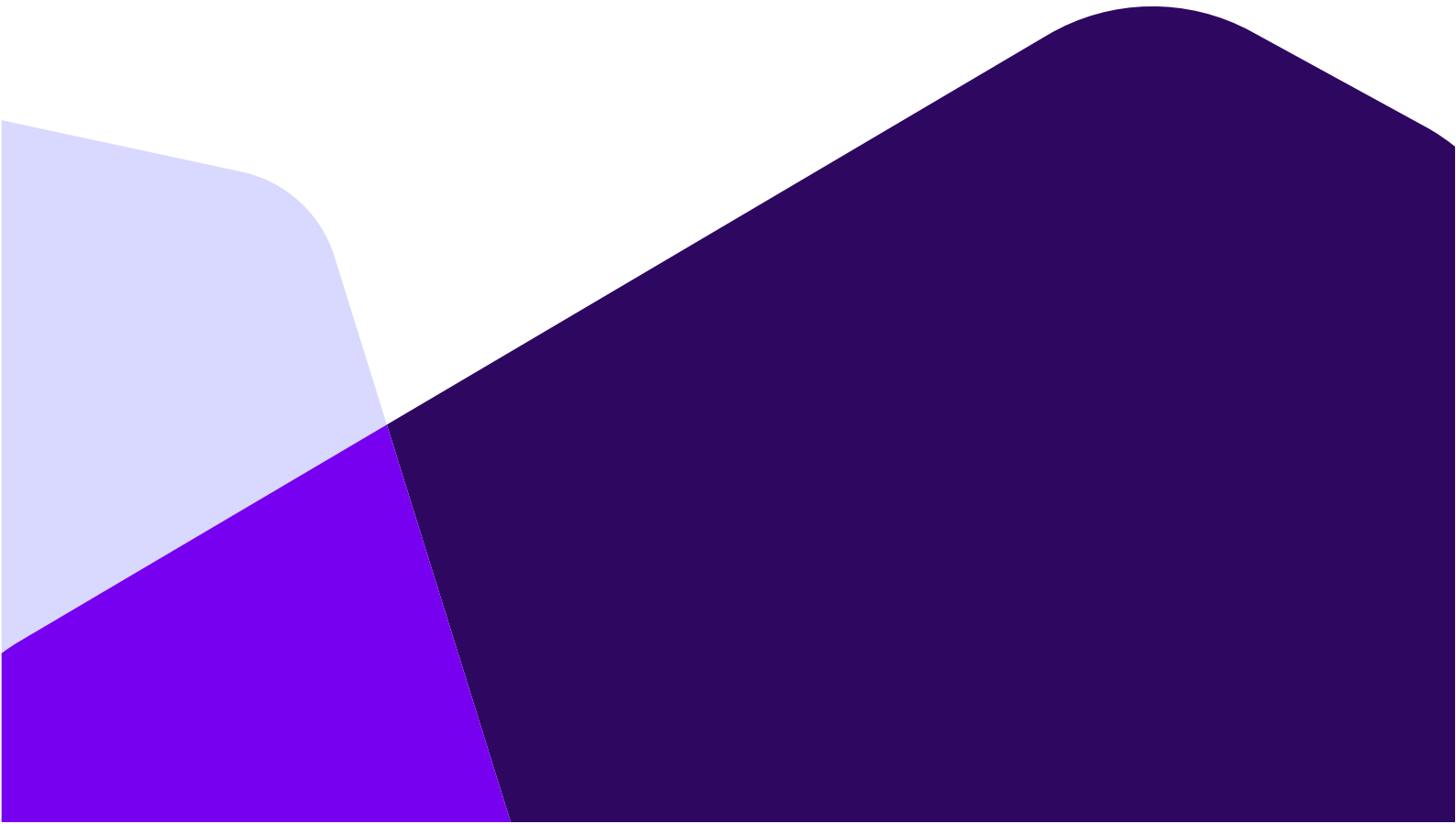


Erlend Stokka Aarlott

Effekten av damping på *Phytophthora* *fragariae* og andre Oomyceter



Universitetet i Sørøst-Norge

Fakultet for Teknologi, Naturvitenskap og Maritime fag

Institutt for Natur, Helse og Miljø

Postboks 4

3199 Borre

<http://www.usn.no>

© 2024 Erlend Stokka Aarlott

Denne avhandlingen representerer 60 studiepoeng

Sammendrag

Phytophthora fragariae og andre oomyceter er en viktig del av jordsammensetningen. Mange oomyceter er patogene og i denne oppgaven ser jeg på hvordan jorrdamping vil kunne påvirke *Phytophthora fragariae*, men også andre oomyceter generelt i jord. Ved hjelp av DNA meta-strekkoding ble endringene i samfunnet av Oomyceter studert, med spesielt fokus på *P.fragariae*. Samfunnet og artene av oomyceter endres med. Arter som *Globisporangium sylvaticum* og *Globisporangium intermedium* er arter som dominerer etter damping og kan også bli brukt som biomarkører. Oppgaven diskuterer hva grunnene til hvorfor disse artene overlever og om det er lurt å bruke damp som en metode med hensyn på resultatene. *P.fragariae* ble bare funnet i enkelte av prøvene og like ofte i dampa som i ikke dampa prøver.

Contents

Forord.....	4
Introduksjon	5
Materiale og Metode	8
2.1 Områdebeskrivelse	8
2.2. Prøveinnsamling.....	9
2.3. DNA-ekstraksjon.....	11
2.4. qPCR og DNA meta-strekkode	11
2.5. Statistiske analyser	13
Resultater	16
3.1 DNA-Konsentrasjon.....	16
3.2 Resultater av qPCR:	17
3.3 Effekten av damping på diversiteten av Oomyceter	17
3.4 Betadiversitet.....	20
3.5 Algoritmiske analyser.....	21
Diskusjon	24
4.1 Oppsummering av resultater:	24
4.2 Utvikle en testprosedyre for å dokumentere om <i>Phytophthora fragariae</i> er til stede i jorda	24
4.3 Effekten av damping på <i>Phytophthora fragariae</i> og andre oomyceter:.....	25
Konklusjon.....	27
Bibliografi.....	28

Forord

Masteroppgaven er skrevet for Universitet i Sør-Øst-Norge. Jeg vil gjerne takke veileder Jørn Henrik Sønstebø for god veiledning på lab og med skriving av oppgave. Jeg vil også takke Celine Jackson Koop for samarbeid om prøveinnsamling og ekstraheringen av DNA. Jeg vil takke samarbeidspartnere SoilSteam som stod for dampmaskin og Bionér for opplæring på lab.

