac, M.; Oszust, K.; Lipiec, J.; Jezierska-Tys, S.; Nwaichi, E.O. Soil microbial functional and fungal diversity as influenced by municipal sewage sludge accumulation. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2014**, *11*, 8891–8908. [[CrossRef](#)]
49. Altshul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410. [[CrossRef](#)]
50. Edgar, R.C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 1792–1797. [[CrossRef](#)]
51. Edgar, R.C. MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinform.* **2004**, *5*, 113. [[CrossRef](#)]
52. Zhang, Z.; Schwartz, S.; Wagner, L.; Miller, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* **2000**, *7*, 203–214. [[CrossRef](#)]
53. Benson, D.A.; Cavanaugh, M.; Clark, K.; Karsch-Mizrachi, I.; Lipman, D.J.; Ostell, J.; Sayers, E.W. GenBank. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 36–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Untergasser, A.; Cutcutache, I.; Koressaar, T.; Ye, J.; Faircloth, B.C.; Remm, M.; Rozen, S.G. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

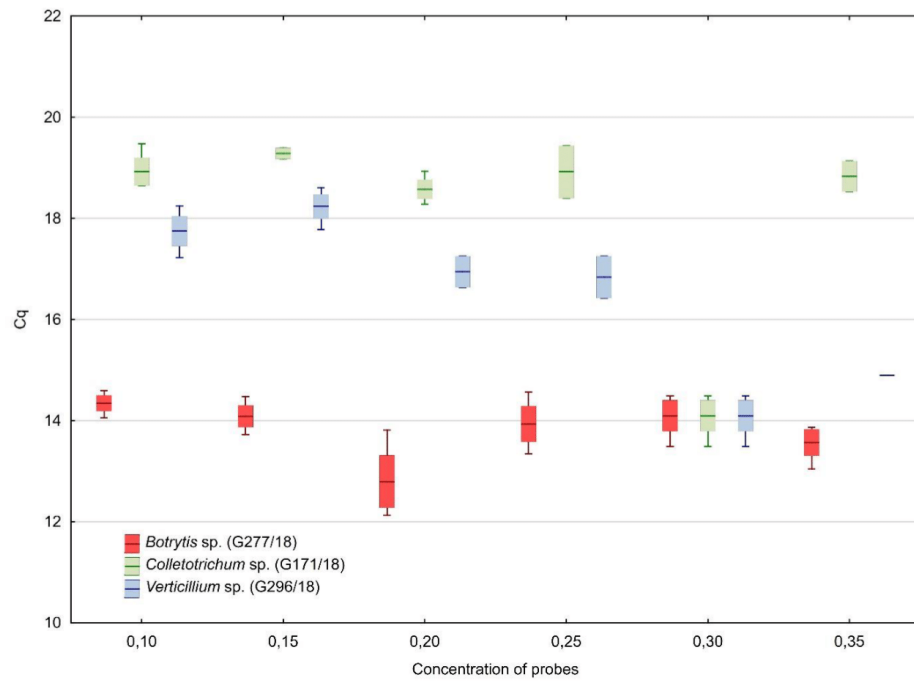


© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

5.2.2. Materiały dodatkowe

Triplex real-time PCR approach for the detection of crucial fungal berry pathogens - *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp.

Dominika G. Malarczyk, Jacek Panek, Magdalena Frąc



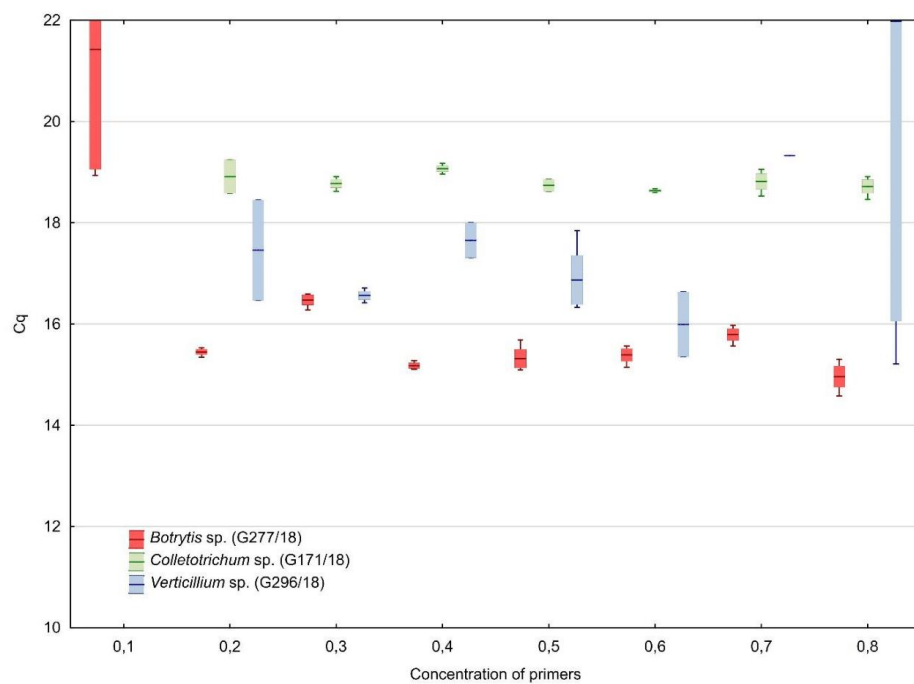
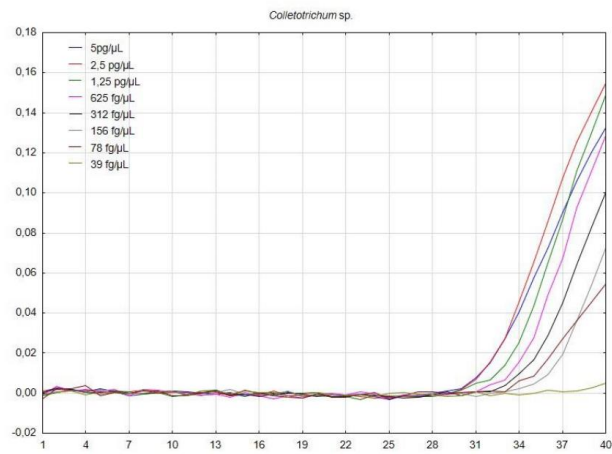
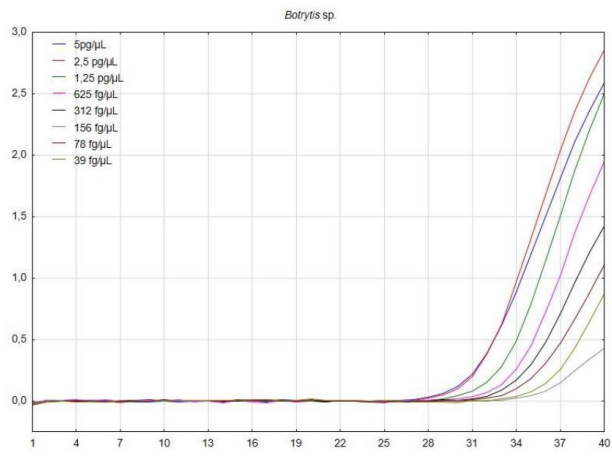


Figure. S1. Cq values of primer and probe concentration optimisation reactions. Box represents standard error,, whiskers represent ranges of values (min-max), and the horizontal line in the middle represents mean values ($n = 3$).



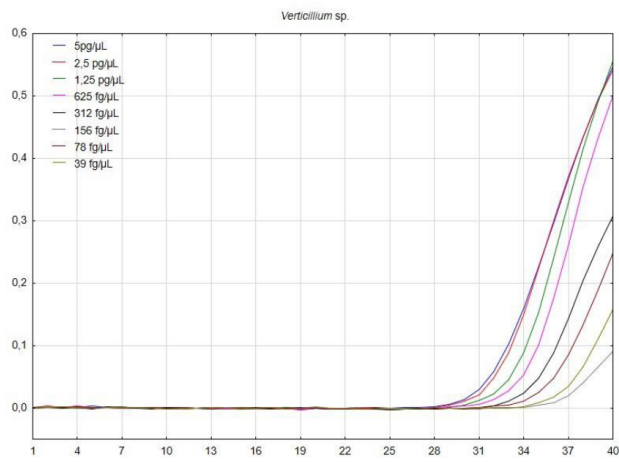


Figure. S2. Detection limit of the phytopathogenic fungi – *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp. The reaction was performed as a multiplex approach in three repeats. Each amplification plot is a mean of three repeats. To show and underline differences in the detection limit for each tested pathogen, the results were presented as filtered data for *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp.

Triplex real-time PCR approach for the detection of crucial fungal berry pathogens - *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp.

Dominika G. Malarczyk, Jacek Panek, Magdalena Frąć

Supplementary Materials

Table S1. List of fungal isolates used in this study and obtained from organic plantations of strawberry, with the accession number of the obtained amplicons in the GenBank

Fungal identification	Isolate code LMEM*	Isolation source/institution	Accession number of sequences in GenBank
<i>Botrytis</i> spp.	G269/18	Strawberry fruits, IA PAS, Poland	MT154301
<i>Botrytis</i> spp.	G275/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT154302
<i>Botrytis</i> spp.	G276/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT154303
<i>Botrytis</i> spp.	G277/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT154304
<i>Botrytis</i> spp.	G321/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT154305
<i>Botrytis</i> spp.	G322/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT154306
<i>Botrytis</i> spp.	G323/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT154307
<i>Colletotrichum</i> spp.	G161/18	Strawberry fruits, IA PAS, Poland	MT126794
<i>Colletotrichum</i> spp.	G162/18	Strawberry fruits, IA PAS, Poland	MT126800
<i>Colletotrichum</i> spp.	G164/18	Strawberry fruits, IA PAS, Poland	MT126799
<i>Colletotrichum</i> spp.	G166/18	Strawberry fruits, IA PAS, Poland	MT126798
<i>Colletotrichum</i> spp.	G167/18	Strawberry fruits, IA PAS, Poland	MT126801
<i>Colletotrichum</i> spp.	G168/18	Strawberry fruits, IA PAS, Poland	MT126804
<i>Colletotrichum</i> spp.	G170/18	Strawberry fruits, IA PAS, Poland	MT126805
<i>Colletotrichum</i> spp.	G171/18	Strawberry fruits, IA PAS, Poland	MT126802
<i>Colletotrichum</i> spp.	G172/18	Strawberry fruits, IA PAS, Poland	MT126803
<i>Colletotrichum</i> spp.	G274/18	Strawberry fruits, IA PAS, Poland	MT126807

<i>Colletotrichum</i> spp.	G350/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	MT126789
<i>Colletotrichum</i> spp.	G353/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	MT126796
<i>Colletotrichum</i> spp.	G355/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	MT126791
<i>Colletotrichum</i> spp.	G356/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	MT126792
<i>Colletotrichum</i> spp.	G400/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	MT126790
<i>Colletotrichum</i> spp.	G401/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	MT126793
<i>Colletotrichum</i> spp.	G404/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	MT126797
<i>Colletotrichum</i> spp.	G405/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	MT126806
<i>Colletotrichum</i> spp.	G406/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	MT126795
<i>Verticillium</i> spp.	G293/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT133324
<i>Verticillium</i> spp.	G294/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT133317
<i>Verticillium</i> spp.	G296/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT133320
<i>Verticillium</i> spp.	G297/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT133316
<i>Verticillium</i> spp.	G298/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT133318
<i>Verticillium</i> spp.	G299/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT133319
<i>Verticillium</i> spp.	G302/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT133314
<i>Verticillium</i> spp.	G327/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT133327
<i>Verticillium</i> spp.	G328/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT133326
<i>Verticillium</i> spp.	G330/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT133315
<i>Verticillium</i> spp.	G335/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT133322
<i>Verticillium</i> spp.	G345/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT133323
<i>Phytophthora</i> spp.	G408/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT126670
<i>Phytophthora</i> spp.	G368/18	Research Institute of Horticulture	MT558571
<i>Phytophthora cactorum</i>	G369/18	Research Institute of Horticulture	MT558729
<i>Phytophthora cinamomi</i>	G372/18	Research Institute of Horticulture	-
<i>Phytophthora</i> spp.	G373/18	Research Institute of Horticulture	-
<i>Phytophthora cactorum</i>	G408/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT126670.1
<i>Phytophthora pseudotsugae</i>	G409/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT126671.1

<i>Phytophthora</i> spp.	G412/18	Strawberry rhizosphere, IA PAS, Poland	MT126672.1
<i>Phytophthora</i> spp.	G413/18	Strawberry rhizosphere, IA PAS, Poland	MT126673.1
<i>Phytophthora</i> spp.	G415/18	Strawberry rhizosphere, IA PAS, Poland	MT126674.1
<i>Phytophthora</i> spp.	G416/18	Strawberry rhizosphere, IA PAS, Poland	MT126675.1
<i>Phytophthora</i> spp.	G417/18	Strawberry rhizosphere, IA PAS, Poland	MT126676.1
<i>Phytophthora</i> spp.	G418/18	Strawberry rhizosphere, IA PAS, Poland	MT126677.1
<i>Phytophthora</i> spp.	G419/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT126678.1
<i>Phytophthora</i> spp.	G420/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT126679.1
<i>Phytophthora</i> spp.	G421/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT126680.1
<i>Phytophthora</i> spp.	G429/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT126681.1
<i>Phytophthora</i> spp.	G430/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT126682.1
<i>Phytophthora</i> spp.	G431/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT126683.1
<i>Phytophthora</i> spp.	G432/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT126684.1
<i>Phytophthora</i> spp.	G434/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT126685.1
<i>Phytophthora</i> spp.	G437/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT126686.1
<i>Phytophthora</i> spp.	G439/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT126687.1
<i>Phytophthora</i> spp.	G440/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT126688.1
<i>Phytophthora</i> spp.	G441/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT126689.1
<i>Phytophthora</i> spp.	G442/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT126690.1
<i>Allantophoma</i> spp.	G320/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175259
<i>Alternaria</i> spp.	G211B/18	Strawberry leaves, IA PAS, Poland	MT154530.1
<i>Alternaria</i> spp.	G216/18	Strawberry leaves, IA PAS, Poland	MT154531.1
<i>Alternaria</i> spp.	G242/18	Strawberry leaves, IA PAS, Poland	MT154532.1
<i>Alternaria</i> spp.	G262/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	MT154533.1
<i>Alternaria</i> spp.	G305/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175255
<i>Alternaria</i> spp.	G306/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT154534.1
<i>Alternaria</i> spp.	G307/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT154535.1
<i>Alternaria</i> spp.	G308/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT154536.1

<i>Alternaria</i> spp.	G309/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT154537.1
<i>Alternaria</i> spp.	G310/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT154538.1
<i>Alternaria</i> spp.	G313/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT154539.1
<i>Alternaria</i> spp.	G314/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MT154540.1
<i>Alternaria</i> spp.	G357/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	MT154541.1
<i>Alternaria</i> spp.	G433/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	MT154542.1
<i>Cadophora</i> spp.	G325/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175260
<i>Cadophora</i> spp.	G333/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175262
<i>Cladosporium</i> spp.	G300/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175251
<i>Cladosporium</i> spp.	G339/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175266
<i>Cladosporium</i> spp.	G445/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	MW175284
<i>Clonostachys</i> spp.	G443/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	MW175282
<i>Coniella solicola</i>	G446/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	MW175285
<i>Coniothyrium</i> spp.	G278/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175237
<i>Fusarium</i> spp.	G260/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	MW175234
<i>Fusarium</i> spp.	G261/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	MW175235
<i>Fusarium</i> spp.	G263/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	MW175236
<i>Fusarium</i> spp.	G290/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175247
<i>Fusarium</i> spp.	G291/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175248
<i>Fusarium</i> spp.	G304/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175254
<i>Fusarium</i> spp.	G311/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175256
<i>Fusarium</i> spp.	G312/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175257
<i>Fusarium</i> spp.	G358/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	-
<i>Fusarium</i> spp.	G403/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	MW175271
<i>Fusarium oxysporum</i>	G435/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	MW175280
<i>Fusarium oxysporum</i>	G438/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	MW175281
<i>Fusarium oxysporum</i>	G447/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	MW175286
<i>Gnomonia radicicola</i>	G444/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	MW175283

<i>Gnomoniopsis</i> spp.	G279/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175238
<i>Gnomoniopsis</i> spp.	G280/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175239
<i>Gnomoniopsis</i> spp.	G422/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	MW175275
<i>Gnomoniopsis</i> spp.	G423/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	MW175276
<i>Ilyonectria</i> spp.	G337/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175264
<i>Metschnikowia</i> spp.	G402/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	MW175270
<i>Mortierella</i> spp.	G181/18	Strawberry leaves, IA PAS, Poland	MW175232
<i>Mucor</i> spp.	G264/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	-
<i>Mucor</i> spp.	G265/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	-
<i>Mucor</i> spp.	G266/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	-
<i>Mucor</i> spp.	G267/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	-
<i>Mucor</i> spp.	G270/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	-
<i>Mucor</i> spp.	G271/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	-
<i>Mucor</i> spp.	G272/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	-
<i>Mucor</i> spp.	G273/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	-
<i>Mycosphaerella</i> spp.	G284/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175243
<i>Mycosphaerella</i> spp.	G285/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175244
<i>Mycosphaerella</i> spp.	G287/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175245
<i>Penicillium</i> spp.	G259/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	MK801768.1
<i>Penicillium</i> spp.	G414/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	MW175274
<i>Pestalotiopsis</i> spp.	G346/18	Strawberry roots, Research Institute of Horticulture	MW175267
<i>Pestalotiopsis</i> spp.	G410/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175272
<i>Pestalotiopsis</i> spp.	G411/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175273
<i>Pestalotiopsis</i> spp.	G424/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175277
<i>Pestalotiopsis</i> spp.	G425/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175278
<i>Phanerochaete</i> spp.	G295/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175250
<i>Phialophora</i> spp.	G281/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175240

<i>Phialophora</i> spp.	G282/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175241
<i>Phialophora</i> spp.	G301/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175252
<i>Phialophora</i> spp.	G317/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175258
<i>Phialophora</i> spp.	G351/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	MW175268
<i>Phialophora</i> spp.	G352/18	Strawberry shoots, IA PAS, Poland	MW175269
<i>Phlebia</i> spp.	G283/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175242
<i>Phlebia</i> spp.	G334/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175263
<i>Phoma</i> spp.	G250/18	Strawberry leaves, IA PAS, Poland	MW175233
<i>Phoma</i> spp.	G303/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175253
<i>Phoma</i> spp.	G331/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175261
<i>Pilidium</i> spp.	G191/18	Strawberry fruit, IA PAS, Poland	MT555756.1
<i>Pilidium</i> spp.	G193/18	Strawberry fruit, IA PAS, Poland	MT555757.1
<i>Pilidium</i> spp.	G197/18	Strawberry fruit, IA PAS, Poland	-
<i>Pilidium</i> spp.	G199/18	Strawberry fruit, IA PAS, Poland	MT555760.1
<i>Pilidium</i> spp.	G200/18	Strawberry fruit, IA PAS, Poland	MT555761.1
<i>Pilidium</i> spp.	G201/18	Strawberry fruit, IA PAS, Poland	MT555762.1
<i>Pilidium</i> spp.	G204/18	Strawberry fruit, IA PAS, Poland	MT555763.1
<i>Pilidium</i> spp.	G205/18	Strawberry fruit, IA PAS, Poland	MT555764.1
<i>Pilidium</i> spp.	G206/18	Strawberry fruit, IA PAS, Poland	MT555765.1
<i>Pilidium</i> spp.	G207/18	Strawberry fruit, IA PAS, Poland	MT555766.1
<i>Pseudeurotium</i> spp.	G292/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175249
<i>Pythium spiculum</i>	G426/18	Strawberry rhizosphere, IA PAS, Poland	MW175279
<i>Sarocladium</i> spp.	G338/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175265
<i>Talaromyces</i> spp.	G289/18	Strawberry roots, IA PAS, Poland	MW175246

* LMEM – Laboratory of Molecular and Environmental Microbiology, Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences (IA PAS)

Sample codes in bold are the isolates selected for development of multiplex real-time PCR detection method

Table 2. Table gathering information on tested environmental samples. Explanations of colour marked samples numbers: yellow – detection of *Botrytis* spp., green – detection of *Colletotrichum* spp., pink – detection of *Botrytis* spp. and *Colletotrichum* spp., red – detection of *Botrytis* spp. and *Verticillium* spp., blue – detection of *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp., samples without any colour (black) – lack of pathogens detection.

Type of samples	Variety of strawberry	Soil type	Codes of sample
bulk soil	-	-	334/19, 335/19
bulk soil	-	-	702/19
bulk soil	-	-	726/19
bulk soil	-	-	727/19
bulk soil	Aprica	fluvisol	348/19, 350/19
bulk soil	Aprica	chernozem	538/19A, 538/19B, 538/19C
bulk soil	Aprica	chernozem	380/19, 382/19, 384/19
bulk soil	Aprica	regosol	55/19A, 55/19B, 55/19C
bulk soil	Aprica	regosol	32/19A, 32/19B, 32/19C
bulk soil	Aprica	-	452/19, 454/19, 456/19
bulk soil	Aprica	acrisol	45/19A, 45/19B, 45/19C
bulk soil	Aprica & Honeoye	fluvisol	48/19A, 48/19, 48/19C
bulk soil	Dipred	fluvisol	53/19A, 53/19B, 53/19C
bulk soil	Dipred	fluvisol	358/19, 360/19
bulk soil	Dipred	-	440/19, 442/19, 444/19
bulk soil	Dipred	acrisol	57/19A, 57/19B, 57/19C
bulk soil	Honeoye	cambisol	368/19, 370/19, 372/19
bulk soil	Honeoye	fluvisol	340/19, 341/19
bulk soil	Honeoye	acrisol	43/19A, 43/19B, 43/19C
bulk soil	Honeoye	acrisol	539/19A, 539/19B, 539/19C
bulk soil	Honeoye	-	464/19, 466/19, 468/19

bulk soil	Honeoye	-	392/19, 396/19
bulk soil	Honeoye	-	416/19, 418/19, 420/19
bulk soil	Honeoye	-	403/19, 405/19, 407/19
bulk soil	Honeoye	-	428/19, 430/19, 432/19
bulk soil	Malwina	-	703/19
fruit	Honeoye	-	514/19A, 514/19B, 514/19C
fruit	Honeoye	-	522/19A, 522/19B, 522/19C
fruit	Honeoye	-	530/19A, 530/19B, 530/19C, 531/19A, 531/19B, 531/19C, 532/19A, 532/19B, 532/19C, 533/19A, 533/19B, 533/19C, 534/19A, 534/19B, 534/19C, 535/19A, 535/19B, 535/19C, 536/19A, 536/19B, 536/19C, 537/19A, 537/19B, 537/19C
fruit	organic	-	246/19
fruit	Honeoye	-	244/19, 245/19
fruit	conventional	-	241/19; 242/19, 243/19, 248/19
rhizosphere	Honeoye	-	404/19, 406/19, 408/19
rhizosphere	Aprica	chernozem	379/19, 381/19, 383/19
rhizosphere	Honeoye	cambisol	367/19, 369/19, 371/19
rhizosphere	Allegro	-	718/19
rhizosphere	Aprica	fluvisol	347/19; 349/19; 351/19
rhizosphere	Aprica	-	451/19, 453/19, 455/19
rhizosphere	Dipred	fluvisol	357/19, 359/19, 361/19
rhizosphere	Dipred	-	439/19, 441/19, 443/19
rhizosphere	Faith	-	706/19
rhizosphere	Faith	-	707/19
rhizosphere	Honeoye	-	704/19
rhizosphere	Honeoye	fluvisol	337/19, 338/19, 339/19
rhizosphere	Honeoye	-	391/19, 393/19, 395/19
rhizosphere	Honeoye	-	463/19, 465/19, 467/19
rhizosphere	Honeoye	-	415/19, 417/19, 419/19

rhizosphere	Honeoye	-	427/19, 429/19, 431/19
rhizosphere	Marmolada	-	723/19, 724/19
rhizosphere	Rumba	-	708/19
rhizosphere	Rumba	-	716/19
roots	Aprica	-	352/19K, 354/19K, 356/19K
roots	Aprica	-	457/19K, 459/19K, 461/19K
roots	Aprica	-	481/19K, 483/19K, 485/19K
roots	Aprica	-	493/19K, 495/19K, 497/19K
roots	Aprica	-	385/19K, 387/19K, 389/19K
roots	Dipred	-	445/19K, 447/19K, 449/19K
roots	Dipred	-	362/19K, 364/19K, 366/19K,
roots	Honeoye	-	469/19K, 471/19K, 473/19K
roots	Honeoye	-	342/19K, 343/19K, 344/19K,
roots	Honeoye	-	397/19K, 399/19K, 401/19K
roots	Honeoye	-	421/19K, 423/19K, 425/19K
roots	Honeoye	-	433/19K, 435/19K, 437/19K
roots	Honeoye	-	410/19K, 412/19K, 414/19K
roots	Honeoye	-	373/19K, 375/19K, 377/19K
roots	Malwina	-	705/19
roots	Marmolada	-	722/19
shoots	-	-	333/19, 336/19
shoots	Allegro	-	714/19
shoots	Allegro	-	717/19
shoots	Aprica	-	352/19L, 354/19L, 356/19L
shoots	Aprica	-	457/19L, 459/19L, 461/19L
shoots	Aprica	-	481/19L, 483/19L, 485/19L
shoots	Aprica	-	493/19L, 495/19L, 497/19L
shoots	Aprica	-	385/19L, 387/19L, 389/19L

shoots	Dipred	-	725/19
shoots	Dipred	-	445/19L, 447/19L, 449/19L
shoots	Dipred	-	362/19L, 364/19L, 366/19L
shoots	Honeoye	-	712/19
shoots	Honeoye	-	247/19
shoots	Honeoye	-	469/19L, 471/19L, 473/19L
shoots	Honeoye	-	342/19L, 343/19L, 344/19L,
shoots	Honeoye	-	397/19L, 399/19L, 401/19L
shoots	Honeoye	-	421/19L, 423/19L, 425/19L
shoots	Honeoye	-	433/19L, 435/19L, 437/19L
shoots	Honeoye	-	410/19L, 412/19L, 414/19L
shoots	Honeoye	-	373/19L, 375/19L, 377/19L
shoots	Marmolada	-	720/19, 721/19
shoots	Rumba	-	713/19
shoots	Rumba	-	715/19

Table S2_Botr-6FAM Probe

Specificity of Botr-6FAM Probe (Minimum 3 hits)				
Organism	Accession number	BLAST Score	Identities/Query	E-Value
uncultured Botrytis	KY816851	48.1	24/24	0.000002
	KY816845	48.1	24/24	0.000002
	KY816872	48.1	24/24	0.000002
uncultured Botryotinia	HQ006111	48.1	24/24	0.000002
	GU055595	48.1	24/24	0.000002
	GU055559	48.1	24/24	0.000002
	GU055551	48.1	24/24	0.000002
	Botrytis sp.	MT154308	48.1	24/24
MT154307		48.1	24/24	0.000004
MT154306		48.1	24/24	0.000004
MT154304		48.1	24/24	0.000004
MT154301		48.1	24/24	0.000004
MN153947		48.1	24/24	0.000004
KX639307		48.1	24/24	0.000004
KX639306		48.1	24/24	0.000004
KX639305		48.1	24/24	0.000004
KX639304		48.1	24/24	0.000004
KX639303		48.1	24/24	0.000004
KX639302		48.1	24/24	0.000004
KX639301		48.1	24/24	0.000004
KX639300		48.1	24/24	0.000004
KX639299		48.1	24/24	0.000004
KX639298		48.1	24/24	0.000004
KX639296		48.1	24/24	0.000004
KX639295		48.1	24/24	0.000004
KX639294		48.1	24/24	0.000004
KX639293		48.1	24/24	0.000004
KX639292		48.1	24/24	0.000004
KX639290		48.1	24/24	0.000004
KX639289		48.1	24/24	0.000004
MT154302		48.1	24/24	0.000004
MT154303		48.1	24/24	0.000004
KX639288		48.1	24/24	0.000004
MF336093		48.1	24/24	0.000004
MF336076		48.1	24/24	0.000004
MF336034		48.1	24/24	0.000004
MF335924		48.1	24/24	0.000004
MF335549		48.1	24/24	0.000004
MF335584		48.1	24/24	0.000004
MF335608		48.1	24/24	0.000004
Botrytis cinerea	LC514949	48.1	24/24	0.000004
	MN747898	48.1	24/24	0.000004
	MN148533	48.1	24/24	0.000004
	MN148532	48.1	24/24	0.000004
	MN148531	48.1	24/24	0.000004
	MH877779	48.1	24/24	0.000004
	MH871836	48.1	24/24	0.000004
	MH871823	48.1	24/24	0.000004
	MH871211	48.1	24/24	0.000004
	MH869558	48.1	24/24	0.000004
	MH868959	48.1	24/24	0.000004
	MH877778	48.1	24/24	0.000004
MH860108	48.1	24/24	0.000004	

Strona 1

Table S2_Botr-6FAM Probe

MH871883	48.1	24/24	0.000004
MK431461	48.1	24/24	0.000004
MK431457	48.1	24/24	0.000004
MH397594	48.1	24/24	0.000004
KX507065	48.1	24/24	0.000004
MF339272	48.1	24/24	0.000004
MF336191	48.1	24/24	0.000004
MF336184	48.1	24/24	0.000004
MF336177	48.1	24/24	0.000004
MF336169	48.1	24/24	0.000004
MF336159	48.1	24/24	0.000004
MF336102	48.1	24/24	0.000004
MF336042	48.1	24/24	0.000004
MF336017	48.1	24/24	0.000004
MF335997	48.1	24/24	0.000004
MF335929	48.1	24/24	0.000004
MF335885	48.1	24/24	0.000004
MF335604	48.1	24/24	0.000004
MF335947	48.1	24/24	0.000004
MF336020	48.1	24/24	0.000004
MF336072	48.1	24/24	0.000004
MF336132	48.1	24/24	0.000004
MF336150	48.1	24/24	0.000004
MF336178	48.1	24/24	0.000004
MF336186	48.1	24/24	0.000004
MF336189	48.1	24/24	0.000004
MF336196	48.1	24/24	0.000004
MF333630	48.1	24/24	0.000004
MF333422	48.1	24/24	0.000004
MF332623	48.1	24/24	0.000004
KU729179	48.1	24/24	0.000004
KU140653	48.1	24/24	0.000004
KT323330	48.1	24/24	0.000004
KT023588	48.1	24/24	0.000004
KT023587	48.1	24/24	0.000004
KT023586	48.1	24/24	0.000004
KT023585	48.1	24/24	0.000004
KT023584	48.1	24/24	0.000004
KT023583	48.1	24/24	0.000004
KT023582	48.1	24/24	0.000004
KR094468	48.1	24/24	0.000004
KP780471	48.1	24/24	0.000004
KP671724	48.1	24/24	0.000004
KM249092	48.1	24/24	0.000004
KC292909	48.1	24/24	0.000004
JN938889	48.1	24/24	0.000004
MT156168	48.1	24/24	0.000004
MN561691	48.1	24/24	0.000004
MN561690	48.1	24/24	0.000004
MN561689	48.1	24/24	0.000004
MT781367	48.1	24/24	0.000004
HQ602686	48.1	24/24	0.000004
HQ691434	48.1	24/24	0.000004
DQ666677	48.1	24/24	0.000004
AY544651	48.1	24/24	0.000004

Strona 2

Table S2_Botr-6FAM Probe

	DQ008060	48.1	24/24	0.000004
	AF250919	48.1	24/24	0.000004
	CP009808	48.1	24/24	0.000004
Botryotinia convoluta	MH870893	48.1	24/24	0.000004
	MH870892	48.1	24/24	0.000004
	MH867460	48.1	24/24	0.000004
Botryotinia ficariarum	MH869859	48.1	24/24	0.000004
	NG_067370	48.1	24/24	0.000004
	MH869858	48.1	24/24	0.000004
Botrytis paeoniae	MH869261	48.1	24/24	0.000004
	MH868667	48.1	24/24	0.000004
	MH867700	48.1	24/24	0.000004
Botryotinia globosa	MH869245	48.1	24/24	0.000004
	MH868768	48.1	24/24	0.000004
	MH868627	48.1	24/24	0.000004
Botrytis fabae	MH869203	48.1	24/24	0.000004
	NG_067342	48.1	24/24	0.000004
	MH866488	48.1	24/24	0.000004
Botrytis porri	MH867981	48.1	24/24	0.000004
	MH854885	48.1	24/24	0.000004
	MH866378	48.1	24/24	0.000004
Botryotinia squamosa	MH867701	48.1	24/24	0.000004
	MH866246	48.1	24/24	0.000004
Botrytis aclada	MH866244	48.1	24/24	0.000004
	KC311471	48.1	24/24	0.000004
	JN938890	48.1	24/24	0.000004
Botrytis prunorum	KT023595	48.1	24/24	0.000004
	KT023594	48.1	24/24	0.000004
	KT023593	48.1	24/24	0.000004
	KT023592	48.1	24/24	0.000004
	KT023591	48.1	24/24	0.000004
	KT023590	48.1	24/24	0.000004
	KT023589	48.1	24/24	0.000004
Botrytis caroliniana	KC171323	48.1	24/24	0.000004
	KC171322	48.1	24/24	0.000004
Helotiales sp.	MF336193	48.1	24/24	0.000006
	MF336157	48.1	24/24	0.000006
	MF336115	48.1	24/24	0.000006
	MF336059	48.1	24/24	0.000006
	MF336049	48.1	24/24	0.000006
	MF336006	48.1	24/24	0.000006
	MF335979	48.1	24/24	0.000006
	MF335938	48.1	24/24	0.000006
	MF335886	48.1	24/24	0.000006
	HE820784	48.1	24/24	0.000006
	HE820774	48.1	24/24	0.000006
	HE820761	48.1	24/24	0.000006
	HE820751	48.1	24/24	0.000006
Sclerotiniaceae sp.	MF336085	48.1	24/24	0.000002
	MF336035	48.1	24/24	0.000002
	MF335995	48.1	24/24	0.000002
	MF335914	48.1	24/24	0.000002
	MF334805	48.1	24/24	0.000002
	MF336174	42.1	21/24	0.0001
Sclerotinia sclerotiorum	LC429380	32.2	22/24	0.11

Table S2_Botr-6FAM Probe

	MN078807	32.2	22/24	0.11	
	MH868246	32.2	22/24	0.11	
	AB926148	32.2	22/24	0.11	
	KM211709	32.2	22/24	0.11	
	KM211708	32.2	22/24	0.11	
	KM211707	32.2	22/24	0.11	
	KF590157	32.2	22/24	0.11	
	KC311494	32.2	22/24	0.11	
	JX648201	32.2	22/24	0.11	
	JQ070160	32.2	22/24	0.11	
	EU926159	32.2	22/24	0.11	
	DQ470965	32.2	22/24	0.11	
	AY789347	32.2	22/24	0.11	
	Z73762	32.2	22/24	0.11	
	AF431951	32.2	22/24	0.11	
	AF222493	32.2	22/24	0.11	
	LC431713	20.3	10/24		401
	AB926199	20.3	10/24		401
	DQ470916	20.3	10/24		401
	AJ745716	20.3	10/24		401
	AF107808	20.3	10/24		401
Dumontinia tuberosa	MH878284	32.2	22/24	0.11	
	MH867692	32.2	22/24	0.11	
	MH866674	32.2	22/24	0.11	
	KX090843	32.2	22/24	0.11	
	KJ941058	32.2	22/24	0.11	
	Z81406	32.2	22/24	0.11	
	AB926161	22.3	11/24		102
Sclerotium cepivorum	MH877856	32.2	22/24	0.11	
	MH874059	32.2	22/24	0.11	
	MH873234	32.2	22/24	0.11	
	MH870230	32.2	22/24	0.11	
	MH870229	32.2	22/24	0.11	
	MH866587	32.2	22/24	0.11	
	FJ212344	24.3	12/24		26
	FJ212339	24.3	12/24		26
	FJ212340	24.3	12/24		26
	FJ212341	24.3	12/24		26
	FJ212342	24.3	12/24		26
	FJ212343	24.3	12/24		26
Grovesinia moricola	KX098504	32.2	22/24	0.11	
	KX098503	32.2	22/24	0.11	
	MW013804	32.2	22/24	0.11	
Sclerotinia nivalis	KM265190	32.2	22/24	0.11	
	KM211706	32.2	22/24	0.11	
	KM211705	32.2	22/24	0.11	
	KM211704	32.2	22/24	0.11	
	KM211703	32.2	22/24	0.11	
	KM211702	32.2	22/24	0.11	
	KM211701	32.2	22/24	0.11	
	KM211700	32.2	22/24	0.11	
Sclerotinia pseudotuberc	MH867209	28.2	20/24	1.6	
	MH867208	28.2	20/24	1.6	
	MH748088	28.2	20/24	1.6	
	AB926143	28.2	20/24	1.6	

Table S2_Botr-6FAM Probe

Monilinia fructigena	MT644896	20.3	10/24	401
	MH874346	20.3	10/24	401
	MH872210	20.3	10/24	401
	MH868243	20.3	10/24	401
	MH868242	20.3	10/24	401
	MH868241	20.3	10/24	401
	MH868240	20.3	10/24	401
	MH868239	20.3	10/24	401
	LT615193	20.3	10/24	401
	LT615191	20.3	10/24	401
	LT615186	20.3	10/24	401
	LT615185	20.3	10/24	401
	LT615184	20.3	10/24	401
	LT615183	20.3	10/24	401
	LT615177	20.3	10/24	401
	LT615176	20.3	10/24	401
	LT615170	20.3	10/24	401
Z73749	20.3	10/24	401	
Monilinia fructicola	MH875934	20.3	10/24	401
	MH875933	20.3	10/24	401
	MH867207	20.3	10/24	401
	MH866345	20.3	10/24	401
	MH866293	20.3	10/24	401
	MK431472	20.3	10/24	401
	MK431471	20.3	10/24	401
	LT615190	20.3	10/24	401
	LT615189	20.3	10/24	401
	LT615175	20.3	10/24	401
	LT615174	20.3	10/24	401
	LT615169	20.3	10/24	401
	AY544683	20.3	10/24	401
	Z73748	20.3	10/24	401
Monilinia laxa	MH874347	20.3	10/24	401
	MH868237	20.3	10/24	401
	MH868236	20.3	10/24	401
	MH867813	20.3	10/24	401
	MH866670	20.3	10/24	401
	MH866669	20.3	10/24	401
	MH866344	20.3	10/24	401
	MH866215	20.3	10/24	401
	MH866214	20.3	10/24	401
	LT615188	20.3	10/24	401
	LT615187	20.3	10/24	401
	LT615173	20.3	10/24	401
	LT615172	20.3	10/24	401
	LT615171	20.3	10/24	401
	LN714571	20.3	10/24	401
	MT156255	20.3	10/24	401
AY544670	20.3	10/24	401	
Z73752	20.3	10/24	401	
Monilinia polystroma	LT615192	20.3	10/24	401
	LT615178	20.3	10/24	401
	LT615168	20.3	10/24	401
	LT615167	20.3	10/24	401
Amphobotrys ricini	MT223677	20.3	10/24	401

Table S2_Botr-6FAM Probe

MT223676	20.3	10/24	401
MT223675	20.3	10/24	401
MT223674	20.3	10/24	401
MT350628	20.3	10/24	401
KR183766	20.3	10/24	401
GQ860996	20.3	10/24	401

Table S2

Results of in silico specificity test of Botr-6FAM Probe with megablast search versus NCBI nt database. Search Included Leotiomyces fungi. Only organisms with 3 or more hits are shown. Query length of this search was 24, while Maximum BLAST score for this probe is 48.1.

The BLAST (alignment) score is calculated by assigning a value of +2 for each aligned pair and -3 for each mismatch and then summing these values.

Table S2_Coll-Tamra Probe

Specificity of Coll-Tamra Probe (Minimum 3 hits)					
Organism	Accession	nur	BLAST Score	Identities/Query	E-Value
Colletotrichum scovillei	NG_070041	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MH877896	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MH877760	50.1	25/25	25/25	0.000001
Colletotrichum salicis	NG_070038	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MK541032	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MH877753	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MH877137	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MH877136	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MH876675	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MH876460	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MH876459	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MH876458	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MH876457	50.1	25/25	25/25	0.000001
Colletotrichum rhombiforme	NG_070016	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MH877400	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MH877132	50.1	25/25	25/25	0.000001
Colletotrichum tamarilloi	NG_070002	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MK541029	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MH877135	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MH877134	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MH877133	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MH876874	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MH876873	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MH876872	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MH876871	50.1	25/25	25/25	0.000001
Colletotrichum lentis	NG_069981	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MH876066	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MH876065	50.1	25/25	25/25	0.000001
Colletotrichum simmondsii	NG_069904	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MK541034	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MN650645	50.1	25/25	25/25	0.000001
Colletotrichum godetiae	NG_069642	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MH877121	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MH877093	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MH877091	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MH877113	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MH876950	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MH877092	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MH876876	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MH877130	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MH876007	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MK431475	50.1	25/25	25/25	0.000001
MT156195	50.1	25/25	25/25	0.000001	
Colletotrichum musae	NG_069093	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MN393490	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MK749853	50.1	25/25	25/25	0.000001
Colletotrichum fioriniae	NG_069002	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MT000494	50.1	25/25	25/25	0.000001
	MK541031	50.1	25/25	25/25	0.000001

Strona 1

Table S2_Coll-Tamra Probe

	MH877936	50.1	25/25	0.000001
	MH877895	50.1	25/25	0.000001
	MH877126	50.1	25/25	0.000001
	MH877120	50.1	25/25	0.000001
	MH877127	50.1	25/25	0.000001
	MH877119	50.1	25/25	0.000001
	MH877111	50.1	25/25	0.000001
	MH877110	50.1	25/25	0.000001
	MH877109	50.1	25/25	0.000001
	MH877096	50.1	25/25	0.000001
	MH877117	50.1	25/25	0.000001
	MH877125	50.1	25/25	0.000001
	MH876456	50.1	25/25	0.000001
	MH876073	50.1	25/25	0.000001
	MH876071	50.1	25/25	0.000001
Colletotrichum sp.	MH875996	50.1	25/25	0.000001
	MT584261	50.1	25/25	0.000001
	MT558572	50.1	25/25	0.000001
	MT000552	50.1	25/25	0.000001
	MT000502	50.1	25/25	0.000001
	MT126807	50.1	25/25	0.000001
	MT126806	50.1	25/25	0.000001
	MT126805	50.1	25/25	0.000001
	MT126804	50.1	25/25	0.000001
	MT126803	50.1	25/25	0.000001
	MT126802	50.1	25/25	0.000001
	MT126801	50.1	25/25	0.000001
	MT126800	50.1	25/25	0.000001
	MT126799	50.1	25/25	0.000001
	MT126798	50.1	25/25	0.000001
	MT126797	50.1	25/25	0.000001
	MT126796	50.1	25/25	0.000001
	MT126795	50.1	25/25	0.000001
	MT126794	50.1	25/25	0.000001
	MT126793	50.1	25/25	0.000001
	MT126792	50.1	25/25	0.000001
	MT126791	50.1	25/25	0.000001
	MT126790	50.1	25/25	0.000001
	MT126789	50.1	25/25	0.000001
	MK411296	50.1	25/25	0.000001
	MN543989	50.1	25/25	0.000001
	MN543949	50.1	25/25	0.000001
	MN543905	50.1	25/25	0.000001
	MN543906	50.1	25/25	0.000001
	MH374491	50.1	25/25	0.000001
	MK299421	50.1	25/25	0.000001
	MK299420	50.1	25/25	0.000001
Colletotrichum gloeosporioides	MT372633	50.1	25/25	0.000001
	MN721338	50.1	25/25	0.000001
	MN625356	50.1	25/25	0.000001
	MN625346	50.1	25/25	0.000001
	MN625338	50.1	25/25	0.000001
	MN625325	50.1	25/25	0.000001
	MN625317	50.1	25/25	0.000001

Strona 2

Table S2_Coll-Tamra Probe

MN625296	50.1	25/25	0.000001	
MN625202	50.1	25/25	0.000001	
MN619639	50.1	25/25	0.000001	
MN619637	50.1	25/25	0.000001	
MN619627	50.1	25/25	0.000001	
MN477464	50.1	25/25	0.000001	
MN477462	50.1	25/25	0.000001	
MN477461	50.1	25/25	0.000001	
MN477460	50.1	25/25	0.000001	
MN477459	50.1	25/25	0.000001	
MN477458	50.1	25/25	0.000001	
MN477457	50.1	25/25	0.000001	
MN427974	50.1	25/25	0.000001	
MN427973	50.1	25/25	0.000001	
MN393488	50.1	25/25	0.000001	
MN136302	50.1	25/25	0.000001	
MN136301	50.1	25/25	0.000001	
MN136300	50.1	25/25	0.000001	
MN136299	50.1	25/25	0.000001	
MN136298	50.1	25/25	0.000001	
MK788141	50.1	25/25	0.000001	
MH248787	50.1	25/25	0.000001	
MH248786	50.1	25/25	0.000001	
MH248785	50.1	25/25	0.000001	
MH878344	50.1	25/25	0.000001	
MH877492	50.1	25/25	0.000001	
MH877488	50.1	25/25	0.000001	
MH877487	50.1	25/25	0.000001	
MH877486	50.1	25/25	0.000001	
MH877485	50.1	25/25	0.000001	
MH877484	50.1	25/25	0.000001	
MH877481	50.1	25/25	0.000001	
MH877122	50.1	25/25	0.000001	
MH876879	50.1	25/25	0.000001	
MH876024	50.1	25/25	0.000001	
MH876006	50.1	25/25	0.000001	
MH876005	50.1	25/25	0.000001	
MH876004	50.1	25/25	0.000001	
MH876003	50.1	25/25	0.000001	
MH876001	50.1	25/25	0.000001	
MH876002	50.1	25/25	0.000001	
Colletotrichum fruticola	MN625360	50.1	25/25	0.000001
	MN625352	50.1	25/25	0.000001
	MN625347	50.1	25/25	0.000001
	MN625324	50.1	25/25	0.000001
	MN619648	50.1	25/25	0.000001
	MH877073	50.1	25/25	0.000001
	MH877039	50.1	25/25	0.000001
	MH877037	50.1	25/25	0.000001
	MH877036	50.1	25/25	0.000001
	MH877035	50.1	25/25	0.000001
	MH877033	50.1	25/25	0.000001
	MH877032	50.1	25/25	0.000001
Colletotrichum fragariae	MN625358	50.1	25/25	0.000001

Strona 3

Table S2_Coll-Tamra Probe

	MN619649	50.1	25/25	0.000001
	MH876067	50.1	25/25	0.000001
	MT876536	50.1	25/25	0.000001
Colletotrichum acutatum	MN625357	50.1	25/25	0.000001
	MN625353	50.1	25/25	0.000001
	MN625330	50.1	25/25	0.000001
	MN625313	50.1	25/25	0.000001
	MG888643	50.1	25/25	0.000001
	MH877942	50.1	25/25	0.000001
	MH877941	50.1	25/25	0.000001
	MH877937	50.1	25/25	0.000001
	MH877129	50.1	25/25	0.000001
	MH877128	50.1	25/25	0.000001
	MH877118	50.1	25/25	0.000001
	MH877103	50.1	25/25	0.000001
	MH877102	50.1	25/25	0.000001
	MH877100	50.1	25/25	0.000001
	MH877095	50.1	25/25	0.000001
	MH877094	50.1	25/25	0.000001
	MH877098	50.1	25/25	0.000001
	MH877101	50.1	25/25	0.000001
	MH877104	50.1	25/25	0.000001
	MH877099	50.1	25/25	0.000001
	MH877938	50.1	25/25	0.000001
	MH875998	50.1	25/25	0.000001
	MH875997	50.1	25/25	0.000001
	MH877939	50.1	25/25	0.000001
	MH877940	50.1	25/25	0.000001
Colletotrichum siamense	MN625355	50.1	25/25	0.000001
	MN625350	50.1	25/25	0.000001
	MN625344	50.1	25/25	0.000001
	MN625341	50.1	25/25	0.000001
	MN625335	50.1	25/25	0.000001
	MN625326	50.1	25/25	0.000001
	MN625312	50.1	25/25	0.000001
	MN625290	50.1	25/25	0.000001
	MN619635	50.1	25/25	0.000001
	MN619630	50.1	25/25	0.000001
	MK652853	50.1	25/25	0.000001
Colletotrichum tropicale	MN625354	50.1	25/25	0.000001
	MH877138	50.1	25/25	0.000001
	MH877034	50.1	25/25	0.000001
	MH876947	50.1	25/25	0.000001
	MH877038	50.1	25/25	0.000001
Colletotrichum aenigma	MN625349	50.1	25/25	0.000001
	MN625342	50.1	25/25	0.000001
	MN619647	50.1	25/25	0.000001
Colletotrichum temperatum	MN625337	50.1	25/25	0.000001
	NG_067478	50.1	25/25	0.000001
	MH877532	50.1	25/25	0.000001
Colletotrichum lupini	MK541037	50.1	25/25	0.000001
	MK541036	50.1	25/25	0.000001
	MH877123	50.1	25/25	0.000001

Strona 4

Table S2_Coll-Tamra Probe

Colletotrichum nymphaeae	MK541035	50.1	25/25	0.000001
	NG_067487	50.1	25/25	0.000001
	MH877749	50.1	25/25	0.000001
	MH877115	50.1	25/25	0.000001
	MH877112	50.1	25/25	0.000001
	MH877108	50.1	25/25	0.000001
	MH877114	50.1	25/25	0.000001
	MH877116	50.1	25/25	0.000001
	MH877107	50.1	25/25	0.000001
	MH877105	50.1	25/25	0.000001
	MH877097	50.1	25/25	0.000001
	MH877050	50.1	25/25	0.000001
	MH876072	50.1	25/25	0.000001
	MH876070	50.1	25/25	0.000001
Colletotrichum costaricense	MK541033	50.1	25/25	0.000001
	MH877748	50.1	25/25	0.000001
	NG_067486	50.1	25/25	0.000001
	MH877747	50.1	25/25	0.000001
Sordariomycetes sp.	KU747687	50.1	25/25	0.00002
	KU747684	50.1	25/25	0.00002
	KU747936	42.1	24/25	0.004
	KU747846	42.1	24/25	0.004
	JQ761088	50.1	25/25	0.00002
	JQ761090	50.1	25/25	0.00002
	JQ761103	50.1	25/25	0.00002
	JQ761104	50.1	25/25	0.00002
	JQ761121	50.1	25/25	0.00002
	JQ761124	50.1	25/25	0.00002
	JQ761133	50.1	25/25	0.00002
Distoseptispora suoluensis	NG_068552	42.1	24/25	0.004
	MF077558	42.1	24/25	0.004
	MF077557	42.1	24/25	0.004
Sporidesmium melaleucaae	NG_064550	42.1	24/25	0.004
	MH327854	42.1	24/25	0.004
	MH327853	42.1	24/25	0.004
Glomerellales sp.	MW045924	42.1	24/25	0.004
	MW045906	42.1	24/25	0.004
	MW045863	42.1	24/25	0.004
	MW045861	42.1	24/25	0.004
	MW045857	42.1	24/25	0.004
	MW045856	42.1	24/25	0.004
	MW045836	42.1	24/25	0.004
	MW045835	42.1	24/25	0.004
	MW045908	38.2	22/25	0.062
	MW045899	38.2	22/25	0.062
Beauveria bassiana	MT226552	38.2	22/25	0.062
	MT159433	38.2	22/25	0.062
	MN494090	38.2	22/25	0.062
	MN494089	38.2	22/25	0.062
	MT124997	38.2	22/25	0.062
	MT124996	38.2	22/25	0.062

Table S2_Coll-Tamra Probe

MT124995	38.2	22/25	0.062
MT124994	38.2	22/25	0.062
MT124993	38.2	22/25	0.062
MT124992	38.2	22/25	0.062
MT124991	38.2	22/25	0.062
MT124990	38.2	22/25	0.062
MT124989	38.2	22/25	0.062
MT124988	38.2	22/25	0.062
MT124987	38.2	22/25	0.062
MT124986	38.2	22/25	0.062
MT124985	38.2	22/25	0.062
MT124984	38.2	22/25	0.062
MN960363	38.2	22/25	0.062
MN960359	38.2	22/25	0.062
LS453307	38.2	22/25	0.062
MN749319	38.2	22/25	0.062
MN749318	38.2	22/25	0.062
MN749317	38.2	22/25	0.062
MN749316	38.2	22/25	0.062
MN749315	38.2	22/25	0.062
MN749314	38.2	22/25	0.062
MN749313	38.2	22/25	0.062
MN749312	38.2	22/25	0.062
MN749311	38.2	22/25	0.062
MN749310	38.2	22/25	0.062
MN749309	38.2	22/25	0.062
MN560148	38.2	22/25	0.062
MH879591	38.2	22/25	0.062
MH876642	38.2	22/25	0.062
MH876023	38.2	22/25	0.062
MH875953	38.2	22/25	0.062
MH871563	38.2	22/25	0.062
MH869591	38.2	22/25	0.062
MH867248	38.2	22/25	0.062
MH867247	38.2	22/25	0.062
MH867246	38.2	22/25	0.062
MH867245	38.2	22/25	0.062
MH867244	38.2	22/25	0.062
MH867243	38.2	22/25	0.062
MH867242	38.2	22/25	0.062
MH867241	38.2	22/25	0.062
MH867240	38.2	22/25	0.062
MH867239	38.2	22/25	0.062
MH866831	38.2	22/25	0.062
MH866359	38.2	22/25	0.062
MG642849	38.2	22/25	0.062
MH854933	38.2	22/25	0.062
MH866427	38.2	22/25	0.062
MG548313	38.2	22/25	0.062
MF337480	38.2	22/25	0.062
KX255641	38.2	22/25	0.062
KU729127	38.2	22/25	0.062
KT359346	38.2	22/25	0.062
KP671729	38.2	22/25	0.062
KF428792	38.2	22/25	0.062

Strona 6

Table S2_Coll-Tamra Probe

	JQ906767	38.2	22/25	0.062
	HF675189	38.2	22/25	0.062
	JX867557	38.2	22/25	0.062
	JX481967	38.2	22/25	0.062
	JQ712135	38.2	22/25	0.062
	JQ411374	38.2	22/25	0.062
	MN576824	38.2	22/25	0.062
	CP045881	38.2	22/25	0.062
	CP045879	38.2	22/25	0.062
	MK632098	38.2	22/25	0.062
	MT674805	38.2	22/25	0.062
	MT674804	38.2	22/25	0.062
	HQ377252	38.2	22/25	0.062
	JF429894	38.2	22/25	0.062
	FJ755242	38.2	22/25	0.062
	EU334679	38.2	22/25	0.062
	EU334678	38.2	22/25	0.062
	EU334677	38.2	22/25	0.062
	EU334676	38.2	22/25	0.062
	EU334675	38.2	22/25	0.062
	EU334674	38.2	22/25	0.062
	EF026006	38.2	22/25	0.062
	AY283555	38.2	22/25	0.062
Cordyceps sp	MT081955	38.2	22/25	0.062
	MT081954	38.2	22/25	0.062
	MG642844	38.2	22/25	0.062
	MG642838	38.2	22/25	0.062
	MF416544	38.2	22/25	0.062
	MF416543	38.2	22/25	0.062
	MF416542	38.2	22/25	0.062
	MF416540	38.2	22/25	0.062
	MF416539	38.2	22/25	0.062
	MF416538	38.2	22/25	0.062

Table S2

Results of In silico specificity test of Coll-Tamra Probe with megablast search versus NCBI nt database. Search Included Sordariomycetes fungi. Only organisms with 3 or more hits are shown. Query length of this search was 25, while Maximum BLAST score for this probe is 50.1.

The BLAST (alignment) score is calculated by assigning a value of +2 for each aligned pair and -3 for each mismatch and then summing these values.

Table S2_Vert-Cy5 Probe

Specificity of Vert-Cy5 Probe (Minimum 3 hits) Organism	Accession	nur	BLAST Score	Identities/Que	E-Value
Verticillium zaregamsianum	NG_069489	46.1		23/23	0.00001
	LR026097	46.1		23/23	0.00001
	LR026096	46.1		23/23	0.00001
	LR026095	46.1		23/23	0.00001
	LR026094	46.1		23/23	0.00001
Verticillium tricorpus	LR026098	46.1		23/23	0.00001
	NG_069488	46.1		23/23	0.00001
	LR026093	46.1		23/23	0.00001
	LR026092	46.1		23/23	0.00001
	LR026091	46.1		23/23	0.00001
	LR026090	46.1		23/23	0.00001
	LR026089	46.1		23/23	0.00001
	LR026088	46.1		23/23	0.00001
	LR026087	46.1		23/23	0.00001
	LR026086	46.1		23/23	0.00001
	LR026085	46.1		23/23	0.00001
	LR026084	46.1		23/23	0.00001
	LR026083	46.1		23/23	0.00001
	LR026082	46.1		23/23	0.00001
	LR026081	46.1		23/23	0.00001
LR026080	46.1		23/23	0.00001	
LR026079	46.1		23/23	0.00001	
LR026078	46.1		23/23	0.00001	
Verticillium nonalfalfae	NG_069487	46.1		23/23	0.00001
	LR026073	46.1		23/23	0.00001
	LR026072	46.1		23/23	0.00001
	LR026071	46.1		23/23	0.00001
	LR026070	46.1		23/23	0.00001
	LR026069	46.1		23/23	0.00001
	LR026068	46.1		23/23	0.00001
	LR026067	46.1		23/23	0.00001
	LR026066	46.1		23/23	0.00001
	LR026065	46.1		23/23	0.00001
	LR026064	46.1		23/23	0.00001
	LR026063	46.1		23/23	0.00001
	LR026062	46.1		23/23	0.00001
	LR026061	46.1		23/23	0.00001
	LR026074	46.1		23/23	0.00001
Verticillium isaacii	NG_069485	46.1		23/23	0.00001
	LR026037	46.1		23/23	0.00001
	LR026036	46.1		23/23	0.00001
	LR026035	46.1		23/23	0.00001
	LR026034	46.1		23/23	0.00001
	LR026033	46.1		23/23	0.00001
	LR026032	46.1		23/23	0.00001
	LR026031	46.1		23/23	0.00001
	LR026030	46.1		23/23	0.00001
	LR026029	46.1		23/23	0.00001
Verticillium dahliae	LR026038	46.1		23/23	0.00001
	NG_069484	46.1		23/23	0.00001
	LC549668	46.1		23/23	0.00001

Strona 1

Table S2_Vert-Cy5 Probe

	LR026027	46.1	23/23	0.00001
	LR026026	46.1	23/23	0.00001
	LR026025	46.1	23/23	0.00001
	LR026024	46.1	23/23	0.00001
	LR026023	46.1	23/23	0.00001
	LR026022	46.1	23/23	0.00001
	LR026021	46.1	23/23	0.00001
	LR026020	46.1	23/23	0.00001
	LR026019	46.1	23/23	0.00001
	LR026018	46.1	23/23	0.00001
	LR026017	46.1	23/23	0.00001
	LR026016	46.1	23/23	0.00001
	LR026015	46.1	23/23	0.00001
	LR026014	46.1	23/23	0.00001
Verticillium sp.	MT133327	46.1	23/23	0.00001
	MT133326	46.1	23/23	0.00001
	MT133325	46.1	23/23	0.00001
	MT133324	46.1	23/23	0.00001
	MT133323	46.1	23/23	0.00001
	MT133322	46.1	23/23	0.00001
	MT133321	46.1	23/23	0.00001
	MT133320	46.1	23/23	0.00001
	MT133319	46.1	23/23	0.00001
	MT133318	46.1	23/23	0.00001
	MT133317	46.1	23/23	0.00001
	MT133316	46.1	23/23	0.00001
	MT133315	46.1	23/23	0.00001
	MT133314	46.1	23/23	0.00001
Verticillium nubilum	LR026077	46.1	23/23	0.00001
	LR026075	46.1	23/23	0.00001
	LR026076	46.1	23/23	0.00001
Verticillium longisporum	LR026060	46.1	23/23	0.00001
	LR026059	46.1	23/23	0.00001
	LR026058	46.1	23/23	0.00001
	LR026057	46.1	23/23	0.00001
	LR026056	46.1	23/23	0.00001
	LR026055	46.1	23/23	0.00001
	LR026054	46.1	23/23	0.00001
	LR026053	46.1	23/23	0.00001
	LR026052	46.1	23/23	0.00001
	LR026051	46.1	23/23	0.00001
	LR026050	46.1	23/23	0.00001
	LR026049	46.1	23/23	0.00001
	LR026048	46.1	23/23	0.00001
	LR026047	46.1	23/23	0.00001
	LR026046	46.1	23/23	0.00001
	LR026045	46.1	23/23	0.00001
	LR026044	46.1	23/23	0.00001
	LR026043	46.1	23/23	0.00001
	LR026042	46.1	23/23	0.00001
	LR026041	46.1	23/23	0.00001
Podospora anserina	FO904938	32.2	16/23	2.9
	FO904937	32.2	16/23	2.9
	CU640366	32.2	16/23	2.9
	CU633453	32.2	16/23	2.9

Strona 2

Table S2_Vert-Cy5 Probe

Fusarium fujikuroi	CP023096	32.2	16/23	2.9	
	CP023108	32.2	16/23	2.9	
	CP023084	32.2	16/23	2.9	
Fusarium graminearum	LT222055	30.2	15/23		11
	HG970334	30.2	15/23		11
	LT222053	30.2	15/23		11
	HG970332	30.2	15/23		11
Trichoderma reesei	CP016235	30.2	15/23		11
	XM_00696977	30.2	15/23		11
	XM_00696786	30.2	15/23		11
	XM_00696173	30.2	15/23		11
	CP016236	30.2	15/23		11
Thermothelomyces thermophilus	CP016233	30.2	15/23		11
	CP003005	30.2	15/23		11
Fusarium oxysporum	CP003006	30.2	15/23		11
	CP003002	30.2	15/23		11
	CP052908	30.2	15/23		11
	CP052899	30.2	15/23		11
	CP052901	28.2	14/23		45
	CP052900	28.2	14/23		45
	CP053273	30.2	15/23		11
	CP053263	30.2	15/23		11
	CP053267	28.2	14/23		45
	CP053266	28.2	14/23		45
	CP053264	28.2	14/23		45
	CP053268	28.2	14/23		45
	CP052043	30.2	15/23		11
	CP052042	28.2	14/23		45
	CP052049	28.2	14/23		45
	CP052040	28.2	14/23		45
	CP052893	28.2	14/23		45
	CP052888	28.2	14/23		45
	CP052887	28.2	14/23		45
	CP052889	28.2	14/23		45
Metarhizium brunneum	CP058933	30.2	15/23		11
	CP058935	28.2	14/23		45
	CP058934	28.2	14/23		45

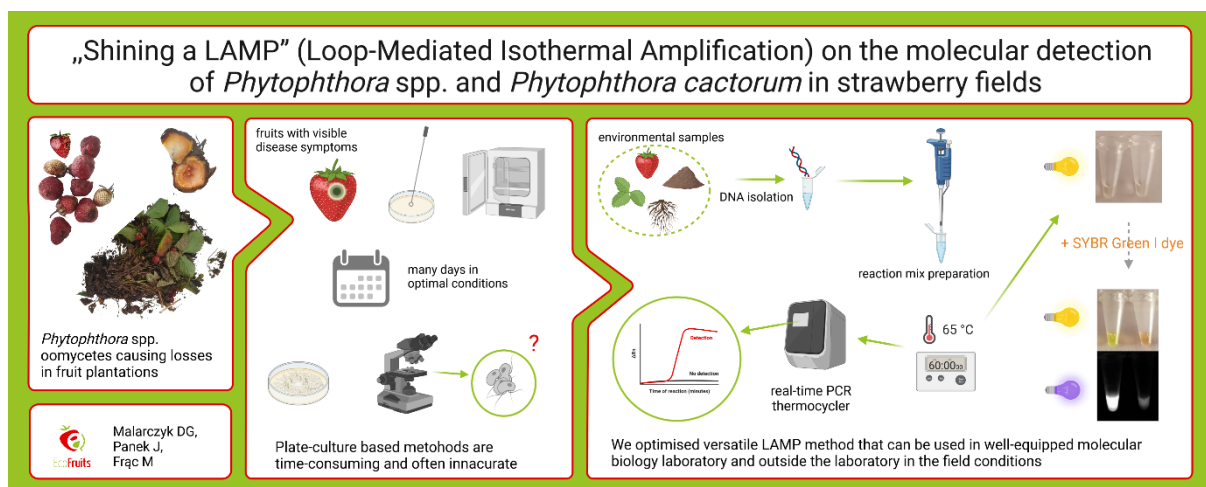
Table S2

Results of In silico specificity test of Vert-Cy5 Probe with megablast search versus NCBI nt database. Search Included Sordariomycetes fungi. Only organisms with 3 or more hits are shown. Query length of this search was 23, while Maximum BLAST score for this probe is 46.1.

The BLAST (alignment) score is calculated by assigning a value of +2 for each aligned pair and -3 for each mismatch and then summing these values.

5.3. Publikacja P3

5.3.1. Abstrakt graficzny



5.3.2. Tekst publikacji



Article

“Shining a LAMP” (Loop-Mediated Isothermal Amplification) on the Molecular Detection of Phytopathogens *Phytophthora* spp. and *Phytophthora cactorum* in Strawberry Fields

Dominika G. Siegieda , Jacek Panek and Magdalena Frąc *

Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin, Poland; d.malarczyk@ipan.lublin.pl (D.G.S.); j.panek@ipan.lublin.pl (J.P.)
* Correspondence: m.frac@ipan.lublin.pl



Citation: Siegieda, D.G.; Panek, J.; Frąc, M. “Shining a LAMP” (Loop-Mediated Isothermal Amplification) on the Molecular Detection of Phytopathogens *Phytophthora* spp. and *Phytophthora cactorum* in Strawberry Fields. *Pathogens* **2021**, *10*, 1453. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111453>

Academic Editor: Kevin D. Hyde

Received: 27 October 2021

Accepted: 9 November 2021

Published: 10 November 2021

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Phytopathogenic microorganisms belonging to the genus *Phytophthora* have been recognized many times as causal agents of diseases that lower the yield of many plants important for agriculture. Meanwhile, *Phytophthora cactorum* causes crown rot and leather rot of berry fruits, mainly strawberries. However, widely-applied culture-based methods used for the detection of pathogens are time-consuming and often inaccurate. What is more, molecular techniques require costly equipment. Here we show a rapid and effective detection method for the aforementioned targets, deploying a simple molecular biology technique, Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). We optimized assays to amplify the translation elongation factor 1- α (EF1 α) gene for two targets: *Phytophthora* spp. and *Phytophthora cactorum*. We optimized the LAMP on pure strains of the pathogens, isolated from organic plantations of strawberry, and successfully validated the assay on biological material from the environment including soil samples, rhizosphere, shoots and roots of strawberry, and with SYBR Green. Our results demonstrate that a simple and reliable molecular detection method, that requires only a thermoblock and simple DNA isolation kit, can be successfully applied to detect pathogens that are difficult to separate from the field. We anticipate our findings to be a starting point for developing easier and faster modifications of the isothermal detection methods and which can be applied directly in the plantation, in particular with the use of freeze-dried reagents and chemistry, allowing observation of the results with the naked eye.

Keywords: Loop-Mediated Isothermal Amplification; *Phytophthora cactorum*; *Phytophthora* spp.; rhizosphere; soil; shoots; roots; simple detection

1. Introduction

The reduction in harvest during the production of fruits, caused by pathogenic microorganisms and the diseases they bring to the plantation, is a severe obstacle in agriculture. *Phytophthora* species have been reported as causal agents for diseases in many crops and ornamental plants in the world [1–6]. The number of species recognized inside the genus and their hosts is constantly increasing [7,8], whereas *P. cactorum* has been reported as a soil-borne pathogen causing dieback mainly of the strawberry (*Fragaria × ananassa*) by both crown rot and leather rot of fruits [9]. The disease symptoms brought by *P. cactorum* are often misrecognized as those caused by different fungal pathogens. What is more, the pathogen has been recognized as being able to transmit not only on machine parts used in agriculture, but also in nursery seedlings and by water [10]. Finally, the *Phytophthora* spp. are not host-specific and can attack many plants, causing their dieback [1]. These four facts increase the severity of the infestation of fields with these pathogenic microorganisms. To implement appropriate preventive methods in the plantations, rapid and efficient detection of phytopathogens present in the fields is crucial. Assays deploying molecular biology tech-

niques offer reliable and immediate detection in comparison to traditional identification methods based on the morphological attributes of the pure strains [11–14].

Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) is a highly effective isothermal DNA amplification technique, developed by Notomi's team in 2000. The assay uses thermostable polymerase with a strand-displacement activity and two to three pairs of primers to amplify specific DNA fragments [15]. LAMP is characterized by four main advantages in comparison to other molecular techniques used for the detection of pathogens. First of all, the reaction is performed at a constant temperature; it does not require an expensive thermocycler and a water bath or thermoblock is sufficient to carry out the detection. Further, for the visualization of the results with the naked eye, fluorescent dye, such as SYBR Green I or hydroxy naphthol blue (HNB), can be added to the reaction mixture. Next, LAMP is 10–100 times more sensitive than Polymerase Chain Reaction [16] and requires lower amounts of input DNA. Finally, PCR inhibitors do not prevent detection with LAMP [17]. On the other hand, the main disadvantage of the technique is the fact, that the design of primers is complex, which restricts the development and optimization of the method only to specialists [18]. Nonetheless, this assay can be performed by non-specialists with ease. The usefulness of the reaction is also given by the fact that, with the use of a simple thermoblock and a fluorescent dye, the assay is suitable for use outside a well-equipped laboratory, including detection in the field conditions [19]. Therefore, new amplification technologies are useful for the development of rapid and field-deployable approaches to genetic diagnostics [20].

Loop-Mediated Isothermal Amplification has already been deployed in the detection of important strawberry pathogens with success [21–28]. Additionally, the LAMP assay for the detection of *Phytophthora* spp. on many plants, such as cucumber [29], soybean [30,31], potato [32–36], tomato [33], taro plants [37], lettuce [38], tobacco [39] and *Rhododendron* trees [16], has been reported. Although there are now numerous examples of LAMP applications in agriculture [40,41], animal health [42], and human medicine [43], there is still the need to develop new assays for the detection of the pathogenic organisms, especially dedicated to specific plants such as strawberry or for native strains of microorganism. Optimising specific detection assays developed for plantations occurring in a particular geographic location is very important, because of the possible genetic variation of site- or plantation-specific strains of pathogens. It is important to remember that organic plantations are characterized by the specific composition of the microbiome and minerals present in the soil and cooccurring in plant tissues which can inhibit the reaction, so it is important to develop detection methods for a given plant and pathogen population. Moreover, approaches that are more sensitive and combine rapid amplification with specificity are becoming an important diagnostic tool, especially for biological samples from the environment (shoots, roots, fruits, rhizosphere, soil) originating from organic cultivation, where chemical agents are not used. Moreover, LAMP for the detection of *Phytophthora* spp. nor *Phytophthora cactorum* strains found in strawberry fields has not been proposed so far.

Considering the aforementioned facts, this study aimed to develop and optimize an effective Loop-Mediated Isothermal Amplification method for the detection of the *Phytophthora* spp. and *Phytophthora cactorum* pathogens, which are a threat to strawberry plantations.

2. Results

2.1. Specificity of the Developed Reaction

Optimized assays for both of the targets: *Phytophthora* spp. and *Phytophthora cactorum* gave positive results for 19 strains (G408/18, G409/18, G412/18, G413/18, G415/18, G416/18, G417/18, G418/18, G419/18, G420/18, G421/18, G429/18, G430/18, G431/18, G432/18, G437/18, G439/18, G440/18, G442/18) (Figure 1a,b). Both of the assays did not amplify non-template controls, as well as non-targeted DNA (Figure 1a,b). The time of detection-T_d (minute of the reaction when the maximum of the second derivative of normalized reporter value was reached) for positive reactions for *Phytophthora* spp.

was 13.16, SD \pm 0.83, and the T_m (melting temperature) was 89.92 °C, SD \pm 0.18 (n = 19). For *P.cactorum*, the T_d was 12.43, SD \pm 0.85, and the T_m was 89.77 °C, SD \pm 0.17 (n = 19) (T1, Supplementary Materials). Amplification plots for both of the targets are presented in Figure 1. Positive results for all of the tested *Phytophthora* spp. and *Phytophthora cactorum* strains suggest that the developed reaction is very specific. Melting curves of *Phytophthora* spp. and *Phytophthora cactorum* assays are pictured in the Figure 2a,b, with the peak of the signal at ~90 °C in positive reactions. Melting curves of chosen negative and positive reactions in biological samples from the environment for *Phytophthora* spp. (Figure 2c) and *Phytophthora cactorum* (Figure 2d) also showed peak signal at ~90 °C in positive reactions. The melting curve of non-targeted DNA samples (Figure 2e) shows the signal of primer-dimers at peak signal at ~63 °C.

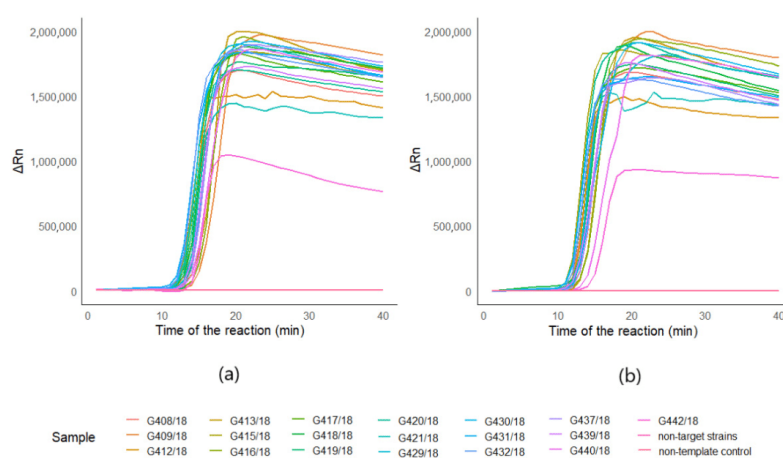


Figure 1. Amplification plots of LAMP detection. Amplification plots of 19 *Phytophthora* spp. (G408/18, G409/18, G412/18, G413/18, G415/18, G416/18, G417/18, G418/18, G419/18, G420/18, G421/18, G429/18, G430/18, G431/18, G432/18, G437/18, G439/18, G440/18, G442/18) pure strains and non-targeted DNA mixtures of *Botrytis* spp. (G276/18, G277/18, G321/18, G322/18, GG323/18), *Colletotrichum* spp. (G168/18, G170/18, G171/18, G172/18, G274/18) and *Verticillium* spp. (G294/18, G296/18, G297/18, G298, G299/18), deposited in the collection of LMEM; (a) amplification plots of the reaction for *Phytophthora cactorum* assay; (b) amplification plots of the reaction for *Phytophthora* spp. target.

2.2. Sensitivity of the Developed LAMP Assays

Agarose gels for the detection limit of *Phytophthora* spp. and *Phytophthora cactorum* conducted on the DNA isolated from the G408/18 strain are presented in Figure 3a,b. The detection of the *Phytophthora* spp. target was achieved in the samples with the concentration range from 0.3 ng/ μ L to 3 pg/ μ L for both of the tested isolation methods. *Phytophthora cactorum* assay was more sensitive, reaching the detection of 300 fg/ μ L for both of the isolation methods. What is more, no amplification was observed in non-template controls. The results suggest that the detection limit for the optimized reaction is 3 pg/ μ L for *Phytophthora* spp. and 300 fg/ μ L for *Phytophthora cactorum*, regardless of the tested DNA isolation method. Probit models of the positive reaction of the detection of *Phytophthora* spp. (n = 38) and *Phytophthora cactorum* (n = 38) are shown in Figure 3c,d, respectively.

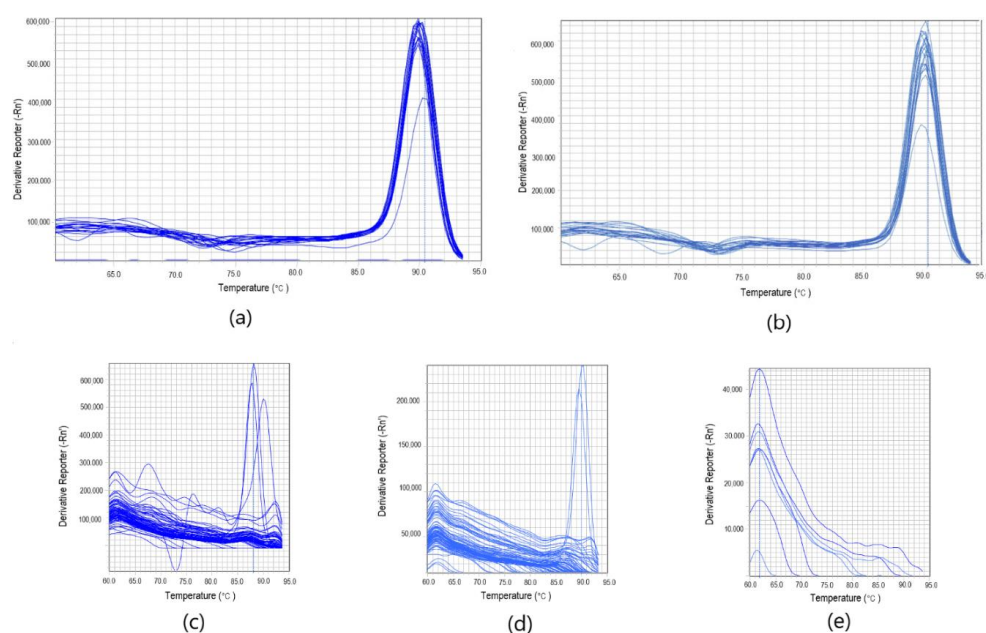


Figure 2. Melting curves of *Phytophthora* spp. (a) and *Phytophthora cactorum* (b) assays. Additionally, melting curves of chosen negative and positive reactions in biological samples from the environment for *Phytophthora* spp. (c) and *Phytophthora cactorum* (d) at peak signal at ~90 °C. The melting curve of non-targeted DNA samples including *Colletotrichum* spp., *Botrytis* spp. and *Verticillium* spp. (e) show the signal of the detection of primer-dimers at peak signal at ~63 °C.

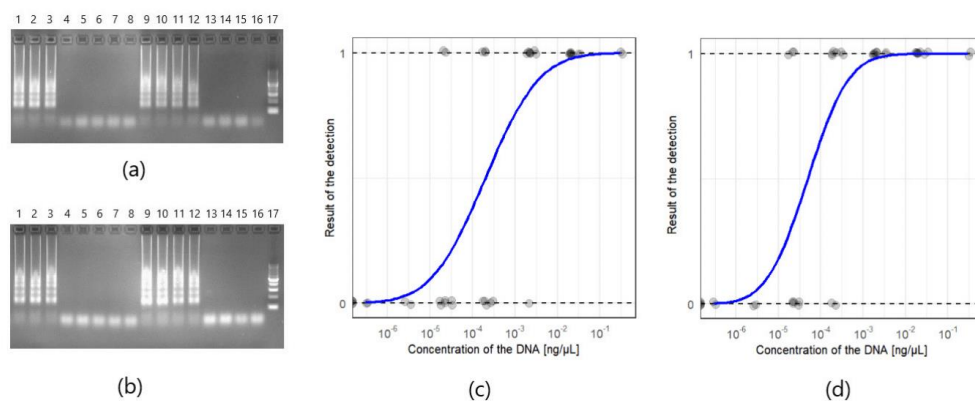


Figure 3. The detection limit of the LAMP detection method for *Phytophthora* spp. and *Phytophthora cactorum*: (a) Agarose gel of the detection limit of FastDNA Spin Kit for Feces kit (MP Biosystems) isolation method, for both targets *Phytophthora* spp. (wells 1–8) and *Phytophthora cactorum* (wells 9–16) of G408/18 strain. Order of the dilutions in each combination: 300 pg/μL (1 and 9), 30 pg/μL (2 and 10), 3 pg/μL (3 and 11), 300 fg/μL (4 and 12), 30 fg/μL (5 and 13) and 3 fg/μL (6 and 14), 300 ag/μL (7 and 15), NTC (non-template control, 8 and 16); (b) Agarose gel of the Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURx) isolation method. Well 17 in (a,b) New England BioLabs 50 bp DNA Ladder. Characteristic for LAMP ladder-like patterns are visible on the lanes with positive reactions (1, 2, 3, 9, 10, 11, and 12); (c) Probit model of probability of the positive detection of *Phytophthora* spp. ($n = 38$) depending on the concentration of the DNA (isolation of the DNA was performed with the PrepMan Ultra and FastDNA Spin Kit for Feces kit and Plant & Fungi DNA Purification Kit); (d) Probit model for *Phytophthora cactorum* assay ($n = 38$).

2.3. Colorimetric Validation

After the detection of *Phytophthora cactorum* performed on strains G415/18, G416/18, and G417/18 (each in duplicate) in the thermoblock, 1.5 μ L of SYBR Green I dye was added into each reaction tube with sterile pipette tips. Reaction mixtures immediately changed color from transparent to yellow in positive samples and into orange in the negative control (Figure 4a). After the examination under the UV light, the positive samples showed bright fluorescence, whereas negative samples were very low. An attempt at visualization of the reaction products in 2% agarose gel revealed ladders in positive reactions, which confirms amplification of LAMP products (Figure 4b).

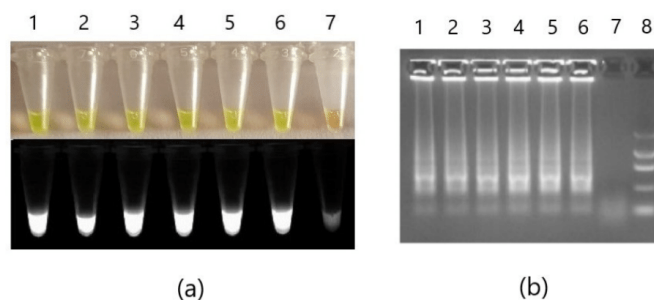


Figure 4. Colorimetric validation of the developed detection methods. LAMP detection for *Phytophthora cactorum* of strains G415/18 (1 and 4), G416/18 (2 and 5), and G417/18 (3 and 6) conducted in thermo-block in 65 °C for 30 min. After the reaction, SYBR Green I (1:9) dye was added to the mixtures for visualization of the results in visible light and UV (a). Samples were then electrophoresed in 2% agarose gel (b). Positive reactions samples 1-6; non-template control sample 7. Additionally, in (b), the A&A Marker I was added in well 8.

2.4. Biological Samples from the Environment

In both of the DNA samples of strain G408/18, detected with the *Phytophthora* spp. assay and isolated with FastDNA Spin Kit for Feces kit (MP Biomedicals) or Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURx), the detection time of the environmental sample contaminated with the DNA of G408/18 pure strain environmental sample lengthened in comparison to pure samples of G408/18. Namely, the time of the detection in Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURx) sample lengthened from the 17th to 30th minute and FastDNA Spin Kit for Feces kit (MP Biomedicals) from the 18th to 43rd (Figure 5a). What is more, the detection time of contaminated diluted reactions lengthened when compared to the reactions diluted in DirectQ water. Additionally, for the sample isolated with FastDNA Spin Kit for Feces kit (MP Biomedicals), T_m of contaminated diluted reaction decreased from 89.95 °C to 87.78 °C (Figure 5c). In the sample isolated with the Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURx) kit, no change of melting temperature was noted (Figure 5b). The detection of the targets in biological samples from the environment was extended to 90 min, due to the fact, that the inhibitors from the environment that co-isolate with the DNA extend the time required for the detection.

In the detection of *Phytophthora* spp. in biological samples from the environment, 4 out of 348 samples derived in organic plantations of strawberries located in Eastern Poland gave positive results (1%). All of the samples with positive detection came from four different plantations, where the symptoms of the disease have not been recognized in the year of the sampling. The 478/19 bulk soil sample on Aprica plantation from the field 13 and the detection started after 65th minute, and the T_m was 90.15 °C. Sample 490/19 was also a bulk soil sample of Aprica cultivar from field 14. Detection started after the 35th minute and the T_m was 87.77 °C. The sample 48/19C was a bulk soil sample from fields 1 and 2. The detection started after the 66th minute with the T_m of 88.18 °C. Finally,

positive sample 1632/20 was a fruit of Rumba cultivar, plantation 15, where the detection started after 66th minute and T_m was 90.32 °C (Table S1).

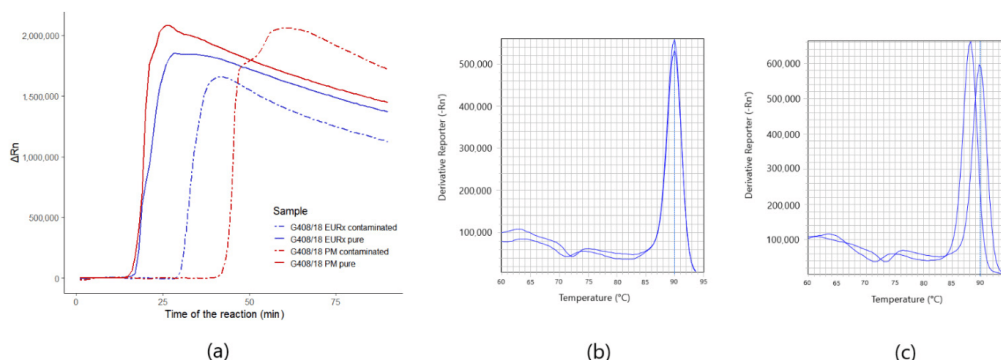


Figure 5. Amplification plots and melting curves of *Phytophthora* spp. assay: (a) amplification plots for the detection of *Phytophthora* spp. assay of pure G408/18 strain and contaminated biological material from the environment with the DNA of G408/18, isolated with FastDNA Spin Kit for Feces kit (MP) and Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURx); (b) melt curves of pure and contaminated samples isolated with FastDNA Spin Kit for Feces kit (MP Biomedicals); (c) melt curves of pure and contaminated material samples isolated with Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURx).

The *Phytophthora cactorum* assay gave positive results in 13 biological samples from the environment (4%). Sample 385K/19 was a root of an Aprica cultivar, plantation 4. The detection started from the 23rd minute, T_m was 91.09 °C; next, 449/19K for the root sample of Dipred from the plantation 10, where the previous year the symptoms of the disease caused by *Verticillium* spp. and *Phytophthora* spp. were identified. Detection time was 32 min and T_m was 90.13 °C. Sample 45/19C was bulk soil of Aprica cultivar, plantation 11. The remaining positive results were noted in the same field 15, and all of the samples were strawberry fruit samples. The time of detection ranged from 38 to 86 min and the T_m from 88.22 to 89.33 °C. (Table S1).

The peak of melting curves for the biological samples from the environment where the *Phytophthora* spp. gave positive results ranged from 87.77 to 90.32 °C, whereas for pure strains the range was 89.68–90.05 °C. For the *Phytophthora cactorum* assay performed on biological samples from the environment, the range of T_m was between 87.66 and 91.09 °C, whereas for pure samples this was within 89.5–90.05 °C.

3. Discussion and Conclusions

Rapid and efficient identification of the pathogens present in a given field is very important as it allows the implementation of proper protection methods and significantly reduces losses related to the spread of the disease caused by microorganisms. Common, traditional plate-culture-based methods, as well as the apple trap method described previously [44] and in this work (Figure 6) for the isolation of pure strains of microorganism from the environment, are characterized with many disadvantages. These methods require a long incubation time and are inconvenient for many samples tested at the same time, when it is necessary to quickly diagnose the disease and the quality of the plantation, taking into account soil, plant, and fruit. Traditional identification methods based on the observation of microstructures of pathogens do not offer sufficient certainty when it comes to valid identification, as opposed to molecular techniques [45]. On the contrary, molecular methods of identification allow detection of the contamination in the field with pathogens before the manifestation of the disease in plants. The presence or absence of a particular pathogen in the field can give a clear indication of whether to start a new plantation. What is more, the results of the molecular detection of the pathogen also give a clear answer whether undertaken agrotechnical measures aimed at the removal of pathogens were

effective. However, it is worth mentioning that, in some cases, it might be worth using trap methods and then to perform LAMP detection of these phytopathogens.

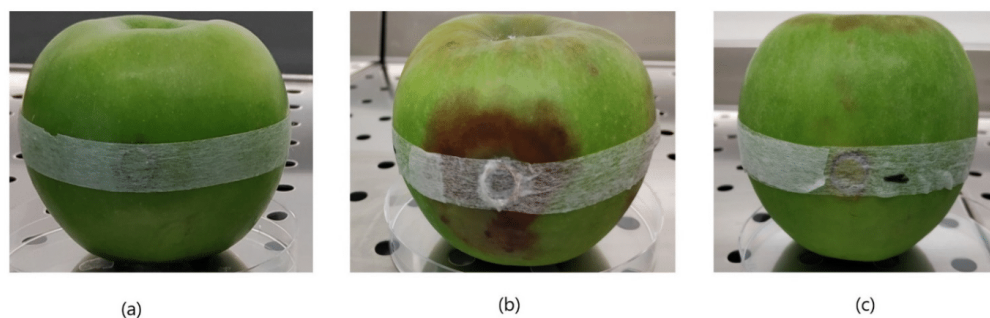


Figure 6. Apple trap method for baiting *Phytophthora* spp. pathogens. First, fragments of infected strawberry tissues were placed inside surface-sterilized apple fruit (a) and incubated at 22 °C for 10 d in a plastic bag. Infected apple tissues (b) changed color from green to brown, and softened. Negative control (c) remained unchanged.

For the molecular detection of the *Phytophthora* spp. with the Polymerase Chain Reaction (PCR), different markers were used, such as ITS1, ITS2 of ribosomal RNA [46–48], or cytochrome oxidase I gene (COX1) [49]. Nonetheless, the real-time PCR method was also optimized for the detection of this pathogen. ITS markers were deployed in the detection of *Phytophthora* spp. in strawberry plantations [50,51]. Enolase (ENOL), ras-like protein (YPT1), and HSP90 genes were also targeted for this aim [52]. Finally, Loop-Mediated Isothermal Amplification is a relatively new detection method, adopting molecular biology, and has been deployed many times in the detection of plant pathogenic fungi and oomycetes on various plants of agricultural significance [41,53–57]. The method has been reported as an efficient tool for the detection of strawberry pathogens, as in [23–27]. In 2017, Khan’s team compared the detection of *Phytophthora infestans* with PCR, nested PCR, real-time PCR, and LAMP with the application of primers for the YPT1 gene. The team concluded that the LAMP was the most sensitive assay out of the tested methods, being 10 times more sensitive than nested PCR and 100 times more sensitive compared to real-time PCR [58].

LAMP is characterized by several advantages, such as high sensitivity of the reaction, high specificity, and constant thermal conditions of the assay. Among them, the fact that the assay has the potential to be used in field conditions seems to be the most important in sustainable phytopathogen control. Due to the fact that the reaction does not require thermal cycling, as opposed to PCR or qPCR, the water bath or a thermoblock is sufficient to provide constant temperature in order to perform the analysis. As we tested 3 DNA isolation kits in the current study (FastDNA Spin Kit for Feces kit, MP Biomedicals, Plant & Fungi DNA Purification Kit, EURx, and PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent—Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific), we proved that the LAMP is not dependent on a specific DNA isolation method. Additionally, as reported in the past, direct evaluation of the results was performed with the addition of chemistry such as calcine [59], hydroxy naphthol blue (HNB) dye [60], or SYBR Green [54,61] as in this study, allowing observation of the change in the color of the positive samples by the naked eye or in ultraviolet light (UV). What is more, lyophilized forms of LAMP reagents [62] can be taken into consideration when talking about the in-field application of the method. Those facts suggest that the assay has a wide range of adaptation possibilities for current conditions in a given laboratory and outside the laboratory. The simplicity of the method application could lead to simple field-deployable products in the future, allowing for rapid detection of plant pathogens from the biological samples from the environment, without costly equipment and highly specialized laboratory staff.

In conclusion, the LAMP assay using primer sets developed in this study successfully detected *Phytophthora* spp. and *Phytophthora cactorum* isolates acquired from organic plantations of strawberry. Moreover, the LAMP assay using developed primers and optimized conditions detected these pathogens rapidly and simply in biological samples from the environment, collected from strawberry plantations. Therefore, the results demonstrated that the LAMP assay with developed primer sets can be used for routine detection and monitoring of strawberry plantations for the presence of *Phytophthora* spp. and *Phytophthora cactorum*.

4. Materials and Methods

4.1. Obtaining Pure Cultures of *Phytophthora* spp.

The phytopathogenic organisms used in the development of this assay were gained from organic plantations of strawberries located in Eastern Poland. Infected plant tissues were placed on Petri dishes with Carrot Agar (CA) or Potato Dextrose Agar (PDA) media and incubated at 22 °C until cultures appeared on the plates. Then, they were further subcultured onto new CA or PDA media until pure cultures were obtained [63]. As this method was not efficient enough for some of the strains, the apple trap method was also deployed (Figure 6), as reported in guidelines of the Main Inspectorate of Plant Health and Seed Inspection in Poland [44], to increase the effectiveness of *Phytophthora* spp. isolation. Granny Smith green apples were washed with detergent water, rinsed with distilled water, and 70% ethanol, and, after such sterilization, fragments of strawberry roots identified visually as infected were placed in the slot in the apple fruit made with a sterile cork borer. The strawberry tissue was covered with cut-out apple tissue and then sealed with a porous adhesive tape (3M Micropore). An apple had three slots for infested roots, and negative control was also made on each trap with no diseased strawberry tissue inside. An apple trap was then placed in a plastic bag and incubated at 22 °C for 10 d [44]. Thereafter, infected apple tissues were placed on the PDA and further subcultured until pure cultures developed on the medium.

4.2. Isolation of the DNA from Pure Strains and Biological Samples from the Environment

For identification purposes as well as to determine the specificity of the reaction and the detection limit assay, the DNA of *Phytophthora* spp., *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp., and *Verticillium* spp. was isolated with PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), following the manufacturer's protocol. Then, the DNA samples were diluted 100 times in DirectQ water before the molecular analysis. Following, the D2 large subunit region of the fungal rDNA was amplified and sequenced as described by Pertile et al. [64] with a modified purification step, using Clean DTR (CleanNA, Qaddinxveen, Netherlands). The information regarding pure strains of *Phytophthora* spp., *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp., and *Verticillium* spp. used in this study is gathered in Table 1.

Isolation of the genomic DNA from pure strains of the *Phytophthora* sp. (G408/18) for the detection limit assays was performed with FastDNA Spin Kit for Feces kit (MP Biomedicals, Solon, OH, USA) and Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURx, Gdańsk, Poland). Before the isolation, pure strains of the pathogen were grown at 22 °C for 10 days in 15 mL conical flasks in Potato Dextrose Broth (PDB). After the incubation, the liquid cultures were centrifuged for 15 min in 4500 × g, the supernatant was discarded and cultures were washed with 5 mL sterile water three times. In the meantime, for the Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURx), homogenization tubes were prepared as described by Panek and Frac [65]: 2 mL cork-cap tubes were filled with 0.5 g of 3.15 mm diameter and 0.25 g of 1.4 mm diameter glass beads and sterilized. Then, the mycelium was sterilely transferred into the prepared tubes and homogenized with Fast-Prep instrument (MP Biomedicals) at 4 m/s for 10 s and the DNA was isolated according to the manufacturer's protocol. Obtained DNA was eluted with 100 µL of Tris-HCl buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) and stored at −22 °C until used.

Table 1. Fungal strains used for the LAMP assay development.