Introduksjon

Klimaendringer og økende befolkningsvekst har gjort matjord til ettertraktet ressurs i mange land. Land som bl.a. Ukraina, Sør-Afrika og Syria har alle store matjordsområder og vil være mer ettertraktet og utsatt med tanke på handel og endringer i form fra klimakrisen (Artsdatabank, 2021). Norge har derimot svært lite dyrkbar jord og det er derfor viktig å ta vare på Norges matjord (Arne Bardalen, 2021). Klimaforskere mener at sjansen for mer ekstremvær i form av nedbør, tørke og stormer vil øke i fremtida (klimapanel, 2023). Dette vil kunne påvirke store deler av landbruket og føre til reduksjon i matproduksjonen (Dasgupta & Robinson, 2022). Kunnskapen om jordhelse, sykdommer og mat er derfor et viktig forskningsområde som kan forberede Norge på den kommende klimakrisen (Bardalen, 2018).

Med endringer som økt nedbør og temperatur vil patogener som fører til sykdommer hos planter og dyr få en større mulighet til å spre seg. Institusjoner som Miljødirektoratet og Nibio regner med at sykdommer, ugress og skadelige insekter vil være et større problem for landbruket i fremtiden kontra nå (Miljødirektoratet, 2024). Plantesykdom er endring i utseende eller morfologi av plantens struktur eller faser forårsaket av en patogen organisme. Patogener kan gi forskjellige utslag som er synlige og mindre synlige. Eksempler kan være unormal farge, form eller størrelse, råte, misdannelser og utvekster (Thines, 2018). Plantesykdommer deles inn i tre hovedgrupper: sykdommer forårsaket av sopp eller sopplignende organismer, bakterier eller virus (Henriksen, 2024). Oomyceter også kalt eggsporesopper er en gruppe mikroorganismer som tidligere var regnet som sopp. Oomyceter er en av de mest spredte eukaryote formene for liv og er funnet på alle kontinenter (Thines, 2018). De fleste kjente arter er parasittiske (patogene) (Aarnes, 2020). Noen av disse patogene Oomycetene er slektene *Globisporangium* og *Phytophthora*.

Globisporangium er en slekt som tidligere hørte til slekten *Pythium*, men ble endret i 2010 (S. Uzuhashi, 2019). Mange av artene innenfor *Globisporangium* er patogener og kan ha sterk påvirkning på økosystemer de lever i (Tojo et al, 2021). Noen patogeniske arter er *Globisporangium sylvaticum* og *Globisporangium intermedium* (tidligere *Pythium intermedium*).

Phytophthora er en slekt av sopplignende mikroorganismer, hvor mange av artene er sykdomsfremkallende. Navnet er gitt ved «Phyto» som betyr plante og «Pthora» som betyr ødelegger. Slekten inneholder 150 kjente arter. De fleste trives i fuktige områder, og i likhet med

sopp har de hyfevekst og danner sporer. Noen danner også hvilesporer som kan ligge i jorden lenge uten vert. Rekken oomyceter har ikke kitin i celleveggen. Dette gjør at fungicider ikke kan brukes til å bekjempe arter i denne gruppen (Martin Pettersson, 2020). De har også et lengre diploid livsstadium kontra soppatogener som er haploid store deler av livssyklusen.

Phytophthora danner oosporer som kan spre seg både seksuelt og aseksuelt. De aseksuelle sporene kan leve lengst, opptil 12-15 år. Slekten kjennetegnes også ved at sporene danner flageller til å svømme i vann, og spres derfor hyppigere i fuktig jord (C.J.Hickman, 2024). En art innenfor *Phytophthora* slekten som er vurdert til «Høy potensial» fare av mattilsynet er *Phytophthora fragariae*.

Phytophthora fragariae er en patogen oomyceter som sannsynligvis har kommet til Norge ved hjelp av internasjonal handel (Dybdal, 2017). *Phytophthora fragariae* er homothallisk som betyr at den er selvkompatibel og befrukter seg selv. Kjennetegn på *Phytophthora fragariae* er at de er diploide, og lager zoosporer som har to flageller. Den er kjent for å forårsake plantesykdommen «Rød Marg» som angriper jordbær (*Fragaria ananassa*), men også andre planter i Rosefamilien (*Rosaceae*). Arten er vurdert til «Potensiell høy» risiko av artsdatabanken etter ny vurdering fra 2018 (Pettersson M et al, 2023). I en gjennomgang i 2012 var arten blitt funnet i følgende fylker: Akershus, Aust-Agder, Vest-Agder, Hedmark, Rogaland og Hordaland (Kari Romstad et al, 2012). I løpet av de neste 50 årene kan vi anta at arten vil finnes i alle kommuner sør for Trøndelag.

Patogene spres ved hjelp av fjernsporer i våt/fuktig jord eller gjennom transport av hvilesporer via fottøy eller forflytting av planter. Hvilesporene kan overleve opp til 12 år uten en vert (Newton et al., 2010). Dagens tiltak for infisert jord er karantene (opptil 15 år) og overvåking av mattilsynet. Siden *Phytophthora fragariae* spres ved fuktig jord, vil økte nedbørmengder og klimaendringer mulig bidra til en mye større spredningsfare. Bruk av eDNA vil kunne gi informasjon om importerte planter før de blir distribuert på det norske markedet. Dette gjelder ikke kun *Phytophthora fragariae*, men også andre patogene oomyceter. Det kan også bidra til økt overvåking over jorder i karantene (Kari Romstad et al, 2012). Symptomer av *Phytophthora fragariae* kjennes ved dårlig etablert rotsystem, misfarging av blader og lite blomstervekst. Sykdommen kan være vanskelig å detektere i sommermånedene ettersom oosporene ofte er

eneste tegn til smitte (C.J.Hickman, 2024). Den ideelle temperaturen for spiring er 10-15 grader celsius og de første symptomene oppstår på rotsystemet (C.J.Hickman, 2024).

Damping av jord er en behandlingsmetode brukt fra tidlig 1900-tallet og har nå blitt en metode flere anser som alternativ til kjemiske metoder (Schreiner & Lathrop, 1912). Ny dampingsteknologi som FieldSaver anses som mulig løsning til å bekjempe oomyceter og andre plantepatogener. FieldSaver er en mobil dampmaskin (FieldSaver). I nyere tid har metoden blitt brukt til behandling for alt fra ugress til svartelista arter og til behandling av skadelig sopp (Olsen et al., 1999). Samlingen av studier gjort av (A.Bergjord, 1999), viser at det er få patogene sopper som overlever en temperatur på 70°C. Andre studier viser også god effekt på damping som behandling av patogene oomyceter. Metoden anses som effektiv for å bli kvitt *Phytophthora cactorum* som er en plantesykdom som angriper rododendron, men forårsaker også rotstokkråte hos jordbær (Volk et al., 2023). Forskning på *Phytophthora fragariae* er dermed viktig for å undersøke muligheten om samme behandling har lik effekt som i forsøkene gjort av (Baggio et al., 2021). Baggio fant ut at varmebehandling av jord på 45°C hindret spredning av *Phytophthora* kronråte, men at det ikke hindret produksjonen av oosporer. Annen forskning gjort på jordbærplanter i USA har brukt damp kombinert med Allyl Isothiocyanate for å bekjempe patogener generelt i jorda (Almasri, 2018). Resultatene viste at selve dampingen ikke hadde stor effekt for «Pathogen crown rot» og forfatterne henviste til at videre forskning burde gjøres (Volk et al., 2023). DNA meta-strekkoding for å identifisere oomyceter er en relativ fersk forskningsmetode og damping som metode for behandling av infisert jord er lite utbredt.

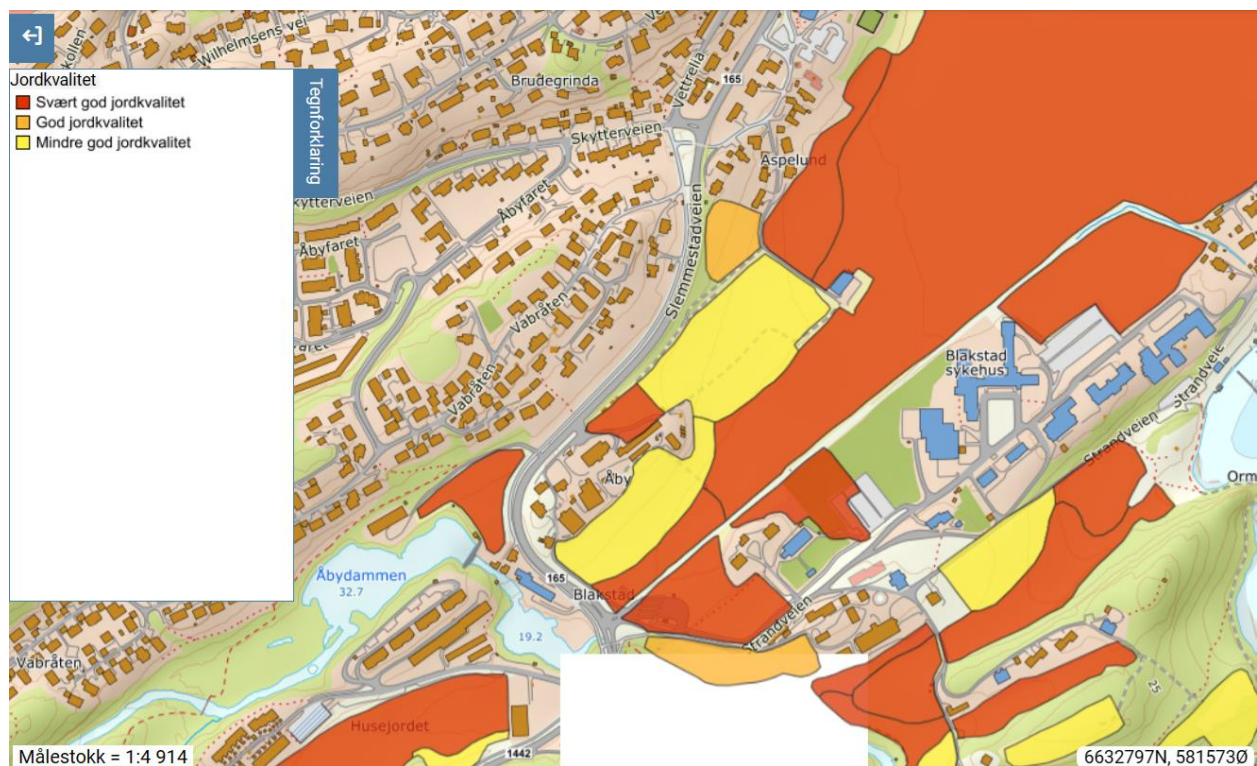
Forsøk på å detektere importerte planteskadelige patogene oomyceter i jord er blitt testet av (Rossmann et al., 2021). Det ble brukt ITS-primer og «baiting» for å dokumentere mengden oomyceter, samt hvilke arter som kommer inn via import. «Baiting» betyr å legge planteåte for oomyceter. Eksempel på åte for *P.fragariae* er jordbærblader. Resultatet for forskningen viste blant annet 19 detekterte arter av *Phytophthora*. Størst mengde arter var av *Phytium* og *Globisporangium* (Rossmann et al., 2021).

Formålet med dette studiet er å teste effekten av jorrdamping med en mobil dampmaskin (FieldSaver) på *P.fragariae* og andre oomyceter, samt å utvikle en testprosedyre for å dokumentere om *Phytophthora fragariae* er til stede i jorda.

Materiale og Metode

2.1 Områdebeskrivelse

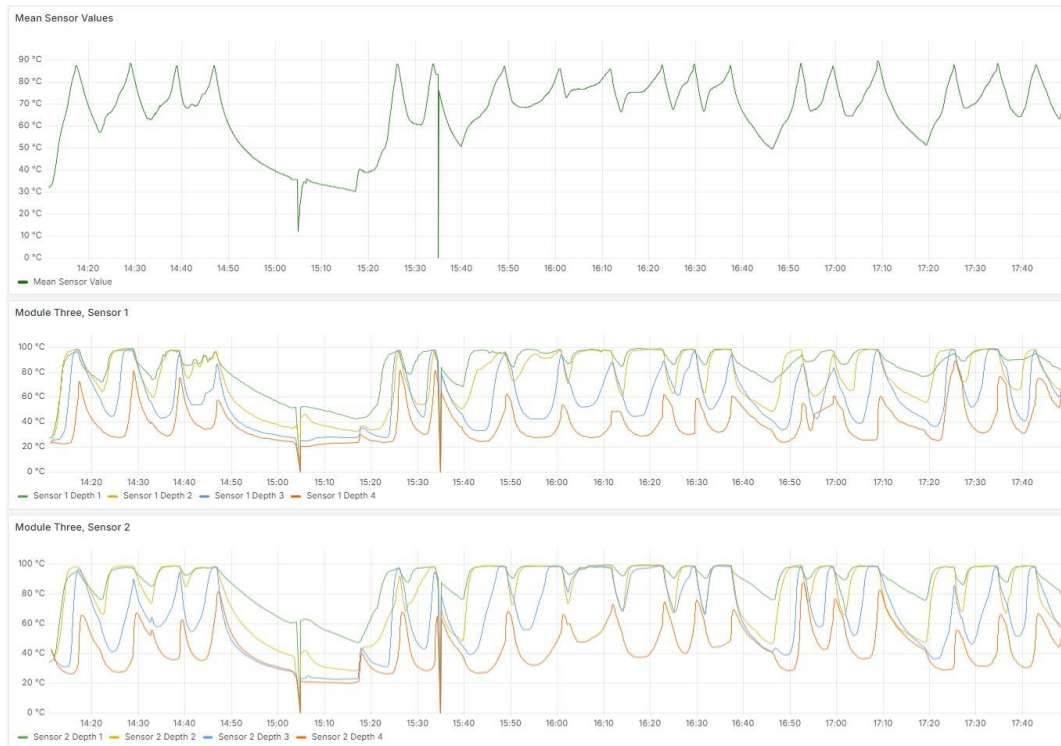
Studieområdet er Aaby gård i Asker (figur 2.1.1). Området ligger mot en bekk, ved laveste punkt av jordbæråkeren. Jordet ligger langt ned i en skråning hvor selve jordet er flatt. Studieområde er flatt slik at maskinen skal effektivt kunne komme til. Jorden her er klassifisert som stagnasol noe som betyr at det øverste jordlaget (omtrent 50 cm) har problemer med å drenere ut vann (Stav, 2022). Det var ingen planter eller ugress på feltet fordi jorden var harva av bonden før forsøket startet.