Fungal Genus	Isolate Code LMEM	Isolation Source	Method of Obtaining Pure Strain	The Accession Number of D2LSU Sequences in GenBank	The Accession Number of EF1 α Sequences in GenBank
<i>Phytophthora</i> spp.	G408/18 *	Strawberry plants, IA PAS	CA ^a	MT126670.1	MW715837
	G409/18 *	Strawberry plants, IA PAS	CA ^a	MT126671.1	MW715838
	G412/18 *	Strawberry roots, IA PAS	apple trap	MT126672.1	MW715839
	G413/18 *	Strawberry roots, IA PAS	apple trap	MT126673.1	MW715840
	G415/18 *	Strawberry roots, IA PAS	apple trap	MT126674.1	MW715841
	G416/18 *	Strawberry roots, IA PAS	apple trap	MT126675.1	MW715842
	G417/18 *	Strawberry roots, IA PAS	apple trap	MT126676.1	MW715843
	G418/18 *	Strawberry roots, IA PAS	apple trap	MT126677.1	MW715844
	G419/18 *	Strawberry plants, IA PAS	PDA ^b	MT126678.1	MW715845
	G420/18 *	Strawberry plants, IA PAS	PDA ^b	MT126679.1	MW715846
	G421/18 *	Strawberry plants, IA PAS	CA ^a	MT126680.1	MW715847
	G429/18 *	Strawberry roots, IA PAS	apple trap	MT126681.1	MW715848
	G430/18 *	Strawberry roots, IA PAS	apple trap	MT126682.1	MW715849
	G431/18 *	Strawberry plants, IA PAS	PDA ^b	MT126683.1	MW715850
	G432/18 *	Strawberry plants, IA PAS	PDA ^b	MT126684.1	MW715851
	G437/18 *	Strawberry roots, IA PAS	apple trap	MT126686.1	MW715852
G439/18 *	Strawberry roots, IA PAS	apple trap	MT126687.1	MW715853	
G440/18 *	Strawberry roots, IA PAS	apple trap	MT126688.1	MW715854	
G442/18 *	Strawberry roots, IA PAS	apple trap	MT126690.1	MW715855	
<i>Colletotrichum</i> spp.	G168/18	Strawberry fruits, IA PAS	PDA ^b	MT126804.1	-
	G170/18	Strawberry fruits, IA PAS	PDA ^b	MT126805.1	-
	G171/18	Strawberry fruits, IA PAS	PDA ^b	MT126802.1	-
	G172/18	Strawberry fruits, IA PAS	PDA ^b	MT126803.1	-
	G274/18	Strawberry fruits, IA PAS	PDA ^b	MT126807.1	-
<i>Botrytis</i> spp.	G276/18	Strawberry roots, IA PAS	PDA ^b	MT154303.1	-
	G277/18	Strawberry roots, IA PAS	PDA ^b	MT154304.1	-
	G321/18	Strawberry roots, IA PAS	PDA ^b	MT154305.1	-
	G322/18	Strawberry roots, IA PAS	PDA ^b	MT154306.1	-
	G323/18	Strawberry roots, IA PAS	PDA ^b	MT154307.1	-
<i>Verticillium</i> spp.	G294/18	Strawberry roots, IA PAS	PDA ^b	MT133317.1	-
	G296/18	Strawberry roots, IA PAS	PDA ^b	MT133320.1	-
	G297/18	Strawberry roots, IA PAS	PDA ^b	MT133316.1	-
	G298/18	Strawberry roots, IA PAS	PDA ^b	MT133318.1	-
	G299/18	Strawberry roots, IA PAS	PDA ^b	MT133319.1	-

* Fungal strains used for the in silico design of the primers; IA PAS: Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences; LMEM: Laboratory of Molecular and Environmental Microbiology, IA PAS; ^a: strain obtained with culturing of plant roots on Carrot Agar; ^b: strain obtained with culturing of plant roots on Potato Dextrose Agar.

For the DNA isolation with the FastDNA Spin Kit for Feces, washed mycelia were first placed into the 2 mL tubes with the 0.1 mm silica spheres, 1.4 mm ceramic spheres, 4 mm glass ball, 825 μ L phosphate buffer, and 275 μ L PLS reagent. The samples were then centrifuged for 5 min in 14,000 \times g and supernatant was discarded. Homogenization was conducted with FastPrep 24 instrument (20 s, 6 m/s) with the 978 μ L of sodium phosphate buffer and 122 μ L of MT buffer. After the centrifugation (15 min, 14,000 \times g), the supernatant was transferred into the new tube with 250 μ L of PPS buffer, mixed, and incubated (10 min, 4 $^{\circ}$ C). After another centrifugation (2 min, 14,000 \times g), the supernatant was transferred into a 5 mL tube with 1 mL of Binding Matrix Solution and mixed on a rotator for 5 min. The samples were then centrifuged (2 min, 14,000 \times g), the supernatant was discarded and the pellet was washed with 1 mL of Wash Buffer 1 and transferred into SPIN Filter columns. The samples were then centrifuged for 1 min in 14,000 \times g and the filtrate was discarded twice. The second wash was performed similarly, with 500 μ L of Wash Buffer 2 and 2 min

centrifuge run ($14,000 \times g$). Finally, 100 μL of the Elution buffer (TES) was pipetted onto the filter and centrifuged for 2 min ($14,000 \times g$). The obtained filtrate was then 10-fold diluted in nuclease-free deionized water and stored at -22°C until used. The quality and quantity of the genetic material isolated with both of the methods were verified by electrophoresis and with Nanodrop 2000 instrument (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

The DNA extraction from biological samples from the environment was conducted with the FastDNA Spin Kit for Feces kit, using 0.5 g of soil or 0.25 g of strawberry fruit tissue and according to the manufacture's protocol with modifications described earlier. Additionally, the homogenization was lengthened to 40 s. The filtrate obtained after the elution was 10-fold diluted in nuclease-free deionized water and stored at -22°C until performing a detection.

4.3. Primers Development and LAMP Optimization

For the LAMP assay development, the translation elongation factor 1-alpha (EF1 α) gene was chosen as a genetic marker after the GenBank database [66] review. Gene was sequenced as described by Fraç et al. [67]. Then, obtained sequences of EF1 α fragments of 19 *Phytophthora* spp. strains collected from strawberry plantations were deposited in GenBank (Table 1) and aligned in MEGA software [68] with several DNA fragments of different representatives from the genus, retrieved from the GenBank database [66]. Further, the possible LAMP primers were designed with the LAMP Designer v.1.13 software (OptiGene Limited, Horsham, UK) and validated in silico with BLAST [69]. All of the oligonucleotides were synthesized in Genomed S.A. (Warsaw, Poland). The Psp_Ef1a_F3 and Psp_Ef1a_B3 primers were used as outer primer pairs for both targets—*Phytophthora* spp. and *Phytophthora cactorum* (Patent applications P.437111 and P.437110, respectively). The information regarding sequences of the primers is gathered in Table 2 and the location of the primers in the contig of EF1 α gene fragment is presented in Figure 7.

LAMP assays for the method optimization were performed in the 7500 Fast thermocyclers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the total reaction volume was 10 μL . The mixture consisted of 6 μL of Isothermal MasterMix (ISO-001, OptiGene, Horsham, UK), 3 μL of primer mix (Table 2), and 1 μL of the DNA sample. The Isothermal MasterMix consisted of fluorescent dye detected by the FAM channel and an isothermal GspSSD polymerase with strand-displacement activity [24]. The reactions were conducted at 65°C for 40 min with the reading of the fluorescent signal after every minute. After every reaction, the melting curve analysis was performed (65°C to 95°C , $\Delta 0.016^\circ\text{C/s}$).

To determine the specificity of the reaction, both primer sets were tested on 19 *Phytophthora* spp. strains (G408/18, G409/18, G412/18, G413/18, G415/18, G416/18, G417/18, G418/18, G419/18, G420/18, G421/18, G429/18, G430/18, G431/18, G432/18, G437/18, G439/18, G440/18 and G442/18) isolated from organic plantations of strawberry and deposited in the Laboratory of Molecular and Environmental Microbiology (LMEM) collection (Table 1). Additionally, the reaction was carried out with the mix of the non-targeted DNA isolated from five strains of *Botrytis* spp. (G276/18, G277/18, G321/18, G322/18 and GG323/18), five strains of *Colletotrichum* spp. (G168/18, G170/18, G171/18, G172/18 and G274/18), and five strains of *Verticillium* spp. (G294/18, G296/18, G297/18, G298, and G299/18). Each of the representatives of non-targeted species was combined in an equal amount into one Eppendorf tube, then 1 μL of the non-targeted DNA mixture was added into reaction and run in identical conditions as targeted samples in biological triplicates.

Table 2. Sequences of the primers designed for the LAMP assays for the detection of *Phytophthora* spp. and *Phytophthora cactorum* (Patent applications P.437111 and P.437110, respectively).

Marker	Target	Primer Name *	The Sequence of the Primer 5'-3'	Concentration
translation elongation factor 1- α (EF1a) gene	<i>Phytophthora</i> spp.	Psp_Ef1a_F3	GTACTTCTTCACGGTCATTGA	0.2 μ M
		Psp_Ef1a_B3	GTACATGACAGACGAGTCG	
		Psp_Ef1a_FIP	AGCAACCACCAGrATGGC CAC CTGACTTCATCAAGAA	
	<i>Phytophthora cactorum</i>	Pca_Ef1a_FIP	AGCAACCACCAGGATGGC CAC GTGACTTCATCAAGAA	0.8 μ M
		Pca_Ef1a_BIP	TATCTCCAAGGA ACrATCATCTGCTTCA CAC	
		Pca_Ef1a_LoopF Pca_Ef1a_LoopB	TATCTCCAAGGA ACrATCATCTGCTTCA CAC CTGCGAGGTACCCGTAATC TGCTTGCCTTCACTCTGG	

* Both sets of primers have the same F3 and B3 primer pair.

4.4. Detection Limit

To establish the detection limit for the optimized reactions, serial 10-fold dilutions of the DNA isolated with three different isolation kits were prepared. Pure strain G408/18 isolated with FastDNA Spin Kit for Feces kit and Plant & Fungi DNA Purification Kit DNA concentrations of 300 pg/ μ L, 30 pg/ μ L, 3 pg/ μ L, 300 fg/ μ L, 30 fg/ μ L, and 3 fg/ μ L were added into the reaction mixtures for *Phytophthora* spp. and *Phytophthora cactorum* assays and fluorescent signal was measured during reactions. Additionally, electrophoresis in the agarose gel (2%, 6 V/cm, 40 min) with Color Load (10 x, EURx, Gdańsk, Poland) and the Marker I (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland) was conducted for the initial check of results (Figure 4). Further, serial 10-fold dilutions of the G415/18, G416/18, and G417/18 strains isolated with PrepMan Ultra were made with sterilized DirectQ water. Starting concentration of the DNA dilutions was 20 pg/ μ L and the lowest 20 fg/ μ L. Probit model of the positive result of the detection of *Phytophthora* spp. and *Phytophthora cactorum* was calculated using RStudio v.1.4.1103 with 43 observations for each assay.

4.5. Colorimetric Approach

To ensure the usefulness of the developed method for the detection of *Phytophthora* spp. and *Phytophthora cactorum* pathogens outside well-equipped conditions, reaction with undiluted strains G415/18, G416/18, and G417/18 was carried out in the thermo-block (ThermoStat Plus, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) at 65 °C for 30 min. To improve the visualization of the results with the naked eye, the reaction was conducted in 20 μ L and 1.5 μ L of 10 times diluted SYBR Green I (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) was added after the reaction, as the dye inhibits the reaction. Reaction results were also visualized on an agarose gel (2%, 6 V/cm, 40 min) and in UV light (Figure 4).

4.6. Validation of the Assay in Biological Samples from the Environment

As it is known, contaminants derived from biological samples from the environment may co-isolate during the DNA extraction. The reaction verifying how the contaminants of the DNA samples isolated from the environment may affect the effectiveness of the reaction was performed. For this purpose, two samples of the DNA, isolated with MP Biomedicals kit and EURx Plant and Fungi isolation kit from a pure sample of G408/18 were added into the environmental sample (recognized as not contaminated with *Phytophthora* spp. beforehand) in 1:9 proportion. Additionally, pure samples of the G408/18 were as well diluted 10-fold in sterile water. Then, the detection of *Phytophthora* spp. was performed on four types of samples: pure strain isolated with EURx, a pure strain isolated with MP, environmental sample contaminated with the G408/18 isolated with EURx, and environmental sample contaminated with the G408/18 isolated with MP. The results

obtained during this step were then employed to decide if it is reasonable to increase the length of the environmental assay due to loss of the reaction sensitivity.

Phytophthora spp.

```

>> Psp_Efla_F3 >> >> Pca_Efla_FIP 2 >> <<
1 TGAAGTTCGAGTCCCCCAA<TACTTCTTCACGGTCATTGA>CGCCCCCTGGT<CACCGTGACTTCATCAAGAA>CATGA
1 ACTTCAAGCTCAGGGGGTTCATGAAGAAGTGCCAGTAACTGCGGGGACCAGTGGCACTGAAGTAGTCTTGTACT

<Pca_Efla_LoopF<< <<Pca_Efla_FIP 1<< >Pca_Efla_BIP 1
76 TTACGGGTACCTCGCAGGCCGACTGCGCCATCCTGGTGGTGTGCTTCGGGCGTGGGTGAGTTYGARGCTGGTATCT
76 AATGCCCR<TGGAGCGTC>CGGCTGAC<CGGTAGGACCACCAACGA>AGCCCGCACCCACTCAARCTTCGACCATAGA

>> >>Pca_Efla_LoopB>><<Pca_Efla_BIP 2 <<
151 CCAAGGAGGGCCAGACYCGTGAGCACGCTC<TGCTTGCCCTTCACCTCTGG>GTGTGAAGCAGATGATCGTCGCCATCA
151 GGTTCCTCCCGGTCTGRGCACTCGTGCGAGACGAACGGAAGTGAGACC<CACACTTCGTCTACTARCA>GCGGTAGT

<< Psp_Efla_B3 <<
226 ACAAGATGGACGACTCGTCTGTCATGTACGGCA
226 TGTTCTACCT<CTGAGCAGACAGTACATC>CCGT

```

Phytophthora cactorum

```

>> Psp_Efla_F3 >> >> Pca_Efla_FIP 2 >> <<
1 TGAAGTTCGAGTCCCCCAA<TACTTCTTCACGGTCATTGA>CGCCCCCTGGT<CACCGTGACTTCATCAAGAA>CATGA
1 ACTTCAAGCTCAGGGGGTTCATGAAGAAGTGCCAGTAACTGCGGGGACCAGTGGCACTGAAGTAGTCTTGTACT

<Pca_Efla_LoopF<< <<Pca_Efla_FIP 1<< >Pca_Efla_BIP 1
76 TTACGGGTACCTCGCAGGCCGACTGCGCCATCCTGGTGGTGTGCTTCGGGCGTGGGTGAGTTYGARGCTGGTATCT
76 AATGCCCR<TGGAGCGTC>CGGCTGAC<CGGTAGGACCACCAACGA>AGCCCGCACCCACTCAARCTTCGACCATAGA

>> >>Pca_Efla_LoopB>><<Pca_Efla_BIP 2 <<
151 CCAAGGAGGGCCAGACYCGTGAGCACGCTC<TGCTTGCCCTTCACCTCTGG>GTGTGAAGCAGATGATCGTCGCCATCA
151 GGTTCCTCCCGGTCTGRGCACTCGTGCGAGACGAACGGAAGTGAGACC<CACACTTCGTCTACTARCA>GCGGTAGT

<< Psp_Efla_B3 <<
226 ACAAGATGGACGACTCGTCTGTCATGTACGGCA
226 TGTTCTACCT<CTGAGCAGACAGTACATC>CCGT

```

Figure 7. The localization of primers in the fragment of EF1 α gene chosen for detection of *Phytophthora* spp. and *Phytophthora cactorum* on contig of sequences of *Phytophthora* spp. strains used for the design of primers.

For validation of the usefulness of the developed detection method and its potential applicability, the assay was performed on 348 various biological samples from the environment derived from organic plantations of strawberries in July 2019 and 2020. The samples collected in 2019 were divided into categories, according to the plantation (14 different plantations), cultivars of strawberry: (Honey, Aprica, and Dipred), and type of the collected sample (rhizosphere, bulk soil, strawberry roots, and shoots). Samples collected in 2020 were all samples of strawberry fruits. The information regarding collected biological samples from the environment and positive results are gathered in Table S2.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pathogens10111453/s1>, Table S1: The time of detection-Td (minute of the reaction when the maximum of 2nd derivative of normalized reporter value was reached), and Tm (melting temperature) for positive reactions for *Phytophthora* spp. and *Phytophthora cactorum*; Table S2: Results

of the detection of *Phytophthora* spp. and *Phytophthora cactorum* in environmental samples of organic strawberry fields. samples collected in 2019 and 2020.

Author Contributions: Conceptualization, M.F., J.P. and D.G.S.; methodology, J.P., D.G.S. and M.F.; software, J.P. and D.G.S.; formal analysis, D.G.S. and J.P.; investigation, D.G.S. and J.P.; resources, M.F.; writing—original draft preparation, D.G.S.; writing—review and editing, J.P. and M.F.; visualization, D.G.S.; supervision, M.F.; project administration, M.F.; funding acquisition, M.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This paper was financed by The National Centre for Research and Development in frame of the project BIOSTRATEG, contract number BIOSTRATEG3/344433/16/NCBR/2018.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Meszka, B.; Michalecka, M. Identification of *Phytophthora* spp. isolated from plants and soil samples on strawberry plantations in Poland. *J. Plant Dis. Prot.* **2016**, *123*, 29–36. [\[CrossRef\]](#)
- Wilcox, W.F.; Scott, P.H.; Hamm, P.B.; Kennedy, D.M.; Duncan, J.M.; Brasier, C.M.; Hansen, E.M. Identity of a *Phytophthora* species attacking raspberry in Europe and North America. *Mycol. Res.* **1993**, *97*, 817–831. [\[CrossRef\]](#)
- Weiland, J.E.; Benedict, C.; Zasada, I.A.; Scagel, C.R.; Beck, B.R.; Davis, A.; Graham, K.; Peetz, A.; Martin, R.R.; Dung, J.K.S.; et al. Late-summer disease symptoms in western Washington red raspberry fields associated with co-occurrence of *Phytophthora rubi*, *Verticillium dahliae* and *Pratylenchus penetrans*, but not raspberry bushy dwarf virus. *Plant Dis.* **2018**, *102*, 938–947. [\[CrossRef\]](#)
- Gigot, J.; Walters, T.W.; Zasada, I.A. Impact and Occurrence of *Phytophthora rubi* and *Pratylenchus penetrans* in commercial red raspberry (*Rubus idaeus*) fields in Northwestern Washington. *Int. J. Fruit Sci.* **2013**, *13*, 357–372. [\[CrossRef\]](#)
- Polashock, J.J.; Caruso, F.L.; Oudemans, P.V.; McManus, P.S.; Crouch, J.A. The North American cranberry fruit rot fungal community: A systematic overview using morphological and phylogenetic affinities. *Plant Pathol.* **2009**, *58*, 1116–1127. [\[CrossRef\]](#)
- Tan, J.; Li, Q.; Chen, L.; Zhang, Y.; Zhang, Y.; Zhou, L. Study on the migration of *Phytophthora nicotianae* zoospores in the soil. *Int. J. Agric. Biol.* **2018**, *20*, 397–403. [\[CrossRef\]](#)
- Kroon, L.P.N.M.; Brouwer, H.; de Cock, A.W.A.M.; Govers, F. The genus *Phytophthora* anno 2012. *Phytopathology* **2012**, *102*, 348–364. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Martin, F.N.; Abad, Z.G.; Balci, Y.; Ivors, K. Identification and detection of *Phytophthora*: Reviewing our progress, identifying our needs. *Plant Dis.* **2012**, *96*, 1080–1103. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Maas, J.L. *Compendium of Strawberry Diseases*, 2nd ed.; American Phytopathological Society (APS Press): St. Paul, MN, USA, 1998; ISBN 0890541949.
- Orlikowski, L.B.; Trzewik, A.; Ptaszek, M.; Orlikowska, T. Relationship between source of water, occurrence, and pathogenicity of *Phytophthora plurivora*. *Acta Mycol.* **2013**, *47*, 3–9. [\[CrossRef\]](#)
- Narayananasamy, P. Detection of fungal pathogens in plants. In *Microbial Plant Pathogens—Detection and Disease Diagnosis: Fungal Pathogens*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2011; Volume 1, pp. 5–199, ISBN 9789048197682.
- Frac, M.; Jezierska-Tys, S.; Yaguchi, T. Occurrence, detection, and molecular and metabolic characterization of heat-resistant fungi in soils and plants and their risk to human health. *Adv. Agron.* **2015**, *132*, 161–204.
- Larkin, R.P.; Ristaino, J.B.; Campbell, L.C. Detection and quantification of *Phytophthora capsici* in soil. *Am. Phytopathol. Soc.* **1995**, *85*, 1057–1063. [\[CrossRef\]](#)
- Capote, N.; Pastrana, M.A.; Aguado, A.; Sanchez-Torres, P. Molecular tools for detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance. *Plant Pathol.* **2012**, *151*–202. [\[CrossRef\]](#)
- Notomi, T.; Okayama, H.; Masubuchi, H.; Yonekawa, T.; Watanabe, K.; Amino, N.; Hase, T. Loop mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, e63. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Tomlinson, J.A.; Dickinson, M.J.; Boonham, N. Rapid detection of *Phytophthora ramorum* and *P. kernoviae* by two-minute DNA extraction followed by isothermal amplification and amplicon detection by generic lateral flow device. *Phytopathology* **2010**, *100*, 143–149. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kaneko, H.; Kawana, T.; Fukushima, E.; Suzutani, T. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2007**, *70*, 499–501. [\[CrossRef\]](#)
- Le, D.T.; Vu, N.T. Progress of loop-mediated isothermal amplification technique in molecular diagnosis of plant diseases. *Appl. Biol. Chem.* **2017**, *60*, 169–180. [\[CrossRef\]](#)
- Wilisiani, F.; Tomiyama, A.; Katoh, H.; Hartono, S.; Neriya, Y.; Nishigawa, H.; Natsuaki, T. Development of a LAMP assay with a portable device for real-time detection of begomoviruses under field conditions. *J. Virol. Methods* **2019**, *265*, 71–76. [\[CrossRef\]](#)

20. Miles, T.D.; Martin, F.N.; Coffey, M.D. Development of rapid isothermal amplification assays for detection of *Phytophthora* spp. In Plant Tissue. *Phytopathology* **2015**, *105*, 265–278. [[CrossRef](#)]
21. Frisch, L.M.; Mann, M.A.; Marek, D.N.; Niessen, L. Development and optimization of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the species-specific detection of *Penicillium expansum*. *Food Microbiol.* **2021**, *95*, 103681. [[CrossRef](#)]
22. Wang, H.; Turechek, W.W. A loop-mediated isothermal amplification assay and sample preparation procedure for sensitive detection of *Xanthomonas fragariae* in strawberry. *PLoS ONE* **2016**, *11*, 1–21. [[CrossRef](#)]
23. Karimi, K.; Arzanlou, M.; Pertot, I. Development of novel species-specific primers for the specific identification of *Colletotrichum nymphaeae* based on conventional PCR and LAMP techniques. *Eur. J. Plant Pathol.* **2019**, *463*–475. [[CrossRef](#)]
24. Panek, J.; Fraç, M. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) approach for detection of heat-resistant *Talaromyces flavus* species. *Sci. Rep.* **2019**, 1–8. [[CrossRef](#)]
25. Wu, J.Y.; Hu, X.R.; Zhang, C.Q. Molecular detection of QoI resistance in *colletotrichum gloeosporioides* causing strawberry anthracnose based on loop-mediated isothermal amplification assay. *Plant Dis.* **2019**, *103*, 1319–1325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Zhang, X.; Harrington, T.C.; Batzer, J.C.; Kubota, R.; Peres, N.A.; Gleason, M.L. Detection of *Colletotrichum acutatum* sensu lato on strawberry by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Plant Dis.* **2016**, *100*, 1804–1812. [[CrossRef](#)]
27. Katoh, H.; Fukuda, T.; Nishigawa, H.; Natsuaki, T. Rapid detection of *Colletotrichum gloeosporioides* in infected strawberry plants using loop-mediated isothermal amplification. *J. Gen. Plant Pathol.* **2016**, *82*, 190–198. [[CrossRef](#)]
28. Duan, Y.B.; Ge, C.Y.; Zhang, X.K.; Wang, J.X.; Zhou, M.G. Development and evaluation of a novel and rapid detection assay for *Botrytis cinerea* based on loop-mediated isothermal amplification. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e111094. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Chen, Q.; Li, B.; Liu, P.; Lan, C.; Zhan, Z.; Weng, Q. Development and evaluation of specific PCR and LAMP assays for the rapid detection of *Phytophthora melonis*. *Eur. J. Plant Pathol.* **2013**, *137*, 597–607. [[CrossRef](#)]
30. Dai, T.T.; Lu, C.C.; Lu, J.; Dong, S.M. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Phytophthora sojae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2012**, *334*, 27–34. [[CrossRef](#)]
31. Zhao, W.; Wang, T.; Qi, R. Ypt1 gene-based detection of *Phytophthora sojae* in a loop-mediated isothermal amplification assay. *J. Plant Dis. Prot.* **2015**, *122*, 66–73. [[CrossRef](#)]
32. Kong, L.; Wang, H.; Wang, S.; Xu, P.; Zhang, R.; Dong, S.; Zheng, X. Rapid detection of potato late blight using a loop-mediated isothermal amplification assay. *J. Integr. Agric.* **2020**, *19*, 1274–1282. [[CrossRef](#)]
33. Ristaino, J.B.; Saville, A.C.; Paul, R.; Cooper, D.C.; Wei, Q. Detection of *Phytophthora infestans* by Loop-Mediated Isothermal Amplification, Real-Time LAMP, and Droplet Digital PCR. *Plant Dis.* **2020**, *104*, 708–716. [[CrossRef](#)]
34. Verma, G.; Sharma, S.; Raigond, B.; Pathania, S.; Naga, K.; Chakrabarti, S.K. Development and application of fluorescent loop mediated isothermal amplification technique to detect *Phytophthora infestans* from potato tubers targeting ITS-1 region. *3 Biotech* **2019**, *9*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Lees, A.K.; Roberts, D.M.; Lynott, J.; Sullivan, L.; Brierley, J.L. Real-Time PCR and LAMP Assays for the Detection of Spores of *Alternaria solani* and Sporangia of *Phytophthora infestans* to Inform Disease Risk Forecasting. *Plant Dis.* **2019**, *103*, 3172–3180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Si Ammour, M.; Bilodeau, G.J.; Tremblay, D.M.; van der Heyden, H.; Yaseen, T.; Varvaro, L.; Carisse, O. Development of real-time isothermal amplification assays for on-site detection of *Phytophthora infestans* in potato leaves. *Plant Dis.* **2017**, *101*, 1269–1277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Feng, W.; Otsubo, K.; Hieno, A.; Suga, H.; Kageyama, K. A simple loop-mediated isothermal amplification assay to detect *Phytophthora colocasiae* in infected taro plants. *J. Gen. Plant Pathol.* **2019**, *85*, 337–346. [[CrossRef](#)]
38. Feng, W.; Hieno, A.; Kusunoki, M.; Suga, H.; Kageyama, K. LAMP detection of four plant-pathogenic oomycetes and its application in lettuce fields. *Plant Dis.* **2019**, *103*, 298–307. [[CrossRef](#)]
39. Li, B.; Liu, P.; Xie, S.; Yin, R.; Weng, Q.; Chen, Q. Specific and sensitive detection of *Phytophthora nicotianae* by nested PCR and loop-mediated isothermal amplification assays. *J. Phytopathol.* **2015**, *163*, 185–193. [[CrossRef](#)]
40. Zhang, S.Y.; Dai, D.J.; Wang, H.D.; Zhang, C.Q. One-step loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the rapid and sensitive detection of *Fusarium fujikuroi* in bakanae disease through NRPS31, an important gene in the gibberellic acid biosynthesis. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–9. [[CrossRef](#)]
41. Winkworth, R.C.; Nelson, B.C.W.; Bellgard, S.E.; Probst, C.M.; McLenachan, P.A.; Lockhart, P.J. A LAMP at the end of the tunnel: A rapid, field deployable assay for the kauri dieback pathogen, *Phytophthora agathidicida*. *PLoS ONE* **2020**, *15*, 1–16.
42. Tumino, S.; Tolone, M.; Parco, A.; Puleio, R.; Arcoleo, G.; Manno, C.; Nicholas, R.A.J.; Loria, G.R. Validation of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Field Tool for Rapid and Sensitive Diagnosis of Contagious Agalactia in Small Ruminants. *Animals* **2020**, *10*, 509. [[CrossRef](#)]
43. García-Bernalt Diego, J.; Fernández-Soto, P.; Crego-Vicente, B.; Alonso-Castrillejo, S.; Febrer-Sendra, B.; Gómez-Sánchez, A.; Vicente, B.; López-Abán, J.; Muro, A. Progress in loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Schistosoma mansoni* DNA: Towards a ready-to-use test. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–11.
44. Szkuta, G. Część II—izolacja i identyfikacja. In *Phytophthora Cactorum—Sprawca Zgnilizny Korony Truskawki*; Państwowa Inspekcja Ochrony Roślin i Nasiennictwa Główny Inspektorat: Warszawa, Poland, 2005; pp. 1–10.
45. Arbefeville, S.; Harris, A.; Ferrieri, P. Comparison of sequencing the D2 region of the large subunit ribosomal RNA gene (MicroSEQ[®]) versus the internal transcribed spacer (ITS) regions using two public databases for identification of common and uncommon clinically relevant fungal species. *J. Microbiol. Methods* **2017**, *140*, 40–46. [[CrossRef](#)]

46. Cooke, D.E.L.; Duncan, J.M. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on ITS1 and ITS2 sequences of the ribosomal RNA gene repeat. *Mycol. Res.* **1997**, *101*, 667–677. [[CrossRef](#)]
47. Polashock, J.J.; Vaiciunas, J.; Oudemans, P.V. Identification of a new *Phytophthora* species causing root and runner rot of cranberry in New Jersey. *Phytopathology* **2005**, *95*, 1237–1243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Bienapfl, J.C.; Balci, Y. Movement of *Phytophthora* spp. in Maryland's Nursery Trade. *Plant Dis.* **2014**, *98*, 134–144. [[CrossRef](#)]
49. Cooke, D.E.L.; Drenth, A.; Duncan, J.M.; Wagels, G.; Brasier, C.M. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genet. Biol.* **2000**, *30*, 17–32. [[CrossRef](#)]
50. Ozyilmaz, U.; Benlioglu, K.; Yildiz, A.; Benlioglu, H.S. Effects of soil amendments combined with solarization on the soil microbial community in strawberry cultivation using quantitative real-time PCR. *Phytoparasitica* **2016**, *44*, 661–680. [[CrossRef](#)]
51. Pastrana, A.M.; Basallote-Ureba, M.J.; Aguado, A.; Capote, N. Potential inoculum sources and incidence of strawberry soilborne pathogens in Spain. *Plant Dis.* **2017**, *101*, 751–760. [[CrossRef](#)]
52. Liao, F.; Zhang, Y.; Zhu, L.-H.; Cao, B.; Lv, D.; Luo, J.-F.; Li, G.-R. Triplex real-time PCR detection of three quarantine *Phytophthora* pathogens infecting *Malus Miller*. *J. Plant Dis. Prof.* **2018**, *125*, 325–330. [[CrossRef](#)]
53. Lan, C.; Yao, J.; Yang, X.; Ruan, H.; Yu, D.; Jiang, J. Specific and sensitive detection of the guava fruit anthracnose pathogen (*Colletotrichum gloeosporioides*) by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Can. J. Microbiol.* **2020**, *66*, 17–24. [[CrossRef](#)]
54. Li, G.R.; Huang, G.M.; Zhu, L.H.; Lv, D.; Cao, B.; Liao, F.; Luo, J.F. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) detection of *Phytophthora hibernalis*, *P. syringae* and *P. cambivora*. *J. Plant Pathol.* **2019**, *101*, 51–57. [[CrossRef](#)]
55. Moradi, A.; Almasi, M.A.; Jafary, H.; Mercado-Blanco, J. A novel and rapid loop-mediated isothermal amplification assay for the specific detection of *Verticillium dahliae*. *J. Appl. Microbiol.* **2014**, *116*, 942–954. [[CrossRef](#)]
56. Duan, Y.B.; Yang, Y.; Li, M.X.; Li, T.; Fraaije, B.A.; Zhou, M.G. Development and application of a simple, rapid and sensitive method for detecting moderately carbendazim-resistant isolates in *Botrytis cinerea*. *Ann. Appl. Biol.* **2018**, *172*, 355–365. [[CrossRef](#)]
57. Aslam, S.; Tahir, A.; Aslam, M.F.; Alam, M.W.; Shedayi, A.A.; Sadia, S. Recent advances in molecular techniques for the identification of phytopathogenic fungi—A mini review. *J. Plant Interact.* **2017**, *12*, 493–504. [[CrossRef](#)]
58. Khan, M.; Li, B.; Jiang, Y.; Weng, Q.; Chen, Q. Evaluation of different PCR-based assays and LAMP method for rapid detection of *Phytophthora infestans* by targeting the Ypt1 gene. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1–11. [[CrossRef](#)]
59. Zhou, D.; Guo, J.; Xu, L.; Gao, S.; Lin, Q.; Wu, Q.; Wu, L.; Que, Y. Establishment and application of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) system for detection of cry1Ac transgenic sugarcane. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Chen, H.-W.; Weissenberger, G.; Atkins, E.; Chao, C.-C.; Suputtamongkol, Y.; Ching, W.-M. Highly Sensitive Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Detection of *Leptospira*. *Int. J. Bacteriol.* **2015**, *2015*, 1–6. [[CrossRef](#)]
61. Tian, Q.; Lu, C.; Wang, S.; Xiong, Q.; Zhang, H.; Wang, Y.; Zheng, X. Rapid diagnosis of soybean anthracnose caused by *Colletotrichum truncatum* using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Eur. J. Plant Pathol.* **2017**, *148*, 785–793. [[CrossRef](#)]
62. Chen, H.W.; Weissenberger, G.; Ching, W.M. Development of lyophilized loop-mediated isothermal amplification reagents for the detection of *Leptospira*. *Mil. Med.* **2016**, *181*, 227–231. [[CrossRef](#)]
63. Malarczyk, D.G.; Panek, J.; Fraç, M. Triplex Real-Time PCR Approach for the Detection of Crucial Fungal Berry Pathogens—*Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8469. [[CrossRef](#)]
64. Pertile, G.; Panek, J.; Oszust, K.; Siczek, A.; Fraç, M. Intraspecific functional and genetic diversity of *Petriella setifera*. *PeerJ* **2018**, *6*, e4420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Panek, J.; Fraç, M. Development of a qPCR assay for the detection of heat-resistant *Talaromyces flavus*. *Int. J. Food Microbiol.* **2018**, *270*, 44–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Benson, D.A.; Cavanaugh, M.; Clark, K.; Karsch-Mizrachi, I.; Lipman, D.J.; Ostell, J.; Sayers, E.W. GenBank. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 36–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Fraç, M.; Oszust, K.; Lipiec, J.; Jezierska-Tys, S.; Nwaichi, E.O. Soil microbial functional and fungal diversity as influenced by municipal sewage sludge accumulation. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2014**, *11*, 8891–8908. [[CrossRef](#)]
68. Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipiński, A.; Kumar, S. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* **2016**, *33*, 1870–1874.
69. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410. [[CrossRef](#)]

5.3.3. Materiały uzupełniające

	Td Phytoph	Td P. cactorum	
1	G408_18	12.84	11.86
2	G409_18	14.76	12.82
3	G412_18	12.74	12.00
4	G413_18	13.92	13.09
5	G415_18	12.21	11.35
6	G416_18	14.49	13.17
7	G417_18	12.58	11.85
8	G418_18	12.84	12.18
9	G419_18		12.34
10	G420_18	12.75	11.47
11	G421_18	13.09	12.20
12	G429_18	12.43	12.32
13	G430_18	13.36	12.48
14	G431_18	11.82	11.49
15	G432_18	12.11	11.81
16	G437_18	13.67	12.84
17	G439_18	13.32	12.32
18	G440_18	13.83	13.85
19	G442_18	14.08	14.74
	mean	13.16	12.43
	SD	0.83	0.85

„Shining a LAMP” (Loop-Mediated Isothermal Amplification) on the molecular detection of *Phytophthora* spp. and *Phytophthora cactorum* in strawberry fields

Dominika G. Siegieda, Jacek Panek and Magdalena Frać

		Tm Phytop	Tm P. cactorum
1	G408_18	90.05	90.05
2	G409_18	89.87	89.87
3	G412_18	89.87	89.87
4	G413_18	89.68	89.50
5	G415_18	89.68	89.68
6	G416_18	89.87	89.68
7	G417_18	90.05	89.87
8	G418_18	90.05	90.05
9	G419_18	89.87	89.87
10	G420_18	89.87	89.87
11	G421_18	89.87	89.87
12	G429_18	89.68	89.68
13	G430_18	89.68	89.50
14	G431_18	89.87	89.68
15	G432_18	90.05	89.68
16	G437_18	90.05	89.87
17	G439_18	90.05	89.87
18	G440_18	89.87	89.68
19	G442_18	90.41	89.50
	mean	89.92	89.77
	SD	0.18	0.17

„Shining a LAMP” (Loop-Mediated Isothermal Amplification) on the molecular detection of *Phytophthora* spp. and *Phytophthora cactorum* in strawberry fields

Dominika G. Siegieda, Jacek Panek and Magdalena Frać

Table. T1. Results of the detection of *Phytophthora* spp. and *Phytophthora cactorum* in environmental samples of organic strawberry fields. samples collected in 2019 and 2020.

Sample	Plantation number	Coordinates	Type of the sample	Type of the soil	Strawberry variety	Time to positive <i>Phytophthora</i> spp.	Temperature of melting <i>Phytophthora</i> spp.	Time to positive <i>Phytophthora cactorum</i>	Temperature of melting <i>Phytophthora cactorum</i>
385/19K	4	N49°55.8617' E022°31.0445'	roots	chernozem	Aprica			23.28	91.09
449/19K	10	N50°08.4584' E023°00.1018'	roots	acrisol	Dipred			32.91	90.13
45/19C	Mean from plantation 11	-	bulk soil	acrisol	Aprica			16.69	89.57
478/19	13	N50°14.9756' E022°44.8757'	bulk soil	regosol	Aprica		90.15		
490/19	14	N50°14.9203' E022°44.8742'	bulk soil	nd	Aprica	35.10	87.77		
48/19C	Mean from plantations 1 and 2	-	bulk soil	fluvisol	Aprica and Honeoye	66.05	88.14		
1468/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd			54.13	88.22
1469/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd			80.40	88.96
1472/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd			86.23	89.14
1485/20	15	N51°35.7167'	fruit	nd	nd			38.39	87.66

		E021°64.5414'							
1491/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd			72.46	89.33
1498/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd			80.96	88.96
1505/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd			78.07	88.96
1506/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd			84.41	88.96
1508/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd			81.19	89.14
1522/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd			81.88	88.96
1632/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Rumba	66.67	90.32		
347/19	1	N50°07.8333' E022°37.5488'	rhizosphere	fluvisol	Aprica				
348/19	1	N50°07.8263' E022°37.5166'	bulk soil	fluvisol	Aprica				
349/19	1	N50°07.8212' E022°37.4898'	rhizosphere	fluvisol	Aprica				
350/19	1	N50°07.8201' E022°37.4812'	bulk soil	fluvisol	Aprica				
351/19	1	N50°07.8185' E022°37.4681'	rhizosphere	fluvisol	Aprica				
352/19K	1	N50°07.8333' E022°37.5488'	shoots	fluvisol	Aprica				
352/19L	1	N50°07.8333' E022°37.5488'	roots	fluvisol	Aprica				
354/19K	1	N50°07.8212' E022°37.4898'	shoots	fluvisol	Aprica				
354/19L	1	N50°07.8212' E022°37.4898'	roots	fluvisol	Aprica				
356/19L	1	N50°07.8185' E022°37.4681'	shoots	fluvisol	Aprica				

356/29K	1	N50°07.8185' E022°37.4681'	roots	fluvisol	Aprica				
337/19	2	N50°07.7870' E022°37.4886'	bulk soil	fluvisol	Honeoye				
338/19	2	N50°07.7906' E022°37.4944'	rhizosphere	fluvisol	Honeoye				
339/19	2	N50°07.7941' E022°37.5015'	bulk soil	fluvisol	Honeoye				
340/19	2	N50°07.7995' E022°37.5139'	rhizosphere	fluvisol	Honeoye				
341/19	2	N50°07.8080' E022°37.5417'	bulk soil	fluvisol	Honeoye				
342/19K	2	N50°07.7870' E022°37.4886'	roots	fluvisol	Honeoye				
342/19L	2	N50°07.7870' E022°37.4886'	shoots	fluvisol	Honeoye				
343/19K	2	N50°07.7906' E022°37.4944'	roots	fluvisol	Honeoye				
343/19L	2	N50°07.7906' E022°37.4944'	shoots	fluvisol	Honeoye				
344/19K	2	N50°07.7941' E022°37.5015'	roots	fluvisol	Honeoye				
344/19L	2	N50°07.7941' E022°37.5015'	shoots	fluvisol	Honeoye				
357/19	3	N50°07.3774' E022°36.8599'	rhizosphere	fluvisol	Aprica				
358/19	3	N50°07.3881' E022°36.8722'	bulk soil	fluvisol	Dipred				
359/19	3	N50°07.3955' E022°36.8877'	rhizosphere	fluvisol	Dipred				
360/19	3	N50°07.4071' E022°36.9098'	bulk soil	fluvisol	Dipred				
361/19	3	N50°07.4200' E022°36.9337'	rhizosphere	fluvisol	Dipred				
362/19K	3	N50°07.3774' E022°36.8599'	roots	fluvisol	Dipred				

362/19L	3	N50°07.3774' E022°36.8599'	shoots	fluvisol	Dipred				
364/19K	3	N50°07.3955' E022°36.8877'	roots	fluvisol	Dipred				
364/19L	3	N50°07.3955' E022°36.8877'	shoots	fluvisol	Dipred				
366/19K	3	N50°07.4200' E022°36.9337'	roots	fluvisol	Dipred				
366/19L	3	N50°07.4200' E022°36.9337'	shoots	fluvisol	Dipred				
53/19A	Mean from plantation 3	-	bulk soil	fluvisol	Dipred				
53/19B	Mean from plantation 3	-	bulk soil	fluvisol	Dipred				
53/19C	Mean from plantation 3	-	bulk soil	fluvisol	Dipred				
379/19	4	N49°55.8617' E022°31.0445'	rhizosphere	chernozem	Aprica				
380/19	4	N49°55.8520' E022°31.0292'	bulk soil	chernozem	Aprica				
381/19	4	N49°55.8339' E022°31.0084'	rhizosphere	chernozem	Aprica				
382/19	4	N49°55.8150' E022°30.9833'	bulk soil	chernozem	Aprica				
383/19	4	N49°55.7974' E022°30.9677'	rhizosphere	chernozem	Aprica				
384/19	4	N49°55.7894' E022°30.9533'	bulk soil	chernozem	Aprica				
385/19L	4	N49°55.8617' E022°31.0445'	shoots	chernozem	Aprica				
387/19K	4	N49°55.8339' E022°31.0084'	roots	chernozem	Aprica				

387/19L	4	N49°55.8339' E022°31.0084'	shoots	chernozem	Aprica				
389/19K	4	N49°55.7974' E022°30.9677'	roots	chernozem	Aprica				
389/19L	4	N49°55.7974' E022°30.9677'	shoots	chernozem	Aprica				
538/19A	Mean from plantation 4	-	bulk soil	acrisol	Aprica				
538/19B	Mean from plantation 4	-	bulk soil	acrisol	Aprica				
538/19C	Mean from plantation 4	-	bulk soil	acrisol	Aprica				
367/19	5	N49°57.3395' E022°32.9881'	rhizosphere	cambisol	Honeoye				
368/19	5	N49°57.3488' E022°32.9403'	bulk soil	cambisol	Honeoye				
369/19	5	N49°57.3610' E022°32.8927'	rhizosphere	cambisol	Honeoye				
370/19	5	N49°57.3695' E022°32.8507'	bulk soil	cambisol	Honeoye				
371/19	5	N49°57.3825' E022°32.7908'	rhizosphere	cambisol	Honeoye				
372/19	5	N49°57.3880' E022°32.7742'	bulk soil	cambisol	Honeoye				
373/19K	5	N49°57.3395' E022°32.9881'	roots	cambisol	Honeoye				
373/19L	5	N49°57.3395' E022°32.9881'	shoots	cambisol	Honeoye				
375/19K	5	N49°57.3610' E022°32.8927'	roots	cambisol	Honeoye				
375/19L	5	N49°57.3610' E022°32.8927'	shoots	cambisol	Honeoye				

377/19K	5	N49°57.3825' E022°32.7908'	roots	cambisol	Honeoye				
377/19L	5	N49°57.3825' E022°32.7908'	shoots	cambisol	Honeoye				
539/19A	Mean plantation 5	-	bulk soil	acrisol	Honeoye				
539/19B	Mean plantation 5	-	bulk soil	acrisol	Honeoye				
539/19C	Mean plantation 5	-	bulk soil	acrisol	Honeoye				
391/19	6	N49°58.8536' E022°39.4243'	rhizosphere	nd	Honeoye				
392/19	6	N49°58.8490' E022°39.4429'	bulk soil	nd	Honeoye				
393/19	6	N49°58.8406' E022°39.4630'	rhizosphere	nd	Honeoye				
394/19	6	N49°58.8330' E022°39.4782'	bulk soil	nd	Honeoye				
395/19	6	N49°58.8262' E022°39.4876'	rhizosphere	nd	Honeoye				
396/19	6	N49°58.8160' E022°39.5011'	bulk soil	nd	Honeoye				
397/19K	6	N49°58.8536' E022°39.4243'	roots	nd	Honeoye				
397/19L	6	N49°58.8536' E022°39.4243'	shoots	nd	Honeoye				
399/19K	6	N49°58.8406' E022°39.4630'	roots	nd	Honeoye				
399/19L	6	N49°58.8406' E022°39.4630'	shoots	nd	Honeoye				
401/19K	6	N49°58.8262' E022°39.4876'	roots	nd	Honeoye				

401/19L	6	N49°58.8262' E022°39.4876'	shoots	nd	Honeoye				
415/19	7	N49°50.9894' E022°48.1942'	rhizosphere	nd	Honeoye				
416/19	7	N49°50.9811' E022°48.1870'	bulk soil	nd	Honeoye				
417/19	7	N49°50.9689' E022°48.1791'	rhizosphere	nd	Honeoye				
418/19	7	N49°50.9501' E022°48.1661'	bulk soil	nd	Honeoye				
419/19	7	N49°50.9269' E022°48.1535'	rhizosphere	nd	Honeoye				
420/19	7	N49°50.9030' E022°48.1427'	bulk soil	nd	Honeoye				
421/19K	7	N49°50.9894' E022°48.1942'	shoots	nd	Honeoye				
421/19L	7	N49°50.9894' E022°48.1942'	roots	nd	Honeoye				
423/19K	7	N49°50.9689' E022°48.1791'	shoots	nd	Honeoye				
423/19L	7	N49°50.9689' E022°48.1791'	roots	nd	Honeoye				
425/19L	7	N49°50.9269' E022°48.1535'	shoots	nd	Honeoye				
426/19K	7	N49°50.9269' E022°48.1535'	roots	nd	Honeoye				
427/19	8	N49°50.9375' E022°48.1501'	rhizosphere	nd	Honeoye				
428/19	8	N49°50.9312' E022°48.1438'	bulk soil	nd	Honeoye				
429/19	8	N49°50.9237' E022°48.1383'	rhizosphere	nd	Honeoye				
430/19	8	N49°50.9227' E022°48.1366'	bulk soil	nd	Honeoye				
431/19	8	N49°50.9132' E022°48.1280'	rhizosphere	nd	Honeoye				

432/19	8	N49°50.9069' E022°48.1229'	bulk soil	nd	Honeoye				
433/19K	8	N49°50.9375' E022°48.1501'	roots	nd	Honeoye				
433/19L	8	N49°50.9375' E022°48.1501'	shoots	nd	Honeoye				
435/19K	8	N49°50.9237' E022°48.1383'	roots	nd	Honeoye				
435/19L	8	N49°50.9237' E022°48.1383'	shoots	nd	Honeoye				
437/19K	8	N49°50.9132' E022°48.1280'	roots	nd	Honeoye				
437/19L	8	N49°50.9132' E022°48.1280'	shoots	nd	Honeoye				
403/19	9	N49°50.9225' E022°48.1597'	bulk soil	nd	Honeoye				
404/19	9	N49°50.9343' E022°48.1676'	rhizosphere	nd	Honeoye				
405/19	9	N49°50.9454' E022°48.1765'	bulk soil	nd	Honeoye				
406/19	9	N49°50.9599' E022°48.1877'	rhizosphere	nd	Honeoye				
407/19	9	N49°50.9723' E022°48.1978'	bulk soil	nd	Honeoye				
408/19	9	N49°50.9809' E022°48.2039'	rhizosphere	nd	Honeoye				
410/19K	9	N49°50.9343' E022°48.1676'	roots	nd	Honeoye				
410/19L	9	N49°50.9343' E022°48.1676'	shoots	nd	Honeoye				
412/19K	9	N49°50.9599' E022°48.1877'	roots	nd	Honeoye				
412/19L	9	N49°50.9599' E022°48.1877'	shoots	nd	Honeoye				
414/19K	9	N49°50.9809' E022°48.2039'	roots	nd	Honeoye				

414/19L	9	N49°50.9809' E022°48.2039'	shoots	nd	Honeoye				
439/19	10	N50°08.5010' E023°00.1346'	rhizosphere	acrisol	Dipred				
440/19	10	N50°08.4844' E023°00.1220'	bulk soil	acrisol	Dipred				
441/19	10	N50°08.4775' E023°00.1167'	rhizosphere	acrisol	Dipred				
442/19	10	N50°08.4652' E023°00.1084'	bulk soil	acrisol	Dipred				
443/19	10	N50°08.4584' E023°00.1018'	rhizosphere	acrisol	Dipred				
444/19	10	N50°08.4585' E023°00.0963'	bulk soil	acrisol	Dipred				
445/19K	10	N50°08.5010' E023°00.1346'	roots	acrisol	Dipred				
445/19L	10	N50°08.5010' E023°00.1346'	shoots	acrisol	Dipred				
447/19K	10	N50°08.4775' E023°00.1167'	roots	acrisol	Dipred				
447/19L	10	N50°08.4775' E023°00.1167'	shoots	acrisol	Dipred				
449/19L	10	N50°08.4584' E023°00.1018'	shoots	acrisol	Dipred				
45/19A	Mean from plantation 11	-	bulk soil	acrisol	Aprica				
45/19B	Mean from plantation 11	-	bulk soil	acrisol	Aprica				
451/19	11	N50°08.4642' E023°00.0965'	rhizosphere	acrisol	Dipred				
452/19	11	N50°08.4802' E023°00.1045'	bulk soil	acrisol	Dipred				