Figur 2.1.1: Kartet viser Aaby gårds jordområder og fargene viser svært god jordkvalitet (Nibio, 2024).

Studieområdene ble delt inn i 3 felt; A, B og C. A har 4 ruter, mens B og C har 6 ruter hvor annenhver rute ble behandla og ikke behandla. Jorda ble behandlet/dampet den 19.06.2023 med FieldSaver. FieldSaver damper og måler temperaturene ved gitte punkter for å passe på at

behandlingen går som det skal. FieldSaver gjorde varmemålinger ved 1cm, 7cm, 13cm og 19cm (figur 2.2.1). Snittemperaturen for alle var 75°C, mens ved 15 cm ned, var den ca. 70°C grader. Temperaturen i figur 2.2.1 ser en at enkelte tider så faller temperaturen ned spesielt rundt klokken 15:00.



Figur 2.2.1 viser temperaturer og snittemperaturer ved damping. Depth er dybden på de forskjellige målene $D=1\text{cm}$, $D2 = 7\text{cm}$, $D3 = 13\text{cm}$ og $D4 = 19\text{cm}$. Snittemperaturen for alle var 75 grader, mens ved 15cm ned, var den ca. 70 grader (SoilSteam, 2024).

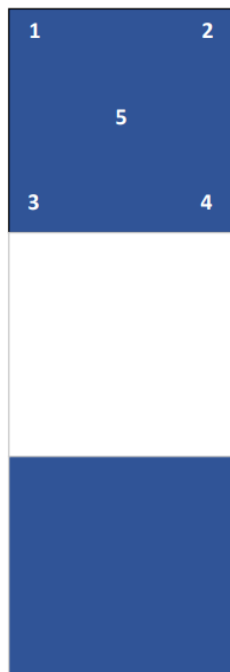
2.2. Prøveinnsamling

Jordprøver ble tatt ved en dag (20.06.2023), en uke (28.06.2023), to måneder (25.08.2023) og tre måneder (27.09.2023) etter damping (tabell 2.2.1). Prøvene ble tatt ved å stikke 50 ml sterile falconrør direkte ned i jorden ca. 7cm på toppen av jorda, både av dampa og ikke dampa ruter. Det ble tatt 5 prøver fra hver rute. 1-4 ble tatt fra vært hjørne, mens prøve 5 ble tatt fra midten (fig. 2.1.2). Fordi ugresset økte i de udampa sonene var det vanskeligere å ikke få med organisk

materiale som planterester i prøvene etter 25.08.2023. Etter innsamling ble prøvene lagt på frys i -23°C frem til de skulle brukes. Ved siste innsamling den 27.09.2023 så ble feltet mulig forstyrret av en hund som løp på feltene. Fordi prøveområdet ikke er tildekket kan dette ha skjedd også mens vi ikke var til stede.

Tabell 2.2.1 viser datoene jordprøvene ble tatt og tiden etter damping.

Tid etter damping	En dag	En uke	To måned	Tre måned
Dato	20.06.2023	28.06.2023	25.08.2023	27.09.2023



Figur 2.1.2. Prøveområdes ruter og fordelingen av damp og udamp felt. Nummeret i rutene viser hvor prøvene ble tatt fra. Pil viser retning av feltene.



Figur 2.2.1. Bildet er tatt juni 2023 og viser «FieldSaver» maskinen. Den viser også rutene hvor maskinen dampet markert med røde pinner og navngitt på trepinner i rutene (SoilSteam, 2024).

2.3. DNA-ekstraksjon

Prøvene ble først tatt opp og tint på benk. De ble deretter homogenisert ved å riste jorden rundt i glasset og 250 mg jord ble tatt av hver prøve. Det var vanskelig å homogenisere jorden fullstendig ved hjelp av risting på grunn av den leirete jorden. Mellom hver prøve ble utstyret sterilisert ved hjelp av flamme deretter nedkjølt til romtemperatur før vi hentet neste prøve. For å utføre DNA-ekstraksjon brukte vi DNeasy PowerSoil kit 250 (Qiagen, 2022). For å måle DNA-konsentrasjonen brukte vi Nanodrop Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher). Alle prøvene ble fortynnet med nukleasefritt vann til mellom 10-20 ng/μL.

2.4. qPCR og DNA meta-strekkode

Vi testa først om det var mulig å detektere *P. fragariae* ved hjelp av DNA analyser av jord direkte, ved hjelp av kvantitativ PCR (qPCR). Grunnen til at vi brukte qPCR er at det er gitt gode resultater med hensyn på ITS-regionen for oomyceter i andre forsøk (Agler et al., 2016; Tojo et al., 2021). Vi brukte metoden beskrevet i (Agler et al., 2016) der gen amplifiseres og qPCR benyttes til å identifisere amplifikasjonen. For master mix ble PowerTrack™ SYBR Green

Master Mix brukt med 40x Yellow Sample Buffer (ThermoFisher). Forholdet var: 0.5µL Yellow Buffer, 1µL sample og 18.5µL SYBR Green Master Mix før prøvene ble tatt videre til annen lab for sekvensering. Primerne brukt var Seq F og Frag R primere som var spesifikk for *P.fragariae*. Amplifisering ble gjort med 40-steg hvor positive treff normalt inntraff ved steg rundt 30 (se vedlegg qPCR). I (Agler et al., 2016) har de endret temperaturen i annealing stege med 5°C og fordi de hadde gode resultater, brukte vi samme metode.

Videre sekvenserte jeg et utvalg prøver (148) ved hjelp av DNA meta-strekkoding metoden beskrevet i Rossmann et al (2021). Prøvene som ble valgt ut til sekvensering inkluderte prøver som var både positive og negative for *Phytophthora fragariae* i qPCR. PCRen til Rossmann et al (2021) amplifiserte ITS1 regionen. Etter amplifisering ble DNA konsentrasjonen målt ved Qubit Flurometer og bekreftet med 2100 Bioanalyser (Rossmann et al., 2021). Sekvenseringen ble gjort på Illumina MiSeq System med MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycles) (Illumina)(Rossmann et al., 2021). I tillegg brukte Rosman et al(2021) fem kontrollprøver hvor 12 arter av Oomyceter og 11 av sopp ble inkludert i begge sekvenseringsrundene. ITS1 (internal transcribed spacer 1) genet ble amplifisert ved hjelp av ITS1-O og ITS4 (Agler et al., 2016) primere der ITS1-O var tagget med korte DNA koder.