453/19	11	N50°08.4880' E023°00.1081'	rhizosphere	acrisol	Dipred				
454/19	11	50.141638, 23.001876	bulk soil	acrisol	Dipred				
455/19	11	50.141820 23.001952	rhizosphere	acrisol	Dipred				
456/19	11	N50°08.5164' E023°00.1201'	bulk soil	acrisol	Dipred				
457/19K	11	N50°08.4642' E023°00.0965'	roots	acrisol	Dipred				
457/19L	11	N50°08.4642' E023°00.0965'	shoots	acrisol	Dipred				
459/19K	11	N50°08.4880' E023°00.1081'	roots	acrisol	Dipred				
459/19L	11	N50°08.4880' E023°00.1081'	shoots	acrisol	Dipred				
461/19K	11	50.141820 23.001952	roots	acrisol	Aprica				
461/19L	11	50.141820 23.001952	shoots	acrisol	Aprica				
57/19A	Mean from plantation 11	-	bulk soil	acrisol	Dipred				
57/19B	Mean from plantation 11	-	bulk soil	acrisol	Dipred				
57/19C	Mean from plantation 11	-	bulk soil	acrisol	Dipred				
43/19A	Mean from plantation 12	-	bulk soil	acrisol	Honeoye				
43/19B	Mean from plantation 12	-	bulk soil	acrisol	Honeoye				

43/19C	Mean from plantation 12	-	bulk soil	acrisol	Honeoye				
463/19	12	N50°08.9259' E023°00.1276'	rhizosphere	acrisol	Honeoye				
464/19	12	N50°08.9400' E023°00.1382'	bulk soil	acrisol	Honeoye				
465/19	12	N50°08.9551' E023°00.1541'	rhizosphere	acrisol	Honeoye				
466/19	12	N50°08.9668' E023°00.1659'	bulk soil	acrisol	Honeoye				
467/19	12	N50°08.9887' E023°00.1803'	rhizosphere	acrisol	Honeoye				
468/19	12	N50°09.0160' E023°00.1975'	bulk soil	acrisol	Honeoye				
469/19K	12	N50°08.9259' E023°00.1276'	roots	acrisol	Honeoye				
469/19L	12	N50°08.9259' E023°00.1276'	shoots	acrisol	Honeoye				
471/19K	12	N50°08.9551' E023°00.1541'	roots	acrisol	Honeoye				
471/19L	12	N50°08.9551' E023°00.1541'	shoots	acrisol	Honeoye				
473/19K	12	N50°08.9887' E023°00.1803'	roots	acrisol	Honeoye				
473/19L	12	N50°08.9887' E023°00.1803'	shoots	acrisol	Honeoye				
475/19	13	N50°14.9959' E022°44.8649'	rhizosphere	regosol	Aprica				
476/19	13	N50°14.9931' E022°44.8690'	bulk soil	regosol	Aprica				
477/19	13	N50°14.9841' E022°44.8706'	rhizosphere	regosol	Aprica				
479/19	13	N50°14.9756' E022°44.8757'	rhizosphere	regosol	Aprica				

480/19	13	N50°14.9683' E022°44.8815'	bulk soil	regosol	Aprica				
481/19K	13	N50°14.9959' E022°44.8649'	roots	regosol	Aprica				
481/19L	13	N50°14.9959' E022°44.8649'	shoots	regosol	Aprica				
483/19K	13	N50°14.9841' E022°44.8706'	roots	regosol	Aprica				
483/19L	13	N50°14.9841' E022°44.8706'	shoots	regosol	Aprica				
485/19K	13	N50°14.9722' E022°44.8806'	roots	regosol	Aprica				
485/19L	13	N50°14.9722' E022°44.8806'	shoots	regosol	Aprica				
487/19	14	N50°14.9445' E022°44.8819'	rhizosphere		Aprica				
488/19	14	50.248953, 22.747947	bulk soil		Aprica				
489/19	14	N50°14.9281' E022°44.8763'	rhizosphere		Aprica				
491/19	14	N50°14.9133' E022°44.8697'	rhizosphere		Aprica				
492/19	14	N50°14.9025' E022°44.8702'	bulk soil		Aprica				
493/19K	14	N50°14.9445' E022°44.8819'	roots		Aprica				
493/19L	14	N50°14.9445' E022°44.8819'	shoots		Aprica				
493/19L	14	N50°14.9281' E022°44.8763'	shoots		Aprica				
495/19K	14	N50°14.9281' E022°44.8763'	roots		Aprica				
495/19L	14	N50°14.9133' E022°44.8697'	shoots		Aprica				
497/19K	14	N50°14.9133' E022°44.8697'	roots		Aprica				

48/19A	Mean from plantations 1 and 2	-	bulk soil	fluvisol	Aprica and Honeoye				
48/19B	Mean from plantations 1 and 2	-	bulk soil	fluvisol	Aprica and Honeoye				
32/19A	Mean from plantations 13 and 14	-	bulk soil	regosol	Aprica				
55/19A	Mean from plantations 13 and 14	-	bulk soil	regosol	Aprica				
55/19B	Mean from plantations 13 and 14	-	bulk soil	regosol	Aprica				
55/19C	Mean from plantations 13 and 14	-	bulk soil	regosol	Aprica				
32/19B	Mean from plantations 13 and 14	-	bulk soil	regosol	Aprica				
32/19C	Mean from plantations 13 and 14	-	bulk soil	regosol	Aprica				
1470/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1471/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1473/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1474/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1475/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				

1476/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1477/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1478/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1479/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1480/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1481/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1482/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1483/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1484/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1486/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1487/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1488/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1489/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1490/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1492/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1493/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1494/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1495/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				

1496/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1497/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1499/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1500/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1501/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1502/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1503/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1504/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1507/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1509/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1510/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1511/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1512/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1513/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1514/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1515/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1516/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1517/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				

1518/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1519/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1520/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1521/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1523/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1524/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1525/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1526/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1527/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1528/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1529/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1530/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1531/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1532/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1533/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1534/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1535/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1536/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				

1537/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1538/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1539/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1540/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1541/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1542/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1543/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1544/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1545/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1546/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1547/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1548/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1549/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1550/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1551/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1552/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1553/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1554/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				

1555/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1556/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1557/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1558/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1559/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1560/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1561/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1562/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1563/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1564/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1565/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1566/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1567/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1568/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1569/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1570/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1571/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1572/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				

1573/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1574/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1575/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1576/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1577/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1578/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1579/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1580/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1581/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	nd				
1624/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Honeoye				
1625/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Vibrant				
1626/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Rumba				
1627/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Honeoye				
1628/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Vibrant				
1629/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Rumba				
1630/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Honeoye				
1631/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Vibrant				
1633/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Honeoye				

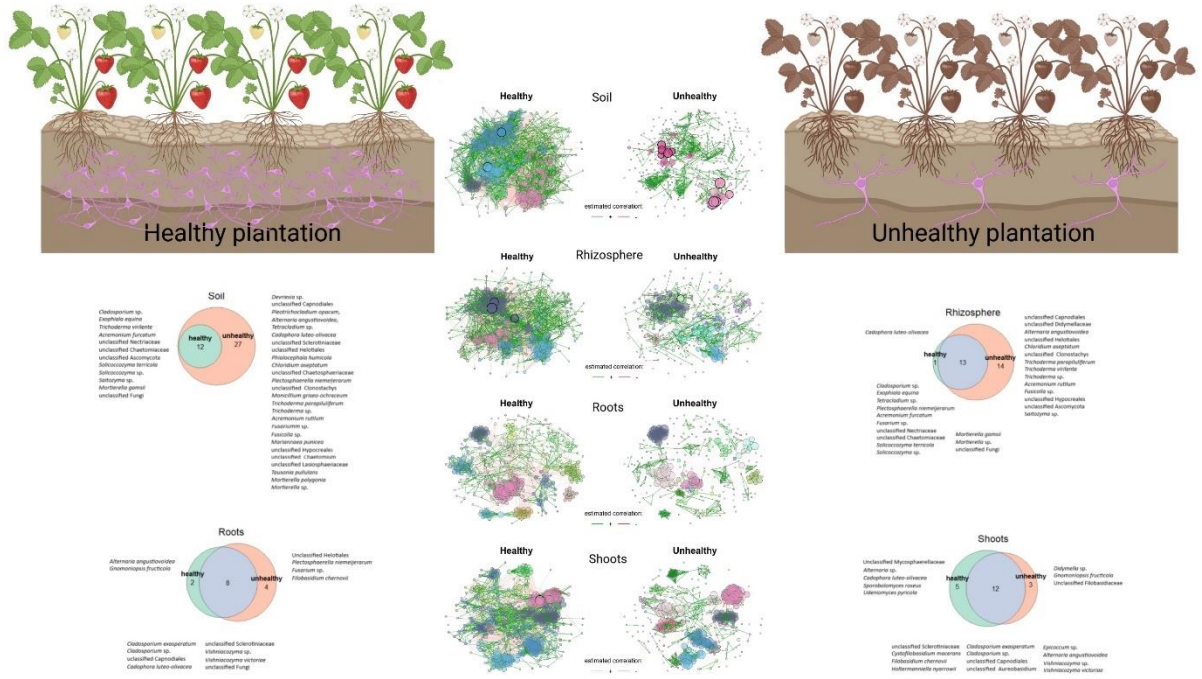
1634/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Vibrant				
1635/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Rumba				
1636/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Honeoye				
1637/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Vibrant				
1638/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Rumba				
1639/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Honeoye				
1640/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Vibrant				
1641/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Rumba				
1642/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Honeoye				
1643/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Vibrant				
1644/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Rumba				
1645/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Honeoye				
1646/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Vibrant				
1647/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Rumba				
1648/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Rumba				
1649/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Honeoye				
1650/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Vibrant				
1651/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Honeoye				

1652/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Vibrant				
1653/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Rumba				
1654/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Honeoye				
1655/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Vibrant				
1656/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Rumba				
1657/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Honeoye				
1658/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Vibrant				
1659/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Rumba				
1660/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Honeoye				
1661/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Vibrant				
1662/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Rumba				
1663/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Honeoye				
1664/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Vibrant				
1665/20	15	N51°35.7167' E021°64.5414'	fruit	nd	Rumba				
	2019		192			4	4	13	13
	2020		156						
	SUM		331			percentage	1%	4%	

					Time to positive <i>Phytophthora</i> spp.	Temperature of melting <i>Phytophthora</i> spp.	Time to positive <i>Phytophthora</i> <i>cactorum</i>	Temperature of melting <i>Phytophthora</i> <i>cactorum</i>
				max	66.67	90.32	86.23	91.09
				min	35.10	87.77	16.69	87.66

5.4. Manuskrypt publikacji P4

5.4.1. Abstrakt graficzny



5.4.2. Tekst manuskryptu P4

1 Plant and soil health in organic plantations of strawberry -
2 mycobiome biodiversity, fungal trophic modes and
3 networks

4

5 Dominika Siegieda (ORCID iD: 0000-0001-8547-8510)

6 Jacek Panek (ORCID iD: 0000-0002-9217-5902)

7 Magdalena Frąc* (ORCID iD: 0000-0001-9437-3139)

8 Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, Lublin, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin,
9 Poland

10 *corresponding author: m.frac@ipan.lublin.pl

11

12 ABSTRACT: Sustainability is the objective to which modern agriculture is aspiring, as it promises high
13 yields without degrading the environment with chemical pesticides and utilizes waste in a more sensible
14 manner. Modern methods of studying the differences between diseased and healthy plant fungal
15 microbiome composition, such as metataxonomic analysis, allow to understand the interactions between
16 mycobiota and the plant host. This allows to apply this knowledge in a relevant way by development of
17 effective biopreparations that stimulate growth of crops. We aimed to reveal characteristic differences
18 between the mycobiome of 4 types of environmental samples (bulk soil, rhizosphere soil, roots and
19 shoots) that we collected in healthy and diseased 13 organic plantations of strawberry. We compared
20 alpha diversity of the mycobiome, composition of fungal trophic modes and also mycobial networks in
21 the samples. The results indicated that alpha diversity of the mycobiome is less important in shaping
22 plant health than particular fungal trophic mode composition in the samples. We demonstrated that not
23 only the most abundant fungal taxa shaped the health of the plant, proving that scarce taxa should not

24 be neglected in analyzing the mycobiome. The results also suggests, that fungal communities in healthy
25 soil, rhizosphere soil, roots and shoots collected from healthy strawberry plantations create more stable
26 and steady networks, having higher resistance, compared to those from unhealthy plantations.

27 **KEYWORDS:** Illumina Miseq, mycobiome, ITS1 metabarcoding, organic strawberries,
28 metataxonomy, soil and plant health

29 1. INTRODUCTION

30 As it has been proven many times (De Souza et al., 2016; Fotios et al., 2021; Xiong et al., 2021,
31 2020; Xu et al., 2018), plants are certainly not axenic organisms. Microbiome inhabiting inside as well
32 as outside surface of plants' organs plays an important role of ensuring the balance between the plant
33 and the environment, by affecting the host in many ways (Busby et al., 2017; Lazcano et al., 2021). The
34 influence of bacteria and fungi on agricultural plants had been already studied for many important
35 species (Hannula et al., 2021; Maçik et al., 2021; Neupane et al., 2021; Xu et al., 2018) and some of the
36 research suggest that mycobiota structure - fungal communities interacting with the plant - can be a good
37 predictor of plant and soil health (Frąc et al., 2021, 2018; Schlatter et al., 2022). Unfortunately,
38 understanding fungal relationships in soil and rhizosphere, as well as their impact on plants had been
39 studied only minimally in the research when compared to bacteria in agricultural sciences, likely due to
40 the complexity of the biology of fungal organisms.

41 Culture-independent methods of determining the microbiome composition in soils and agricultural
42 plantations are crucial, because vast majority of soil microorganisms are unculturable in laboratory
43 conditions (Vartoukian et al., 2010). Also, using molecular detection methods, such as Polymerase
44 Chain Reaction (PCR) (Pertile et al., 2020; Saiki et al., 1988), real-time PCR (Higuchi et al., 1993, 1992;
45 Ippolito et al., 2004; Suarez et al., 2005; Tzelepis et al., 2017) or Loop-Mediated Isothermal
46 Amplification (LAMP) (Notomi et al., 2000; Panek and Frąc, 2019; Siegieda et al., 2021; Yamamoto et
47 al., 2014) that are targeted against specific pathogens, or with multiplexed reaction up to three pathogens
48 in one reaction (Liao et al., 2018; Malarczyk et al., 2020), does not allow to determine the complete
49 composition of the microorganisms present in the sample. Nonetheless, high-throughput sequencing
50 techniques, such as: Illumina Sequencing-by-synthesis (Hannula et al., 2021; Mirmajlessi et al., 2018),
51 Oxford Nanopore (Kong et al., 2021; LeBlanc, 2022) or Single Molecule, Real-Time (SMRT)
52 sequencing by PacBio (Banerjee et al., 2019; Dirks and Jackson, 2020), are applied more frequently in
53 the research of fungal and bacterial communities of plants, allowing to further investigate the structure
54 of the microorganisms in the samples.

55 Europe holds nearly half of the worlds harvesting area of soft fruits such as: strawberry, blueberry
56 and raspberry (“FAOSTAT,” 2022). What is worth noting, nearly fifth of the berry production in
57 European Union is organic (Lenroud and Willer, 2018). Importantly, strawberry, as a fruit with thin cell
58 wall is especially exposed to pathogenic microorganisms that can penetrate the wall with ease.
59 Therefore, strawberry fruit with highly susceptibility to microbial infections loose very rapidly its
60 quality after harvest (Cybulska et al., 2022). Thus, understanding the optimal composition of
61 microorganisms that promote healthy growth and yield of these crops is very important from the point
62 of view of both, scientists and farmers. Organic agriculture is getting more important in Europe and in
63 the world (Willer and Lernoud, 2018), as it opens the possibility to recover natural biodiversity of the
64 environment, allowing to use only sparse amount of chemical pesticides or to entirely exclude them
65 from the production. European Union announced in 2020 the European Green Deal (European
66 Commission, 2019), that aims to implement United Nation’s 2030 Agenda (“United nations general
67 assembly. Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development.,” 2015) and
68 sustainable development goals. Initiatives such as: EU Biodiversity Strategy for 2030, focuses on
69 increasing the area of organic farming and reducing pesticide usage in European Union, and Farm to
70 Fork Strategy (European Commission, 2020) - a fair, healthy and environmentally friendly food system,
71 aims to accelerate transition to sustainable food production. Moreover, biodiversity in food and
72 agriculture sector includes the diversity of microorganisms at the genetic, species and ecosystem levels
73 that sustain the structure, functions and processes of production systems. The biodiversity can be
74 managed also by farmers through both - human activities and natural processes. However, this approach
75 needs a comprehensive understanding of the state and considering of all components of the value chain
76 and developing the rules for environment monitoring based on the biological indicators relating to
77 microbial, especially fungal biodiversity, because healthy ecosystems are essential to increase resilience
78 and sustainable agricultural production. Therefore, biodiversity maintenance and monitoring is very
79 important also in the organic cultivation of soft fruits. Thus, the main goal of the study was to select the
80 relevant indicator for monitoring of soils microbial diversity as ecosystem health marker in the soft fruits
81 organic cultivations, taking into account especially fungal microbiome, in order to propose an approach
82 that is the most significant in determination of soil status to set up the new plantations of soft fruits in

83 the organic cultivation and to monitor their quality with both soil and plants, including rhizosphere and
84 bulk soil, roots, and shoots.

85 We hypothesized that (1) alpha diversity of diseased strawberry plants is significantly lower than
86 alpha-diversity in healthy plants, (2) strawberry plants that have visible symptoms of the disease differ
87 in overall mycobiome composition from healthy strawberries and the main drivers are the fungi
88 belonging to pathotrophs trophic mode. Also, we hypothesized that (3) health status of different types
89 of samples (bulk soil, rhizosphere, roots and shoots), derived from organic plantations of strawberry,
90 affect overall structure of microbial networks within those groups. The evaluation of the hypotheses was
91 made based on 3 strawberry cultivars (Aprica, Dipred, Honeoye) of healthy and unhealthy organic
92 strawberry plantations, that were established on different types of soil (acrisol, fluvisol, sandy compact,
93 sandy loose and brown soil) and in different locations (13 plantations). Plantations were also divided
94 between different cultivation systems: on raised beds with agrotexile and flat-planting method without
95 agrotexile and with straw mulch. Finally, we examined plantations that were equipped with an
96 automatic irrigation system and were not. For the evaluation of the fungal community composition, we
97 used ITS1 region amplicon sequencing and bioinformatical tools such as QIIME2 and statistical
98 analyses conducted in RStudio.

99 2. MATERIAL AND METHODS

100 2.1 Sample acquisition

101 Environmental samples, containing strawberry roots, shoots, rhizosphere (soil adhering to the roots
102 after shaking), and bulk soil (0-20 cm), were collected after the fruiting season in 2019, from organic
103 plantations of strawberry located in south east Poland. The information regarding plantation, soil and
104 cultivation type, strawberry cultivar and irrigation system and elemental composition of soils was
105 gathered in the Supplementary table 1. Samples coming from the plantations with visible symptoms of
106 disease, such as: leaf discoloration, necrosis and plant wilting were assigned to unhealthy group and
107 samples from plantations without symptoms of the disease were left in healthy group. Collected samples
108 were immediately put in cooling conditions, and after transportation into the research facility, frozen at
109 -75°C before isolation of the DNA.

110 2.2 DNA extraction

111 The environmental, epiphyte and endophyte DNA was isolated with modified FastDNA Spin Kit
112 for Feces kit (MP Biomedicals, Solon, OH, USA) procedure, that we nicknamed 'FasterPrep'. For this
113 purpose, we put frozen samples at 4°C for 24 hours, and then we put 500 mg of the biological material
114 into the Lysing Matrix Tube with 800 µL Sodium Phosphate Buffer and 200 µL of PLS Solution, shook
115 to mix and vortexed 10-15 seconds. Then, after centrifuging at 14,000 x g for 5 minutes, we decanted
116 supernatant and added 900 µL and 110 µL of Sodium Phosphate Buffer and MT Buffer, respectively.
117 After quick vortex, we homogenised the samples with the Fast-Prep-24 instrument (MP Biomedicals,
118 Solon, OH, USA) for 40 seconds with 6 m/s and centrifuged at 14,000 x g for 15 minutes. We then
119 transferred the supernatant to clean 2 µL centrifuge tube and added 250 µL of PPS solution, shook to
120 mix (no vortex!) and incubated 10 minutes at 4 °C. In the meantime, we prepared new 2 mL tubes with
121 500 µL of Binding Matrix Solution. After the incubation, we centrifuged at 14,000 x g for 2 minutes
122 and transferred the supernatant to prepared tubes and placed on shaker for 3-5 minutes. After the 2-
123 minute centrifuge at 14,000 x g, we decanted supernatant and washed the pellet by resuspending it with
124 500 µL of Wash Buffer #1. We then again placed the samples on the shook for 3-5 minutes and
125 transferred 600 µL of the binding mixture to a SPIN Filter tube and centrifuged at 14,000 x g for 1
126 minute and emptied the catch tube. Next, we added 500 µL of prepared Wash Buffer #2 to the SPIN
127 Filter tube and centrifuged at 14,000 for 5 minutes and discarded the flow-through. We then again
128 repeated adding the 500 µL of Wash Buffer #2, centrifuging and discarding the flow-through. Finally,
129 we again centrifuged the samples in 14,000 x g for 5 minutes to discard residual ethanol from the Wash
130 Buffer #2. Then we transferred SPIN Filter bucket into new 1.5 µL tube and added 100 µL of TES onto
131 the filter and resuspended with the pipette. Then, we incubated at room temperature for 2 minutes,
132 centrifuged at 14,000 x g for 2 minutes and discarded the SPIN filter. We the stored the genetic material
133 at -22°C until used.

134 2.3 Amplicon sequencing analysis

135 We prepared the library by amplification of marker genes and indexing amplicons with adapters
136 complimentary to MiSeq flowcell and barcodes. We amplified the ITS1 (Schoch et al., 2012) fragment

137 of the fungal DNA for the identification of fungi present in the samples, with primers gathered in
138 Supplementary Table 2, as proposed by Bellemain (Bellemain et al., 2010) and Fungal Metagenomic
139 Sequencing Protocol by Illumina (Illumina, 2019). We used KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Kapa
140 Biosystems, Cape Town, South Africa) for the amplification. We chose conditions as follows: 95°C for
141 3 minutes of initial denaturation and 35 cycles of 95°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds and 72°C
142 for 60 seconds with final step in 72°C for 5 minutes. We then purified obtained amplicons using
143 magnetic beads CleanNGS (CleanNA, Netherlands, Gouda). We indexed the samples with Illumina
144 sequencing adapters (Illumina Nextera set a, b and c) with the following program: 95°C for 3 minutes
145 and 10 cycles of 95°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds and 72°C for 60 seconds with final step in
146 72°C for 5 minutes. Prior the quantification on the Quantus fluorometer with QuantiFluor® ONE
147 reagents (Promega, Madison, WI, USA), we purified the samples with magnetic beads and checked the
148 library size with D1000 DNA ScreenTape on TapeStation 4150 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara,
149 USA). Next, we diluted the samples to the same concentration with PCR grade water and pooled the
150 samples. The final concentration of pooled libraries was 8 pM. We then sequenced the libraries with
151 Illumina MiSeq platform (2x300 paired-end) with 15% PhiX as an internal positive quality control
152 (Illumina, San Diego, CA, USA).

153 2.4 Bioinformatical and statistical analysis

154 We performed initial processing and analysing of the data in QIIME2 (Quantitative Insights Into
155 Microbial Ecology) environment (version 2020.11) (Bolyen et al., 2019) in Linux shell (Ubuntu ver.
156 20.04.3 LTS). We used ITSxpress (Rivers et al., 2018) for the primer trimming and DADA2 (Divisive
157 Amplicon Denoising Algorithm v. 2) (Callahan et al., 2016) for denoising, removing chimeras (method:
158 consensus and minimal fold parent over abundance parameter set to 12), merging and Amplicon
159 Sequence Variant (ASV)(Callahan et al., 2017) calling. We assigned the taxonomy with Scikit-learn
160 (sklearn) classifier (Pedregosa et al., 2011) trained on UNITE 8.3 database (Abarenkov et al., 2021)
161 (ver. dynamic, 98.5% similarity level) (Kõljalg et al., 2020; Nilsson et al., 2019). We also used
162 FUNGuild tool to taxonomically parse fungal ASVs by ecological guild (Nguyen et al., 2016). Then,
163 we further analysed the results and produced figures with R language (v. 4.0.3) in RStudio (v.1.4.1103)

164 (R Studio Team) with phyloseq (v. 1.34.0)(McMurdie and Holmes, 2013), microbiome (v. 1.12.0)(Lahti
165 et al., 2017), DESeq2 (v. 1.30.1)(Love et al., 2014), NetCoMi (v. 1.0.2)(Peschel et al., 2021),
166 microbiomeutilities (v. 1.00.16) (Shetty and Lahti, 2020), metagMisc (v. 0.0.4)(Mikryukov, 2022),
167 eulerr (v. 6.1.1) (Larsson, 2021), genefilter (Gentleman et al., 2021) (v. 1.76.0) and ggplot2 (v. 3.3.5)
168 (Wickham, 2008) packages. First, we constructed the fungal ASV-based phyloseq object with
169 taxonomy, OTU count and metadata tables, and that phyloseq object was used as an input for most of
170 the R-based analyses. We calculated the ENS (Effective Number of Species) (Jost, 2006) α -diversity
171 measure by 'estimate_richness' command from phyloseq package, and calculated exponential of
172 Shannon entropy index. Then, we calculated if this index differ between healthy and unhealthy samples
173 for all types of samples and each sample type (roots, shoots, rhizosphere and bulk soil) individually. For
174 the groups where the healthy and unhealthy subgroups were characterised by normal distribution
175 (verified by Shapiro-Wilk test; 'shapiro.test' command) and no difference in variances (F-test; 'var.test'
176 command) (all samples together, roots, soil samples), we used unpaired Two-Sample T-test with 't.test'
177 command. For the rhizosphere samples, where the assumption of equal variances of ENS between
178 healthy and unhealthy samples was violated, we performed Welch's ANOVA with 'oneway.test'
179 command. Finally, for the shoot samples, where we detected not-normal distribution within healthy and
180 unhealthy samples, we used two-samples Wilcoxon test with 'wilcox.test' command. When the final
181 result of p-value < 0.05, we deducted significant differences between health status' ENS in the samples.
182 For β -diversity of fungal microbiome analysis, we used PCoA (Principal Coordinates
183 Analysis/Multidimensional Scaling) method with Bray-Curtis algorithm-based matrix. We also
184 performed Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) with the 'adonis' command
185 from vegan (v. 2.5-7) (Oksanen et al., 2007) R package with 9999 permutations to assess β -diversity
186 differences between sample type and health status of the strawberry samples, for all types of sample
187 collectively, and each sample type separately. We used 'betadisper' and 'anova' to investigate
188 homogeneity of the variances between groups and pairwise PERMANOVA (9999 permutations,
189 adjustment method: Benjamini & Hochberg) to reveal differences between each pair of sample types.
190 Next, we compared median abundances of trophic modes between healthy and unhealthy groups for all
191 types of samples altogether as well as for each sample type individually with Kruskal-Wallis test

192 ('kruskal.test') and adjusted p-values ('p.adjust') with Benjamini & Hochberg (BH) method. For
193 detection of differentially abundant taxa based on the negative binomial (Gamma-Poisson) distribution,
194 we used DESeq2 package with Wald significance tests and parametric type of fitting of dispersions to
195 the mean intensity. To detect core species for healthy and unhealthy samples in each sample type, we
196 used phyloseq object aggregated to species level and 'core_memebers' command from microbiome
197 package with detection set to 0.001 and prevalence at 95%. For the comparison of fungal microbial
198 association networks on species level in healthy and unhealthy samples we used NetCoMi (v. 1.0.2)
199 package (Peschel et al., 2021) and phyloseq object as an input. We constructed the network with Pearson
200 correlations, with zero handling by pseudo count and normalization with centered log-ratio
201 transformation. We kept taxa with at least 200 reads and used three centrality measures: degree,
202 betweenness and closeness.

203 3. RESULTS AND DISCUSSION

204 3.1 Fungal microbiome

205 After initial cleaning of the phyloseq object, where we discarded all of the ASVs that were assigned
206 to kingdoms different than Fungi and Stramenopiles, and discarding two samples that had less than
207 1,000 reads, we obtained 9,085,062 reads (average: 60,164.5 per sample and 607.412 per ASV),
208 clustered in 14,957 different ASVs from 151 samples of bulk soil, rhizosphere, roots and shoots
209 collected from organic plantations of strawberries analysed. Plateau of rarefaction curves was reached
210 in all of the samples, which suggests, that the diversity of fungi was covered adequately (Fig.1).
211 Generally, the mycobiome of studied samples was composed mainly of Ascomycota (mean: 69.22%
212 range: 34.6% - 93.53%) and Basidiomycota (mean: 22.43%, range: 3.53% - 63.27%), and were
213 consistent with results obtained by other teams (Huang et al., 2018; Mirmajlessi et al., 2018). Those two
214 dominant phyla were followed by Morterellomycota (mean: 5.53%, range: 0% - 24.58%), unclassified
215 Fungi (mean: 1.9%, range: 0% - 12.79%), Chytridiomycota (mean: 0.41%, range: 0% - 4.64%) and
216 Mucoromycota (mean: 0.22%, range: 0% - 5.24%), and remaining phyla that made 4.29% of relative
217 abundance in analysed samples were: Rozellomycota, Glomeromycota, Zoopagomycota, Oomycota,
218 Kickxellomycota, Basidiobolomycota, Olpidiomycota, Aphelidiomycota, Monoblepharomycota,

219 Blastocladiomycota, Entomophthoromycota, unclassified Stramenopiles and Ochrophyta
220 (Supplementary Table 1). The structure and abundance of 70 most frequent taxa present in all samples
221 is showed in the Figure 1.

222 As first, rapid analysis aiming to differentiate healthy and unhealthy samples, we compared
223 mean abundance of 8 most abundant fungal phyla in each sample type separately (Supplementary Figure
224 2, Supplementary Table 3). As expected, we did not find many significant differences, but interestingly,
225 in bulk soil, Chytridiomycota and Zoopagomycota were more abundant in unhealthy samples, in
226 rhizosphere, we found that Mucoromycota was less abundant and Zoopagomycota was more abundant
227 in unhealthy samples. However, for roots and shoots, we did not find significant differences.

228 3.2 Alpha and beta diversity of fungal communities

229 Some studies suggest, that high microbial diversity improves the stability of the community
230 (Delgado-Baquerizo et al., 2016; Lefcheck et al., 2015). In our study, for the determination of microbial
231 diversity, we used Effective Number of Species (ENS) measure, as the most frequently used in soil
232 microbiology indexes - Shannon entropy and Gini-Simpson index are characterised by important
233 disadvantages (Jost et al., 2010). We found significant differences between mean of ENS only between
234 two healthy Plantations - 5 and 10 (Supplementary Figure 3, Supplementary Table 6). Then we checked
235 how the health status of the strawberry influences the microbial diversity, by comparing ENS in all
236 samples and each sample type independently (Figure 2A). Statistical analysis revealed, that the health
237 status did not influence the α -diversity of the fungal communities when all samples were considered
238 together (p-value > 0.05) as well as for rhizosphere (p-value > 0.05) and shoot samples (p-value > 0.05)
239 (even though the disease symptoms were visible in shoots) and these results were coherent with healthy
240 and diseased rhizosphere of tomato from recent study (Xiong et al., 2020). Nonetheless, the α -diversity
241 measure was significantly lower in unhealthy root samples (p-value < 0.05). Surprisingly, α -diversity
242 was significantly higher in unhealthy samples of bulk soil (Fig. 2, p-value < 0.05), which is opposite
243 what was found in watermelon cultivation attacked by *Fusarium* (Wang et al., 2019). When all samples
244 were considered together in β -diversity analysis, PCoA plot and pairwise PERMANOVA revealed that
245 rhizosphere and soil samples have clustered into a one group for sample type (rhizosphere+bulk soil,

246 roots and shoots) (Fig. 2 B). Then, PCoA plot showed no clustering when it comes to health status of
247 the sample (Fig. 2 C). We then estimated statistical significance of the observed community composition
248 with the PERMANOVA analysis. As the result, we confirmed statistical difference between both,
249 sample types and health status, and they explained 24.7% and 4.9% data variance, respectively.
250 However, group dispersion were not homogenous in both tested combinations. Then, we proceeded with
251 PCoA plots for each type of sample individually, by health status. PERMANOVA analysis revealed,
252 that in all sample type groups - rhizosphere, shoots, roots and bulk soil, community composition was
253 different between healthy and unhealthy samples and explained 4.7%, 4.9%, 3.6% and 5.2% of sample
254 variability, respectively. However, only shoot and root samples showed homogenous group dispersions
255 between health status (Fig. 2 D) (Supplementary table 4 - PERMANOVA and pairwise PERMANOVA).

256 3.3 Trophic mode, core microbiota, differential abundance analysis and most abundant fungal 257 genera

258 We then investigated differences in medians of relative abundances of fungal microorganisms
259 assigned to 6 trophic modes: symbiotroph, saprotroph-symbiotroph, saprotroph, pathotroph-
260 symbiotroph, pathotroph-saprotroph-symbiotroph, pathotroph-saprotroph and pathotroph between
261 healthy and unhealthy strawberry samples (Fig. 3), using FUNGuild database (Nguyen et al., 2016). We
262 discarded from the analysis all ASVs that failed to parse with trophic mode and we used only ASVs that
263 were ranked as Probable and Highly Probable, as recommended by the creator of the database. When
264 all types of samples were considered altogether, only median relative abundance of pathotroph-
265 symbiotroph taxa were lower in healthy samples (p -value < 0.05). In healthy soil samples, taxa classified
266 as pathotroph-symbiotroph and pathotroph-saprotroph-symbiotroph were less numerous compared to
267 unhealthy soil samples (p -value < 0.05). We found that this situation was caused by higher abundance
268 of mixed fungal trophic modes of pathotroph-symbiotroph and pathotroph-saprotroph-symbiotroph in
269 unhealthy soil samples. It is likely that these microorganisms acted mainly as pathotrophs in these
270 samples of soil. The alpha diversity equilibrium between healthy and diseased samples in all samples
271 altogether, in rhizosphere and shoots was disrupted in the soil from plantations where the disease on
272 plants had developed. This is an evident, that species diversity is not unconditionally an indicator of the

273 community stability, and particular composition of mycobial diversity is a main driver of plant health.
274 For rhizosphere, roots and shoots samples we did not note any significance differences between healthy
275 and unhealthy samples. Root samples, on the other side, were characterised by higher alpha diversity in
276 healthy samples, but no significant differences between trophic modes were detected - there has been a
277 more balanced change in the composition of the microorganisms. The decrease in diversity of the root
278 mycobiome was in line with the findings of Wu's team on wheat (Wu et al., 2021).

279 Establishing core fungal taxa in the complicated community of microbiome of plant is crucial for
280 better understanding critical components of the communities. We identified core mycobiome for healthy
281 and unhealthy samples for each type of sample (bulk soil, rhizosphere, shoots, roots) individually (Fig.
282 4., Supplementary table 5). Core species were defined as species present in at least 95% of samples and
283 with 0.1% of relative abundance in the sample. In bulk soil samples (Fig. 4 A) we did not identify core
284 species in healthy plantations, nonetheless, 27 species were core for unhealthy plantations
285 (*Cladosporium* sp., *Devriesia* sp., unclassified Capnodiales, *Pleotrichocladium opacum*, *Alternaria*
286 *angustiovoidea*, *Exophiala equina*, unclassified Chaetomellaceae, *Tetracladium* sp., *Cadophora luteo-*
287 *olivacea*, unclassified Sclerotiniaceae, unclassified Helotiales, *Phialocephala humicola*, *Chloridium*
288 *aseptatum*, unclassified Chaetosphaeriaceae, *Plectosphaerella niemeijerum*, unclassified
289 Clonostachys, *Monocillium griseo-ochraceum*, *Trichoderma parapiluliferum*, *Trichoderma virilente*,
290 *Trichoderma* sp., *Acremonium furcatum*, *Acremonium rutilum*, *Fusarium* sp., *Fusicolla* sp., *Mariannaea*
291 *punicea*, unclassified Nectriaceae, unclassified Hypocreales, unclassified Chaetomium, unclassified
292 Chaetomiaceae, unclassified Lasiosphaeriaceae, unclassified Ascomycota, *Tausonia pullulans*,
293 *Solicoccozyma terricola*, *Solicoccozyma* sp., *Saitozyma* sp., *Mortierella gamsii*, *Mortierella polygonia*,
294 *Mortierella* sp., unclassified Fungi) and 12 were common core taxa in healthy and unhealthy plantations
295 (*Cladosporium* sp., *Exophiala equina*, *Trichoderma virilente*, *Acremonium furcatum*, unclassified
296 Nectriaceae, unclassified Chaetomiaceae, unclassified Ascomycota, *Solicoccozyma terricola*,
297 *Solicoccozyma* sp., *Saitozyma* sp., *Mortierella gamsii*, unclassified Fungi). For rhizosphere samples
298 (Fig 4B), we identified 1 (*Cadophora luteo-olivacea*), 14 (unclassified Capnodiales, unclassified
299 Didymellaceae, *Alternaria angustiovoidea*, unclassified Helotiales, *Chloridium aseptatum*, unclassified

300 *Clonostachys*, *Trichoderma parapiluliferum*, *Trichoderma virilente*, *Trichoderma* sp., *Acremonium*
301 *rutilum*, *Fusicolla* sp., unclassified Hypocreales, unclassified Ascomycota, *Saitozyma* sp.) and 13
302 species (*Cladosporium* sp., *Exophiala equina*, *Tetracladium* sp., *Plectosphaerella niemeijerum*,
303 *Acremonium furcatum*, *Fusarium* sp., unclassified Nectriaceae, unclassified Chaetomiaceae,
304 *Solicoccozyma terricola*, *Solicoccozyma* sp., *Mortierella gamsii*, *Mortierella* sp., unclassified Fungi)
305 characteristic for healthy, unhealthy and common for healthy and unhealthy samples, respectively.
306 Continuing, healthy roots samples (Fig. 4C) were composed of 2 core fungal species (*Alternaria*
307 *angustiovoidea* and *Gnomoniopsis fructicola*), unhealthy of 4 (Unclassified Helotiales, *Plectosphaerella*
308 *niemeijerum*, *Fusarium* sp. and *Filobasidium chernovii*); and 8 species were common for healthy and
309 unhealthy plantations (*Cladosporium exasperatum*, *Cladosporium* sp., unclassified Capnodiales,
310 *Cadophora luteo-olivacea*, unclassified Sclerotiniaceae, *Vishniacozyma* sp., *Vishniacozyma victoriae*,
311 unclassified Fungi). Finally, healthy shoots (Fig.4D) had 5 core species (Unclassified
312 Mycosphaerellaceae, *Alternaria* sp., *Cadophora luteo-olivacea*, *Sporobolomyces roseus*, *Udeniomyces*
313 *pyricola*), 3 (*Didymella* sp., *Gnomoniopsis fructicola*, Unclassified Filobasidiaceae) in unhealthy and
314 12 common for healthy and unhealthy (*Cladosporium exasperatum*, *Cladosporium* sp., unclassified
315 Capnodiales, unclassified Aureobasidium, *Epicoccum* sp., *Alternaria angustiovoidea*, unclassified
316 Sclerotiniaceae, *Cystofilobasidium macerans*, *Filobasidium chernovii*, *Holtermanniella nyarrowii*,
317 *Vishniacozyma* sp., *Vishniacozyma victoriae*).

318 We found that unhealthy samples of soil, rhizosphere, roots and all samples altogether had more
319 taxa that belonged to core community, similarly to study conducted on pea (Hossain et al., 2021).
320 Previous study report, that core taxa are in line with the dominant taxa in the microbiome communities
321 (Yang et al., 2020), but present study suggest, that this is not the case for organic strawberry mycobiome.
322 Even though some of the taxa that were most abundant belonged to core taxa, it was not the case for
323 some of the microorganisms, which suggests, that less abundant fungi are also very important factors
324 that shape fungal communities and cannot be neglected when analysing them. In the other hand,
325 *Cladosporium* sp. is an important taxon that was one of the 20 most abundant species and core taxon of
326 both, healthy and unhealthy and each type of sample. What is worth noting, this taxon had been also

327 reported as core fungus in other plant species (Hamonts et al., 2018), suggesting that it is a key member
328 of microbiome of plants. When it comes to different core taxa, we also identified a number of fungi that
329 could not be recognized to higher taxa levels - strawberry mycobiome composed of both, taxa that are
330 well known and taxa poorly characterizing or even unknown, which is in line with other studies (De
331 Souza et al., 2016; Hamonts et al., 2018).

332 After determining core mycobiome, we performed differential abundance analysis between healthy
333 and unhealthy samples for each type of sample individually (Fig. 5). In bulk soil samples, we identified
334 14 different genera that were differentially abundant between healthy and unhealthy samples, from
335 which 8 were more abundant in healthy samples, and 6 were more abundant in unhealthy samples, 10
336 were pathotrophs (*Coniochaeta* sp., *Coprinellus* sp., *Volutella* sp., *Acremonium* sp., *Paraphaeosphaeria*
337 sp., *Trichoderma* sp., *Pseudozyma* sp., *Dactylaria* sp.) and 2 - *Rhizoctonia* sp. and *Alternaria* sp. were
338 a typical strawberry pathogen (Garrido et al., 2011). Less abundant in unhealthy shoots *Dioszegia*
339 saprotrophic yeasts were also noted to be less abundant in fungicide treated leaves than fungicide-free
340 wheat (Karlsson et al., 2014). Next, also less abundant *Talaromyces* are also reported to as antagonists
341 against plant fungal pathogens (Thambugala et al., 2020). Then, less abundant in unhealthy samples
342 *Phaeosphaeria* were also negatively correlated with aflatoxin-producing fungal species in rice in China
343 and could potentially help to control abundance of such pathogenic fungi (Qi et al., 2022).

344 In rhizosphere samples, we identified 19 different genera that were differentially abundant between
345 healthy and unhealthy samples of rhizosphere that belonged to Ascomycota, Basidiomycota,
346 Mucoromycota and Mortierellomycota phylas. Eight were characterized as pathotrophs (*Conocybe* sp.,
347 *Lecanicillium* sp., *Acremonium* sp., *Coniochaeta* sp., *Mucor* sp., *Paraphaeosphaeria* sp., *Trichoderma*
348 sp., *Pseudozyma* sp.), 16 were more abundant in healthy samples and 3 in unhealthy. We also identified
349 one taxon - *Mucor* sp., that is recognized as a pathogen causing postharvest decay of strawberry fruits
350 (Feliziani and Romanazzi, 2016), but it was more abundant in healthy samples. These results can suggest
351 that this fungus can be responsible for strawberry roots colonization as beneficial endophytic fungus.
352 Plant-endophyte relationship was confirmed during mutualistic interaction between *Arabidopsis*
353 *thaliana* and *Mucor* sp. (Rozpadek et al., 2018). We found that *Niesslia* and *Gyoerfyella* genera, that

354 participate in the decomposition of organic matter (Gams et al., 2019; Purahong et al., 2016) were
355 significantly less abundant in unhealthy samples. We also noted a number of genera that are known to
356 be fungal antagonists against plant pathogens. Again, those genera were less abundant in unhealthy
357 samples. *Acrostalagmus luteoalbus* was reported to have an antifungal activity against *Alternaria*
358 *alternata*, *Fusarium oxysporum* and *Phytophthora drechleri* (Lv et al., 2019). Number of *Talaromyces*
359 species are reported to be fungal antagonists against plant fungal pathogens (Thambugala et al., 2020),
360 but also heat-resistant species, as *T. flavus*, are a significant threat to food production (Panek and Frąc,
361 2018). *Cladorrhinum* sp. are used as biocontrol agents, significantly reducing Fusarium wilt of tomato
362 (Martin et al., 2019). We also noted that two *Mortierella* species, that are plant growth promoting species
363 (Ozimek and Hanaka, 2021) were also less abundant in unhealthy plants. Finally, *Naganishia* were less
364 abundant in unhealthy rhizosphere of strawberry, where as in soils that apple root rot disease developed,
365 they were more abundant (Yang et al., 2020).

366 In strawberry roots, we identified differentially abundant taxa that belonged to 25 different genera,
367 and they belonged to Ascomycota, Basidiomycota and Mucoromycota phylas. 22 were less abundant in
368 unhealthy samples than healthy samples and 3 were more abundant in unhealthy samples. Similarly to
369 rhizosphere, we identified one taxon that is a typical strawberry pathogen - *Rhizoctonia* sp., and 8 more
370 taxa that belonged to pathotrophs (*Volutella* sp., *Acremonium* sp., *Thanatephorus* sp., *Flagelloscypha*
371 sp., *Lecanicillium* sp., *Cyphellophora* sp., *Clonostachys* sp.). Unhealthy strawberry roots had lower
372 abundance of *Sebacinales*, and Lee et al. (Lee and Hawkes, 2021) suggest, that *Sebacinales* might be
373 complementary to arbuscular mycorrhizal fungi in plant roots. Further, another genera that were less
374 abundant in unhealthy roots, that seem to have an important role in plant health and development were
375 *Hymenoscyphus*, that are potentially pathogenic to raspberry (Oszust and Frąc, 2021), *Hyaloscypha* sp.,
376 *H. variabilis* control agent against *Pythium* root rot (Marian et al., 2022), *Dactylella* sp. have
377 antagonistic mechanisms against nematoda (Topalović et al., 2020). Finally, we noted that
378 *Chaetosphaeria* that were suggested to have an important role in plant development and disease
379 tolerance in sugarcane (Tayyab et al., 2021), were more abundant in unhealthy strawberry roots.

380 Interestingly enough, in shoot samples, we identified the smallest number of differentially abundant
381 taxa - only 7 genera were more abundant in healthy samples, and 1 that is a typical strawberry pathogen
382 - *Verticillium* sp. that was more abundant in unhealthy samples. Also, 3 more of the taxa were
383 pathotrophs (*Claviceps* sp., *Xenoramularia* sp., *Taphrina* sp.).

384 We found that populations of some core taxa for healthy or unhealthy samples were also
385 differentially abundant between samples with different health status. In particular - *Acremonium* sp. was
386 a hub taxa for healthy and unhealthy samples of bulk soil and rhizosphere and in the same time was
387 significantly less abundant in unhealthy samples of rhizosphere, roots and bulk soil. It was also shown
388 that this taxon is a potential disease suppressive agent (Liu et al., 2021). Different studies also showed
389 that *Acremonium* fungi promote plant growth as they resist soil-borne pathogens (Breen, 1994; Zheng
390 et al., 2017). *Mortierella* sp. also belonged to core taxa of healthy and unhealthy samples of rhizosphere
391 and bulk soil, and they were also amongst the most abundant in those two types of samples. What is
392 more, we discovered that this taxon was less abundant in healthy samples of rhizosphere, and roots, and
393 also shaped microbiome in network analysis of bulk soil. The fungus was also reported as important
394 plant growth-promoting microorganism, which highlights its importance in shaping healthy
395 mycobiomes (Ozimek and Hanaka, 2021; Qin et al., 2017; Toju et al., 2018), that also can take part in
396 nematode control (Topalović et al., 2020). Interestingly, when it comes to root samples, we found that
397 one of the most abundant taxon, that was also significantly less abundant in unhealthy samples -
398 *Dactylonectria* sp. causing black root rot of strawberry in China (Chen et al., 2021), is also a pathogen
399 of grapevine (Bleach et al., 2021) and showed negative correlation with strawberry plant growth in
400 different study (Soppelsa et al., 2021). This opposite effect of the microorganism in our study might be
401 caused by the fact, that in our strawberry roots, *Dactylonectria* sp. might function as non-pathogenic
402 endophyte, as it can act as in weeds and grapevine (Gramaje et al., 2020). Also an important taxon
403 seemed to be unclassified *Trechisporales*, that was accounted as one of the most abundant taxon and
404 also significantly less abundant in unhealthy samples of roots. Also in shoots we identified important,
405 but poorly recognized taxon that was amongst most abundant, but also in the group of core
406 microorganisms of healthy samples - unclassified Mycosphaerellaceae. The presence of those 2 poorly

407 identified taxa reminds us, that some microorganisms that are important factors of plant health are
408 insufficiently described. Continuing, bulk soil had two very important fungi that shaped the community
409 and belonged to most abundant taxa - *Acremonium* sp. and *Alternaria* sp. that also were less and more
410 abundant in unhealthy samples, respectively. The second taxon also belonged to core taxa of unhealthy
411 samples of bulk soil and is known to be a strawberry pathogen (Dwiastuti et al., 2021; Nishikawa and
412 Nakashima, 2019).

413 Defining differentially abundant fungal taxa between plants with apposite health status can help to
414 indicate main drivers of plant disease incidence. Our organic strawberry samples had more taxa defined
415 as less abundant in unhealthy samples, which is in contrast with Hossain's team study on pea where
416 healthy samples had more indicator taxa than unhealthy (Hossain et al., 2021). Although between
417 differentially abundant taxa we found a number of plant pathogenic fungi and some of them were
418 typically strawberry pathogen, only *Verticillium* sp. seemed to be more abundant in the plant samples.
419 Even though *Alternaria* sp. that attacks strawberry was more abundant in unhealthy soil samples, was
420 also amongst most abundant taxa in rhizosphere, roots and shoot samples and also was core taxon of
421 unhealthy rhizosphere and roots, it did not seem to cause disease symptoms on the plant, as only the
422 *Verticillium* sp. was significantly more abundant in unhealthy strawberry shoots. Also, abundance of
423 other typical strawberry pathogen, belonging to the genus *Mucor* (Feliziani and Romanazzi, 2016) and
424 *Rhizoctonia* (Avilés et al., 2019; Guarnaccia et al., 2022) were smaller in unhealthy strawberry samples,
425 unlike *Verticillium* sp. that thrived on shoot samples, which can indicate competition between
426 *Verticillium* and these pathogens.

427 Finally, we established 20 most abundant genera in all types of sample and we combined those
428 information with core taxa and differential abundance analysis (Table 1). In bulk soil, *Acremonium*
429 (differently abundant between soil of healthy and unhealthy strawberry) and *Alternaria* (core for
430 unhealthy samples) also belonged to the core taxa of healthy and unhealthy soil samples. In rhizosphere,
431 *Acremonium* and 2 *Mortierella* ASVs, in roots - *Dactyloeria* and unclassified *Trechisporales*. Finally,
432 in shoots - unclassified *Mycosphaerellaceae* (also core for healthy shoot samples).

433 2.5 Differences in fungal networks between healthy and unhealthy samples

434 To investigate how health status shapes fungal networks, we extended our research and explored
435 patterns in fungal interkingdom cooccurrence network analysis on ASV level and drew plots. For bulk
436 soil samples, there was significant difference between clusterings in networks of healthy and unhealthy
437 samples expressed in ARI (Adjusted Rand Index - similarity between clusterings, $ARI=0.035$, p -
438 value=0). Healthy samples had lower number of components (7 vs 189), clustering coefficient (0.487
439 vs. 0.746), modularity (0.375 vs. 0.877) and positive edge percentage (63% vs. 95%), and higher edge
440 density (0.055 vs. 0.008) and natural connectivity (0.03 vs. 0.018) (Fig. 6A).

441 In rhizosphere samples, clusterings were different between healthy and unhealthy samples
442 ($ARI=0.066$, p -value=0). Also, the number of components (93 vs 10), clustering coefficient (0.677 vs
443 0.494) and modularity (0.555 vs 0.398) were higher in unhealthy samples, whereas positive edge
444 percentage were equal in both sample types (67%). Edge density (0.049 vs 0.018) and natural
445 connectivity (0.037 vs 0.021) were higher in healthy samples (Fig. 6B).

446 Root samples were also characterized by different clustering between healthy and unhealthy samples
447 ($ARI=0.169$, p -value=0) and higher number of components (97 vs 16), clustering coefficient (0.806 vs
448 0.626) and modularity (0.847 vs 0.732) in unhealthy samples. Positive edge percentage (89% vs 85%),
449 edge density (0.033 vs 0.015) and natural connectivity (0.022 vs 0.043) were higher in healthy samples.

450 Finally, in shoot samples, ARI showed that clusterings were different between healthy and unhealthy
451 samples ($ARI=0.129$, p -value=0), number of components (71 vs 11), clustering coefficient, modularity
452 (0.747 vs 0.553), positive edge percentage (88% vs 78%) and, surprisingly, natural connectivity (0.060
453 vs 0.047) were higher in unhealthy samples. Edge density (0.047 vs 0.031) was higher in healthy samples
454 of shoots.

455 We also investigated Jaccard's index to discover how different central nodes of healthy and
456 unhealthy samples are related (Table 2). For soil and rhizosphere samples, degree, betweenness,
457 closeness and eigenvector centralities showed statistical differences between healthy and unhealthy
458 samples. In roots, betweenness, closeness and eigenvector centralities showed significant differences,

459 and finally in shoot samples, only betweenness was significantly different between health status. We
460 also constructed the networks with SPRING and 50 taxa that had the most variability in abundance
461 (Supplementary figures 4).

462 The importance of connectivity of microbial networks in the context of plant health had been already
463 discussed (Wagg et al., 2019). Our findings of differential network analysis revealed that indeed, plant
464 health status is an important factor that influences fungal networks of strawberry samples. Studies on
465 different plants suggest, that fungal networks of rhizosphere are more connected in healthy plants than
466 in unhealthy (Huang et al., 2020; Wang et al., 2019). This was coherent with our study and not only for
467 rhizosphere samples, but also shoots and bulk soil, nonetheless, contrasting trend of increased fungal
468 connectivity was noted for chilli with *Fusarium* wilt disease (Gao et al., 2021). We also discovered a
469 hub taxa that were important in shaping network in different sample type of healthy and unhealthy
470 plants. Some of the hub taxa (*Cladosporium* sp., *Acremonium* sp., *Solicoccozyma* sp., *Sporobolomyces*
471 sp.) were also amongst the most abundant ones in our samples. The results are very important from a
472 point of view of regenerative agriculture which aims are especially restoration of soil health and reversal
473 of biodiversity loss (EASAC, 2022). The presented results give the responses not only on soil fungal
474 community structure, but also focus on functional aspects of soil fungal biodiversity, including trophic
475 modes to evaluate how soil mycobiome is influenced by changing environmental conditions, especially
476 healthy and unhealthy plantations. The results are useful not only from basic knowledge explaining soil-
477 plant-fungal microbiome interactions, but also can be relevant for harnessing sustainable strategy of
478 plant production taking into account particularly soil health and biodiversity aspects.

479 5. CONCLUSIONS

480 Through understating which taxa drive soil and strawberry health the most, we can develop
481 organic solutions, such as bioproducts, biostimulants, biopreparations and microbial inoculants
482 containing carefully selected microorganisms that naturally stimulate plants response to pathogens and
483 are resistant to diseases, as well as help to reverse soil biodiversity loss. This, in consequence, can help
484 to develop sustainable agriculture with exclusion of chemical pesticides and will help to preserve the
485 soil microbiological diversity that is so important in plant cultivation. Interestingly enough, in line with

486 our hypothesis, we discovered that alpha-diversity of fungal communities was only lower in root
487 samples in response to plant infection, nevertheless higher in bulk soil. This higher diversity in bulk soil
488 was connected with higher number of mixed pathogenic trophic modes of fungi present in those samples.
489 We also discovered, that a number of core taxa for healthy and unhealthy samples overlapped, but more
490 microorganisms belonged to core taxa in unhealthy samples of rhizosphere, roots, soil and all samples
491 altogether. The most abundant taxa from our samples were important creators of fungal microbiomes,
492 as they belonged also to core differentially abundant taxa. But what is important, not only most
493 abundant, core and differentially abundant taxa shaped the fungal microbiome - this suggest that rare
494 microorganisms are also important members of the community and theirs role cannot be omitted.

495 What is also worth noting - fungal communities in soil, rhizosphere, roots and shoots collected
496 from healthy strawberry plantations create more stable and steady networks, compared to those from
497 unhealthy plantations.

498 Although in this research we differentiated between healthy and unhealthy mycobiome in
499 organic strawberry cultivations, health of the plant is influenced by not only one fungal taxon, but on
500 number of microorganisms that develop complicated networks of common binds. Unfortunately,
501 classical methods for identifying a biological marker for future plant health in a cultivation, such as
502 finding core microorganisms and identifying differentially abundant taxa in healthy and unhealthy plants
503 cannot lead to the selection of a single biomarker. For the prediction whether particular soil could be
504 suitable to establish a new plantation, it would be worth to test modern bioinformatic methods, such as
505 machine learning techniques. Implementing not only state-of-the-art microbiome sequencing techniques
506 to first characterize the microbiome, but then also modern statistical methods of modelling in
507 establishing the most suitable soil for a particular plant will bring us closer to pesticide-reduced and
508 sustainable agriculture.

509 2.6 List of abbreviations

510 NGS - Next-Generation Sequencing

511 ITS1 - Internal Transcribed Spacer 1

512 QIIME2 - Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2

513 ENS - Effective Number of Species
514 PCoA - Principal Coordinates Analysis
515 ANOVA - analysis of variance
516 PERMANOVA - Permutational multivariate analysis of variance
517 SPRING - Semi-Parametric Rank-based approach for Inference in Graphical model

518 7. DECLARATIONS

- 519 • Funding: This paper was financed by The National Centre for Research and Development in
520 frame of the project BIOSTRATEG, contract number BIOSTRATEG3/344433/16/NCBR/2018
- 521 • Competing interests: The authors declare that they have no competing interests
- 522 • Ethics approval and consent to participate: Not applicable
- 523 • Consent to participate: Not applicable
- 524 • Consent for publication: Not applicable
- 525 • Availability of data and material: Raw sequencing data are available at The Sequence Read
526 Archive (SRA) database; BioProjectID: PRJNA842178.
- 527 • Authors' contributions: D.S. designed the study, collected the samples, performed laboratory
528 experiments, performed bioinformatical analyses in QIIME2, performed statistical analyses and
529 wrote code in R, analysed the results, produced tables and figures, wrote the initial manuscript
530 and corrected the manuscript; J.P. collected the samples, designed the study, performed
531 laboratory experiments, performed bioinformatical analyses in QIIME2, contributed in
532 analysing the results and corrected the manuscript; M.F. proposed conception of the research,
533 designed the study, collected the samples, contributed in analysing of the results, obtained
534 funding and corrected the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.
- 535 • Acknowledgements: We thank to Mr. Stanisław Jamrozik (Producer Group of BIO-FOOD
536 ROZTOCZE) for his help in selection of plantations into these study and farmers whos agreed
537 for samples collection from their plantations. We thank anonymous reviewers for their
538 constructive comments on the manuscript.

539 8. REFERENCES

- 540 Abarenkov, K., Zirk, A., Piirmann, T., Pöhönen, R., Ivanov, F., Nilsson, R.H., Kõljalg, U., 2021.
541 UNITE QIIME release for eukaryotes 2 [WWW Document].
542 <https://doi.org/10.15156/BIO/1264861>
- 543 Avilés, M., Avilés-García, I., Pérez, S., Borrero, C., 2019. First Report of Root Rot on Strawberry
544 Caused by Binucleate Rhizoctonia AG-A in Spain. *Plant Dis.* 103, 1036–1036.
545 <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-18-1300-PDN>
- 546 Banerjee, S., Walder, F., Büchi, L., Meyer, M., Held, A.Y., Gättinger, A., Keller, T., Charles, R., van
547 der Heijden, M.G.A., 2019. Agricultural intensification reduces microbial network complexity
548 and the abundance of keystone taxa in roots. *ISME J.* 13, 1722–1736.
549 <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0383-2>
- 550 Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., Kauserud, H., 2010. ITS as an
551 environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC*
552 *Microbiol.* 10, 189. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-189>
- 553 Bleach, C., Ridgway, H.J., Jaspers, M. V., Jones, E.E., 2021. The relative susceptibility of grapevine
554 rootstocks to black foot disease is dependent on inoculum pressure. *New Zeal. Plant Prot.* 74,
555 62–69. <https://doi.org/10.30843/nzpp.2021.74.11735>
- 556 Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., Alexander, H.,
557 Alm, E.J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J.E., Bittinger, K., Brejnrod, A.,
558 Brislawn, C.J., Brown, C.T., Callahan, B.J., Caraballo-Rodríguez, A.M., Chase, J., Cope, E.K.,
559 Da Silva, R., Diener, C., Dorrestein, P.C., Douglas, G.M., Durall, D.M., Duvall, C.,
560 Edwardson, C.F., Ernst, M., Estaki, M., Fouquier, J., Gauglitz, J.M., Gibbons, S.M., Gibson,
561 D.L., Gonzalez, A., Gorlick, K., Guo, J., Hillmann, B., Holmes, S., Holste, H., Huttenhower, C.,
562 Huttley, G.A., Janssen, S., Jarmusch, A.K., Jiang, L., Kaehler, B.D., Kang, K. Bin, Keefe, C.R.,
563 Keim, P., Kelley, S.T., Knights, D., Koester, I., Kosciulek, T., Kreps, J., Langille, M.G.I., Lee, J.,

564 Ley, R., Liu, Y.-X., Loftfield, E., Lozupone, C., Maher, M., Marotz, C., Martin, B.D.,
565 McDonald, D., McIver, L.J., Melnik, A. V., Metcalf, J.L., Morgan, S.C., Morton, J.T., Naimey,
566 A.T., Navas-Molina, J.A., Nothias, L.F., Orchanian, S.B., Pearson, T., Peoples, S.L., Petras, D.,
567 Preuss, M.L., Pruesse, E., Rasmussen, L.B., Rivers, A., Robeson, M.S., Rosenthal, P., Segata, N.,
568 Shaffer, M., Shiffer, A., Sinha, R., Song, S.J., Spear, J.R., Swafford, A.D., Thompson, L.R.,
569 Torres, P.J., Trinh, P., Tripathi, A., Turnbaugh, P.J., Ul-Hasan, S., van der Hooft, J.J.J., Vargas,
570 F., Vázquez-Baeza, Y., Vogtmann, E., von Hippel, M., Walters, W., Wan, Y., Wang, M.,
571 Warren, J., Weber, K.C., Williamson, C.H.D., Willis, A.D., Xu, Z.Z., Zaneveld, J.R., Zhang, Y.,
572 Zhu, Q., Knight, R., Caporaso, J.G., 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible
573 microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 37, 852–857.
574 <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>

575 Breen, J.P., 1994. Acremonium Endophyte Interactions with Enhanced Plant Resistance to Insects.
576 *Annu. Rev. Entomol.* 39, 401–423. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.39.010194.002153>

577 Busby, P.E., Soman, C., Wagner, M.R., Friesen, M.L., Kremer, J., Bennett, A., Morsy, M., Eisen, J.A.,
578 Leach, J.E., Dangl, J.L., 2017. Research priorities for harnessing plant microbiomes in
579 sustainable agriculture. *PLoS Biol.* 15, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001793>

580 Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Holmes, S.P., 2017. Exact sequence variants should replace
581 operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J.* 11, 2639–2643.
582 <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>

583 Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016.
584 DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581–
585 583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

586 Chen, Q., Yin, S.L., Zhang, X.G., Ma, X.Y., Zhong, S., Zhang, G.Z., 2021. *Dactylonectria* species
587 associated with black root rot of strawberry in China. *Australas. Plant Pathol.* 50, 501–511.
588 <https://doi.org/10.1007/s13313-021-00804-1>

589 Cybulska, J., Drobek, M., Panek, J., Cruz-Rubio, J.M., Kurzyńska-Szklarek, M., Zdunek, A., Fraç, M.,

590 2022. Changes of pectin structure and microbial community composition in strawberry fruit
591 (*Fragaria × ananassa* Duch.) during cold storage. *Food Chem.* 381, 132151.
592 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132151>

593 De Souza, R.S.C., Okura, V.K., Armanhi, J.S.L., Jorrín, B., Lozano, N., Da Silva, M.J., González-
594 Guerrero, M., De Araújo, L.M., Verza, N.C., Bagheri, H.C., Imperial, J., Arruda, P., 2016.
595 Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. *Sci.*
596 *Rep.* 6, 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep28774>

597 Delgado-Baquerizo, M., Maestre, F.T., Reich, P.B., Jeffries, T.C., Gaitan, J.J., Encinar, D., Berdugo,
598 M., Campbell, C.D., Singh, B.K., 2016. Microbial diversity drives multifunctionality in
599 terrestrial ecosystems. *Nat. Commun.* 7, 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms10541>

600 Dirks, A.C., Jackson, R.D., 2020. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in soils of
601 switchgrass harvested for bioenergy. *Appl. Environ. Microbiol.* 86.
602 <https://doi.org/10.1128/AEM.00880-20>

603 Dwiastuti, M.E., Soesanto, L., Aji, T.G., Devy, N.F., Hardiyanto, 2021. Biological control strategy for
604 postharvest diseases of citrus, apples, grapes and strawberries fruits and application in Indonesia.
605 *Egypt. J. Biol. Pest Control* 31, 141. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00488-1>

606 EASAC, 2022. Regenerative agriculture in Europe: A critical analysis of contributions to European
607 Union Farm to Fork and Biodiversity Strategies. European Academies Science Advisory
608 Council, policy report 44, April 2022, pp. 1-70, ISBN: 978-3-8047-4372-4, www.easac.eu

609 European Commission, 2020. Farm to Fork Strategy. For a fair, healthy and environmentally-friendly
610 food system.

611 European Commission, 2019. The European Green Deal. Communication from the commission to the
612 European Parliament, the European Council, the Council, the European Economic and Social
613 Committee and the Committee of the regions. *Eur. Comm.* 24.
614 <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

- 615 FAOSTAT [WWW Document], 2022. URL <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (accessed
616 2.16.22).
- 617 Feliziani, E., Romanazzi, G., 2016. Postharvest decay of strawberry fruit: Etiology, epidemiology, and
618 disease management. *J. Berry Res.* 6, 47–63. <https://doi.org/10.3233/JBR-150113>
- 619 Fotios, B., Sotirios, V., Elena, P., Anastasios, S., Stefanos, T., Danae, G., Georgia, T., Alik, T.,
620 Epaminondas, P., Emmanuel, M., George, K., Kalliope, P.K., Dimitrios, K.G., 2021. Grapevine
621 wood microbiome analysis identifies key fungal pathogens and potential interactions with the
622 bacterial community implicated in grapevine trunk disease appearance. *Environ. Microbiome* 16,
623 1–17. <https://doi.org/10.1186/s40793-021-00390-1>
- 624 Frąc, M., Hannula, S.E., Belka, M., Jędryczka, M., 2018. Fungal biodiversity and their role in soil
625 health. *Front. Microbiol.* 9, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00707>
- 626 Frąc, M., Pertile, G., Panek, J., Gryta, A., Oszust, K., Lipiec, J., Usowicz, B., 2021. Mycobiome
627 composition and diversity under the long-term application of spent mushroom substrate and
628 chicken manure. *Agronomy* 11. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030410>
- 629 Gams, W., Stielow, B., Gräfenhan, T., Schroers, H.-J., 2019. The ascomycete genus *Niesslia* and
630 associated monocillium-like anamorphs. *Mycol. Prog.* 18, 5–76. <https://doi.org/10.1007/s11557-018-1459-5>
- 632 Gao, M., Xiong, C., Gao, C., Tsui, C.K.M., Wang, M.M., Zhou, X., Zhang, A.M., Cai, L., 2021.
633 Disease-induced changes in plant microbiome assembly and functional adaptation. *Microbiome*
634 9, 1–18. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01138-2>
- 635 Garrido, C., Carbú, M., Fernández-Acero, F., González-Rodríguez, V., Cantoral, J., 2011. New
636 insights in the study of strawberry fungal pathogens. *Genes Genomes Genomics* 5, 24–39.
- 637 Gentleman, R.V., Carey, J., Huber, W., Hahne, F., 2021. genefilter: methods for filtering genes from
638 high-throughput experiments.
- 639 Gramaje, D., Berlanas, C., Martínez-Diz, M. del P., Diaz-Losada, E., Antonielli, L., Beier, S., Gorfer,

640 M., Schmoll, M., Compant, S., 2020. Comparative Genomic Analysis of *Dactylonectria*
641 *torresensis* Strains from Grapevine, Soil and Weed Highlights Potential Mechanisms in
642 Pathogenicity and Endophytic Lifestyle. *J. Fungi* 6, 255. <https://doi.org/10.3390/jof6040255>

643 Guarnaccia, V., Gilardi, G., Pugliese, M., Gullino, M.L., 2022. First Report of Multinucleate
644 *Rhizoctonia solani* AG4 HG-I Causing Crown and Root Rot on Strawberry in Italy. *Plant Dis.*
645 106, 332. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-21-1276-PDN>

646 Hamonts, K., Trivedi, P., Garg, A., Janitz, C., Grinyer, J., Holford, P., Botha, F.C., Anderson, I.C.,
647 Singh, B.K., 2018. Field study reveals core plant microbiota and relative importance of their
648 drivers. *Environ. Microbiol.* 20, 124–140. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14031>

649 Hannula, S.E., Heinen, R., Huberty, M., Steinauer, K., De Long, J.R., Jongen, R., Bezemer, T.M.,
650 2021. Persistence of plant-mediated microbial soil legacy effects in soil and inside roots. *Nat.*
651 *Commun.* 12, 5686. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25971-z>

652 Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, S.P., Griffith, R., 1992. Simultaneous amplification and detection
653 of specific DNA sequences. *Nat. Biotechnol.* 10, 413–417.

654 Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R., 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring
655 of DNA amplification reactions. *Nat. Biotechnol.* 11, 1026–1030.

656 Hossain, Z., Hubbard, M., Gan, Y., Bainard, L.D., 2021. Root rot alters the root-associated
657 microbiome of field pea in commercial crop production systems. *Plant Soil* 460, 593–607.
658 <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04779-8>

659 Huang, X., Liu, S., Liu, X., Zhang, S., Li, L., Zhao, H., Zhao, J., Zhang, J., Cai, Z., 2020. Plant
660 pathological condition is associated with fungal community succession triggered by root
661 exudates in the plant-soil system. *Soil Biol. Biochem.* 151, 108046.
662 <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.108046>

663 Huang, Y., Xiao, X., Huang, H., Jing, J., Zhao, H., Wang, L., Long, X.E., 2018. Contrasting beneficial
664 and pathogenic microbial communities across consecutive cropping fields of greenhouse

665 strawberry. Appl. Microbiol. Biotechnol. 102, 5717–5729. <https://doi.org/10.1007/s00253-018->
666 9013-6

667 Illumina, 2019. Fungal Metagenomic Sequencing Demonstrated Protocol [WWW Document]. URL
668 <https://support.illumina.com/content/dam/illumina->
669 [support/documents/documentation/chemistry_documentation/metagenomic/fungal-metagenomic-](https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/metagenomic/fungal-metagenomic-demonstrated-protocol-100000064940-01.pdf)
670 [demonstrated-protocol-100000064940-01.pdf](https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/metagenomic/fungal-metagenomic-demonstrated-protocol-100000064940-01.pdf) (accessed 3.17.22).

671 Ippolito, A., Schena, L., Nigro, F., Soleti Ligorio, V., Yaseen, T., 2004. Real-time detection of
672 *Phytophthora nicotianae* and *P. citrophthora* in citrus roots and soil. Eur. J. Plant Pathol. 110,
673 833–843. <https://doi.org/10.1007/s10658-004-5571-9>

674 Jost, L., 2006. Entropy and diversity. Oikos 113, 363–375. <https://doi.org/10.1111/j.2006.0030->
675 1299.14714.x

676 Jost, L., Devries, P., Walla, T., Greeney, H., Chao, A., Ricotta, C., 2010. Partitioning diversity for
677 conservation analyses. Divers. Distrib. 16, 65–76. <https://doi.org/10.1111/j.1472->
678 4642.2009.00626.x

679 Karlsson, I., Friberg, H., Steinberg, C., Persson, P., 2014. Fungicide effects on fungal community
680 composition in the wheat phyllosphere. PLoS One 9.
681 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111786>

682 Kõljalg, U., Nilsson, H.R., Schigel, D., Tedersoo, L., Larsson, K.H., May, T.W., Taylor, A.F.S.,
683 Jeppesen, T.S., Frøslev, T.G., Lindahl, B.D., Põldmaa, K., Saar, I., Suija, A., Savchenko, A.,
684 Yatsiuk, I., Adojaan, K., Ivanov, F., Piirmann, T., Põhönen, R., Zirk, A., Abarenkov, K., 2020.
685 The taxon hypothesis paradigm—On the unambiguous detection and communication of taxa.
686 Microorganisms 8, 1–24. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121910>

687 Kong, P., Sharifi, M., Bordas, A., Hong, C., 2021. Differential tolerance to calonectria
688 pseudonaviculata of english boxwood plants associated with the complexity of culturable fungal
689 and bacterial endophyte communities. Plants 10. <https://doi.org/10.3390/plants10112244>

690 Lahti, L., Shetty, S., Al., E., 2017. Tools for microbiome analysis in R.

691 Larsson, J., 2021. eulerr: Area-Proportional Euler and Venn Diagrams with Ellipses.

692 Lazcano, C., Boyd, E., Holmes, G., Hewavitharana, S., Pasulka, A., Ivors, K., 2021. The rhizosphere
693 microbiome plays a role in the resistance to soil-borne pathogens and nutrient uptake of
694 strawberry cultivars under field conditions. *Sci. Rep.* 11, 1–17. [https://doi.org/10.1038/s41598-](https://doi.org/10.1038/s41598-021-82768-2)
695 021-82768-2

696 LeBlanc, N., 2022. Green Manures Alter Taxonomic and Functional Characteristics of Soil Bacterial
697 Communities. *Microb. Ecol.* <https://doi.org/10.1007/s00248-022-01975-0>

698 Lee, M.R., Hawkes, C. V., 2021. Widespread co-occurrence of Sebaciales and arbuscular
699 mycorrhizal fungi in switchgrass roots and soils has limited dependence on soil carbon or
700 nutrients. *PLANTS, PEOPLE, PLANET* 3, 614–626. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10181>

701 Lefcheck, J.S., Byrnes, J.E.K., Isbell, F., Gamfeldt, L., Griffin, J.N., Eisenhauer, N., Hensel, M.J.S.,
702 Hector, A., Cardinale, B.J., Duffy, J.E., 2015. Biodiversity enhances ecosystem
703 multifunctionality across trophic levels and habitats. *Nat. Commun.* 6.
704 <https://doi.org/10.1038/ncomms7936>

705 Lenroud, J., Willer, H., 2018. Current statistics on organic agriculture worldwide: area, operators and
706 market, in: *The World of Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends 2018.* pp. 34–125.

707 Liao, F., Zhang, Y., Zhu, L.-H., Cao, B., Lv, D., Luo, J.-F., Li, G.-R., 2018. Triplex real-time PCR
708 detection of three quarantine *Phytophthora pathogens* infecting *Malus Miller*. *J. Plant Dis. Prot.*
709 125, 325–330. <https://doi.org/10.1007/s41348-017-0144-2>

710 Liu, L., Yan, Y., Ding, H., Zhao, J., Cai, Z., Dai, C., Huang, X., 2021. The fungal community
711 outperforms the bacterial community in predicting plant health status. *Appl. Microbiol.*
712 *Biotechnol.* 105, 6499–6513. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11486-6>

713 Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for
714 RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>

- 715 Lv, Y., Shen, Y., Shi, Y., Shen, F., Chen, Y., Zi, S., Zhu, Z., Kennelly, E.J., Zhao, D., 2019. Root-
716 Endophytic Fungi Diversity Of Fuzi (*Acronitum Carmichaelii*) And Their Anti-Fungal Activity.
717 *Appl. Ecol. Environ. Res.* 17. https://doi.org/10.15666/aeer/1706_1528915300
- 718 Mączik, M., Gryta, A., Sas-Paszt, L., Frąc, M., 2021. Composition, activity and diversity of bacterial
719 and fungal communities responses to inputs of phosphorus fertilizer enriched with beneficial
720 microbes in Brunic Arenosol degraded soil. *L. Degrad. Dev.* 0–1.
721 <https://doi.org/10.1002/ldr.4179>
- 722 Malarczyk, D.G., Panek, J., Frąc, M., 2020. Triplex Real-Time PCR Approach for the Detection of
723 Crucial Fungal Berry Pathogens—*Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp. *Int. J.*
724 *Mol. Sci.* 21, 8469. <https://doi.org/10.3390/ijms21228469>
- 725 Marian, M., Takashima, Y., Harsonowati, W., Murota, H., Narisawa, K., 2022. Biocontrol of Pythium
726 root rot on lisianthus using a new dark septate endophytic fungus *Hyaloscypha variabilis* J1PC1.
727 *Eur. J. Plant Pathol.* <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02459-0>
- 728 Martin, M., Saparrat, M., Barrera, V., Gasoni, L., 2019. Mini-review: Cladorrhinum species, their
729 diversity and application in biotechnology. *Nov. Hedwigia* 108, 489–503.
730 https://doi.org/10.1127/nova_hedwigia/2018/0516
- 731 McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and
732 Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* 8.
733 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- 734 Mikryukov, V., 2022. metagMisc: Miscellaneous functions for metagenomic analysis.
- 735 Mirmajlessi, S.M., Bahram, M., Mänd, M., Najdabbasi, N., Mansouripour, S., Loit, E., 2018. Survey
736 of soil fungal communities in strawberry fields by Illumina amplicon sequencing. *Eurasian Soil*
737 *Sci.* 51, 682–691. <https://doi.org/10.1134/S106422931806011X>
- 738 Neupane, A., Bulbul, I., Wang, Z., Lehman, R.M., Nafziger, E., Marzano, S.-Y.L., 2021. Long term
739 crop rotation effect on subsequent soybean yield explained by soil and root-associated

740 microbiomes and soil health indicators. *Sci. Rep.* 11, 9200. <https://doi.org/10.1038/s41598-021->
741 88784-6

742 Nguyen, N.H., Song, Z., Bates, S.T., Branco, S., Tedersoo, L., Menke, J., Schilling, J.S., Kennedy,
743 P.G., 2016. FUNGuild : An open annotation tool for parsing fungal community datasets by
744 ecological guild. *Fungal Ecol.* 20, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.06.006>

745 Nilsson, R.H., Larsson, K.H., Taylor, A.F.S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T.S., Schigel, D.,
746 Kennedy, P., Picard, K., Glöckner, F.O., Tedersoo, L., Saar, I., Kõljalg, U., Abarenkov, K., 2019.
747 The UNITE database for molecular identification of fungi: Handling dark taxa and parallel
748 taxonomic classifications. *Nucleic Acids Res.* 47, D259–D264.
749 <https://doi.org/10.1093/nar/gky1022>

750 Nishikawa, J., Nakashima, C., 2019. Morphological and molecular characterization of the strawberry
751 black leaf spot pathogen referred to as the strawberry pathotype of *Alternaria alternata*.
752 *Mycoscience* 60, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2018.05.003>

753 Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T., 2000.
754 Loop mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28, e63.
755 <https://doi.org/doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>

756 Oksanen, J., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, B., Stevens, H., Oksanen, M.J., 2007. The vegan
757 package. *Community Ecol. Packag.* 10, 719.

758 Oszust, K., Frąc, M., 2021. First report on the microbial communities of the wild and planted
759 raspberry rhizosphere – A statement on the taxa, processes and a new indicator of functional
760 diversity. *Ecol. Indic.* 121, 107117. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.107117>

761 Ozimek, E., Hanaka, A., 2021. *Mortierella* species as the plant growth-promoting fungi present in the
762 agricultural soils. *Agric.* 11, 1–18. <https://doi.org/10.3390/agriculture11010007>

763 Panek, J., Frąc, M., 2019. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) approach for detection of
764 heat-resistant *Talaromyces flavus* species. *Sci. Rep.* 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-019->

765 42275-x

766 Panek, J., Fraç, M., 2018. Development of a qPCR assay for the detection of heat-resistant
767 *Talaromyces flavus*. Int. J. Food Microbiol. 270, 44–51.
768 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.010>

769 Pedregosa, F., Varoquaux, G., Gramfort, A., Michel, V., Thirion, B., Grisel, O., Blondel, M.,
770 Prettemhofer, P., Weiss, R., Dubourg, V., Vanderplas, J., Passos, A., Cournapeau, D., 2011.
771 Scikit-learn: Machine Learning in Python. J. Mach. Learn. Res. 12, 2825–2830.

772 Pertile, G., Fraç, M., Fornal, E., Oszust, K., Gryta, A., Yaguchi, T., 2020. Molecular and metabolic
773 strategies for postharvest detection of heat-resistant fungus *Neosartorya fisheri* and its
774 discrimination from *Aspergillus fumigatus*. Postharvest Biol. Technol. 161.

775 Peschel, S., Müller, C.L., Von Mutius, E., Boulesteix, A.L., Depner, M., 2021. NetCoMi: Network
776 construction and comparison for microbiome data in R. Brief. Bioinform. 22, 1–18.
777 <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa290>

778 Purahong, W., Krüger, D., Buscot, F., Wubet, T., 2016. Correlations between the composition of
779 modular fungal communities and litter decomposition-associated ecosystem functions. Fungal
780 Ecol. 22, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.04.009>

781 Rozpądek, P., Domka, A.M., Nosek, M., Ważny, R., Jędrzejczyk, R.J., Wiciarz, M., Turnau, K., 2018.
782 The role of strigolactone in the cross-talk between *Arabidopsis thaliana* and the endophytic
783 fungus *Mucor* sp. Front Microbiol. 9:441. doi: 10.3389/fmicb.2018.00441

784 Qi, Z., Zhou, X., Tian, L., Zhang, H., Cai, L., Tang, F., 2022. Distribution of mycotoxin-producing
785 fungi across major rice production areas of China. Food Control 134, 108572.
786 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108572>

787 Qin, S., Yeboah, S., Xu, X., Liu, Y., Yu, B., 2017. Analysis on fungal diversity in rhizosphere soil of
788 continuous cropping potato subjected to different furrow-ridge mulching managements. Front.
789 Microbiol. 8, 845. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00845>

790 Rivers, A.R., Weber, K.C., Gardner, T.G., Liu, S., Armstrong, S.D., 2018. ITSxpress: Software to
791 rapidly trim internally transcribed spacer sequences with quality scores for marker gene analysis.
792 F1000Research 7, 1418. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15704.1>

793 Saiki, R.K., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., 1988. Primer-
794 directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* (80-.).
795 239, 487–491. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nbt0492-413>

796 Schlatter, D.C., Hansen, J., Carlson, B., Leslie, I.N., Huggins, D.R., Paulitz, T.C., 2022. Are microbial
797 communities indicators of soil health in a dryland wheat cropping system? *Appl. Soil Ecol.* 170,
798 104302. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104302>

799 Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W.,
800 Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P.W., Miller, A.N., Wingfield, M.J., Aime, M.C., An, K.D.,
801 Bai, F.Y., Barreto, R.W., Begerow, D., Bergeron, M.J., Blackwell, M., Boekhout, T., Bogale, M.,
802 Boonyuen, N., Burgaz, A.R., Buyck, B., Cai, L., Cai, Q., Cardinali, G., Chaverri, P., Coppins,
803 B.J., Crespo, A., Cubas, P., Cummings, C., Damm, U., de Beer, Z.W., de Hoog, G.S., Del-Prado,
804 R., Dentinger, B., Diéguez-Urbeondo, J., Divakar, P.K., Douglas, B., Dueñas, M., Duong, T.A.,
805 Eberhardt, U., Edwards, J.E., Elshahed, M.S., Fliegerova, K., Furtado, M., García, M.A., Ge,
806 Z.W., Griffith, G.W., Griffiths, K., Groenewald, J.Z., Groenewald, M., Grube, M., Gryzenhout,
807 M., Guo, L.D., Hagen, F., Hambleton, S., Hamelin, R.C., Hansen, K., Harrold, P., Heller, G.,
808 Herrera, C., Hirayama, K., Hirooka, Y., Ho, H.M., Hoffmann, K., Hofstetter, V., Högnabba, F.,
809 Hollingsworth, P.M., Hong, S.B., Hosaka, K., Houbraken, J., Hughes, K., Huhtinen, S., Hyde,
810 K.D., James, T., Johnson, E.M., Johnson, J.E., Johnston, P.R., Jones, E.B.G., Kelly, L.J., Kirk,
811 P.M., Knapp, D.G., Kõljalg, U., Kovács, G.M., Kurtzman, C.P., Landvik, S., Leavitt, S.D.,
812 Ligginstoffer, A.S., Liimatainen, K., Lombard, L., Luangsa-ard, J.J., Lumbsch, H.T., Maganti,
813 H., Maharachchikumbura, S.S.N., Martin, M.P., May, T.W., McTaggart, A.R., Methven, A.S.,
814 Meyer, W., Moncalvo, J.M., Mongkolsamrit, S., Nagy, L.G., Nilsson, R.H., Niskanen, T.,
815 Nyilasi, I., Okada, G., Okane, I., Olariaga, I., Otte, J., Papp, T., Park, D., Petkovits, T., Pino-
816 Bodas, R., Quaedvlieg, W., Raja, H.A., Redecker, D., Rintoul, T.L., Ruibal, C., Sarmiento-

817 Ramírez, J.M., Schmitt, I., Schübler, A., Shearer, C., Sotome, K., Stefani, F.O.P., Stenroos, S.,
818 Stielow, B., Stockinger, H., Suetrong, S., Suh, S.O., Sung, G.H., Suzuki, M., Tanaka, K.,
819 Tedersoo, L., Telleria, M.T., Tretter, E., Untereiner, W.A., Urbina, H., Vágvölgyi, C., Vialle, A.,
820 Vu, T.D., Walther, G., Wang, Q.M., Wang, Y., Weir, B.S., Weiß, M., White, M.M., Xu, J., Yahr,
821 R., Yang, Z.L., Yurkov, A., Zamora, J.C., Zhang, N., Zhuang, W.Y., Schindel, D., 2012. Nuclear
822 ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi.
823 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109, 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>

824 Shetty, S.A., Lahti, L., 2020. microbiomeutilities: Utilities for Microbiome Analytics.

825 Siegieda, D.G., Panek, J., Frac, M., 2021. “Shining a LAMP” (Loop-Mediated Isothermal
826 Amplification) on the Molecular Detection of Phytopathogens *Phytophthora* spp. and
827 *Phytophthora cactorum* in Strawberry Fields. Pathogens 10, 1453.
828 <https://doi.org/10.3390/pathogens10111453>

829 Soppelsa, S., Manici, L.M., Caputo, F., Zago, M., Kelderer, M., 2021. Locally Available Organic
830 Waste for Counteracting Strawberry Decline in a Mountain Specialized Cropping Area.
831 Sustainability 13, 3964. <https://doi.org/10.3390/su13073964>

832 Suarez, M.B., Walsh, K., Boonham, N., O’Neill, T.M., Pearson, S., Barker, I., 2005. Development of
833 real-time PCR (TaqMan®) assays for the detection and quantification of *Botrytis cinerea* in
834 planta. Plant Physiol. Biochem. 43, 890–899. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.07.003>

835 Tayyab, M., Fallah, N., Zhang, C., Pang, Z., Islam, W., Lin, S., Lin, W., Zhang, H., 2021. Sugarcane
836 cultivar-dependent changes in assemblage of soil rhizosphere fungal communities in subtropical
837 ecosystem. Environ. Sci. Pollut. Res. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17229-4>

838 Thambugala, K.M., Daranagama, D.A., Phillips, A.J.L., Kannangara, S.D., Promputtha, I., 2020.
839 Fungi vs. Fungi in Biocontrol: An Overview of Fungal Antagonists Applied Against Fungal
840 Plant Pathogens. Front. Cell. Infect. Microbiol. 10, 1–19.
841 <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.604923>

- 842 Toju, H., Tanabe, A.S., Sato, H., 2018. Network hubs in root-associated fungal metacommunities.
843 *Microbiome* 6, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0497-1>
- 844 Topalović, O., Hussain, M., Heuer, H., 2020. Plants and Associated Soil Microbiota Cooperatively
845 Suppress Plant-Parasitic Nematodes. *Front. Microbiol.* 11, 1–15.
846 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00313>
- 847 Tzelepis, G., Bejai, S., Sattar, M.N., Schwelm, A., Ilbäck, J., Fogelqvist, J., Dixelius, C., 2017.
848 Detection of *Verticillium* species in Swedish soils using real-time PCR. *Arch. Microbiol.* 199,
849 1383–1389. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1412-z>
- 850 United nations general assembly. Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable
851 Development., 2015. <https://doi.org/10.1163/157180910X12665776638740>
- 852 Vartoukian, S.R., Palmer, R.M., Wade, W.G., 2010. Strategies for culture of ‘unculturable’ bacteria.
853 *FEMS Microbiol. Lett.* no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02000.x>
- 854 Wagg, C., Schlaeppi, K., Banerjee, S., Kuramae, E.E., van der Heijden, M.G.A., 2019. Fungal-
855 bacterial diversity and microbiome complexity predict ecosystem functioning. *Nat. Commun.* 10,
856 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12798-y>
- 857 Wang, T., Hao, Y., Zhu, M., Yu, S., Ran, W., Xue, C., Ling, N., Shen, Q., 2019. Characterizing
858 differences in microbial community composition and function between Fusarium wilt diseased
859 and healthy soils under watermelon cultivation. *Plant Soil* 421–433.
860 <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04037-6>
- 861 Wickham, H., 2008. *Elegant Graphics for Data Analysis: ggplot2, Applied Spatial Data Analysis with*
862 *R.*
- 863 Willer, H., Lernoud, J. (Eds.), 2018. *The world of organic agriculture. Statistics and emerging trends*
864 *2018.* Research Institute of Organic Agriculture FiBL IFOAM -Organics International.
865 <https://doi.org/10.4324/9781849775991>
- 866 Wu, C., Wang, F., Ge, A., Zhang, H., Chen, G., Deng, Y., Yang, J., Chen, J., Ge, T., 2021. Enrichment

867 of microbial taxa after the onset of wheat yellow mosaic disease. *Agric. Ecosyst. Environ.* 322,
868 107651. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2021.107651>

869 Xiong, C., Singh, B.K., He, J.Z., Han, Y.L., Li, P.P., Wan, L.H., Meng, G.Z., Liu, S.Y., Wang, J.T.,
870 Wu, C.F., Ge, A.H., Zhang, L.M., 2021. Plant developmental stage drives the differentiation in
871 ecological role of the maize microbiome. *Microbiome* 9, 1–15. [https://doi.org/10.1186/s40168-](https://doi.org/10.1186/s40168-021-01118-6)
872 021-01118-6

873 Xiong, W., Song, Y., Yang, K., Gu, Y., Wei, Z., Kowalchuk, G.A., Xu, Y., Jousset, A., Shen, Q.,
874 Geisen, S., 2020. Rhizosphere protists are key determinants of plant health. *Microbiome* 8, 1–9.
875 <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00799-9>

876 Xu, J., Zhang, Y., Zhang, P., Trivedi, P., Riera, N., Wang, Y., Liu, X., Fan, G., Tang, J., Coletta-Filho,
877 H.D., Cubero, J., Deng, X., Ancona, V., Lu, Z., Zhong, B., Roper, M.C., Capote, N., Catara, V.,
878 Pietersen, G., Vernière, C., Al-Sadi, A.M., Li, L., Yang, F., Xu, X., Wang, J., Yang, H., Jin, T.,
879 Wang, N., 2018. The structure and function of the global citrus rhizosphere microbiome. *Nat.*
880 *Commun.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07343-2>

881 Yamamoto, N., Nazaroff, W.W., Peccia, J., 2014. Assessing the aerodynamic diameters of taxon-
882 specific fungal bioaerosols by quantitative PCR and next-generation DNA sequencing. *J. Aerosol*
883 *Sci.* 78, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2014.08.007>

884 Yang, G., Huang, W., Li, Y., Zhao, S., Kong, B., Ma, J., Li, F., Li, K., Ma, J., 2020. Fungal
885 community and diversity in rhizospheric soil with root rot in an apple orchard. *J. Fruit Sci.* 37,
886 875–881. <https://doi.org/10.13925/j.cnki.gsxb.20190242>

887 Zheng, Y.-K., Miao, C.-P., Chen, H.-H., Huang, F.-F., Xia, Y.-M., Chen, Y.-W., Zhao, L.-X., 2017.
888 Endophytic fungi harbored in *Panax notoginseng* : diversity and potential as biological control
889 agents against host plant pathogens of root-rot disease. *J. Ginseng Res.* 41, 353–360.
890 <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2016.07.005>

891

892 FIGURES CAPTIONS

893 **Fig. 1.** The abundance and structure of 70 most abundant taxa present in all analysed samples.
894 Edge colour represents number of samples where taxa was present, node colour represents
895 number of reads and node size represents number of ASVs. The plot was made with metacoder
896 package in RStudio.

897 **Fig. 2.** Alpha and beta diversity measures of tested samples. **A** Alpha diversity (Effective
898 Number of Species) between healthy and unhealthy strawberry plantations together for all
899 samples and for 4 types of samples separately. Green and red dots indicate samples, vertical
900 lines indicate medians within groups; variability of samples on x-axis is random and added to
901 visualize distribution of all samples; n.s.: not significant, *: p-value <0.05. **B-D** PCoA plots of
902 strawberry plantations of mycobiome, according to the type of sample **B** and health status
903 (healthy vs unhealthy) and sample type for all samples altogether and subsequent sample type.
904 The plots were made with vegan, phyloseq and microbiome packages in RStudio.

905 **Fig. 3.** Composition of trophic modes of fungal communities between healthy and unhealthy
906 samples of different parts of strawberry. Dots are median abundances and vertical lines show
907 0.95 confidence intervals. Significant differences between health status within groups are
908 marked with asterisk (p. adjusted < 0.05). The plot was made with tidyverse package in
909 RStudio.

910 **Fig. 4.** Venn diagram representing core taxa for each samples type individually, for healthy and
911 unhealthy samples. The plot was made with phyloseq, microbiome, metagMisc and eulerr
912 packages in RStudio.

913 **Fig. 5.** Differential analysis of species present in healthy and unhealthy strawberry plantation.
914 Each taxon was identified to the genus level. Only significant results are showed, with p.
915 adjusted <0.05. with red ovals we marked genera taxa that were assigned to pathotroph tropic

916 mode; *: genera that are known to attack strawberry (Garrido et al., 2011). The plot was made
917 with phyloseq and DESeq2 packages in RStudio.

918 **Fig. 6.** Differential networks of healthy and unhealthy strawberry soil samples, collected from
919 organic plantations of soil (A), rhizosphere (B), roots (C) and shoots (D) samples. Node colours
920 represent clusters, edge colours represent estimated Pearson correlation between ASVs - green
921 positive and red negative. Hub taxa are with highest degree, betweenness, and closeness
922 centrality at the same time and are shown in bulk. Only taxa with total reads with at least 200
923 reads are shown. The plots were made with phyloseq, genefilter and NetCoMi packages in
924 RStudio.

925

926

927

928

929

930

931

932

933

934

935

936

937 TABLE CAPTIONS

938 **Table 1.** The most abundant 20 ASVs (identified to the genus level) in all samples altogether
939 and each type individually. With black circle (●) we marked genera that were differentially
940 abundant in each sample type between healthy and unhealthy samples. With green triangle (►)
941 we marked genera that were core for healthy in each sample type. With red square (■) we
942 marked genera that were core component of mycobiome for unhealthy in each sample type. The
943 lack of symbol indicates genera that were not differentially abundant in both samples type nor
944 belonged to core taxa of healthy and unhealthy samples.

945 **Table 2.** Table summarizes information whether Jaccard index (how different the sets of most
946 central nodes are between healthy and unhealthy samples) is greater than or smaller than
947 expecting at random, significant results are marked with asterisk (p-value < 0.05). Jaccard index
948 ranges from 0 (completely different) to 1 (sets equal).