DNA konsentrasjonen i PCR produkt ble målt ved hjelp av Qubit high sensitivity assay (Invitrogen) og de tagget PCR produktene ble slått sammen. Biblioteket ble preparert for sekvensering etter protokollen gitt ved Prepare Amplicon Libraries without Fragmentation Using the Ion Plus Fragmentation Library Kit (IonTorrent, 2024). Denne prosedyren inkluderer reparasjon og ligering av adaptore A og P1 på endene av de amplifiserte fragmentene. Fragmenter med A og P1 adaptore i hver sin ende ble sekvensert på IonS5 sekvenseringsmaskin. For å jevne ut antallet sekvenser fra hver prøve ble prøvene «rarefied» og 96 OTUer ble fjernet. Denne prosedyren ble gjort ved hjelp av pakken Phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013) og pakken vegan (Jari Oksanen et al., 2022).

Tabell 2.4.1. Protokoll for amplifisering av oomyceter. For å nå antall volum som trengs for vårt prosjekt ble verdiene ganget med 7 (ThermoScientific, 2018).

Reagenser	Volum
PCR-grade water	9.5 μ L
PCR Master mix, Phusion (2x)	12.5 μ L
Forward Primer (5 μ M)	1.0 μ L
Revers Primer (5 μ M)	1.0 μ L
Template DNA ca. (15ng/ μ L)	1.0 μ L
Totalt volum	25.0μL

Tabell 2.4.2 PCR stegene brukt. Oversikt over thermosyklusen for oomyceter.

Syklus steg	Temp	Tid	Syklus
Initial denaturering	98°C	30 sek	1
- Denaturering	98°C	10 sek	
- Annealing	55°C	10 sek	35
- Extension	72°C	15 sek	
Final Extension	72°C	5 min	1

Før sekvensering ble amplifiserte fragmenter videre preparert og amplifisert i en Ion Chef ved hjelp av Ion 510TM & Ion 520TM & Ion 530TM Kit (ThermoFisher). Mengden bibliotek som ble tilsatt til Ion Chef var ca 50 pM og konsentrasjonen av det ferdige biblioteket ble målt ved hjelp av Ion Library TaqManTM Quantitation Kit (ThermoFisher). Sekvenseringen ble gjort på en Ion 530TM chip (ThermoFisher) i en IonS5 sekvenseringsmaskin (ThermoFisher).

2.5. Statistiske analyser

For å undersøke om behandling (dampingen) førte til endringer i DNA-konsentrasjon i jorda sammenlignet jeg (i samarbeid med Celine Jackson Koop) prøver fra dampa og udampa jord ved de fire ulike innsamlingene ved hjelp av Mann-Whitney U tester i R-Studio (Mann & Whitney, 1947). Endringene i DNA-konsentrasjon i de behandla (dampa) og ubehandla (udampa) prøvene

ble videre plottet i et boxplot for visualisering. En Mann-Whitney U Test ble gjort på dato og DNA-konsentrasjon for å sammenligne dampa og udampa ved hver dato. For qPCR registrerte jeg hvilke prøver som hadde fått en positiv qPCR test og om disse kom fra dampa eller udampa prøver.

Alphadiversitet

Diversiteten av Oomyceter i prøvene fra dampa og udampa jord ble undersøkt ved å regne ut antallet observerte ASVer (Amplicon sequence variants) innen hver prøve. Jeg gjorde en Shannon Index får å se på mengden og likheten i artene som er tilstede i prøvene (Ian F. Spellerberg, 2003). En annen metode som brukes er ACE. ACE er en ikke-parametrisk metode for å se mengde og observerte arter (Anne Chao, 2006). Disse analysene ble gjort ved hjelp av R-pakken Phyloseq. En ikke-parametrisk test ble gjort for med ACE og Shannon som utgangspunkt for analysene. Denne analysen ble brukt for å sammenligne «dato» og «damping» ved Observed og Shannon metodene.

Betadiversitet

For å se forskjeller i sammensetning brukte jeg «rarefied» dataen med samplesize på 10 000 med PCoA test. Det gir innblikk i hvor like sammensetningen vil være etter damping og for hver dato. Fordi ASV-ene for de første datoene var for lave, ble disse fjernet datoene 20.06.2023 og 28.06.2023.

Taksonomiske komposisjons analyser med forskjellen på sammensetning av oomyceter i dampa og ikke dampa prøver. For å få en visuell oversikt over de forskjellige artene ble de visualisert i to boksplo. Det ene boksploet inneholder alle ukjente arter for oomyceter samt mengden av dem. Derfor laget jeg et script som fjernet de ukjente artene. Grunnen til at begge ble inkludert er at begge gir en oversikt over artssammensetningen og mengden ukjente arter i prøvene.

Analysene ble gjennomført i R-Studio ved hjelp å bruke ggplot2 (Hadley, 2016).

Random Forest er en algoritme som kombinerer analysene for damping og mengde for å gi hvilke ASV-er som har størst påvirkning i prøvene. Pakken brukt for Random Forest med algoritme og Phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013). Dataen brukt er data.rare. Dataen blir skilt for training og testing, som betyr at algoritmen tester parameterne mot hverandre. For denne

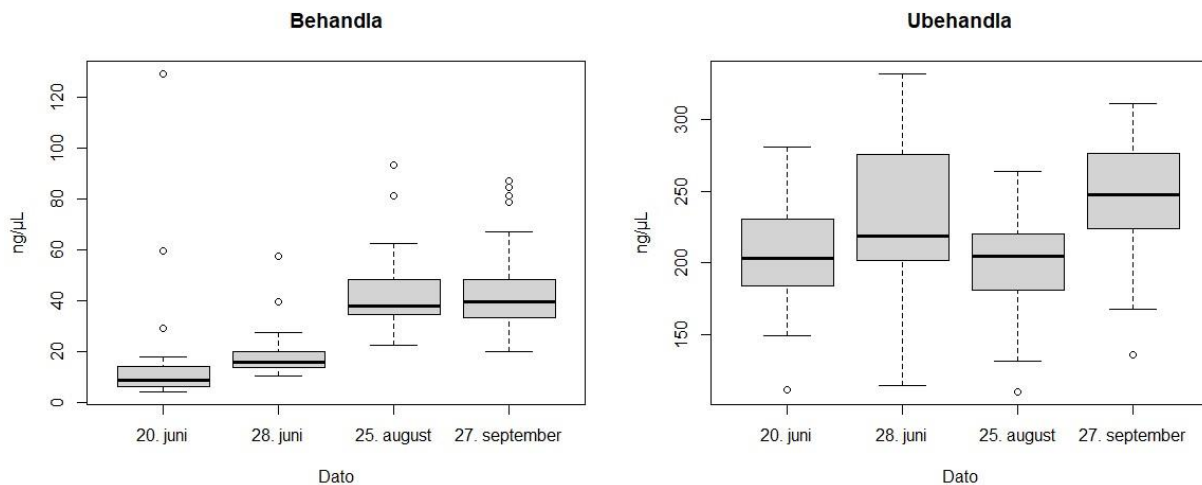
analysen har jeg brukt 80% (0.8) for training og 20% (0.2) for testing. Disse testes mot hverandre og man får viktigheten av de forskjellige ASV-ene.

For å se på de taksonomiske rangeringene brukte jeg en analyse kalt LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size)(Asya, 2024). Dette er en algoritme som samler taksonomiske grupper og sammenligner dem mot to faktorer og kan gi oss endringer i de taksonomiske gruppene i form av biomarkører. I dette tilfelle på dampa eller udampa jord. Analysene er gjort på rarefisert data og ble gjort i R-Studio ved hjelp av pakkene ggplot2 (Hadley, 2016), microbiomarker (Cao Y et al, 2022) og LEfSE (Asya, 2024). Ved hjelp av disse pakkene vil denne algoritmen detektere biomarkører basert på dampingen.

Resultater

3.1 DNA-Konsentrasjon

DNA-konsentrasjonen før og etter damping. Behandla står for dampet og ubehandla for udampet. Det er en klar mindre DNA-konsentrasjon i de dampa prøvene. Det er også en økning i konsentrasjonen over tid etter behandling av jord. I de ubehandla så øker og synker DNA konsentrasjonen over tid (figur 3.1.1).



Figur 3.1.1 viser DNA-konsentrasjon før og etter behandling og mengden DNA som øker over tid. Det er tydelige forskjeller på mengden DNA i behandla kontra ubehandla prøver, også over tid.

Mann Whitney U-test mellom konsentrasjon og datoene gir oss alle p-verdier under 0.05. Dette tyder på en signifikant endring i DNA-konsentrasjon etter damping og at denne holdt seg gjennom hele sesongen.

Tabell 3.1.1 gir oversikt over p-verdi med Mann Whitney U test for forskjell i DNA-konsentrasjon ved hver dato. Alle verdiene er under 0.05 så det er en signifikant forskjell mellom dato og DNA-konsentrasjon.

Dato:	20.06.2023	28.06.2023	25.08.2023	27.09.2023
P-verdi	1.433e-14	1.432e-14	1.433e-14	1.434e-14

3.2 Resultater av qPCR:

Kvantifisering av *Phytophthora fragariae* ved hjelp av qPCR.

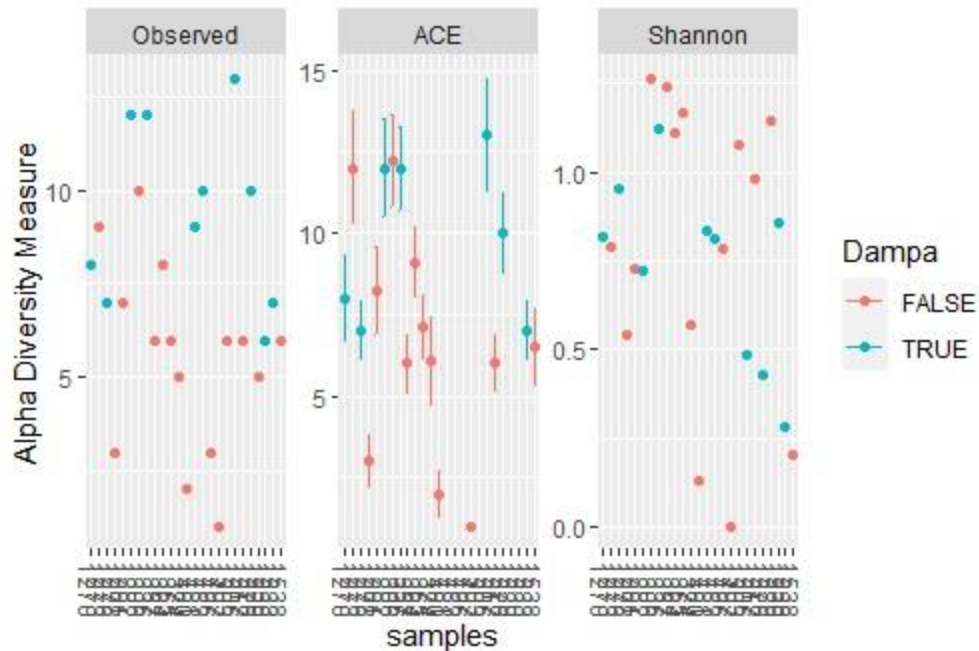
Totalt ble 142 prøver analysert med spesifikke primere Seq F og Frag R for å amplifisere *Phytophthora fragariae* ved hjelp av qPCR. Av de 142 prøvene som ble analysert viste kun 6 prøver antydning til positiv amplifisering. *Phytophthora fragariae* ble kun oppdaget i prøvenumrene: 1228, 1229, 1270, 1497, 1507 og 1530. Av de positive prøvene var det 4 som kom fra dampa og 2 som kom fra udampa jord. Amplifiseringen skjedde mellom syklusene 27-34.

Identifikasjon av *Phytophthora fragariae* ved hjelp av DNA meta-strekkoding.

Totalt oppnådde jeg 1.85 millioner antall sekvenser fra sekvenseringen av Oomyceter. Mange prøver fikk lavere antall enn 10 000 sekvenser og ble derfor ekskludert for videre analyser. Av prøvene som ble sekvensert ble det funnet *Phytophthora fragariae* i kun 3 prøver. I disse prøvene fant vi 31 antall sekvenser i prøvene 1534, 1506 og 1483. Alle 3 prøvene var fra dampa felt. Sekvenseringen gav oss gjennomsnittlig 232 bp og totalt ble det funnet 170 ASV-er, hvor de fleste var ukjente oomyceter. Av oomycetene som ble detektert var de mest vanlige *Globisporangium sylvaticum* og *Globisporangium intermedium*.

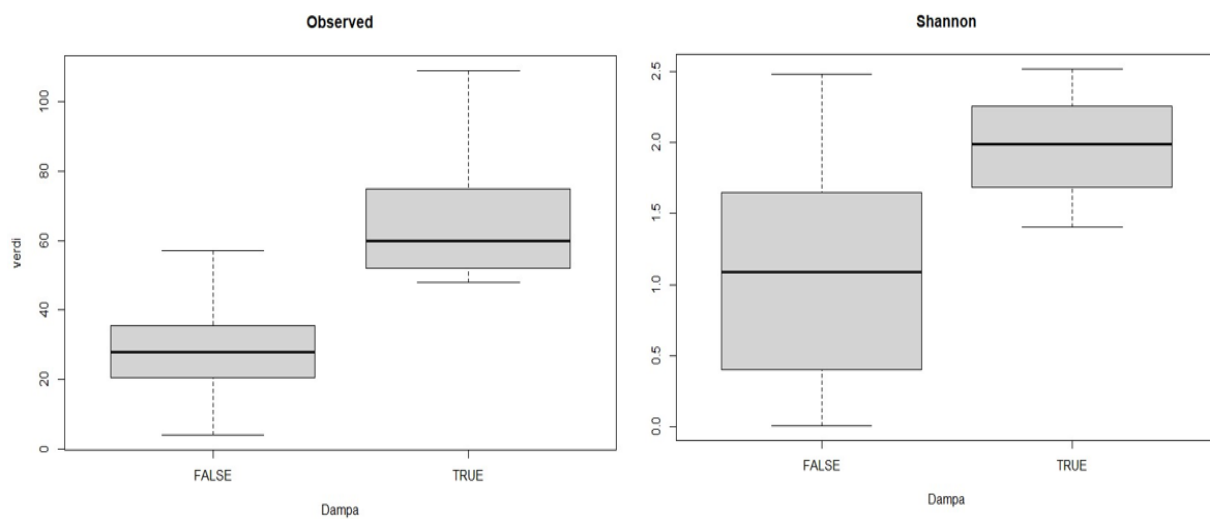
3.3 Effekten av damping på diversiteten av Oomyceter