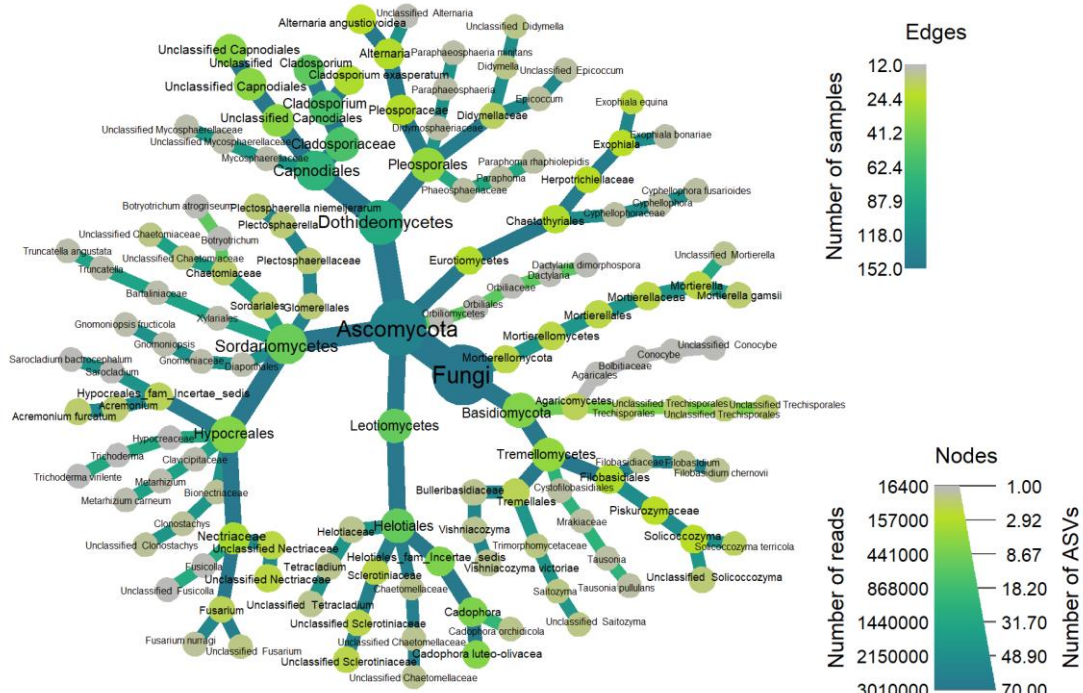


Figure 1.

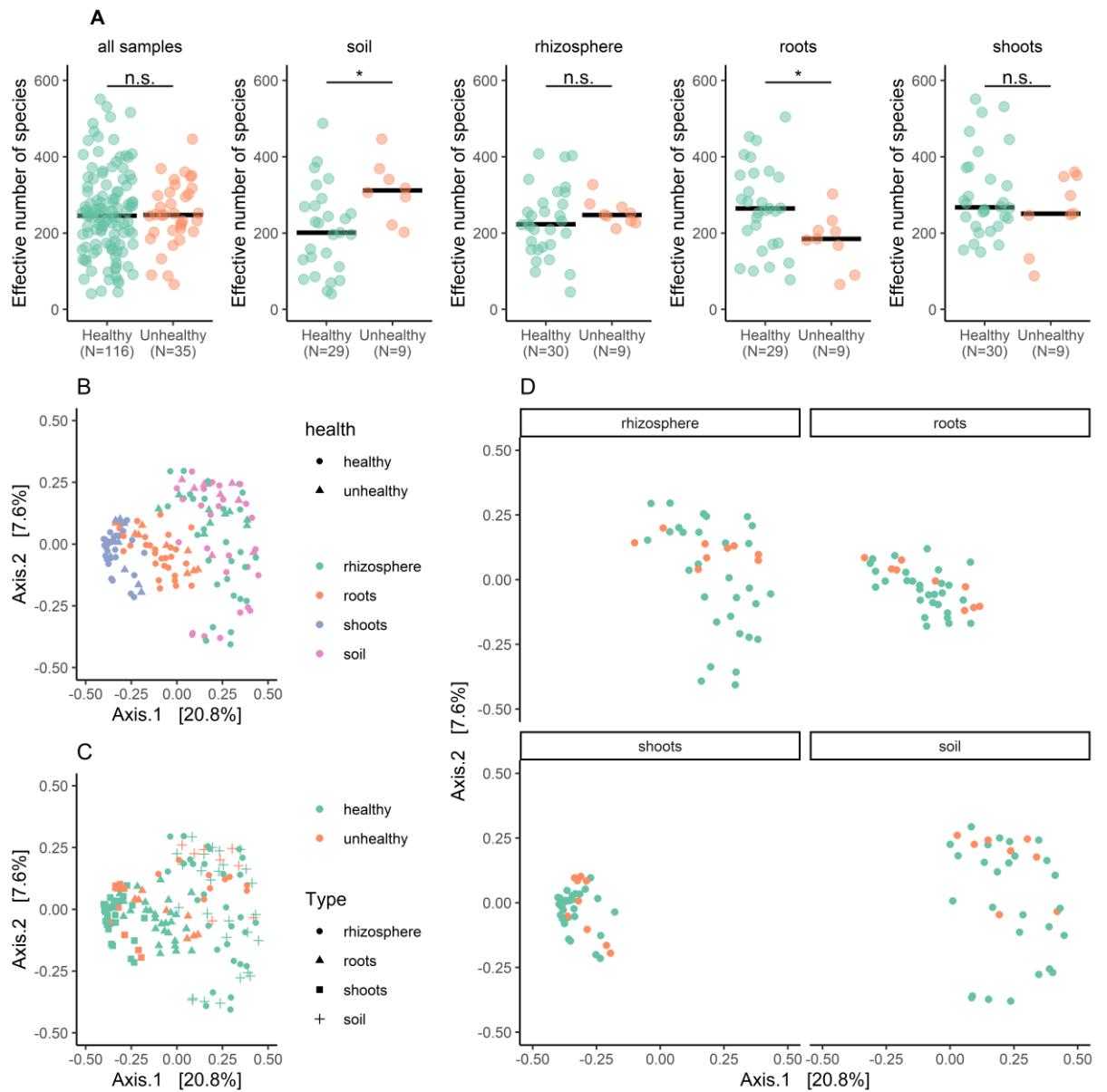


Figure 2.

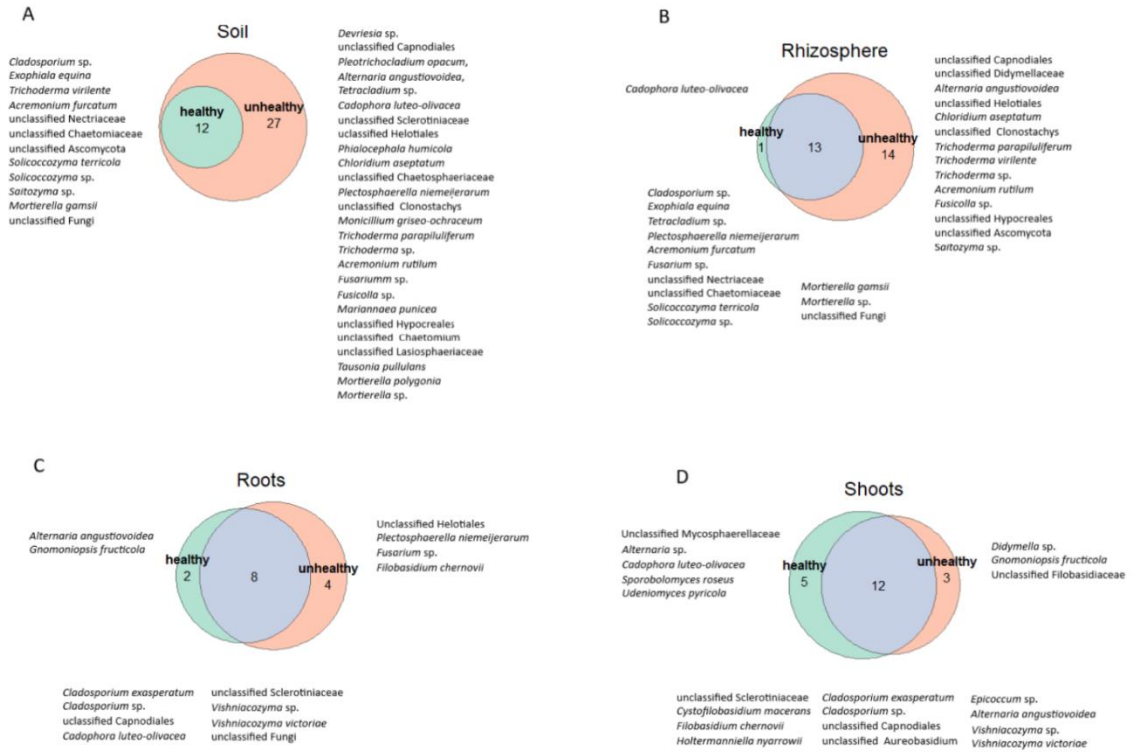


Figure 3.

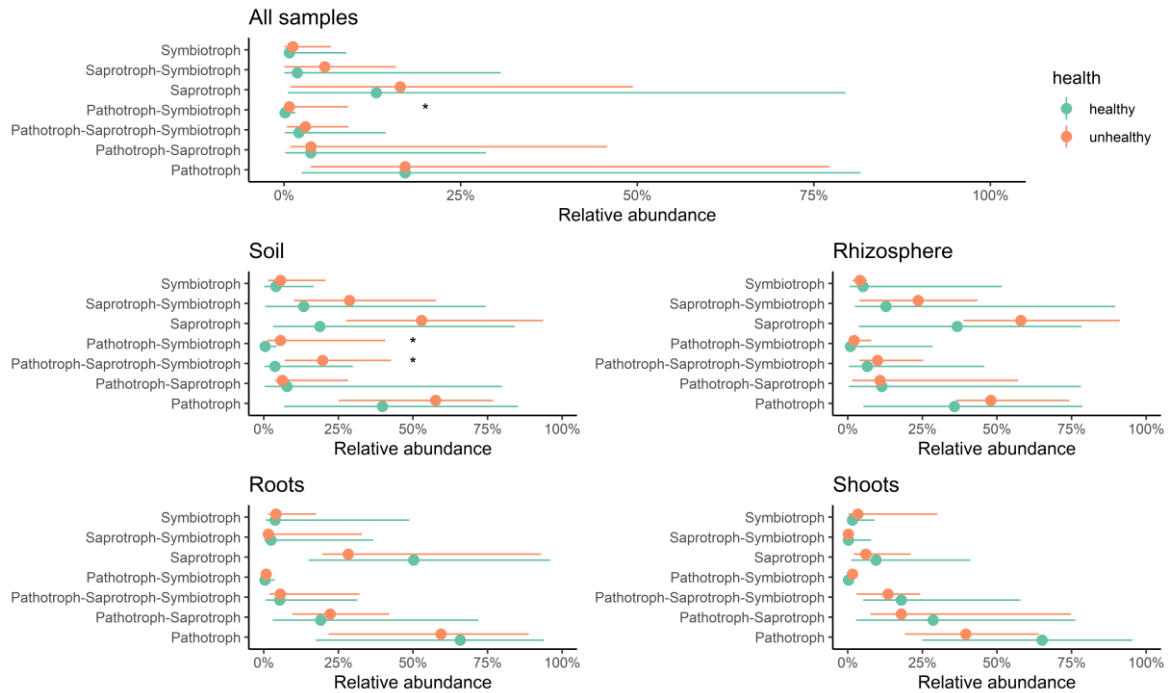


Figure 4.

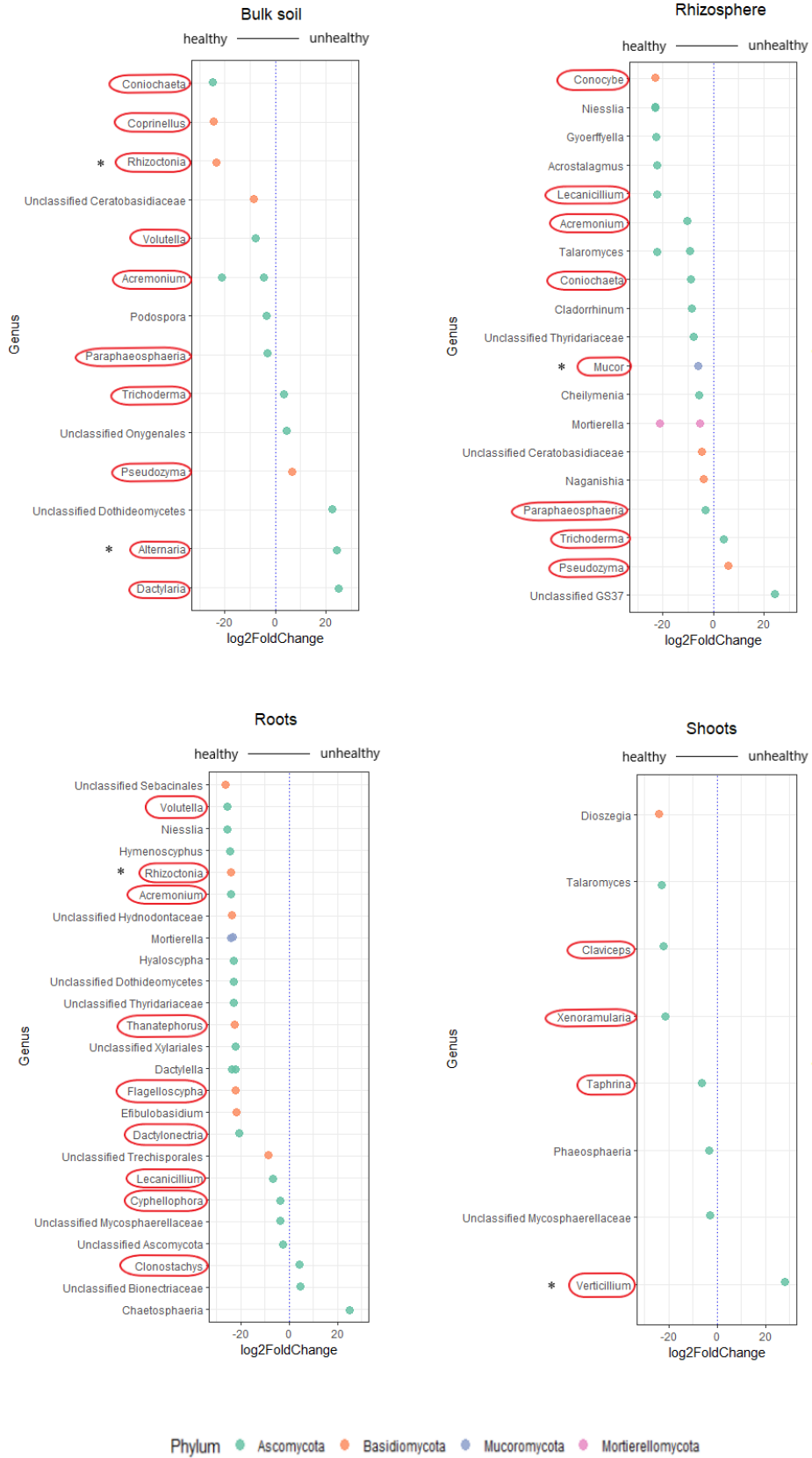


Figure 5.

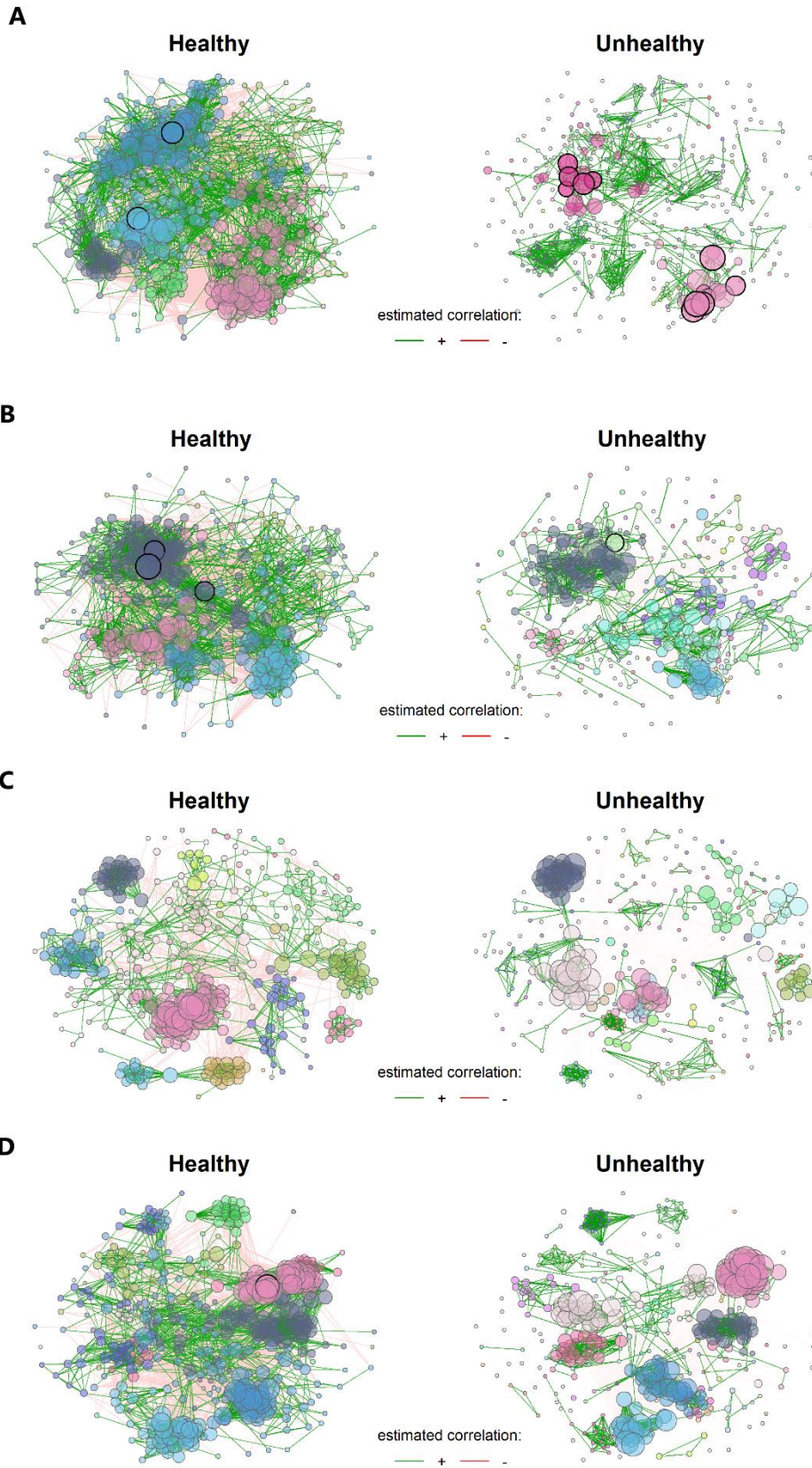


Figure 6.

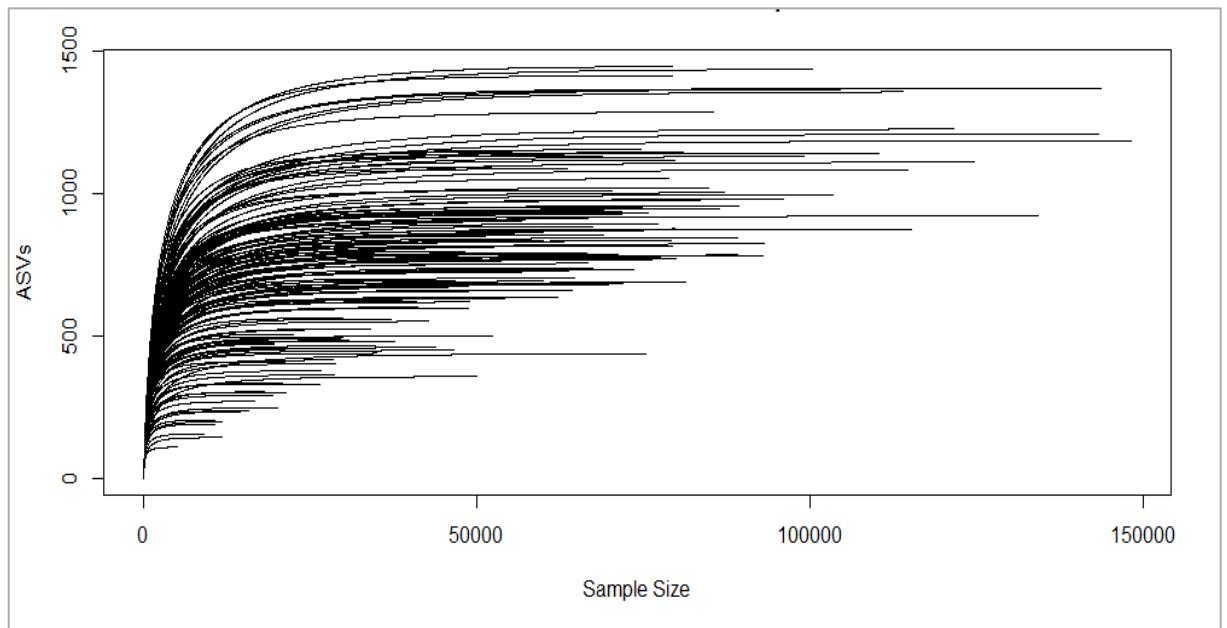
Table 1.

Bulk soil	Rhizosphere	Roots	Shoots
<i>Cadophora</i> sp. ■	<i>Cadophora</i> sp. ►	<i>Cadophora</i> sp. ► ■	<i>Cadophora</i> sp. ►
unclassified Nectriaceae ► ■	unclassified Nectriaceae ■	<i>Cadophora</i> sp. ► ■	unclassified Mycosphaerellaceae ► ●
<i>Fusarium</i> sp. ■	<i>Fusarium</i> sp. ►	<i>Dactylonectria</i> sp. ●	<i>Gnomoniopsis</i> sp. ■
<i>Exophiala</i> sp. ► ■	<i>Exophiala</i> sp. ► ■	<i>Fusarium</i> sp. ■	<i>Plectosphaerella</i> sp.
unclassified Chaetomiaceae ► ■	unclassified Chaetomiaceae ► ■	<i>Gnomoniopsis</i> sp. ►	<i>Alternaria</i> sp. ► ■
<i>Acremonium</i> sp. ●	<i>Botryotrichum</i> sp.	<i>Plectosphaerella</i> sp. ■	unclassified Capnodiales ► ■
<i>Alternaria</i> sp. ■ ●	<i>Acremonium</i> sp. ► ■ ●	<i>Alternaria</i> sp. ►	<i>Cladosporium</i> sp. ► ■
unclassified Capnodiales	<i>Alternaria</i> sp. ■	unclassified Capnodiales	<i>Cladosporium</i> sp. ► ■
<i>Cladosporium</i> sp. ► ■	unclassified Capnodiales	<i>Cladosporium</i> sp. ► ■	<i>Filobasidium</i> sp. ► ■
<i>Cladosporium</i> sp. ► ■	<i>Cladosporium</i> sp. ► ■	<i>Cladosporium</i> sp. ► ■	<i>Sporobolomyces</i> sp. ►
unclassified Fungi	<i>Cladosporium</i> sp. ► ■	unclassified Fungi	<i>Symmetrospora</i> sp.
<i>Tausonia</i> sp. ■	unclassified Fungi	unclassified Ceratobasidiaceae	<i>Vishniacozyma</i> sp. ► ■
<i>Saitozyma</i> sp. ► ■	<i>Tausonia</i> sp.	<i>Vishniacozyma</i> sp.	<i>Vishniacozyma</i> sp. ► ■
<i>Solicoccozyma</i> sp. ► ■	<i>Saitozyma</i> sp. ■	unclassified Trechisporales ●	<i>Didymella</i> sp. ■
<i>Solicoccozyma</i> sp. ► ■	<i>Solicoccozyma</i> sp. ► ■	<i>Didymella</i> sp.	<i>Epicoccum</i> sp. ► ■
unclassified Didymellaceae	<i>Solicoccozyma</i> sp. ► ■	unclassified Didymellaceae	unclassified Didymellaceae
<i>Mortierella</i> sp. ► ■	<i>Mortierella</i> sp. ► ■ ●	unclassified Sclerotiniaceae ► ■	<i>Paraphoma</i> sp.
<i>Mortierella</i> sp. ► ■	<i>Mortierella</i> sp. ► ■ ●	unclassified Helotiales ■	unclassified Chaetomellaceae
unclassified Sclerotiniaceae ■	unclassified Sclerotiniaceae	<i>Dactylaria</i> sp.	<i>Podosphaera</i> sp.
<i>Tetracladium</i> sp.	<i>Tetracladium</i> sp. ►	<i>Tetracladium</i> sp.	unclassified Sclerotiniaceae ► ■

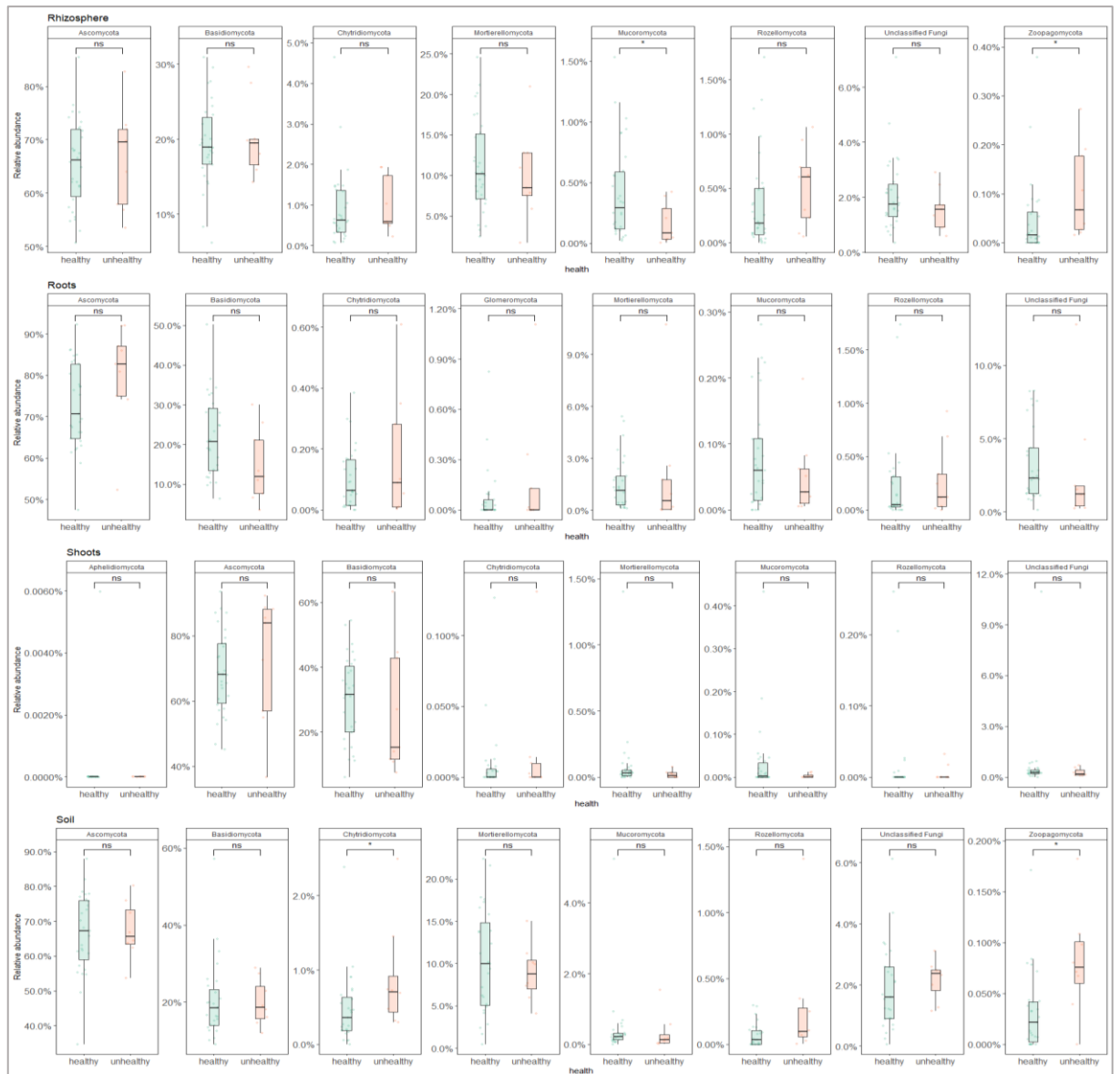
Table 2.

	Jaccard index greater than or smaller than expected at random			
	Soil	Rhizosphere	Roots	Shoots
degree	0.134*	0.253*	0.333	0.279
betweenness centrality	0.028*	0.121*	0.090*	0.159*
closeness centrality	0.110*	0.202*	0.231*	0.333
eigenvector centrality	0.134*	0.224*	0.257*	0.291

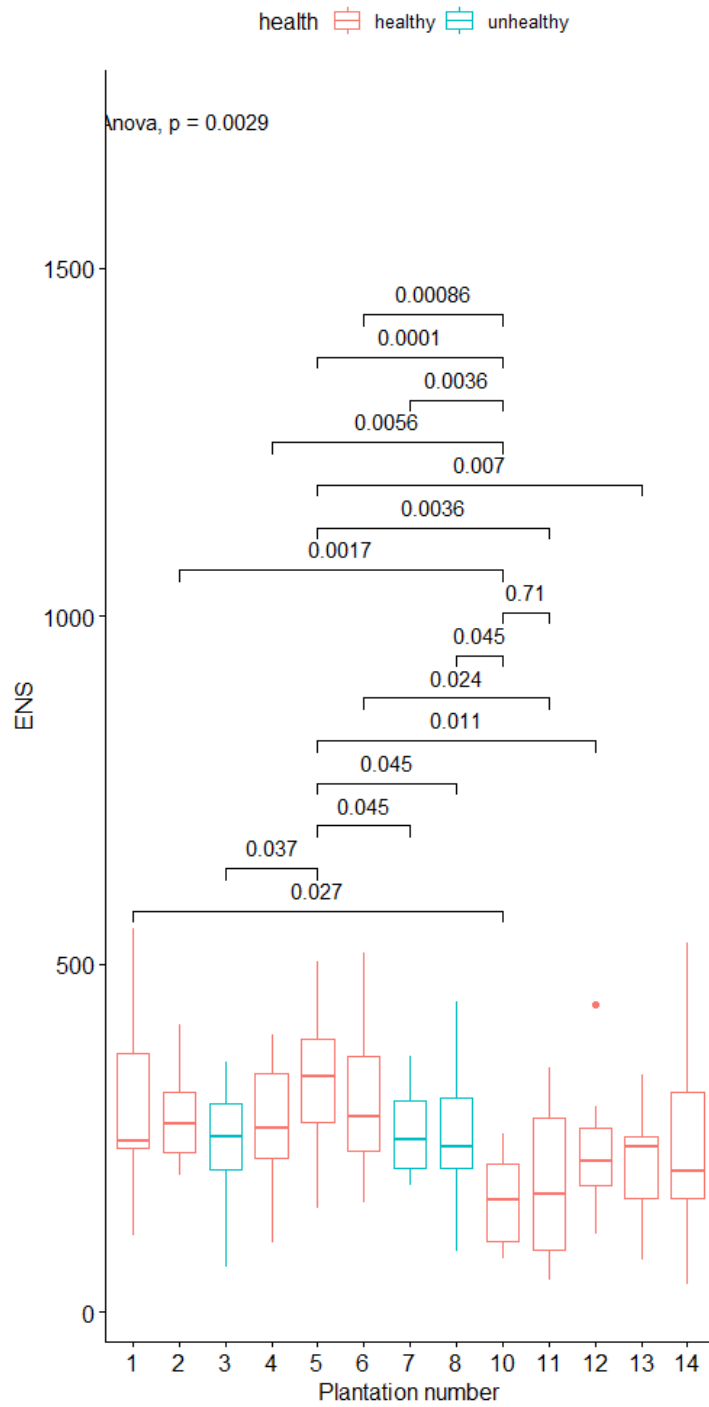
5.4.3. Materiały uzupełniające



Supplementary Fig. 1. Rarefaction curves of all sequenced samples made with vegan package in RStudio.

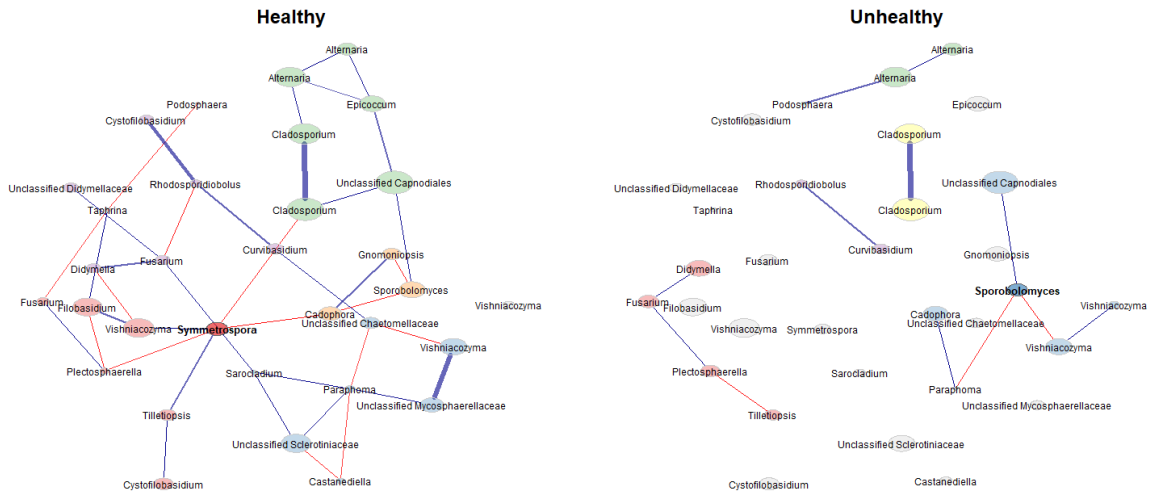


Supplementary Figure 2. Differences between mean abundances of healthy and unhealthy samples of top 8 phyla in analysed strawberry samples. Wilcoxon test was used to determine statistical significance. ns: not-significant, *: p-value < 0.05. The plot was made with microbiomeutilities, microbiome and phyloseq packages in RStudio.

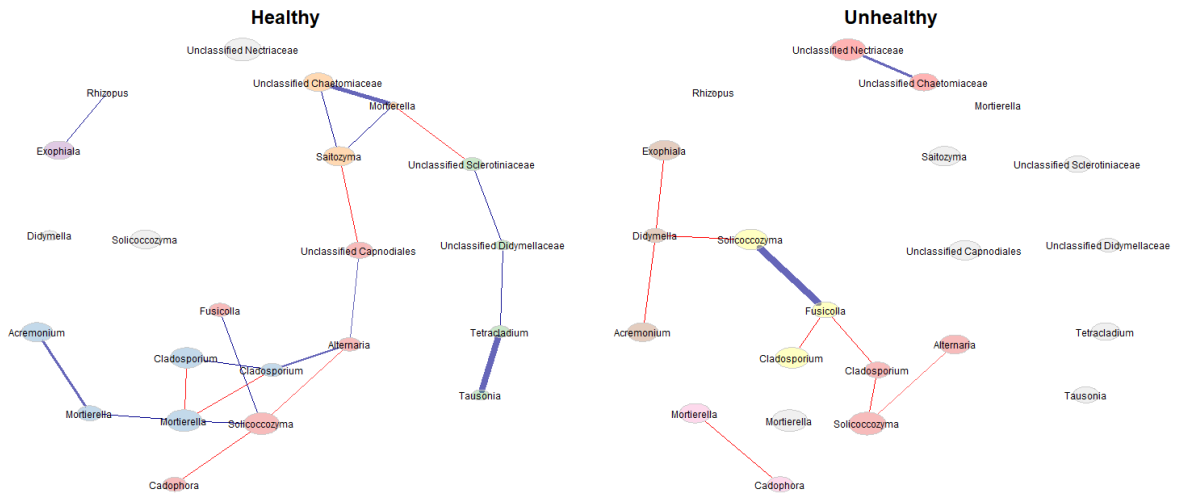


Supplementary figure 3. Differences between mean ENS in the analyzed plantations

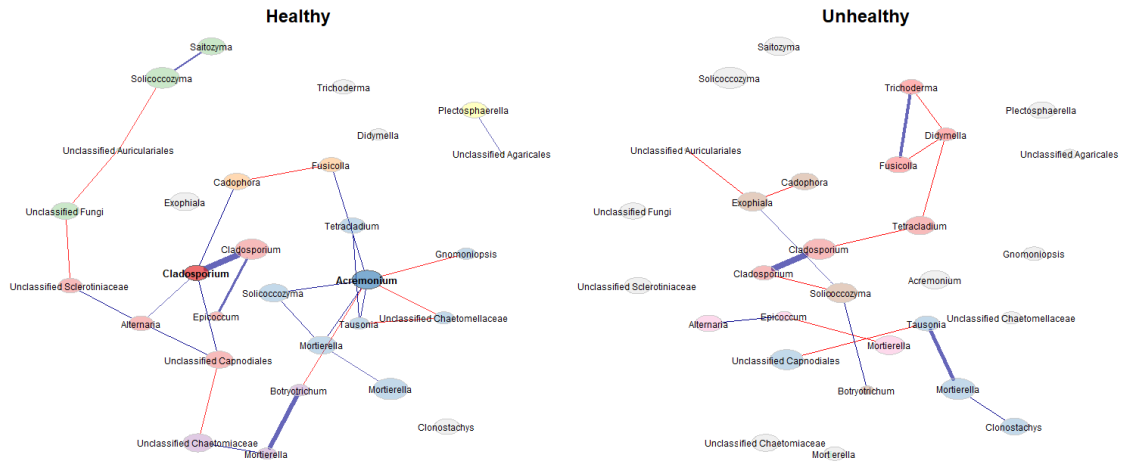
Shoots



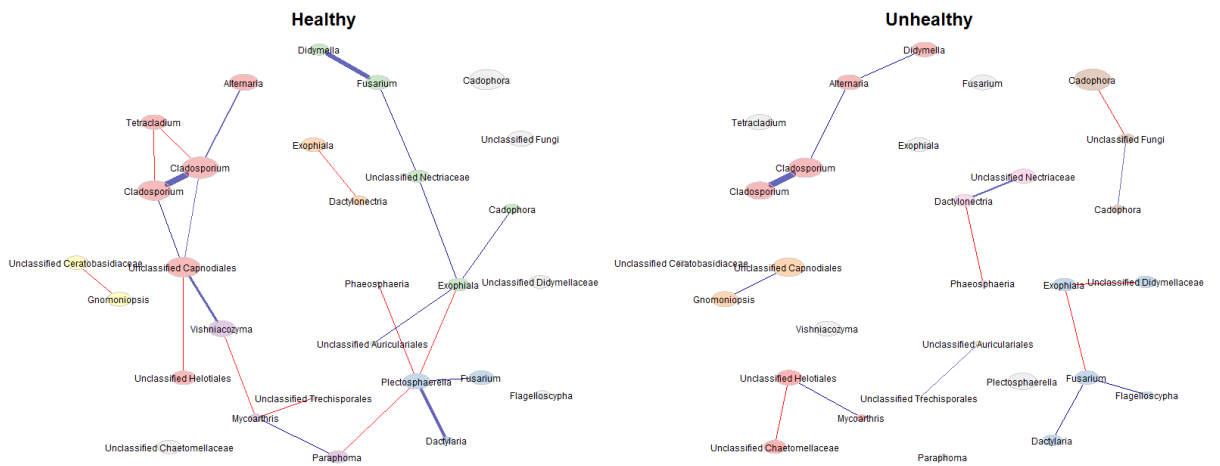
Bulk soil



Rhizosphere



Roots



Supplementary Figure 4. Dissimilarity networks of healthy and unhealthy samples of rhizosphere, bulk soil, shoots and roots. For the analysis, we kept 50 taxa that had the highest variance and used SPRING method for construction of networks.

Supplementary table 1. Metadata of analyzed samples from strawberry plantations.

sample-id	Plantation	Type	Variety	Soil-type	Health status	Cultivation	Irrigation
337-19	2	rhizosphere	Honeoye	fluvisol	healthy	agrotextile	Yes
338-19	2	rhizosphere	Honeoye	fluvisol	healthy	agrotextile	Yes
339-19	2	rhizosphere	Honeoye	fluvisol	healthy	agrotextile	Yes
340-19	2	bulk-soil	Honeoye	fluvisol	healthy	agrotextile	Yes
341-19	2	bulk-soil	Honeoye	fluvisol	healthy	agrotextile	Yes
347-19	1	rhizosphere	Aprica	fluvisol	healthy	agrotextile	Yes
348-19	1	bulk-soil	Aprica	fluvisol	healthy	agrotextile	Yes
349-19	1	rhizosphere	Aprica	fluvisol	healthy	agrotextile	Yes
350-19	1	bulk-soil	Aprica	fluvisol	healthy	agrotextile	Yes
351-19	1	rhizosphere	Aprica	fluvisol	healthy	agrotextile	Yes
357-19	3	rhizosphere	Dipred	fluvisol	unhealthy	agrotextile	Yes
358-19	3	bulk-soil	Dipred	fluvisol	unhealthy	agrotextile	Yes
359-19	3	rhizosphere	Dipred	fluvisol	unhealthy	agrotextile	Yes
360-19	3	bulk-soil	Dipred	fluvisol	unhealthy	agrotextile	Yes
361-19	3	rhizosphere	Dipred	fluvisol	unhealthy	agrotextile	Yes
367-19	5	rhizosphere	Honeoye	brown-soil	healthy	no-agrotextile-in-the-ground	No
368-19	5	bulk-soil	Honeoye	brown-soil	healthy	no-agrotextile-in-the-ground	No
369-19	5	rhizosphere	Honeoye	brown-soil	healthy	no-agrotextile-in-the-ground	No
370-19	5	bulk-soil	Honeoye	brown-soil	healthy	no-agrotextile-in-the-ground	No
371-19	5	rhizosphere	Honeoye	brown-soil	healthy	no-agrotextile-in-the-ground	No
372-19	5	bulk-soil	Honeoye	brown-soil	healthy	no-agrotextile-in-the-ground	No

379-19	4	rhizosphere	Aprica	brown-soil	healthy	no-agrotextile-in-the-ground	No
380-19	4	bulk-soil	Aprica	brown-soil	healthy	no-agrotextile-in-the-ground	No
381-19	4	rhizosphere	Aprica	brown-soil	healthy	no-agrotextile-in-the-ground	No
382-19	4	bulk-soil	Aprica	brown-soil	healthy	no-agrotextile-in-the-ground	No
383-19	4	rhizosphere	Aprica	brown-soil	healthy	no-agrotextile-in-the-ground	No
384-19	4	bulk-soil	Aprica	brown-soil	healthy	no-agrotextile-in-the-ground	No
391-19	6	rhizosphere	Honeoye	NaN	healthy	straw	No
392-19	6	bulk-soil	Honeoye	NaN	healthy	straw	No
393-19	6	rhizosphere	Honeoye	NaN	healthy	straw	No
394-19	6	bulk-soil	Honeoye	NaN	healthy	straw	No
395-19	6	rhizosphere	Honeoye	NaN	healthy	straw	No
396-19	6	bulk-soil	Honeoye	NaN	healthy	straw	No
415-19	7	rhizosphere	Honeoye	NaN	unhealthy	agrotextile	Yes
416-19	7	bulk-soil	Honeoye	NaN	unhealthy	agrotextile	Yes
417-19	7	rhizosphere	Honeoye	NaN	unhealthy	agrotextile	Yes
418-19	7	bulk-soil	Honeoye	NaN	unhealthy	agrotextile	Yes
419-19	7	rhizosphere	Honeoye	NaN	unhealthy	agrotextile	Yes
420-19	7	bulk-soil	Honeoye	NaN	unhealthy	agrotextile	Yes
427-19	8	rhizosphere	Honeoye	NaN	unhealthy	agrotextile	Yes
428-19	8	bulk-soil	Honeoye	NaN	unhealthy	agrotextile	Yes
429-19	8	rhizosphere	Honeoye	NaN	unhealthy	agrotextile	Yes
430-19	8	bulk-soil	Honeoye	NaN	unhealthy	agrotextile	Yes
431-19	8	rhizosphere	Honeoye	NaN	unhealthy	agrotextile	Yes
432-19	8	bulk-soil	Honeoye	NaN	unhealthy	agrotextile	Yes

439-19	10	rhizosphere	Dipred	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
440-19	10	bulk-soil	Dipred	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
441-19	10	rhizosphere	Dipred	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
442-19	10	bulk-soil	Dipred	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
443-19	10	rhizosphere	Dipred	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
444-19	10	bulk-soil	Dipred	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
451-19	11	rhizosphere	Aprica	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
452-19	11	bulk-soil	Aprica	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
453-19	11	rhizosphere	Aprica	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
454-19	11	bulk-soil	Aprica	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
455-19	11	rhizosphere	Aprica	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
456-19	11	bulk-soil	Aprica	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
463-19	12	rhizosphere	Honeye	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
464-19	12	bulk-soil	Honeye	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
465-19	12	rhizosphere	Honeye	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
466-19	12	bulk-soil	Honeye	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
467-19	12	rhizosphere	Honeye	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
468-19	12	bulk-soil	Honeye	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
475-19	13	rhizosphere	Aprica	sandy loose	healthy	agrotextile	Yes
476-19	13	bulk-soil	Aprica	sandy loose	healthy	agrotextile	Yes
477-19	13	rhizosphere	Aprica	sandy loose	healthy	agrotextile	Yes
478-19	13	bulk-soil	Aprica	sandy loose	healthy	agrotextile	Yes
479-19	13	rhizosphere	Aprica	sandy loose	healthy	agrotextile	Yes
480-19	13	bulk-soil	Aprica	sandy loose	healthy	agrotextile	Yes
487-19	14	rhizosphere	Aprica	sandy compact	healthy	agrotextile	Yes
488-19	14	bulk-soil	Aprica	sandy compact	healthy	agrotextile	Yes

489-19	14	rhizosphere	Aprica	sandy compact	healthy	agrotextile	Yes
490-19	14	bulk-soil	Aprica	sandy compact	healthy	agrotextile	Yes
491-19	14	rhizosphere	Aprica	sandy compact	healthy	agrotextile	Yes
492-19	14	bulk-soil	Aprica	sandy compact	healthy	agrotextile	Yes
342K-19	2	roots	Honeoye	fluvisol	healthy	agrotextile	Yes
342L-19	2	shoots	Honeoye	fluvisol	healthy	agrotextile	Yes
343K-19	2	roots	Honeoye	fluvisol	healthy	agrotextile	Yes
343L-19	2	shoots	Honeoye	fluvisol	healthy	agrotextile	Yes
344K-19	2	roots	Honeoye	fluvisol	healthy	agrotextile	Yes
344L-19	2	shoots	Honeoye	fluvisol	healthy	agrotextile	Yes
352K-19	1	roots	Aprica	fluvisol	healthy	agrotextile	Yes
352L-19	1	shoots	Aprica	fluvisol	healthy	agrotextile	Yes
354K-19	1	roots	Aprica	fluvisol	healthy	agrotextile	Yes
354L-19	1	shoots	Aprica	fluvisol	healthy	agrotextile	Yes
356K-19	1	roots	Aprica	fluvisol	healthy	agrotextile	Yes
356L-19	1	shoots	Aprica	fluvisol	healthy	agrotextile	Yes
362K-19	3	roots	Dipred	fluvisol	unhealthy	agrotextile	Yes
362L-19	3	shoots	Dipred	fluvisol	unhealthy	agrotextile	Yes
364K-19	3	roots	Dipred	fluvisol	unhealthy	agrotextile	Yes

364L-19	3	shoots	Dipred	fluvisol	unhealthy	agrotextile	Yes
366K-19	3	roots	Dipred	fluvisol	unhealthy	agrotextile	Yes
366L-19	3	shoots	Dipred	fluvisol	unhealthy	agrotextile	Yes
373K-19	5	roots	Honeoye	brown-soil	healthy	no-agrotextile-in-the-gound	No
373L-19	5	shoots	Honeoye	brown-soil	healthy	no-agrotextile-in-the-gound	No
375K-19	5	roots	Honeoye	brown-soil	healthy	no-agrotextile-in-the-gound	No
375L-19	5	shoots	Honeoye	brown-soil	healthy	no-agrotextile-in-the-gound	No
377K-19	5	roots	Honeoye	brown-soil	healthy	no-agrotextile-in-the-gound	No
377L-19	5	shoots	Honeoye	brown-soil	healthy	no-agrotextile-in-the-gound	No
385K-19	4	roots	Aprica	brown-soil	healthy	no-agrotextile-in-the-gound	No
385L-19	4	shoots	Aprica	brown-soil	healthy	no-agrotextile-in-the-gound	No
387K-19	4	roots	Aprica	brown-soil	healthy	no-agrotextile-in-the-gound	No
387L-19	4	shoots	Aprica	brown-soil	healthy	no-agrotextile-in-the-gound	No
389K-19	4	roots	Aprica	brown-soil	healthy	no-agrotextile-in-the-gound	No