Alfadiversitetsestimater (Observert, Shannon og ACE) for de individuelle prøvene viser at spesielt for ACE er det høyere diversiteten i de behandla enn de ubehandla prøvene (figur 3.1.2). For Shannon diversitet er forskjellen mellom behandla og ubehandla prøver mindre tydelig. Ser man derimot på medianen til diversitetsmålene presentert i boxplottet i figur 3.1.2, er det en tydelig lavere diversitet i de ubehandla prøvene i både Shannon og ACE.



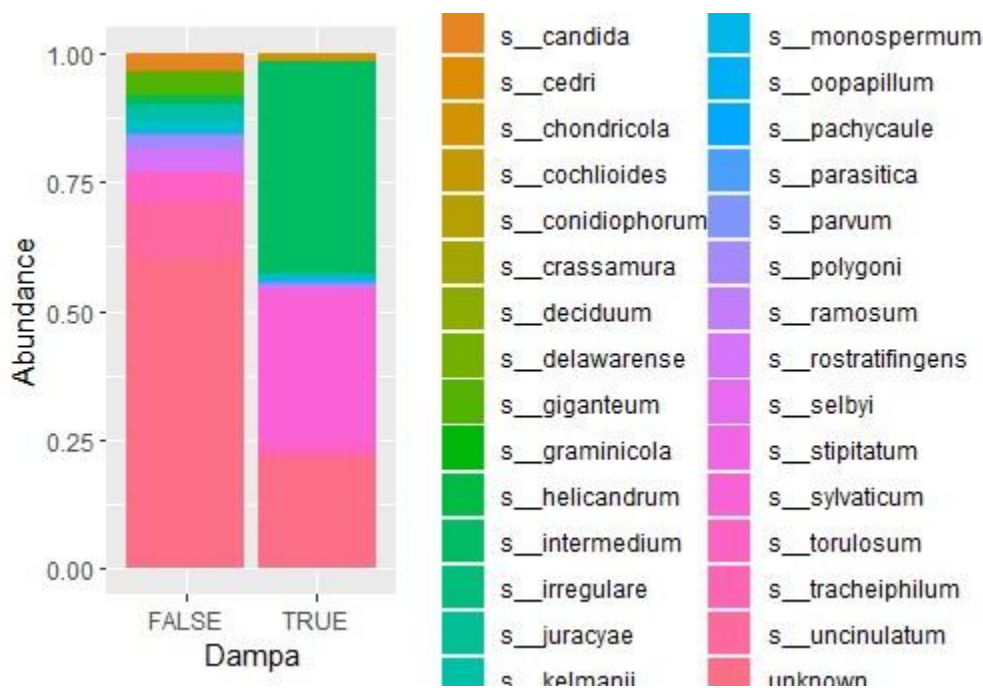
Figur 3.3.1 viser alphasdiversiteten med «Observed, ACE og Shannon som analyser. «TRUE» er symbol for dampka prøver og «FALSE» er udampka. Y-aksen viser mengden diversitet.

En ikke parametrisk Mann Whitney U-test P-verdi for observed = $3.551e-05$ og P-verdi for Shannon = 0.001154 viser at det er signifikant forskjell for både «Observed» og «Shannon» når det kommer til damping. Med utgangspunkt fra figur 3.1.2.

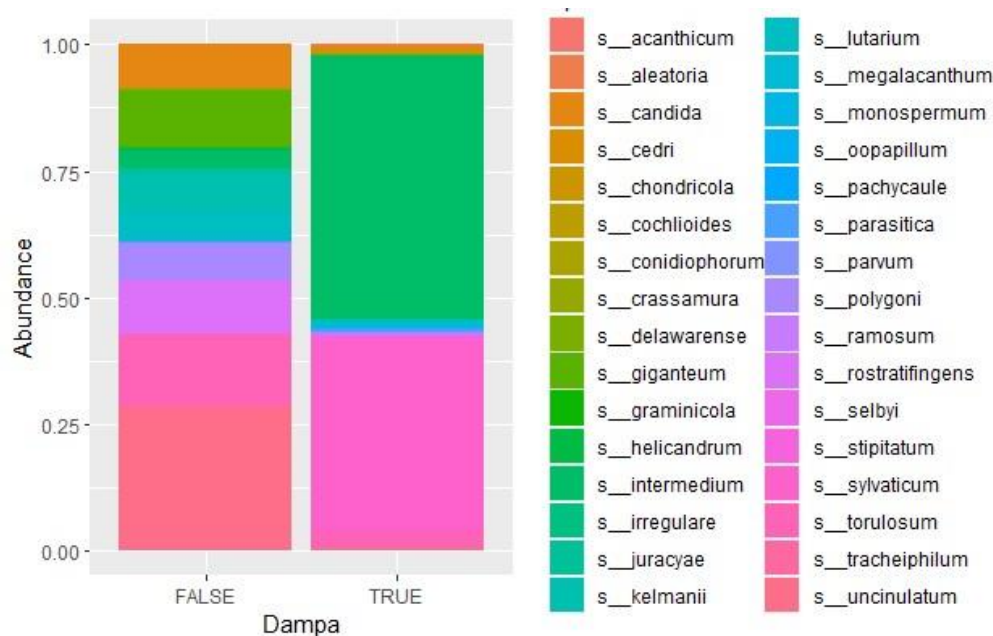


Figur 3.3.2 viser boxplot for “observed” og “Shannon” for damping. Ved en Mann Whitney U Test ser vi at P-verdi for observed = $3.551e-05$ og P-verdi for Shannon = 0.001154 som betyr at begge er signifikant forskjellige.

Etter «rareification» var det 170 ASV-er som gikk til klassen oomyceter. Av disse var det 68 som gikk til art. I prøvene fra dampa jord forsvinner mange av de ukjente artene, og de dominerende artene blir *Globisporangium sylvaticum* og *Globisporangium intermedium*. Disse til sammen står for over 50% av artene etter damping. Ved fjerning av NA (figur 3.3.4) kan en se at 90% av artene etter damping er *Globisporangium sylvaticum*, og *Globisporangium intermedium*.