389L-19	4	shoots	Aprica	brown-soil	healthy	no-agrotextile-in-the-gound	No
397K-19	6	roots	Honeoye	NaN	healthy	straw	No
397L-19	6	shoots	Honeoye	NaN	healthy	straw	No
399K-19	6	roots	Honeoye	NaN	healthy	straw	No
399L-19	6	shoots	Honeoye	NaN	healthy	straw	No
401K-19	6	roots	Honeoye	NaN	healthy	straw	No
401L-19	6	shoots	Honeoye	NaN	healthy	straw	No
421K-19	7	roots	Honeoye	NaN	unhealthy	agrotextile	Yes
421L-19	7	shoots	Honeoye	NaN	unhealthy	agrotextile	Yes
423K-19	7	roots	Honeoye	NaN	unhealthy	agrotextile	Yes
423L-19	7	shoots	Honeoye	NaN	unhealthy	agrotextile	Yes
425K-19	7	roots	Honeoye	NaN	unhealthy	agrotextile	Yes
425L-19	7	shoots	Honeoye	NaN	unhealthy	agrotextile	Yes
433K-19	8	roots	Honeoye	NaN	unhealthy	agrotextile	Yes
433L-19	8	shoots	Honeoye	NaN	unhealthy	agrotextile	Yes
435K-19	8	roots	Honeoye	NaN	unhealthy	agrotextile	Yes
435L-19	8	shoots	Honeoye	NaN	unhealthy	agrotextile	Yes
437K-19	8	roots	Honeoye	NaN	unhealthy	agrotextile	Yes
437L-19	8	shoots	Honeoye	NaN	unhealthy	agrotextile	Yes

445K-19	10	roots	Dipred	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
445L-19	10	shoots	Dipred	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
447K-19	10	roots	Dipred	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
447L-19	10	shoots	Dipred	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
449K-19	10	roots	Dipred	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
449L-19	10	shoots	Dipred	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
457K-19	11	roots	Aprica	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
457L-19	11	shoots	Aprica	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
459K-19	11	roots	Aprica	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
459L-19	11	shoots	Aprica	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
461K-19	11	roots	Aprica	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
461L-19	11	shoots	Aprica	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
469K-19	12	roots	Honeoye	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
469L-19	12	shoots	Honeoye	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
471K-19	12	roots	Honeoye	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
471L-19	12	shoots	Honeoye	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
473K-19	12	roots	Honeoye	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
473L-19	12	shoots	Honeoye	acrisol	healthy	agrotextile	Yes
481K-19	13	roots	Aprica	sandy loose	healthy	agrotextile	Yes

481L-19	13	shoots	Aprica	sandy loose	healthy	agrotextile	Yes
483K-19	13	roots	Aprica	sandy loose	healthy	agrotextile	Yes
483L-19	13	shoots	Aprica	sandy loose	healthy	agrotextile	Yes
485K-19	13	roots	Aprica	sandy loose	healthy	agrotextile	Yes
485L-19	13	shoots	Aprica	sandy loose	healthy	agrotextile	Yes
493K-19	14	roots	Aprica	sandy compact	healthy	agrotextile	Yes
493L-19	14	shoots	Aprica	sandy compact	healthy	agrotextile	Yes
495K-19	14	roots	Aprica	sandy compact	healthy	agrotextile	Yes
495L-19	14	shoots	Aprica	sandy compact	healthy	agrotextile	Yes
497K-19	14	roots	Aprica	sandy compact	healthy	agrotextile	Yes
497L-19	14	shoots	Aprica	sandy compact	healthy	agrotextile	Yes

Supplemetanry Table 2. Primers used in ITS1 NGS metataxonomics based on paper by Bellemain et al. (Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., Kausserud, H., 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. BMC Microbiol. 10, 189. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-189>)

	Overhang	Locus-specific sequence	Primer sequence 5'→3'
Forward			
ITS_fwd_1	TCGTCGGCAGCGTCAGA	CTTGGTCATTTA	TCGTCGGCAGCGTCAGA
	TGTGTATAAGAGACAG	GAGGAAGTAA	TGTGTATAAGAGACAG
			CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
ITS_fwd_2	TCGTCGGCAGCGTCAGA	CTCGGTCATTTA	TCGTCGGCAGCGTCAGA
	TGTGTATAAGAGACAG	GAGGAAGTAA	TGTGTATAAGAGACAG
			CTCGGTCATTTAGAGGAAGTAA
ITS_fwd_3	TCGTCGGCAGCGTCAGA	CTTGGTCATTTA	TCGTCGGCAGCGTCAGA
	TGTGTATAAGAGACAG	GAGGAACTAA	TGTGTATAAGAGACAG
			CTTGGTCATTTAGAGGAACTAA
ITS_fwd_4	TCGTCGGCAGCGTCAGA	CCCGGTCATTTA	TCGTCGGCAGCGTCAGA
	TGTGTATAAGAGACAG	GAGGAAGTAA	TGTGTATAAGAGACAG
			CCCGGTCATTTAGAGGAAGTAA
ITS_fwd_5	TCGTCGGCAGCGTCAGA	CTAGGCTATTTA	TCGTCGGCAGCGTCAGA
	TGTGTATAAGAGACAG	GAGGAAGTAA	TGTGTATAAGAGACAG
			CTAGGCTATTTAGAGGAAGTAA
ITS_fwd_6	TCGTCGGCAGCGTCAGA	CTTAGTTATTTA	TCGTCGGCAGCGTCAGA
	TGTGTATAAGAGACAG	GAGGAAGTAA	TGTGTATAAGAGACAG
			CTTAGTTATTTAGAGGAAGTAA
ITS_fwd_7	TCGTCGGCAGCGTCAGA	CTACGTCATTTA	TCGTCGGCAGCGTCAGA
	TGTGTATAAGAGACAG	GAGGAAGTAA	TGTGTATAAGAGACAG
			CTACGTCATTTAGAGGAAGTAA
ITS_fwd_8	TCGTCGGCAGCGTCAGA	CTTGGTCATTTA	TCGTCGGCAGCGTCAGA

	TGTGTATAAGAGACAG	GAGGTCGTAA	TGTGTATAAGAGACAG
			CTTGGTCATTTAGAGGTCGTA AA
Reverse			
ITS_rev_1	GTCTCGTGGGCTCGGAG	GCTGCGTTCT	GTCTCGTGGGCTCGGAG
	ATGTGTATAAGAGACAG	TCATCGATGC	ATGTGTATAAGAGACAG
			GCTGCGTTCTTCATCGATGC
ITS_rev_2	GTCTCGTGGGCTCGGAG	GCTGCGTTCT	GTCTCGTGGGCTCGGAG
	ATGTGTATAAGAGACAG	TCATCGATGG	ATGTGTATAAGAGACAG
			GCTGCGTTCTTCATCGATGG
ITS_rev_3	GTCTCGTGGGCTCGGAG	GCTACGTTCT	GTCTCGTGGGCTCGGAG
	ATGTGTATAAGAGACAG	TCATCGATGC	ATGTGTATAAGAGACAG
			GCTACGTTCTTCATCGATGC
ITS_rev_4	GTCTCGTGGGCTCGGAG	GCTGCGTTCT	GTCTCGTGGGCTCGGAG
	ATGTGTATAAGAGACAG	TCATCGATGT	ATGTGTATAAGAGACAG
			GCTGCGTTCTTCATCGATGT
ITS_rev_5	GTCTCGTGGGCTCGGAG	ACTGTGTTCT	GTCTCGTGGGCTCGGAG
	ATGTGTATAAGAGACAG	TCATCGATGT	ATGTGTATAAGAGACAG
			ACTGTGTTCTTCATCGATGT
ITS_rev_6	GTCTCGTGGGCTCGGAG	GCTGCGTTCT	GTCTCGTGGGCTCGGAG
	ATGTGTATAAGAGACAG	TCATCGTTGC	ATGTGTATAAGAGACAG
			GCTGCGTTCTTCATCGTTGC
iTS_rev_7	GTCTCGTGGGCTCGGAG	GCGTTCTTCA	GTCTCGTGGGCTCGGAG
	ATGTGTATAAGAGACAG	TCGATGC	ATGTGTATAAGAGACAG
			GCGTTCTTCATCGATGC

Supplementary table 3. Mean, maximum and minimum relative abundances of fungal phylas found in analysed samples.

phyla	min	max	mean
Ascomycota	34.604%	93.533%	69.219%
Basidiomycota	3.525%	63.267%	22.435%
Mortierellomycota	0.000%	24.583%	5.530%
Unclassified Fungi	0.000%	12.795%	1.898%
Chytridiomycota	0.000%	4.643%	0.409%
Mucoromycota	0.000%	5.240%	0.217%
Rozellomycota	0.000%	1.738%	0.196%
Glomeromycota	0.000%	1.106%	0.033%
Zoopagomycota	0.000%	0.379%	0.026%
Oomycota	0.000%	0.220%	0.020%
Kickxellomycota	0.000%	0.187%	0.006%
Basidiobolomycota	0.000%	0.170%	0.005%
Olpidiomycota	0.000%	0.304%	0.003%
Aphelidiomycota	0.000%	0.0631594%	0.0013318%
Monoblepharomycota	0.000%	0.0339960%	0.0010703%
Blastocladiomycota	0.000%	0.0471809%	0.0008060%
Entomophthoromycota	0.000%	0.0277393%	0.0004171%
Unclassified Stramenopila	0.000%	0.0148321%	0.0002742%
Ochrophyta	0.000%	0.0043703%	0.0000289%

Supplementary table 4. PERMANOVA and pairwise PERMANOVA of beta-diversity. Results of statistical tests of beta-diversity. *: p-value ≤ 0.05

group of samples	compare by	PERMANOVA		ANOVA
		R ²	Pr (>F)	Pr (>F)
all samples	sample type	23.70%	1.00E-04 *	4.13E-14 *
all samples	health status	1.60%	0.0077 *	0.002297 *
rhizosphere	health status	4.70%	0.0167 *	0.000261 *
shoots	health status	4.90%	0.0143 *	0.153
roots	health status	3.60%	0.05 *	0.5663
bulk soil	health status	5.20%	0.0118 *	4.65E-07 *
pairwise PERMANOVA				
		p	p.adj	
rhizosphere	soil	0.851	0.851	
rhizosphere	roots	0.001	0.0012 *	
rhizosphere	shoots	0.001	0.0012 *	
soil	roots	0.001	0.0012 *	
soil	shoots	0.001	0.0012 *	
roots	shoots	0.001	0.0012 *	

Supplementary table 5. Core species in healthy and unhealthy samples

in bulk we marked species, that are shared between healthy and unhealthy group
in yellow we marked species that differ in abundance between healthy and unhealthy samples

All samples			
healthy	Trophic_Mode	unhealthy	Trophic_Mode
1 Unclassified Cladosporium	-	1 Unclassified Cladosporium	-
2 Unclassified Capnodiales	-	2 Unclassified Capnodiales	-
3 Unclassified Fungi	-	3 Alternaria angustiovoidea	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
		4 Unclassified Sclerotiniaceae	

Rhizosphere			
healthy	Trophic_Mode	unhealthy	Trophic_Mode
1 Unclassified Cladosporium	-	1 Unclassified Cladosporium	-
2 Exophiala equina	Pathotroph	2 Unclassified Capnodiales	-
3 Unclassified Tetracladium	-	3 Unclassified Didymellaceae	Pathotroph-Saprotroph
4 Cadophora luteo-olivacea	Symbiotroph	4 Alternaria angustiovoidea	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
5 Plectosphaerella niemeijerarum	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph	5 Exophiala equina	Pathotroph
6 Acremonium furcatum	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph	6 Unclassified Tetracladium	-
7 Unclassified Fusarium	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph	7 Unclassified Helotiales	-
8 Unclassified Nectriaceae	-	8 Chloridium aseptatum	Saprotroph
9 Unclassified Chaetomiaceae	-	9 Plectosphaerella niemeijerarum	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
10 Solicozozyma terricola	-	10 Unclassified Clonostachys	Pathotroph-Saprotroph
11 Unclassified Solicozozyma	-	11 Trichoderma parapiluliferum	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
12 Mortierella gamsii	Saprotroph-Symbiotroph	12 Trichoderma virilente	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
13 Unclassified Mortierella	Saprotroph-Symbiotroph	13 Unclassified Trichoderma	-
14 Unclassified Fungi	-	14 Acremonium furcatum	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
		15 Acremonium rutilum	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
		16 Unclassified Fusarium	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
		17 Unclassified Fusicolla	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
		18 Unclassified Nectriaceae	-
		19 Unclassified Hypocreales	-
		20 Unclassified Chaetomiaceae	-
		21 Unclassified Ascomycota	-
		22 Solicozozyma terricola	-
		23 Unclassified Solicozozyma	-
		24 Unclassified Saitozyma	-
		25 Mortierella gamsii	Saprotroph-Symbiotroph
		26 Unclassified Mortierella	Saprotroph-Symbiotroph
		27 Unclassified Fungi	-

Roots			
healthy	Trophic_Mode	unhealthy	Trophic_Mode
1 Cladosporium exasperatum	-	1 Cladosporium exasperatum	-
2 Unclassified Cladosporium	-	2 Unclassified Cladosporium	-
3 Unclassified Capnodiales	-	3 Unclassified Capnodiales	-
4 Alternaria angustiovoidea	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph	4 Cadophora luteo-olivacea	Symbiotroph
5 Cadophora luteo-olivacea	Symbiotroph	5 Unclassified Sclerotiniaceae	-
6 Unclassified Sclerotiniaceae	-	6 Unclassified Helotiales	-
7 Gnomoniopsis fructicola	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph	7 Plectosphaerella niemeijerarum	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
8 Unclassified Vishniacozyma	-	8 Unclassified Fusarium	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
9 Vishniacozyma victoriae	-	9 Filobasidium chernovii	Saprotroph
10 Unclassified Fungi	-	10 Unclassified Vishniacozyma	-
		11 Vishniacozyma victoriae	-
		12 Unclassified Fungi	-

Shoots			
healthy	Trophic_Mode	unhealthy	Trophic_Mode
1 <i>Cladosporium exasperatum</i>	-	1 <i>Cladosporium exasperatum</i>	-
2 <i>Unclassified Cladosporium</i>	-	2 <i>Unclassified Cladosporium</i>	-
3 <i>Unclassified Mycosphaerellaceae</i>	-	3 <i>Unclassified Capnodiales</i>	-
4 <i>Unclassified Capnodiales</i>	-	4 <i>Unclassified Aureobasidium</i>	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
5 <i>Unclassified Aureobasidium</i>	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph	5 <i>Unclassified Didymella</i>	-
6 <i>Unclassified Epicoccum</i>	Pathotroph-Saprotroph	6 <i>Unclassified Epicoccum</i>	Pathotroph-Saprotroph
7 <i>Alternaria angustiovoidea</i>	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph	7 <i>Alternaria angustiovoidea</i>	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
8 <i>Unclassified Alternaria</i>	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph	8 <i>Unclassified Sclerotiniaceae</i>	-
9 <i>Cadophora luteo-olivacea</i>	Symbiotroph	9 <i>Gnomoniopsis fructicola</i>	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
10 <i>Unclassified Sclerotiniaceae</i>	-	10 <i>Cystofilobasidium macerans</i>	Saprotroph
11 <i>Sporobolomyces roseus</i>	Pathotroph-Saprotroph	11 <i>Filobasidium chernovii</i>	Saprotroph
12 <i>Cystofilobasidium macerans</i>	Saprotroph	12 <i>Unclassified Filobasidiaceae</i>	-
13 <i>Udeniomyces pyricola</i>	-	13 <i>Holtermanniella nyarrowii</i>	-
14 <i>Filobasidium chernovii</i>	Saprotroph	14 <i>Unclassified Vishniacozyma</i>	-
15 <i>Holtermanniella nyarrowii</i>	-	15 <i>Vishniacozyma victoriae</i>	-
16 <i>Unclassified Vishniacozyma</i>	-		
17 <i>Vishniacozyma victoriae</i>	-		

bulk soil			
healthy	Trophic_Mode	unhealthy	Trophic_Mode
1 <i>Unclassified Cladosporium</i>	-	1 <i>Unclassified Cladosporium</i>	-
2 <i>Exophiala equina</i>	Pathotroph	2 <i>Unclassified Devriesia</i>	-
3 <i>Trichoderma virilente</i>	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph	3 <i>Unclassified Capnodiales</i>	-
4 <i>Acremonium furcatum</i>	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph	4 <i>Plectrochloadium opacum</i>	Saprotroph
5 <i>Unclassified Nectriaceae</i>	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph	5 <i>Alternaria angustiovoidea</i>	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
6 <i>Unclassified Chaetomiaceae</i>	-	6 <i>Exophiala equina</i>	Pathotroph
7 <i>Unclassified Ascomycota</i>	-	7 <i>Unclassified chaetomellaceae</i>	-
8 <i>Solicozozyma terricola</i>	-	8 <i>Unclassified Tetracladium</i>	-
9 <i>Unclassified Solicozozyma</i>	-	9 <i>Cadophora luteo-olivacea</i>	Symbiotroph
10 <i>Unclassified Saitozyma</i>	-	10 <i>Unclassified Sclerotiniaceae</i>	-
11 <i>Mortierella gamsii</i>	Saprotroph-Symbiotroph	11 <i>Unclassified Helotiales</i>	-
12 <i>Unclassified Fungi</i>	-	12 <i>Phialocephala humicola</i>	Symbiotroph
		13 <i>Chloridium aseptatum</i>	Saprotroph
		14 <i>Unclassified Chaetosphaeriaceae</i>	-
		15 <i>Plectosphaerella niemeijerorum</i>	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
		16 <i>Unclassified Clonostachys</i>	Pathotroph-Saprotroph
		17 <i>Monocillium griseo-ochraceum</i>	Saprotroph
		18 <i>Trichoderma parapiluliferum</i>	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
		19 <i>Trichoderma virilente</i>	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
		20 <i>Unclassified Trichoderma</i>	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
		21 <i>Acremonium furcatum</i>	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
		22 <i>Acremonium rutilum</i>	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
		23 <i>Unclassified Fusarium</i>	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
		24 <i>Unclassified Fusicolla</i>	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
		25 <i>Mariannaea punicea</i>	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
		26 <i>Unclassified Nectriaceae</i>	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
		27 <i>Unclassified Hypocreales</i>	-
		28 <i>Unclassified Chaetomium</i>	-
		29 <i>Unclassified Chaetomiaceae</i>	-
		30 <i>Unclassified Lasiosphaeriaceae</i>	-
		31 <i>Unclassified Ascomycota</i>	-
		32 <i>Tausonia pullulans</i>	Saprotroph
		33 <i>Solicozozyma terricola</i>	-
		34 <i>Unclassified Solicozozyma</i>	-
		35 <i>Unclassified Saitozyma</i>	-
		36 <i>Mortierella gamsii</i>	Saprotroph-Symbiotroph
		37 <i>Mortierella polygonia</i>	Saprotroph-Symbiotroph
		38 <i>Unclassified Mortierella</i>	Saprotroph-Symbiotroph
		39 <i>Unclassified Fungi</i>	-

Supplementary table 6. Significant differences between ENS in plantations

.y.	plantatio n	plantatio n	p	p.adj	p.format	p.signif	method
ENS	2	1	0.94872929	1	0.94873	ns	Wilcoxon
ENS	2	3	0.43846324	1	0.43846	ns	Wilcoxon
ENS	2	5	0.21149667	1	0.21150	ns	Wilcoxon
ENS	2	4	0.73989814	1	0.73990	ns	Wilcoxon
ENS	2	6	0.69470252	1	0.69470	ns	Wilcoxon
ENS	2	7	0.486503	1	0.48650	ns	Wilcoxon
ENS	2	8	0.486503	1	0.48650	ns	Wilcoxon
ENS	2	10	0.00168777	0.13	0.00169	**	Wilcoxon
ENS	2	11	0.05121894	1	0.05122	ns	Wilcoxon
ENS	2	12	0.13299368	1	0.13299	ns	Wilcoxon
ENS	2	13	0.07589109	1	0.07589	ns	Wilcoxon
ENS	2	14	0.16931715	1	0.16932	ns	Wilcoxon
ENS	1	3	0.60631783	1	0.60632	ns	Wilcoxon
ENS	1	5	0.23511661	1	0.23512	ns	Wilcoxon
ENS	1	4	0.78594874	1	0.78595	ns	Wilcoxon
ENS	1	6	0.65054975	1	0.65055	ns	Wilcoxon
ENS	1	7	0.60752412	1	0.60752	ns	Wilcoxon
ENS	1	8	0.44913681	1	0.44914	ns	Wilcoxon
ENS	1	10	0.02680023	1	0.02680	*	Wilcoxon
ENS	1	11	0.11792811	1	0.11793	ns	Wilcoxon
ENS	1	12	0.4778547	1	0.47785	ns	Wilcoxon
ENS	1	13	0.19318659	1	0.19319	ns	Wilcoxon
ENS	1	14	0.28754702	1	0.28755	ns	Wilcoxon
ENS	3	5	0.03741796	1	0.03742	*	Wilcoxon
ENS	3	4	0.65054975	1	0.65055	ns	Wilcoxon
ENS	3	6	0.31638559	1	0.31639	ns	Wilcoxon
ENS	3	7	0.97593334	1	0.97593	ns	Wilcoxon
ENS	3	8	0.78594874	1	0.78595	ns	Wilcoxon
ENS	3	10	0.05949805	1	0.05950	ns	Wilcoxon
ENS	3	11	0.31638559	1	0.31639	ns	Wilcoxon
ENS	3	12	0.60631783	1	0.60632	ns	Wilcoxon
ENS	3	13	0.29998639	1	0.29999	ns	Wilcoxon
ENS	3	14	0.60752412	1	0.60752	ns	Wilcoxon
ENS	5	4	0.11350233	1	0.11350	ns	Wilcoxon
ENS	5	6	0.55116717	1	0.55117	ns	Wilcoxon
ENS	5	7	0.044902	1	0.04490	*	Wilcoxon
ENS	5	8	0.044902	1	0.04490	*	Wilcoxon
ENS	5	10	0.0001028	0.008	0.00010	***	Wilcoxon
ENS	5	11	0.00363662	0.27	0.00364	**	Wilcoxon
ENS	5	12	0.01057335	0.75	0.01057	*	Wilcoxon
ENS	5	13	0.0069848	0.5	0.00698	**	Wilcoxon
ENS	5	14	0.07802434	1	0.07802	ns	Wilcoxon
ENS	4	6	0.51372258	1	0.51372	ns	Wilcoxon

ENS	4	7	0.6297255	1	0.62973	ns	Wilcoxon
ENS	4	8	0.58987573	1	0.58988	ns	Wilcoxon
ENS	4	10	0.00555959	0.41	0.00556	**	Wilcoxon
ENS	4	11	0.07802434	1	0.07802	ns	Wilcoxon
ENS	4	12	0.28754702	1	0.28755	ns	Wilcoxon
ENS	4	13	0.16931715	1	0.16932	ns	Wilcoxon
ENS	4	14	0.37768531	1	0.37769	ns	Wilcoxon
ENS	6	7	0.34735792	1	0.34736	ns	Wilcoxon
ENS	6	8	0.24152379	1	0.24152	ns	Wilcoxon
ENS	6	10	0.00085794	0.066	0.00086	***	Wilcoxon
ENS	6	11	0.02418426	1	0.02418	*	Wilcoxon
ENS	6	12	0.05949805	1	0.05950	ns	Wilcoxon
ENS	6	13	0.05949805	1	0.05950	ns	Wilcoxon
ENS	6	14	0.19780811	1	0.19781	ns	Wilcoxon
ENS	7	8	0.75528483	1	0.75528	ns	Wilcoxon
ENS	7	10	0.00363662	0.27	0.00364	**	Wilcoxon
ENS	7	11	0.14316778	1	0.14317	ns	Wilcoxon
ENS	7	12	0.37933906	1	0.37934	ns	Wilcoxon
ENS	7	13	0.13354851	1	0.13355	ns	Wilcoxon
ENS	7	14	0.31858517	1	0.31859	ns	Wilcoxon
ENS	8	10	0.044902	1	0.04490	*	Wilcoxon
ENS	8	11	0.24152379	1	0.24152	ns	Wilcoxon
ENS	8	12	0.56578393	1	0.56578	ns	Wilcoxon
ENS	8	13	0.60752412	1	0.60752	ns	Wilcoxon
ENS	8	14	0.58987573	1	0.58988	ns	Wilcoxon
ENS	10	11	0.71253508	1	0.71254	ns	Wilcoxon
ENS	10	12	0.02680023	1	0.02680	*	Wilcoxon
ENS	10	13	0.28754702	1	0.28755	ns	Wilcoxon
ENS	10	14	0.19780811	1	0.19781	ns	Wilcoxon
ENS	11	12	0.37933906	1	0.37934	ns	Wilcoxon
ENS	11	13	0.56578393	1	0.56578	ns	Wilcoxon
ENS	11	14	0.4095104	1	0.40951	ns	Wilcoxon
ENS	12	13	0.65218476	1	0.65218	ns	Wilcoxon
ENS	12	14	0.88011195	1	0.88011	ns	Wilcoxon
ENS	13	14	0.97593334	1	0.97593	ns	Wilcoxon

6. Bibliografía

- Allawi, Hatim T., and John SantaLucia. 1997. "Thermodynamics and NMR of Internal G·T Mismatches in DNA." *Biochemistry* 36 (34): 10581–94. <https://doi.org/10.1021/bi962590c>.
- Arbefeville, S., A. Harris, and P. Ferrieri. 2017. "Comparison of Sequencing the D2 Region of the Large Subunit Ribosomal RNA Gene (MicroSEQ®) versus the Internal Transcribed Spacer (ITS) Regions Using Two Public Databases for Identification of Common and Uncommon Clinically Relevant Fungal Species." *Journal of Microbiological Methods* 140 (May): 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.06.015>.
- Avilés, M., I. Avilés-García, S. Pérez, and C. Borrero. 2019. "First Report of Root Rot on Strawberry Caused by Binucleate *Rhizoctonia* AG-A in Spain." *Plant Disease* 103 (5): 1036–1036. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-18-1300-PDN>.
- Bellemain, Eva, Tor Carlsen, Christian Brochmann, Eric Coissac, Pierre Taberlet, and Håvard Kauserud. 2010. "ITS as an Environmental DNA Barcode for Fungi: An in Silico Approach Reveals Potential PCR Biases." *BMC Microbiology* 10 (1): 189. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-189>.
- Benjamini, Y., and Y. Hochberg. 1995. "Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing." *Journal of the Royal Statistical Society: Series B* 57: 289–300.
- Bleach, Carolyn, Hayley J. Ridgway, Marlene V. Jaspers, and E. Eirian Jones. 2021. "The Relative Susceptibility of Grapevine Rootstocks to Black Foot Disease Is Dependent on Inoculum Pressure." *New Zealand Plant Protection* 74 (1): 62–69. <https://doi.org/10.30843/nzpp.2021.74.11735>.
- Bolyen, Evan, Jai Ram Rideout, Matthew R. Dillon, Nicholas A. Bokulich, Christian C. Abnet, Gabriel A. Al-Ghalith, Harriet Alexander, et al. 2019. "Reproducible, Interactive, Scalable and Extensible Microbiome Data Science Using QIIME 2." *Nature Biotechnology* 37 (8): 852–57. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>.
- Braak, Cajo J.F. Ter, and I. Colin Prentice. 1988. "A Theory of Gradient Analysis." In , 271–317. [https://doi.org/10.1016/S0065-2504\(08\)60183-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2504(08)60183-X).
- Bray, J. Roger, and J. T. Curtis. 1957. "An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin." *Ecological Monographs* 27 (4): 325–49.

- <https://doi.org/10.2307/1942268>.
- Breen, J P. 1994. "Acremonium Endophyte Interactions with Enhanced Plant Resistance to Insects." *Annual Review of Entomology* 39 (1): 401–23. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.39.010194.002153>.
- Breslauer, K J, R Frank, H Blöcker, and L A Marky. 1986. "Predicting DNA Duplex Stability from the Base Sequence." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83 (11): 3746–50. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.11.3746>.
- Busby, Posy E., Chinmay Soman, Maggie R. Wagner, Maren L. Friesen, James Kremer, Alison Bennett, Mustafa Morsy, Jonathan A. Eisen, Jan E. Leach, and Jeffery L. Dangl. 2017. "Research Priorities for Harnessing Plant Microbiomes in Sustainable Agriculture." *PLoS Biology* 15 (3): 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001793>.
- Callahan, Benjamin J, Paul J McMurdie, Michael J Rosen, Andrew W Han, Amy Jo A Johnson, and Susan P Holmes. 2016. "DADA2: High-Resolution Sample Inference from Illumina Amplicon Data." *Nature Methods* 13 (7): 581–83. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.
- Capote, Nieves, Maria Ana Pastrana, Ana Aguado, and Paloma Sanchez-Torres. 2012. "Molecular Tools for Detection of Plant Pathogenic Fungi and Fungicide Resistance." *Plant Pathology*. <https://doi.org/10.5772/38011>.
- Chen, Q., S. L. Yin, X. G. Zhang, X. Y. Ma, S. Zhong, and G. Z. Zhang. 2021. "Dactylonectria Species Associated with Black Root Rot of Strawberry in China." *Australasian Plant Pathology* 50 (5): 501–11. <https://doi.org/10.1007/s13313-021-00804-1>.
- Chien, A, D B Edgar, and J M Trela. 1976. "Deoxyribonucleic Acid Polymerase from the Extreme Thermophile *Thermus Aquaticus*." *Journal of Bacteriology* 127 (3): 1550–57. <https://doi.org/10.1128/jb.127.3.1550-1557.1976>.
- Colwell, R. K., and J. A. Coddington. 1994. "Estimating Terrestrial Biodiversity through Extrapolation." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 345 (1311): 101–18. <https://doi.org/10.1098/rstb.1994.0091>.
- Cybulska, Justyna, Magdalena Drobek, Jacek Panek, José M. Cruz-Rubio, Magdalena Kurzyna-Szklarek, Artur Zdunek, and Magdalena Frąc. 2022. "Changes of Pectin Structure and Microbial Community Composition in Strawberry Fruit (*Fragaria × Ananassa* Duch.) during Cold Storage." *Food Chemistry* 381 (July): 132151. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132151>.

- Dean, Ralph, Jan A. L. Van Kan, Zacharias A. Pretorius, Kim E. Hammond-Kosack, Antonio Di Pietro, Pietro D. Spanu, Jason J. Rudd, et al. 2012. "The Top 10 Fungal Pathogens in Molecular Plant Pathology." *Molecular Plant Pathology* 13 (4): 414–30. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>.
- Delgado-Baquerizo, Manuel, Fernando T. Maestre, Peter B. Reich, Thomas C. Jeffries, Juan J. Gaitan, Daniel Encinar, Miguel Berdugo, Colin D. Campbell, and Brajesh K. Singh. 2016. "Microbial Diversity Drives Multifunctionality in Terrestrial Ecosystems." *Nature Communications* 7: 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms10541>.
- Dirks, A.C., and R.D. Jackson. 2020. "Community Structure of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Soils of Switchgrass Harvested for Bioenergy." *Applied and Environmental Microbiology* 86 (19). <https://doi.org/10.1128/AEM.00880-20>.
- Dwiastuti, Mutia Erti, Loekas Soesanto, Titistyas Gusti Aji, Nirmala Friyanti Devy, and Hardiyanto. 2021. "Biological Control Strategy for Postharvest Diseases of Citrus, Apples, Grapes and Strawberries Fruits and Application in Indonesia." *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 31 (1): 141. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00488-1>.
- European Commission. 2019. "The European Green Deal. Communication from the Commission to the European Parliament, the European Council, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions." *European Commission*, 24. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- "FAOSTAT." 2022. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- Feliziani, E., and G. Romanazzi. 2016. "Postharvest Decay of Strawberry Fruit: Etiology, Epidemiology, and Disease Management." *Journal of Berry Research* 6 (1): 47–63. <https://doi.org/10.3233/JBR-150113>.
- Fernandes, Andrew D., Jean M. Macklaim, Thomas G. Linn, Gregor Reid, and Gregory B. Gloor. 2013. "ANOVA-Like Differential Expression (ALDEx) Analysis for Mixed Population RNA-Seq." Edited by John Parkinson. *PLoS ONE* 8 (7): e67019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067019>.
- Fernandes, Andrew D, Jennifer NS Reid, Jean M Macklaim, Thomas A McMurrough, David R Edgell, and Gregory B Gloor. 2014. "Unifying the Analysis of High-Throughput Sequencing Datasets: Characterizing RNA-Seq, 16S RRNA Gene Sequencing and Selective Growth Experiments by Compositional Data Analysis." *Microbiome* 2 (1): 15.

- <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-15>.
- Förster, Th. 1948. “Zwischenmolekulare Energiewanderung Und Fluoreszenz.” *Annalen Der Physik* 437 (1–2): 55–75. <https://doi.org/10.1002/andp.19484370105>.
- Fotios, Bekris, Vasileiadis Sotirios, Papadopoulou Elena, Samaras Anastasios, Testempasis Stefanos, Gkizi Danae, Tavlaki Georgia, et al. 2021. “Grapevine Wood Microbiome Analysis Identifies Key Fungal Pathogens and Potential Interactions with the Bacterial Community Implicated in Grapevine Trunk Disease Appearance.” *Environmental Microbiome* 16 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1186/s40793-021-00390-1>.
- Fraç, Magdalena, Silja E. Hannula, Marta Belka, and Malgorzata Jędrzycka. 2018. “Fungal Biodiversity and Their Role in Soil Health.” *Frontiers in Microbiology* 9 (APR): 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00707>.
- Fraç, Magdalena, Stefania Jezierska-Tys, and Takashi Yaguchi. 2015. “Occurrence, Detection, and Molecular and Metabolic Characterization of Heat-Resistant Fungi in Soils and Plants and Their Risk to Human Health.” *Advances in Agronomy* 132: 161–204. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2015.02.003>.
- Fraç, Magdalena, Giorgia Pertile, Jacek Panek, Agata Gryta, Karolina Oszust, Jerzy Lipiec, and Bogusław Usowicz. 2021. “Mycobiome Composition and Diversity under the Long-Term Application of Spent Mushroom Substrate and Chicken Manure.” *Agronomy* 11 (3). <https://doi.org/10.3390/agronomy11030410>.
- Francois, Patrice, Manuela Tangomo, Jonathan Hibbs, Eve Julie Bonetti, Catharina C. Boehme, Tsugunori Notomi, Mark D. Perkins, and Jacques Schrenzel. 2011. “Robustness of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction for Diagnostic Applications.” *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 62 (1): 41–48. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00785.x>.
- Gams, W., B. Stielow, T. Gräfenhan, and H.-J. Schroers. 2019. “The Ascomycete Genus *Niesslia* and Associated Monocillium-like Anamorphs.” *Mycological Progress* 18 (1–2): 5–76. <https://doi.org/10.1007/s11557-018-1459-5>.
- Garrido, Carlos, M. Carbú, F. J. Fernández-Acero, N. Boonham, A. Colyer, J. M. Cantoral, and G. Budge. 2009. “Development of Protocols for Detection of *Colletotrichum Acutatum* and Monitoring of Strawberry Anthracnose Using Real-Time PCR.” *Plant Pathology* 58 (1): 43–51. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01933.x>.

- Garrido, Carlos, María Carbú, Francisco Fernández-Acero, Victoria González-Rodríguez, and Jesús Cantoral. 2011. “New Insights in the Study of Strawberry Fungal Pathogens.” *Genes Genomes Genomics* 5 (1): 24–39.
- Gentleman, Robert C., Vincent J. Carey, Douglas M. Bates, Ben Bolstad, Marcel Dettling, Sandrine Dudoit, Byron Ellis, et al. 2004. “Bioconductor: Open Software Development for Computational Biology and Bioinformatics.” *Genome Biology* 5 (10).
- Gibbons, Sean M., J. Gregory Caporaso, Meg Pirrung, Dawn Field, Rob Knight, and Jack A. Gilbert. 2013. “Evidence for a Persistent Microbial Seed Bank throughout the Global Ocean.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (12): 4651–55. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217767110>.
- Gilbert, Jack A., Janet K. Jansson, and Rob Knight. 2014. “The Earth Microbiome Project: Successes and Aspirations.” *BMC Biology* 12 (1): 1–4. <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0069-1>.
- Ginzinger, David G. 2002. “Gene Quantification Using Real-Time Quantitative PCR.” *Experimental Hematology* 30 (6): 503–12. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(02\)00806-8](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(02)00806-8).
- Graf, J., N. Ledala, M. J. Caimano, E. Jackson, D. Gratalo, D. Fasulo, M. D. Driscoll, S. Coleman, and A. P. Matson. 2021. “High-Resolution Differentiation of Enteric Bacteria in Premature Infant Fecal Microbiomes Using a Novel rRNA Amplicon.” Edited by Edward G. Ruby. *MBio* 12 (1). <https://doi.org/10.1128/mBio.03656-20>.
- Gramaje, David, Carmen Berlanas, María del Pilar Martínez-Diz, Emilia Diaz-Losada, Livio Antonielli, Sabrina Beier, Markus Gorfer, Monika Schmoll, and Stéphane Compant. 2020. “Comparative Genomic Analysis of *Dactylonectria Torresensis* Strains from Grapevine, Soil and Weed Highlights Potential Mechanisms in Pathogenicity and Endophytic Lifestyle.” *Journal of Fungi* 6 (4): 255. <https://doi.org/10.3390/jof6040255>.
- Guarnaccia, V., G. Gilardi, M. Pugliese, and M. L. Gullino. 2022. “First Report of Multinucleate *Rhizoctonia Solani* AG4 HG-I Causing Crown and Root Rot on Strawberry in Italy.” *Plant Disease* 106 (1): 332. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-21-1276-PDN>.
- Hamonts, Kelly, Pankaj Trivedi, Anshu Garg, Caroline Janitz, Jasmine Grinyer, Paul Holford, Frederik C. Botha, Ian C. Anderson, and Brajesh K. Singh. 2018. “Field Study Reveals Core Plant Microbiota and Relative Importance of Their Drivers.” *Environmental*

- Microbiology* 20 (1): 124–40. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14031>.
- Hannula, S. Emilia, Robin Heinen, Martine Huberty, Katja Steinauer, Jonathan R De Long, Renske Jongen, and T. Martijn Bezemer. 2021. “Persistence of Plant-Mediated Microbial Soil Legacy Effects in Soil and inside Roots.” *Nature Communications* 12 (1): 5686. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25971-z>.
- Heck, Kenneth L., Gerald van Belle, and Daniel Simberloff. 1975. “Explicit Calculation of the Rarefaction Diversity Measurement and the Determination of Sufficient Sample Size.” *Ecology* 56 (6): 1459–61. <https://doi.org/10.2307/1934716>.
- Higuchi, Russell, Gavin Dollinger, Sean P. Walsh, and Robert Griffith. 1992. “Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences.” *Nature Biotechnology* 10 (4): 413–17.
- Higuchi, Russell, Carita Fockler, Gavin Dollinger, and Robert Watson. 1993. “Kinetic PCR Analysis: Real-Time Monitoring of DNA Amplification Reactions.” *Nature Biotechnology* 11 (9): 1026–30. <https://doi.org/10.1038/nbt0993-1026> PMID: 7764001.
- Hossain, Zakir, Michelle Hubbard, Yantai Gan, and Luke D. Bainard. 2021. “Root Rot Alters the Root-Associated Microbiome of Field Pea in Commercial Crop Production Systems.” *Plant and Soil* 460 (1–2): 593–607. <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04779-8>.
- Illumina. 2019. “Fungal Metagenomic Sequencing Demonstrated Protocol.” 2019. https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/metagenomic/fungal-metagenomic-demonstrated-protocol-1000000064940-01.pdf.
- Jost, Lou. 2006. “Entropy and Diversity.” *Oikos* 113 (2): 363–75. <https://doi.org/10.1111/j.2006.0030-1299.14714.x>.
- Jost, Lou, Philip Devries, Thomas Walla, Harold Greeney, Anne Chao, and Carlo Ricotta. 2010. “Partitioning Diversity for Conservation Analyses.” *Diversity and Distributions* 16 (1): 65–76. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2009.00626.x>.
- Kaneko, Hisatoshi, Takashi Kawana, Eiko Fukushima, and Tatsuo Suzutani. 2007. “Tolerance of Loop-Mediated Isothermal Amplification to a Culture Medium and Biological Substances.” *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70 (3): 499–501. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.08.008>.
- Karlsson, Ida, Hanna Friberg, Christian Steinberg, and Paula Persson. 2014. “Fungicide Effects

- on Fungal Community Composition in the Wheat Phyllosphere.” *PLoS ONE* 9 (11).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111786>.
- Kieleczawa, Jan. 2006. “Fundamentals of Sequencing of Difficult Templates-An Overview.”
Journal of Biomolecular Techniques 17 (3): 207–17.
- Kõljalg, Urmas, Henrik R. Nilsson, Dmitry Schigel, Leho Tedersoo, Karl Henrik Larsson, Tom W. May, Andy F.S. Taylor, et al. 2020. “The Taxon Hypothesis Paradigm—On the Unambiguous Detection and Communication of Taxa.” *Microorganisms* 8 (12): 1–24.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8121910>.
- Kong, P., M. Sharifi, A. Bordas, and C. Hong. 2021. “Differential Tolerance to *Calonectria Pseudonaviculata* of English Boxwood Plants Associated with the Complexity of Culturable Fungal and Bacterial Endophyte Communities.” *Plants* 10 (11).
<https://doi.org/10.3390/plants10112244>.
- Kulski, Jerzy K. 2016. “Next-Generation Sequencing — An Overview of the History, Tools, and ‘Omic’ Applications.” In *Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges*. InTech. <https://doi.org/10.5772/61964>.
- Larkin, Robert P., Jean B. Ristaino, and Lee C. Campbell. 1995. “Detection and Quantification of *Phytophthora Capsici* in Soil.” *The American Phytopathological Society* 85 (10): 1057–63.
- Law, Charity W., Yunshun Chen, Wei Shi, and Gordon K. Smyth. 2014. “Voom: Precision Weights Unlock Linear Model Analysis Tools for RNA-Seq Read Counts.” *Genome Biology* 15 (2): 1–17. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r29>.
- Lawyer, F C, S Stoffel, R K Saiki, S Y Chang, P A Landre, R D Abramson, and D H Gelfand. 1993. “High-Level Expression, Purification, and Enzymatic Characterization of Full-Length *Thermus Aquaticus* DNA Polymerase and a Truncated Form Deficient in 5’ to 3’ Exonuclease Activity.” *Genome Research* 2 (4): 275–87.
<https://doi.org/10.1101/gr.2.4.275>.
- Lazcano, Cristina, Eric Boyd, Gerald Holmes, Shashika Hewavitharana, Alexis Pasulka, and Kelly Ivors. 2021. “The Rhizosphere Microbiome Plays a Role in the Resistance to Soil-Borne Pathogens and Nutrient Uptake of Strawberry Cultivars under Field Conditions.” *Scientific Reports* 11 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82768-2>.
- Le, Dung Tien, and Nam Tuan Vu. 2017. “Progress of Loop-Mediated Isothermal

- Amplification Technique in Molecular Diagnosis of Plant Diseases.” *Applied Biological Chemistry* 60 (2): 169–80. <https://doi.org/10.1007/s13765-017-0267-y>.
- Lee, Marissa R., and Christine V. Hawkes. 2021. “Widespread Co-occurrence of Sebaciniales and Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Switchgrass Roots and Soils Has Limited Dependence on Soil Carbon or Nutrients.” *PLANTS, PEOPLE, PLANET* 3 (5): 614–26. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10181>.
- Lefcheck, Jonathan S., Jarrett E.K. Byrnes, Forest Isbell, Lars Gamfeldt, John N. Griffin, Nico Eisenhauer, Marc J.S. Hensel, Andy Hector, Bradley J. Cardinale, and J. Emmett Duffy. 2015. “Biodiversity Enhances Ecosystem Multifunctionality across Trophic Levels and Habitats.” *Nature Communications* 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms7936>.
- Lin, Huang, and Shyamal Das Peddada. 2020. “Analysis of Compositions of Microbiomes with Bias Correction.” *Nature Communications* 11 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17041-7>.
- Liu, Liangliang, Yuanyuan Yan, Huanxin Ding, Jun Zhao, Zucong Cai, Chuanchao Dai, and Xinqi Huang. 2021. “The Fungal Community Outperforms the Bacterial Community in Predicting Plant Health Status.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 105 (16–17): 6499–6513. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11486-6>.
- Livak, Kenneth J., Susan J. A. Flood, Jeffrey Marmaro, William Giusti, and Karin Deetz. 1995. “Oligonucleotides with Fluorescent Dyes at System Useful for Detecting PCR Product and Nucleic Acid Hybridization.” *PCR Methods and Applications* 4: 357–62.
- Love, Michael I., Wolfgang Huber, and Simon Anders. 2014. “Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2.” *Genome Biology* 15 (12): 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.
- Lozupone, Catherine, and Rob Knight. 2005. “UniFrac: A New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities.” *Applied and Environmental Microbiology* 71 (12): 8228–35. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005>.
- Lv, Y, Y. Shen, Y. Shi, F. Shen, Y. Chen, S. Zi, Z. Zhu, E.J. Kennelly, and D Zhao. 2019. “Root-Endophytic Fungi Diversity Of Fuzi (*Acronitum Carmichaelii*) And Their Anti-Fungal Activity.” *Applied Ecology and Environmental Research* 17 (6). https://doi.org/10.15666/aeer/1706_1528915300.
- Mackay, I.M. 2004. “Real-Time PCR in the Microbiology Laboratory.” *Clinical Microbiology*

- and Infection* 10 (3): 190–212. <https://doi.org/10.1111/j.1198-743X.2004.00722.x>.
- Magurran, Anne E. 1988. *Ecological Diversity and Its Measurement*. Vol. 7. London: Chapman and Hall.
https://www.researchgate.net/publication/269107473_What_is_governance/link/548173090cf22525dcb61443/download%0Ahttp://www.econ.upf.edu/~reynal/Civilwars_12December2010.pdf%0Ahttps://think-asia.org/handle/11540/8282%0Ahttps://www.jstor.org/stable/41857625.
- Malarczyk, Dominika G., Jacek Panek, and Magdalena Frać. 2020. “Triplex Real-Time PCR Approach for the Detection of Crucial Fungal Berry Pathogens—*Botrytis* Spp., *Colletotrichum* Spp. and *Verticillium* Spp.” *International Journal of Molecular Sciences* 21 (22): 8469. <https://doi.org/10.3390/ijms21228469>.
- Mallick, Himel, Ali Rahnavard, Lauren J. McIver, Siyuan Ma, Yancong Zhang, Long H. Nguyen, Timothy L. Tickle, et al. 2021. “Multivariable Association Discovery in Population-Scale Meta-Omics Studies.” *PLoS Computational Biology* 17 (11): 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009442>.
- Mandal, Siddhartha, Will Van Treuren, Richard A White, Merete Eggesbø, Rob Knight, and Shyamal D Peddada. 2015. “Analysis of Composition of Microbiomes: A Novel Method for Studying Microbial Composition” 1: 1–7.
- Marian, Malek, Yusuke Takashima, Wiwiek Harsonowati, Haruhiko Murota, and Kazuhiko Narisawa. 2022. “Biocontrol of Pythium Root Rot on Lisianthus Using a New Dark Septate Endophytic Fungus *Hyaloscypha Variabilis* J1PC1.” *European Journal of Plant Pathology*, February. <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02459-0>.
- Martin, Mara, Mario Saparrat, Viviana Barrera, and Laura Gasoni. 2019. “Mini-Review: Cladorrhinum Species, Their Diversity and Application in Biotechnology.” *Nova Hedwigia* 108 (3–4): 489–503. https://doi.org/10.1127/nova_hedwigia/2018/0516.
- McMurdie, Paul J., and Susan Holmes. 2013. “Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data.” *PLoS ONE* 8 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>.
- . 2014. “Waste Not, Want Not: Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible.” Edited by Alice Carolyn McHardy. *PLoS Computational Biology* 10 (4): e1003531. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003531>.

- Mertely, J. C., C. K. Chandler, C. L. Xiao, and D. E. Legard. 2007. "Comparison of Sanitation and Fungicides for Management of Botrytis Fruit Rot of Strawberry." *Plant Disease* 84 (11): 1197–1202. <https://doi.org/10.1094/pdis.2000.84.11.1197>.
- Narayanasamy, P. 2011. "Detection of Fungal Pathogens in Plants." In *Microbial Plant Pathogens - Detection and Disease Diagnosis: Fungal Pathogens*, 1:5–199. <https://doi.org/10.1128/AAC.03728-14>.
- Neu, Alexander T., Eric E. Allen, and Kaustuv Roy. 2021. "Defining and Quantifying the Core Microbiome: Challenges and Prospects." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118 (51): 1–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.2104429118>.
- Neupane, Achal, Izzet Bulbul, Ziyi Wang, R. Michael Lehman, Emerson Nafziger, and Shin-Yi Lee Marzano. 2021. "Long Term Crop Rotation Effect on Subsequent Soybean Yield Explained by Soil and Root-Associated Microbiomes and Soil Health Indicators." *Scientific Reports* 11 (1): 9200. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88784-6>.
- Nguyen, Nhu H, Zewei Song, Scott T Bates, Sara Branco, Leho Tedersoo, Jon Menke, Jonathan S Schilling, and Peter G Kennedy. 2016. "FUNGuild: An Open Annotation Tool for Parsing Fungal Community Datasets by Ecological Guild." *Fungal Ecology* 20: 241–48. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.06.006>.
- Nilsson, Rolf Henrik, Karl Henrik Larsson, Andy F.S. Taylor, Johan Bengtsson-Palme, Thomas S. Jeppesen, Dmitry Schigel, Peter Kennedy, et al. 2019. "The UNITE Database for Molecular Identification of Fungi: Handling Dark Taxa and Parallel Taxonomic Classifications." *Nucleic Acids Research* 47 (D1): D259–64. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1022>.
- Nishikawa, Junji, and Chiharu Nakashima. 2019. "Morphological and Molecular Characterization of the Strawberry Black Leaf Spot Pathogen Referred to as the Strawberry Pathotype of *Alternaria Alternata*." *Mycoscience* 60 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2018.05.003>.
- Notomi, Tsugunori, Hiroto Okayama, Harumi Masubuchi, Toshihiro Yonekawa, Keiko Watanabe, Nobuyuki Amino, and Tetsu Hase. 2000. "Loop Mediated Isothermal Amplification of DNA." *Nucleic Acids Research* 28 (12): e63. <https://doi.org/doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>.
- Oszust, Karolina, and Magdalena Fraç. 2021. "First Report on the Microbial Communities of

- the Wild and Planted Raspberry Rhizosphere – A Statement on the Taxa, Processes and a New Indicator of Functional Diversity.” *Ecological Indicators* 121 (February): 107117. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.107117>.
- Owczarzy, Richard, Peter M. Vallone, Frank J. Gallo, Teodoro M. Paner, Michael J. Lane, and Albert S. Benight. 1997. “Predicting Sequence-Dependent Melting Stability of Short Duplex DNA Oligomers.” *Biopolymers* 44 (3): 217–39. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(1997\)44:3<217::AID-BIP3>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(1997)44:3<217::AID-BIP3>3.0.CO;2-Y).
- Ozimek, Ewa, and Agnieszka Hanaka. 2021. “Mortierella Species as the Plant Growth-Promoting Fungi Present in the Agricultural Soils.” *Agriculture (Switzerland)* 11 (1): 1–18. <https://doi.org/10.3390/agriculture11010007>.
- Panek, Jacek, and Magdalena Frąć. 2018. “Development of a QPCR Assay for the Detection of Heat-Resistant *Talaromyces Flavus*.” *International Journal of Food Microbiology* 270 (August 2017): 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.010>.
- Pedregosa, Fabian, Gael Varoquaux, Alexandre Gramfort, Vincent Michel, Bertrand Thirion, Olivier Grisel, Mathieu Blondel, et al. 2011. “Scikit-Learn: Machine Learning in Python.” *Journal of Machine Learning Research* 12 (September): 2825–30. <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/EHP4713>.
- Pelt-Verkuil, Elizabeth van, Alex van Belkum, and John P. Hays. 2008. *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Dordrecht: Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6241-4>.
- Prokkola, Soile, and Pirjo Kivijärvi. 2007. “Effect of Biological Sprays on the Incidence of Grey Mould, Fruit Yield and Fruit Quality in Organic Strawberry Production.” *Agricultural and Food Science* 16 (1): 25–33. <https://doi.org/10.2137/145960607781635886>.
- Prusky, Dov. 1996. “Pathogen Quiescence in Postharvest Diseases.” *Annu. Rev. Phytopathol* 34: 413–34. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.413>.
- Purahong, Witoon, Dirk Krüger, François Buscot, and Tesfaye Wubet. 2016. “Correlations between the Composition of Modular Fungal Communities and Litter Decomposition-Associated Ecosystem Functions.” *Fungal Ecology* 22 (August): 106–14. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.04.009>.
- Pylak, Michał, Karolina Oszust, and Magdalena Frąć. 2020. “Searching for New Beneficial

- Bacterial Isolates of Wild Raspberries for Biocontrol of Phytopathogens-Antagonistic Properties and Functional Characterization.” *International Journal of Molecular Sciences* 21 (24): 1–33. <https://doi.org/10.3390/ijms21249361>.
- Qi, Zhihui, Xin Zhou, Lin Tian, Haiyang Zhang, Lei Cai, and Fang Tang. 2022. “Distribution of Mycotoxin-Producing Fungi across Major Rice Production Areas of China.” *Food Control* 134 (April): 108572. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108572>.
- Qin, Shuhao, Stephen Yeboah, Xuexue Xu, Yuhui Liu, and Bin Yu. 2017. “Analysis on Fungal Diversity in Rhizosphere Soil of Continuous Cropping Potato Subjected to Different Furrow-Ridge Mulching Managements.” *Frontiers in Microbiology* 8 (MAY): 845. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00845>.
- R Core Team. 2021. “R: A Language and Environment for Statistical Computing.” *R Foundation for Statistical Computing*. Vienna, Austria. <https://www.r-project.org/>.
- Ritchie, Matthew E., Belinda Phipson, Di Wu, Yifang Hu, Charity W. Law, Wei Shi, and Gordon K. Smyth. 2015. “Limma Powers Differential Expression Analyses for RNA-Sequencing and Microarray Studies.” *Nucleic Acids Research* 43 (7): e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>.
- Rivers, Adam R., Kyle C. Weber, Terrence G. Gardner, Shuang Liu, and Shalamar D. Armstrong. 2018. “ITSxpress: Software to Rapidly Trim Internally Transcribed Spacer Sequences with Quality Scores for Marker Gene Analysis.” *F1000Research* 7 (0): 1418. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15704.1>.
- Robinson, Mark D., Davis J. McCarthy, and Gordon K. Smyth. 2009. “EdgeR: A Bioconductor Package for Differential Expression Analysis of Digital Gene Expression Data.” *Bioinformatics* 26 (1): 139–40. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>.
- Root, Richard B. 1967. “The Niche Exploitation Pattern of the Blue-Gray Gnatcatcher.” *Ecological Monographs* 37 (4): 317–50. <https://doi.org/10.2307/1942327>.
- Rozpądek, P., A. Domka, R. Ważny, M. Nosek, R. Jędrzejczyk, K. Tokarz, and K. Turnau. 2018. “How Does the Endophytic Fungus *Mucor* Sp. Improve *Arabidopsis Arenosa* Vegetation in the Degraded Environment of a Mine Dump?” *Environmental and Experimental Botany* 147 (August 2017): 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.11.009>.
- Sahota, Amarjit. 2018. “The Global Market for Organic Food and Drink.” In *The World of*

Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends 2018, 146–50.

- Saiki, Randall K, Susanne Stoffel, Stephen J Scharf, Russell Higuchi, Glenn T Horn, Kary B Mullis, and Henry A Erlich. 1988. “Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase.” *Science* 239: 487–91. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nbt0492-413>.
- Sanders, Howard L. 1968. “Marine Benthic Diversity: A Comparative Study.” *The American Naturalist* 102 (925): 243–82. <https://doi.org/10.1086/282541>.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. “DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (12): 5463–67. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>.
- SantaLucia, John, Hatim T. Allawi, and P. Ananda Seneviratne. 1996. “Improved Nearest-Neighbor Parameters for Predicting DNA Duplex Stability.” *Biochemistry* 35 (11): 3555–62. <https://doi.org/10.1021/bi951907q>.
- Schena, Leonardo, Franco Nigro, Antonio Ippolito, and Donato Gallitelli. 2004. “Real-Time Quantitative PCR: A New Technology to Detect and Study Phytopathogenic and Antagonistic Fungi.” *European Journal of Plant Pathology* 110 (9): 893–908. <https://doi.org/10.1007/s10658-004-4842-9>.
- Schimper, Andreas, and Wilhelm Franz. 1902. “Plant-Geography upon a Physiological Basis.” *Clarendon Press*.
- Schlatter, Daniel C., Jeremy Hansen, Bryan Carlson, Ian N. Leslie, David R. Huggins, and Timothy C. Paulitz. 2022. “Are Microbial Communities Indicators of Soil Health in a Dryland Wheat Cropping System?” *Applied Soil Ecology* 170 (February): 104302. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104302>.
- Schloss, Patrick D., Sarah L. Westcott, Thomas Ryabin, Justine R. Hall, Martin Hartmann, Emily B. Hollister, Ryan A. Lesniewski, et al. 2009. “Introducing Mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities.” *Applied and Environmental Microbiology* 75 (23): 7537–41. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>.
- Schmidt, Philipp André, Miklós Bálint, Bastian Greshake, Cornelia Bandow, Jörg Römbke, and Imke Schmitt. 2013. “Illumina Metabarcoding of a Soil Fungal Community.” *Soil Biology and Biochemistry* 65: 128–32. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.05.014>.

- Shannon, C. E. 1948. "A Mathematical Theory of Communication." *Bell System Technical Journal* 27 (3): 379–423. <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>.
- Siegieda, Dominika G, Jacek Panek, and Magdalena Frąc. 2021. "'Shining a LAMP' (Loop-Mediated Isothermal Amplification) on the Molecular Detection of Phytopathogens *Phytophthora* Spp. and *Phytophthora Cactorum* in Strawberry Fields." *Pathogens* 10 (11): 1453. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111453>.
- Simpson, E. H. 1949. "Measurement of Diversity." *Nature* 163 (4148): 688–688. <https://doi.org/10.1038/163688a0>.
- Smith, Dylan P., Kabir G. Peay, Gail Ackermann, Amy Apprill, Markus Bauer, Donna Berg-Lyons, Jason Betley, et al. 2018. "EMP ITS Illumina Amplicon Protocol." *Protocols.io*. <https://doi.org/dx.doi.org/10.17504/protocols.io.pa7dihh>.
- Sogin, Mitchell L., Hilary G. Morrison, Julie A. Huber, David Mark Welch, Susan M. Huse, Phillip R. Neal, Jesus M. Arrieta, and Gerhard J. Herndl. 2006. "Microbial Diversity in the Deep Sea and the Underexplored 'Rare Biosphere.'" *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (32): 12115–20. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605127103>.
- Soppelsa, Sebastian, Luisa Maria Manici, Francesco Caputo, Massimo Zago, and Markus Kelderer. 2021. "Locally Available Organic Waste for Counteracting Strawberry Decline in a Mountain Specialized Cropping Area." *Sustainability* 13 (7): 3964. <https://doi.org/10.3390/su13073964>.
- Souza, Rafael Soares Correa De, Vagner Katsumi Okura, Jaderson Silveira Leite Armanhi, Beatriz Jorrín, Núria Lozano, Márcio José Da Silva, Manuel González-Guerrero, et al. 2016. "Unlocking the Bacterial and Fungal Communities Assemblages of Sugarcane Microbiome." *Scientific Reports* 6 (February): 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep28774>.
- Tayyab, Muhammad, Nyumah Fallah, Caifang Zhang, Ziqin Pang, Waqar Islam, Sheng Lin, Wenxiong Lin, and Hua Zhang. 2021. "Sugarcane Cultivar-Dependent Changes in Assemblage of Soil Rhizosphere Fungal Communities in Subtropical Ecosystem." *Environmental Science and Pollution Research*, November. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17229-4>.
- Thambugala, Kasun M., Dinushani A. Daranagama, Alan J.L. Phillips, Sagarika D. Kannangara, and Itthayakorn Promputtha. 2020. "Fungi vs. Fungi in Biocontrol: An Overview of Fungal Antagonists Applied Against Fungal Plant Pathogens." *Frontiers in*

- Cellular and Infection Microbiology* 10 (November): 1–19.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.604923>.
- Toju, Hirokazu, Akifumi S. Tanabe, and Hirotoshi Sato. 2018. “Network Hubs in Root-Associated Fungal Metacommunities.” *Microbiome* 6 (1): 1–16.
<https://doi.org/10.1186/s40168-018-0497-1>.
- Tomlinson, J. A., M. J. Dickinson, and Neil Boonham. 2010. “Rapid Detection of *Phytophthora Ramorum* and *P. Kernoviae* by Two-Minute DNA Extraction Followed by Isothermal Amplification and Amplicon Detection by Generic Lateral Flow Device.” *Phytopathology* 100 (2): 143–49. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-2-0143>.
- Topalović, Olivera, Muzammil Hussain, and Holger Heuer. 2020. “Plants and Associated Soil Microbiota Cooperatively Suppress Plant-Parasitic Nematodes.” *Frontiers in Microbiology* 11 (February): 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00313>.
- Wang, Tingting, Yüewen Hao, Mingzhu Zhu, Sitian Yu, Wei Ran, Chao Xue, Ning Ling, and Qirong Shen. 2019. “Characterizing Differences in Microbial Community Composition and Function between Fusarium Wilt Diseased and Healthy Soils under Watermelon Cultivation.” *Plant and Soil*, 421–33. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04037-6>.
- Whittaker, R. H. 1972. “Evolution and Measurement of Species Diversity.” *TAXON* 21 (2–3): 213–51. <https://doi.org/10.2307/1218190>.
- Wickham, Hadley. 2008. *Elegant Graphics for Data Analysis: Ggplot2. Applied Spatial Data Analysis with R*.
- Wilisiani, Fariha, Aika Tomiyama, Hiroshi Katoh, Sedyo Hartono, Yutaro Neriya, Hisashi Nishigawa, and Tomohide Natsuaki. 2019. “Development of a LAMP Assay with a Portable Device for Real-Time Detection of Begomoviruses under Field Conditions.” *Journal of Virological Methods* 265 (March): 71–76.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.10.005>.
- Xiong, Chao, Brajesh K. Singh, Ji Zheng He, Yan Lai Han, Pei Pei Li, Li Hua Wan, Guo Zhong Meng, et al. 2021. “Plant Developmental Stage Drives the Differentiation in Ecological Role of the Maize Microbiome.” *Microbiome* 9 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01118-6>.
- Xiong, Wu, Yuqi Song, Keming Yang, Yian Gu, Zhong Wei, George A. Kowalchuk, Yangchun Xu, Alexandre Jousset, Qirong Shen, and Stefan Geisen. 2020. “Rhizosphere Protists Are

- Key Determinants of Plant Health.” *Microbiome* 8 (1): 1–9.
<https://doi.org/10.1186/s40168-020-00799-9>.
- Xu, Jin, Yunzeng Zhang, Pengfan Zhang, Pankaj Trivedi, Nadia Riera, Yayu Wang, Xin Liu, et al. 2018. “The Structure and Function of the Global Citrus Rhizosphere Microbiome.” *Nature Communications* 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07343-2>.
- Xu, S., and G. Yu. 2022. “MicrobiotaProcess: A Comprehensive R Package for Managing and Analyzing Microbiome and Other Ecological Data within the Tidy Framework.” *R Package Version 1.8.1*. <https://github.com/YuLab-SMU/MicrobiotaProcess/>.
- Yang, G., W. Huang, Y. Li, S. Zhao, B. Kong, J. Ma, F. Li, K. Li, and J. Ma. 2020. “Fungal Community and Diversity in Rhizospheric Soil with Root Rot in an Apple Orchard.” *Journal of Fruit Science* 37 (6): 875–81. <https://doi.org/10.13925/j.cnki.gsx.20190242>.
- Zheng, You-Kun, Cui-Ping Miao, Hua-Hong Chen, Fang-Fang Huang, Yu-Mei Xia, You-Wei Chen, and Li-Xing Zhao. 2017. “Endophytic Fungi Harbored in *Panax Notoginseng*: Diversity and Potential as Biological Control Agents against Host Plant Pathogens of Root-Rot Disease.” *Journal of Ginseng Research* 41 (3): 353–60. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2016.07.005>.

7. Protokoły

7.1. Protokół izolacji DNA

Protokół izolacji DNA z próbek środowiskowych jest oparty o protokół oraz odczynniki 'FastPrep' firmy MP Biomedicals.

1. Do 2 ml próbki z matrycą lizującą dodać 800 µl Sodium Phosphate Buffer (buforu fosforanu sodu), 200 µl roztworu PLS i 250 mg gramów rośliny (zhomogenizowanej za pomocą młynka) lub 500 mg gleby. Wstrząsnąć do wymieszania, a następnie worteksować 10-15 sekund.
2. Odwirować próbki przy 14.000 x g przez 5 minut i zdekantować supernatant.
3. Dodać 110 µl buforu MT i 900 µl Sodium Phosphate Buffer (buforu fosforanu sodu). Energicznie wstrząsnąć lub krótko worteksować w celu wymieszania.
4. Homogenizować próbki w aparacie FastPrep® 24 z prędkością 6,0 m/s przez 40 sekund.
5. Odwirować próbki przy 14.000 x g przez 15 minut.
6. Przenieść supernatant do czystej próbki wirówkowej o pojemności 2,0 ml.
7. Dodać 250 µl roztworu PPS, energicznie wstrząsnąć w celu wymieszania i inkubować w temperaturze 4°C przez 10 minut. Nie worteksować! Odwirować próbki przy 14.000 x g przez 2 minuty.
8. Podczas gdy próbki są odwirowywane, dodać 500 µl Binding Matrix Solution do czystej próbki wirówkowej o pojemności 2,0 ml.
9. Przenieść supernatant do Binding Matrix Solution w próbce 2,0 ml. Delikatnie wstrząsnąć ręką w celu wymieszania, a następnie umieścić na wytrząsarce/wirówce na 5 minut.
10. Odwirować próbki przy 14.000 x g przez 2 minuty. Zdekantować supernatant.
11. Dodać 500 µl Wash Buffer #1 do peletu mieszaniny wiążącej i umieścić na wytrząsarce/wirówce na 5 minut.
12. Przenieść około 600 µl mieszaniny wiążącej do próbki SPIN Filter i odwirować przy 14.000 x g przez 1 minutę. Opróżnić próbkę.
13. Dodać 500 µl przygotowanego Wash Buffer #2 do próbki SPIN Filter. UWAGA: Upewnić się, że do Wash Buffer #2 został dodany etanol (100 ml 100% etanolu).
14. Odwirować próbki przy 14.000 x g przez 5 minut. Zlać odwirowany supernatant.
15. Powtórzyć kroki 13 i 14.

16. Ponownie odwirować próbki przez 5 minut w celu ekstrakcji pozostałości etanolu z matrycy wiążącej i wysuszyć próbki.
17. Przenieść SPIN Filter do czystej 1,5 ml probówki typu Eppendorfa. Dodać 100 μ l TES, delikatnie wymieszać pelet pipetując roztwór i inkubować w temperaturze pokojowej przez 2 minuty. Nie wortexować!
18. Odwirować próbki przy 14.000 x g przez 2 minuty w celu elucji oczyszczonego DNA do czystej probówki wychwytyjącej.
19. DNA jest teraz gotowe do analiz PCR i innych zastosowań lub może być rozcieńczone w stosunku 1:9 z wodą, jeśli to konieczne.
20. Przechowywać w temperaturze -20°C przez dłuższy czas lub w temperaturze 4°C przez okres do 12 godzin.

7.2. Protokół potrójnej detekcji real-time PCR

Sekwencje oligonukleotydów do reakcji:

Starter/sonda	Fluorofor	Sekwencja (5' – 3')	Wygaszacz
D2LSU_F		AGA CCG ATA GCG MAC AAG	
D2LSU_R		CTT GGT CCG TGT TTC AAG	
Botrytis6FAM	6FAM	TCAGGGTCTCGTACCCTGTGTACTT	BHQ-1
ColletotrichumTamra	Tamra(R)	TGTGACCAGACTTGCGTCCGGTGAA	BHQ-2
VerticilliumCy5	Cy5	TGGTTCAACCAGGTCCATGACCT	BHQ-2

Warunki reakcji:

(Opcjonalnie) UNG: 37°C 2 minuty

Denaturacja wstępna: 95°C 12 minut

40 cykli :

Denaturacja 95°C 5 s

Hybrydyzacja i elongacja: 60°C 2 min (Odczyt danych fluorescencji)

Skład mieszaniny reakcyjnej:

MP qPCR MM (EURx)(2×)	1×	10 µl
D2LSU_F	0,3µM	0,6 µl
D2LSU_R	0,3µM	0,6 µl
Botrytis6FAM	0,15µM	0,3 µl
ColletotrichumTamra	0,15µM	0,3 µl
VerticilliumCy5	0,15µM	0,3 µl
ROX		0,25 µl
(Opcjonalnie)UNG		0,2 µl
DNA		4 µl
Woda		do 20 µl

7.3. Protokół detekcji LAMP

Sekwencje oligonukleotydów do reakcji:

Marker	Mikroorganizm	Nazwa startera*	Sekwencja starterów 5'→3'
translation elongation factor 1- α (EF1a) gene	<i>Phytophthora</i> spp.	Psp_Ef1a_F3	GTACTTCTTCACGGTCATTGA
		Psp_Ef1a_B3	GTACATGACAGACGAGTCG
		Psp_Ef1a_FIP	AGCAACCACCAGrATGGC CACCGTGACTTCATCAAGA A
		Psp_Ef1a_BIP	TyGArGCTGGTATCTCCAAGGA ACrATCATCTGCTTCA CAC
		Psp_Ef1a_LoopF	CTGCGAGGTTrCCCGTAATC
		Psp_Ef1a_LoopB	TGCTTGCCTTCACyCTGG
	<i>Phytophthora cactorum</i>	Pca_Ef1a_FIP	AGCAACCACCAGGATGGC CACCGTGACTTCATCAAG AA
		Pca_Ef1a_BIP	TyGAAGCTGGTATCTCCAAGGA ACrATCATCTGCTTCA CAC
		Pca_Ef1a_LoopF	CTGCGAGGTACCCGTAATC
		Pca_Ef1a_LoopB	TGCTTGCCTTCACTCTGG

Warunki reakcji:

cały czas trwania reakcji: 65°C 40 minut

Skład mieszaniny reakcyjnej:

ISO-001 (OptiGene)(2×)	1×	10 μ l
FIP/BIP	0,8 μ M	1,6 μ l
F3/B3	0,2 μ M	0,4 μ l
LoopF/LoopB	0,4 μ M	0,8 μ l
ROX		0,2 μ l
DNA		1 μ l
Woda		do 20 μ l

8. Oświadczenia współautorów



Lublin, 31.08.2022

mgr inż. Dominika Siegieda
Zakład Badań Systemu Gleba-Roślina
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w niżej wymienionych pracach inicjatywa podjętych badań jest moim wkładem intelektualnym, a mój udział obejmował:

P1: Malarczyk D. (obecnie: Siegieda), Panek J., Frąc M., (2019). Alternative Molecular-Based Diagnostic Methods of Plant Pathogenic Fungi Affecting Berry Crops—A Review. *Molecules* 24, 1200.

- współudział w opracowaniu koncepcji manuskryptu,
- zebranie i szczegółowe przeanalizowanie danych literaturowych,
- wykonanie fotografii, rysunków oraz tabel do manuskryptu,
- przygotowanie manuskryptu,
- uczestnictwo w odpowiedziach do recenzentów oraz edycji manuskryptu.

P2: Malarczyk D. (obecnie: Siegieda), Panek J., Frąc M., (2020). Triplex Real-Time PCR Approach for the Detection of Crucial Fungal Berry Pathogens—*Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp.. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 8469

- współudział w opracowaniu koncepcji badań,
- współudział w izolacji czystych kultur szczepów fitopatogenicznych z porażonych próbek środowiskowych oraz izolacji DNA z próbek czystych szczepów patogenicznych,
- współudział w identyfikacji molekularnej czystych szczepów fitopatogenicznych,
- współudział w zebraniu próbek środowiskowych (gleba, ryzosfera, korzenie, owoce, liście) z ekologicznych plantacji truskawek ekologicznych oraz izolacji DNA,
- współudział w zaprojektowaniu sekwencji starterów oraz sond molekularnych,
- zoptymalizowanie warunków reakcji triplex real-time PCR,
- określenie limitu detekcji opracowanej reakcji,
- walidację opracowanej metody na próbkach zanieczyszczonych oraz środowiskowych,
- analizę i interpretację wyników badań,
- zebranie i szczegółowe przeanalizowanie danych literaturowych,

- przygotowanie manuskryptu,
- przygotowanie wykresów oraz tabel,
- uczestnictwo w odpowiedziach do recenzentów oraz edycji manuskryptu.

P3: **Siegieda D.**, Panek J., Frąc M., (2021). “Shining a LAMP” (Loop-Mediated Isothermal Amplification) on the Molecular Detection of Phytopathogens *Phytophthora* spp. and *Phytophthora cactorum* in Strawberry Fields. *Pathogens* 10, 1453

- współdział w opracowaniu koncepcji badań,
- udział w izolacji czystych szczepów patogenicznych *Phytophthora* spp.,
- identyfikację molekularną czystych szczepów,
- udział w zaprojektowaniu starterów reakcji LAMP,
- optymalizację stężeń reagentów reakcji LAMP oraz określenie limitu detekcji reakcji,
- walidację reakcji kolorymetrycznej oraz reakcji na próbkach środowiskowych,
- analizę i interpretację wyników badań,
- zebranie i szczegółowe przeanalizowanie danych literaturowych,
- przygotowanie manuskryptu,
- przygotowanie wykresów oraz tabel,
- uczestnictwo w odpowiedziach do recenzentów oraz edycji manuskryptu.

Dominika Siegieda

Lublin, 31.08.2022

mgr inż. Dominika Siegięda
Zakład Badań Systemu Gleba-Roślina
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w niżej wymienionym manuskrypcie artykułu naukowego inicjatywa podjętych badań jest moim wkładem intelektualnym, a mój udział obejmował:

P4: Siegięda D., Panek J., Frąc M., Plant and soil health in organic plantations of strawberry - mycobiome biodiversity, fungal trophic modes and networks.

- współudział w opracowaniu koncepcji badań,
- współudział w zebraniu próbek środowiskowych, izolacji DNA oraz w sekwencjonowaniu metataksonomicznym,
- współudział w przygotowaniu wyników badań do analiz statystycznych w środowisku QIIME2,
- analizę statystyczną wyników sekwencjonowania w środowisku R oraz przygotowanie skryptów bioinformatycznych,
- przygotowanie wykresów w języku R,
- analizę i interpretację wyników badań,
- zebranie i szczegółowe przeanalizowanie danych literaturowych,
- przygotowanie manuskryptu.

Dominika Siegięda

Lublin, 31.08.2022

prof. dr hab. Magdalena Frąc
Zakład Badań Systemu Gleba-Roślina
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższych pracach inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgr inż. Dominiki Siegiedy.

P1: Malarczyk D. (obecnie: Siegieda), Panek J., Frąc M., (2019). Alternative Molecular-Based Diagnostic Methods of Plant Pathogenic Fungi Affecting Berry Crops—A Review. *Molecules* 24, 1200.

P2: Malarczyk D. (obecnie: Siegieda), Panek J., Frąc M., (2020). Triplex Real-Time PCR Approach for the Detection of Crucial Fungal Berry Pathogens—*Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp.. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 8469

P3: Siegieda D., Panek J., Frąc M., (2021). “Shining a LAMP” (Loop-Mediated Isothermal Amplification) on the Molecular Detection of Phytopathogens *Phytophthora* spp. and *Phytophthora cactorum* in Strawberry Fields. *Pathogens* 10, 1453

Mój wkład w powyższe prace polegał na:

- określeniu problematyki i zakresu prac,
- współdziałaniu w opracowaniu koncepcji badań,
- zapewnieniu materiałów i aparatury umożliwiających realizację badań,
- kierowaniu przebiegiem badań zgodnie z założeniami projektu,
- nadzorowaniu procesu przygotowania manuskryptu,
- pozyskaniu środków finansowych umożliwiających realizację badań,
- udziale w analizie i interpretacji wyników badań,
- edycji i korekcie manuskryptu,
- uczestnictwo w odpowiedziach na recenzje.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby prace zostały wykorzystane w rozprawie doktorskiej mgr inż. Dominiki Siegiedy.

Magdalena Frąc

Lublin, 31.08.2022

prof. dr hab. Magdalena Frąc
Zakład Badań Systemu Gleba-Roślina
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w niżej wymienionym manuskrypcie artykułu naukowego inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgr inż. Dominiki Siegiedy.

P4: Siegieda D., Panek J., Frąc M., Plant and soil health in organic plantations of strawberry - mycobiome biodiversity, fungal trophic modes and networks

Mój wkład w powyższy manuskrypt polegał na:

- określeniu problematyki i zakresu prac,
- współdziałaniu w opracowaniu koncepcji badań,
- zapewnieniu materiałów i aparatury umożliwiających realizację badań,
- kierowaniu przebiegiem badań zgodnie z założeniami projektu,
- nadzorowaniu procesu przygotowania manuskryptu,
- pozyskaniu środków finansowych umożliwiających realizację badań,
- udziale w analizie i interpretacji wyników badań,
- edycji i korekcie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby powyższy manuskrypt artykułu naukowego został wykorzystany w rozprawie doktorskiej mgr inż. Dominiki Siegiedy.

Magdalena Frąc

Lublin, 31.08.2022

dr inż. Jacek Panek
Zakład Badań Systemu Gleba-Roślina
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższych pracach inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgr inż. Dominiki Siegiedy.

P1: Malarczyk D. (obecnie: Siegieda), Panek J., Frąc M., (2019). Alternative Molecular-Based Diagnostic Methods of Plant Pathogenic Fungi Affecting Berry Crops—A Review. *Molecules* 24, 1200.

P2: Malarczyk D. (obecnie: Siegieda), Panek J., Frąc M., (2020). Triplex Real-Time PCR Approach for the Detection of Crucial Fungal Berry Pathogens—*Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp.. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 8469

P3: Siegieda D., Panek J., Frąc M., (2021). “Shining a LAMP” (Loop-Mediated Isothermal Amplification) on the Molecular Detection of Phytopathogens *Phytophthora* spp. and *Phytophthora cactorum* in Strawberry Fields. *Pathogens* 10, 1453

Mój wkład w powyższe prace polegał na:

- współdziałanie w opracowaniu koncepcji badań,
- kierowaniu przebiegiem badań laboratoryjnych zgodnie z założeniami projektu,
- współdziałanie w opracowaniu metodyk wykorzystywanych w badaniach,
- zapewnieniu sprawności stanowiska bioinformatycznego do analizy wyników,
- udziale w analizie i interpretacji wyników badań,
- edycji i korekcie manuskryptu,
- uczestnictwo w odpowiedziach na recenzje.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby prace zostały wykorzystane w rozprawie doktorskiej mgr inż. Dominiki Siegiedy.



Lublin, 31.08.2022

dr inż. Jacek Panek
Zakład Badań Systemu Gleba-Roślina
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w niżej wymienionym manuskrypcie artykułu naukowego inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgr inż. Dominiki Siegiedy.

P4: Siegieda D., Panek J., Frąc M., Plant and soil health in organic plantations of strawberry - mycobiome biodiversity, fungal trophic modes and networks

Mój wkład w powyższą pracę polegał na:

- współdziałanie w opracowaniu koncepcji badań,
- kierowaniu przebiegiem badań laboratoryjnych zgodnie z założeniami projektu,
- współdziałanie w opracowaniu metodyk wykorzystywanych w badaniach,
- zapewnieniu sprawności stanowiska bioinformatycznego do analizy wyników,
- udziale w analizie i interpretacji wyników badań,
- edycji i korekcie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby powyższy manuskrypt artykułu naukowego został wykorzystany w rozprawie doktorskiej mgr inż. Dominiki Siegiedy.



9. Życiorys naukowy

Dane personalne: Dominika Siegieda (poprzednie nazwisko: Malarczyk)

Wykształcenie

2018 - obecnie

Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk, Zakład Badań Systemu Gleba-Roślina, Laboratorium Mikrobiologii Molekularnej i Środowiskowej, studia stacjonarne III^o w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo

2016-2018

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Biologii, Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki, studia stacjonarne II^o, kierunek: biologia, specjalność: biologia stosowana, obszar nauk przyrodniczych.

2018 - uzyskanie tytułu **magister**, praca pt.: Zróżnicowanie genetyczne orlika krzykliwego (*Aquila pomarina*) i orlika grubodziobego (*Aquila clanga*) na podstawie analizy mtDNA, wykonana w Instytucie Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej pod opieką promotorską dr Beaty Horeckiej.

2015-2016

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, studia stacjonarne II^o, kierunek: biotechnologia, obszar nauk rolniczych, leśnych i weterynaryjnych.

2016 - uzyskanie tytułu **magister inżynier**, praca pt.: Homologia genu TYR (*tyrosinase*) wybranych gatunków zwierząt futerkowych, wykonana w Katedrze Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej, pod opieką promotorską dr Beaty Horeckiej.

2011-2015

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, studia stacjonarne I^o, kierunek: biotechnologia, obszar nauk rolniczych, leśnych i weterynaryjnych.

2015 - uzyskanie tytułu **inżynier**, praca pt.: Ocena zależności między temperaturą gniazda pszczelego a szerokością komórek plastrów - praca projektowa, wykonana w Katedrze Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej pod opieką promotorską dra hab. Krzysztofa Olszewskiego.

Osiągnięcia związane z rozprawą doktorską

Ustne wystąpienia na międzynarodowych konferencjach naukowych:

1. Siegieda D., Panek J., Frąc M., 2022 *Metataxonomy in organic strawberry cultivation - what's the big deal?* "21st International Workshop for Young Scientists BioPhys Spring 2022", 30-31 V 2022, Nitra, Słowacja
2. Siegieda D., Panek J., Frąc M., 2022, *Correlations between fungal trophic modes in healthy and unhealthy strawberry samples* "MycoRiseUp! Youth in mycology", 27-29 V 2022, Warszawa
3. Malarczyk D., Panek J., Frąc M., 2021, *LAMP - efficient detection of Phytophthora spp. found in organic strawberry plantations*, "20th International Workshop for Young Scientists BioPhys Spring 2021", 15 V 2021, on-line
4. Malarczyk D., Panek J., Frąc M., 2020, *Detection of crucial fungal pathogens of soft fruits in environmental samples derived from organic strawberry plantations*, 19th International Workshop for Young Scientists BioPhys Spring 2020, 19-21 V 2020, Praga, Republika Czeska
5. Malarczyk D., Panek J., Frąc M., 2019, *Fungal pathogens in ecological strawberry fields*, 18th International Workshop for Young Scientists BioPhys Spring 2019, 22-24 V 2019, Gödöllő, Węgry

Ustne wystąpienia na ogólnopolskich konferencjach naukowych:

6. Siegieda D., Panek J., Frąc M., 2022, *Abundance of phytopathogenic fungi and other guilds in soil, rhizosphere, roots and leaves of organic strawberry*, konferencja „Nowoczesne spojrzenie na fitopatologię” Polskiego Towarzystwa Fitopatologicznego, Poznań, 7-8 IX 2022
7. Siegieda D., Panek J., Frąc M., 2021, *Sekwencjonowanie nowej generacji w badaniach mikrobiomu próbek gleby i roślin*, IV Konferencja Doktorantów pt. „Cztery żywioły – współczesne problemy w naukach o życiu”, Lublin, 14 XII 2021
8. Malarczyk D., Panek J., Frąc M., 2021, *Structural and functional analysis of fungal communities occurring in organic strawberry plantations*, "MycoRiseUp! Youth in mycology", 23 IV 2021, on-line

9. Malarczyk D., Panek J., Frąc M., 2020, *Interakcje mykobioty gleby i roślin w ekologicznej uprawie truskawki*, III Konferencja Doktorantów pt. „Cztery żywioły – współczesne problemy w naukach o życiu”, 18 XII 2020, Warszawa-Lublin
10. Malarczyk D., Panek J., Frąc M., 2019, *Zagrożenie fitopatogenami w ekologicznej uprawie owoców*, II Konferencja Doktorantów pt. „Cztery żywioły – współczesne problemy w naukach o życiu”, 24 X 2019, Lublin
11. Panek J., Malarczyk D., Gryta A., Oszust K., Frąc M., 2019, *Detekcja i identyfikacja patogenów grzybowych występujących w ekologicznej uprawie truskawek*, Ochrona bioróżnorodności gleby warunkiem zdrowia obecnych i przyszłych pokoleń, 16 X 2019, Skierniewice

Postery na międzynarodowych konferencjach naukowych:

12. Siegieda D., Panek J., Frąc M., 2021, *Aprica strawberry cultivation on four types of soil. Does it impact the mycobiome composition?*, 13th International Conference on Agrophysics: Agriculture in changing climate, 15-16 XI 2021, Lublin
13. Panek J., Malarczyk D., Frąc M., 2019, *Multiplex qPCR method for detection of *Verticillium sp.* and *Phytophthora sp.**, XVIII Congress of European Mycologists, 16-21 IX 2019, Warszawa/Białowieża

Postery na ogólnopolskich konferencjach naukowych:

14. Siegieda D., Panek J., Frąc M., 2022, *Are fungi good networkers? Mycobiome networks in healthy and diseased strawberry fields*, Ogólnopolska Konferencja naukowa z okazji X-lecia Polskiego Towarzystwa Mykologicznego, 24-28 IX 2022, Poznań
15. Siegieda D., Panek J., Frąc M., 2022 *Analiza sieci powiązań bakterii w zdrowych i chorych próbkach ekologicznej truskawki*, XXIX Ogólnopolski Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, 15-17 IX 2022, Warszawa
16. Siegieda D., Panek J., Frąc M., 2022, *Comparing Differential Abundance (DA) methods on mycobiome of organic strawberry*, V Ogólnopolskie Sympozjum Mikrobiologiczne „Metagenomy różnych środowisk”, 23-24 VI 2022, Puławy
17. Siegieda D., Panek J., Frąc M., 2021, *Czy skład mykobioty próbek roślin i gleby z plantacji truskawek jest identyczny dla odmian Honeoye, Aprica i Dipred?*, 54. Konferencja Mikrobiologiczna - „Mikroorganizmy różnych środowisk”, 20-21 IX 2021, Warszawa

18. Malarczyk D., Panek J., Frąc M., 2021, *Różnice w składzie mykobiomu ekologicznych upraw truskawek odmian Honeoye i Aprica*, IV Ogólnopolskie Sympozjum Mikrobiologiczne „Metagenomy różnych środowisk”, 17-18 VI 2021, Lublin
19. Malarczyk D., Panek J., Frąc M., 2020, *Detekcja roślinnych patogenów grzybowych w środowiskowych próbkach truskawek w zależności od warunków pogodowych i w trakcie przechowywania*, Bioróżnorodność środowiska glebowego – wskaźniki oceny, 5 XI 2020, Puławy
20. Panek J., Malarczyk D., Frąc M., 2019, *Izolacja DNA z Verticillium sp. i Phytophthora sp.*, 53. Ogólnopolska Konferencja Mikrobiologiczna, 08-11 IX 2019, Poznań

Współautorstwo doniesień pokonferencyjnych:

21. Frąc M., Oszust K., Panek J., Pertille G., Gryta A., Mącik M., Pylak M., Siegieda D., 2022, *Soil microbiome and mycobiome as an important driver of plant health and soil quality*, 22nd World Congress of Soil Science, 31 VII - 5 VIII 2022, Glasgow, Szkocja
22. Panek J., Malarczyk D., Frąc M., 2019, *Porównanie wybranych metod izolacji DNA z gleby w badaniach metataksonomicznych*, IV Ogólnopolskie Sympozjum Mikrobiologiczne „Metagenomy Różnych Środowisk” 27–28 VI 2019, Lublin
23. Panek J., Malarczyk D., Frąc M., 2019, *Isolation of microbial DNA from soil – metagenomic approach*, 18th International Workshop for Young Scientists BioPhys Spring 2019, 22-24 V 2019, Gödöllő, Węgry

Udział w projekcie naukowym:

- XI 2021 - IX 2022, pracowniczka badawczo-techniczna w projekcie: *Nowe rozwiązania biotechnologiczne w diagnostyce, kontroli i monitoringu kluczowych patogenów grzybowych w ekologicznych uprawach owoców miękkich (akronim: EcoFruits)*, finansowane przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach projektu BIOSTRATEG
- XI 2019 - XI 2021, pracowniczka inżynierska w projekcie: *Nowe rozwiązania biotechnologiczne w diagnostyce, kontroli i monitoringu kluczowych patogenów grzybowych w ekologicznych uprawach owoców miękkich (akronim: EcoFruits)*, finansowane przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach projektu BIOSTRATEG

Patenty:

- P.431985. *Startery oligonukleotydowe oraz sonda molekularna do wykrywania fitopatogenicznego grzyba Botrytis sp. oraz sposób jego wykrywania*. Twórcy: Jacek Panek, Magdalena Frąc, Dominika Malarczyk, Data zgłoszenia: 2019-11-28.
- P.431986. *Startery oligonukleotydowe oraz sonda molekularna do wykrywania fitopatogenicznego grzyba Colletotrichum sp. oraz sposób jego wykrywania*. Twórcy: Jacek Panek, Magdalena Frąc, Dominika Malarczyk, Data zgłoszenia: 2019-11-28.
- P.431987. *Startery oligonukleotydowe oraz sonda molekularna do wykrywania fitopatogenicznego grzyba Verticillium sp. oraz sposób jego wykrywania*. Twórcy: Jacek Panek, Magdalena Frąc, Dominika Malarczyk, Data zgłoszenia: 2019-11-28.
- P.431988. *Startery oligonukleotydowe oraz sondy molekularne do jednoczesnego wykrywania fitopatogenicznych grzybów Botrytis sp., Colletotrichum sp., Verticillium sp. oraz sposób ich wykrywania*. Twórcy: Jacek Panek, Magdalena Frąc, Dominika Malarczyk, Data zgłoszenia: 2019-11-28.

Zgłoszenia patentowe:

- P.437110. *Startery oligonukleotydowe do wykrywania fitopatogennych mikroorganizmów Phytophthora cactorum i sposób ich wykrywania*. Twórcy: Jacek Panek, Dominika Malarczyk, Magdalena Frąc, Data zgłoszenia: 2021-02-24
- P.437111. *Startery oligonukleotydowe do wykrywania fitopatogennych mikroorganizmów Phytophthora spp. oraz sposób ich wykrywania*. Twórcy: Jacek Panek, Dominika Malarczyk, Magdalena Frąc, Data zgłoszenia: 2021-02-24

Osiągnięcia niezwiązane z rozprawą doktorską

Staż naukowy:

- II - III 2017, Uniwersytet Techniczny w Monachium, Niemcy, Zakład Biotechnologii Zwierząt Gospodarskich, Sekcja Analiz Genetycznych i Epigenetycznych, program stażowy ERASMUS+

Współautorstwo doniesień pokonferencyjnych:

- Frąc M., Panek, J., Siegieda, D., Treder, K., Pawłowska A., Michałowska A., Salles, J.F., 2022, *Strategies to improve soil resource-use efficiency through plant-microbiome interactions - microbiome discrete groups of potato cultivars and their fungal trophic*

guilds, Ogólnopolska Konferencja naukowa z okazji X-lecia Polskiego Towarzystwa Mykologicznego, 24-28 IX 2022, Poznań

Udział w projekcie międzynarodowym:

- V 2022 - XI 2022: *Harnessing the potato-microbiome interactions for development of sustainable breeding and production strategies* (potatoMETABiome); Międzynarodowe konsorcjum naukowe SusCrop ERA-Net Cofund Action H2020: Uniwersytet w Groningen, Niderlandy - Lider, Partnerzy: Instytut Agrofizyki PAN - Polska (Lider Polskiego Konsorcjum), Uniwersytet Techniczny w Monachium - Niemcy, Politechnika w Graz - Austria, University of Limerick - Irlandia, Université de Pau et des Pays de l'Adour - Francja, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego - Polska, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - Państwowy Instytut Badawczy - Polska, Instytut Molekularnej Fizjologii Roślin im. Maxa Plancka - Niemcy

Złożony projekt:

- *Charakterystyka multiomiczna oraz detekcja rozprzestrzeniającego się grzyba fitopatogenicznego - *Pilidium lythri** w konkursie PRELUDIUM 21, organizowanym przez Narodowe Centrum Nauki

Wyróżnienia i nagrody:

- 2021, Stypendium Dyrektora Instytutu Agrofizyki Polskiej Akademii Nauk, prof. dra hab. Cezarego Sławińskiego, czł. koresp. PAN, dla najlepszych doktorantów na rok akademicki 2021/2022
- 2021, Wyróżnienie posteru pt.: *Czy skład mykobiomu próbek roślin i gleby z plantacji truskawek jest identyczny dla odmian Honeoye, Aprica i Dipred?* na 54. Konferencji Mikrobiologicznej "Mikroorganizmy różnych środowisk"
- 2021, Dyplom za II miejsce w sesji posterowej za poster pt.: *Różnice w składzie mykobiomu ekologicznych upraw truskawek odmian Honeoye i Aprica* na V Ogólnopolskim Sympozjum Mikrobiologicznym "Metagenomy różnych środowisk"
- 2018, Stypendium Dyrektora Instytutu Agrofizyki Polskiej Akademii Nauk, prof. dra hab. Cezarego Sławińskiego, dla najlepszych doktorantów na rok akademicki 2018/2019

- 2018, Dyplom Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, prof. dr hab. Zygmunta Litwińczuka, za wyróżniającą się pracę magisterską pt. *Zróźnicowanie genetyczne orlika krzykliwego (Aquila pomarina) i orlika grubodziobego (Aquila clanga) na podstawie analizy mtDNA*

Szkolenia i certyfikaty:

- NGSchool: Machine Learning in Computational Biology, 15 - 23 IX 2022
- Data Analytics With R, NobleProg, 14 - 31 III 2022
- NGSeminars2021, 9 VI - 10 XI 2021
- NGSeminars2020, 18 VI - 17 IX 2020
- London Calling 2020: Flow cell loading demonstration workshop, 17 VI 2020
- Nanopore seminars: an online series, 12-26 V 2020
- Python dla początkujących, Rafał Mobilo Certyfikowany Instruktor Microsoft, Udemy, 15 V 2020
- Laboratorium Mikrobiologii Molekularnej i Środowiskowej IA PAN, szkolenie z obsługi autoklawów, 20 I 2020
- Instytut Chemii Organicznej PAN oraz Pałac w Jabłonie, III Konferencja Doktorantów PAN, szkolenie z wystąpień publicznych, 11-13 X 2019
- Certyfikat EF SET znajomości języka angielskiego na poziomie C2 (Proficient), 26 VII 2019
- Laboratorium Mikrobiologii Molekularnej i Środowiskowej IA PAN, Szkolenie aplikacyjne obejmujące szlak wykonania bibliotek, metagenomikę i sekwencjonowanie małych genomów, w tym wykonanie oznaczenia WGS próbki DNA izolatu bakteryjnego i grzybowego, 31 I 2019
- Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego, Dni aplikacyjne Illumina, 15 XI 2018
- Ośrodek Doskonalenia Kadr MECHANIKA, Obsługa autoklawów, sterylizatorów laboratoryjnych do 50 kW, 08-15 IV 2015

Pełnione funkcje:

- Członkini Komisji Rekrutacyjnej Interdyscyplinarnej Szkoły Doktorskiej Nauk Rolniczych w roku akademickim 2022/2023

- Wiceprzewodnicząca Rady Samorządu Doktorantów IA PAN w roku akademickim 2021/2022
- Koordynatorka merytoryczna projektu *PhD Mental Health*, finansowanego przez Ministerstwo Edukacji i Nauki, pozyskanego przez Krajową Reprezentację Doktorantów
- Koordynatorka zespołu ds. Public Relations *I Targów Pracy dla Doktorantów Work&Science Forum 2021*, organizowanych przez Krajową Reprezentację Doktorantów
- Wiceprzewodnicząca Komisji ds. Public Relations przy Krajowej Reprezentacji Doktorantów w kadencji 2021
- Członkini Komitetu Organizacyjnego IV Konferencji Doktorantów *Cztery żywioły – współczesne problemy w naukach o życiu*, 14 XII 2021, IA PAN, Lublin
- Członkini Komisji Rekrutacyjnej Interdyscyplinarnej Szkoły Doktorskiej Nauk Rolniczych w roku akademickim 2020/2021
- Przewodnicząca Komisji Stypendialnej ds. przyznawania świadczeń pomocy materialnej uczestnikom stacjonarnych studiów doktoranckich w Instytucie Agrofizyki PAN w roku akademickim 2021/2022
- Członkini Komitetu Organizacyjnego III Konferencji Doktorantów *Cztery żywioły – współczesne problemy w naukach o życiu*, 18 XII 2020, SGGW, Warszawa
- Członkini Komisji Stypendialnej ds. przyznawania świadczeń pomocy materialnej uczestnikom stacjonarnych studiów doktoranckich w Instytucie Agrofizyki PAN w roku akademickim 2020/2021
- Członkini Komitetu Organizacyjnego II Konferencji Doktorantów *Cztery żywioły – współczesne problemy w naukach o życiu*, 24 X 2019, IA PAN, Lublin
- Przewodnicząca Samorządu Doktorantów IA PAN w roku akademickim 2019/2020
- Wiceprzewodnicząca Rady Samorządu Doktorantów IA PAN w roku akademickim 2018/2019