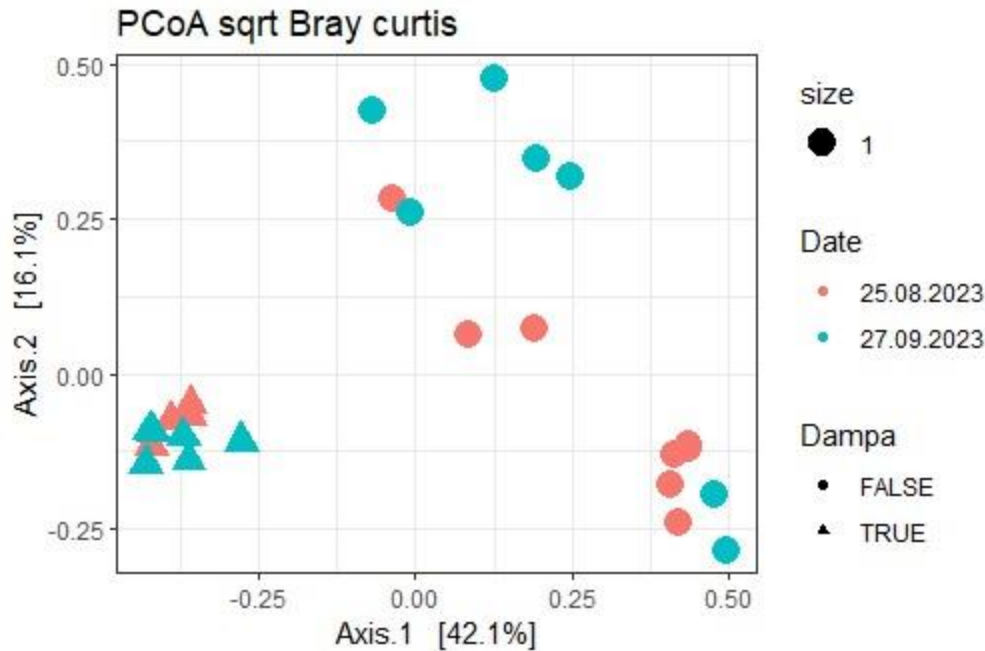
Figur 3.3.3 viser mengden av oomycete-arter. TRUE er dampet og FALSE er udampa jord. Det er tydelig forskjeller i mengden og hvilke arter som befinner seg i jorden før og etter damping. Over 50% av de udampa prøvene er «unknown» eller ukjente arter av oomyceter. Hvor etter damping synker de ukjente til under 25% og *Globisporangium sylvaticum* og *Globisporangium intermedium* blir de mest dominerende artene.



Figur 3.3.4 viser mengden for oomyceter basert på art før og etter damping. TRUE er dampa og FALSE er udampa. I motsetning til figur 3.3.1 så er alle ukjente fjernet, og en ser at det er mer diversitet før damping enn etter. Etter damping er *Globisporangium sylvaticum* og *Globisporangium intermedium* de klart dominerende artene.

3.4 Betadiversitet

Ordinasjonsplottet basert på Bray-Curtis distanse viser en klar forskjell mellom dampet og udampet prøver. Akse 1 og akse 2 forklarer henholdsvis 42,1% og 16,1% av forskjellen i artssammensetningen i prøvene. Prøvene fra dampa jord danner en tett gruppe i ordinasjonsplottet i motsetning til prøvene fra udampa jord der det er større spredning. Dette tyder på at samfunnet av Oomyceter blir mer homogent etter damping. Det er også tydelig at dato ikke påvirker sammensetningen nevneverdig for de dampa prøvene.

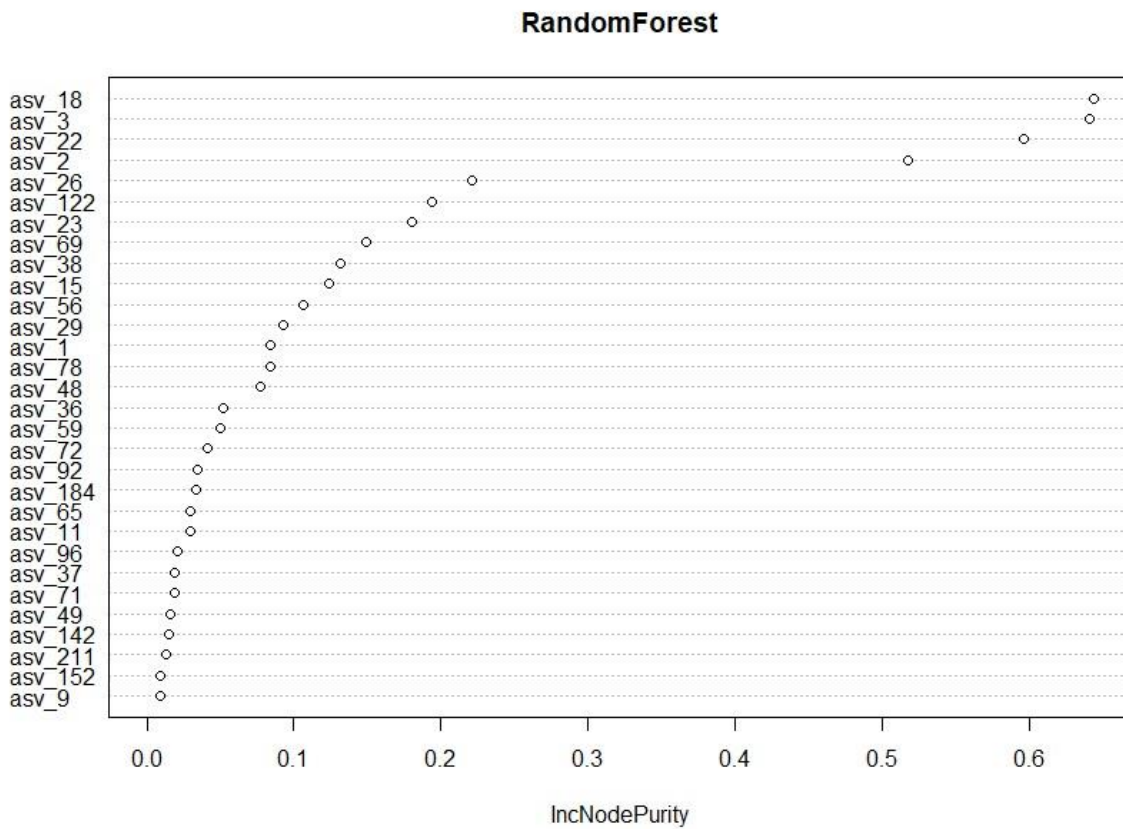


Figur 3.4.1 beskriver oomyceter og forskjellen på dampa (trekant) og udampa (sirkel). Desto lengre fra hverandre punktene er jo mer forskjell er det i mengden på prøvene. 2 akse beskriver forskjell på 16,1% og 1 akse beskriver forskjell på 42,1%.

3.5 Algoritmiske analyser

Random Forest:

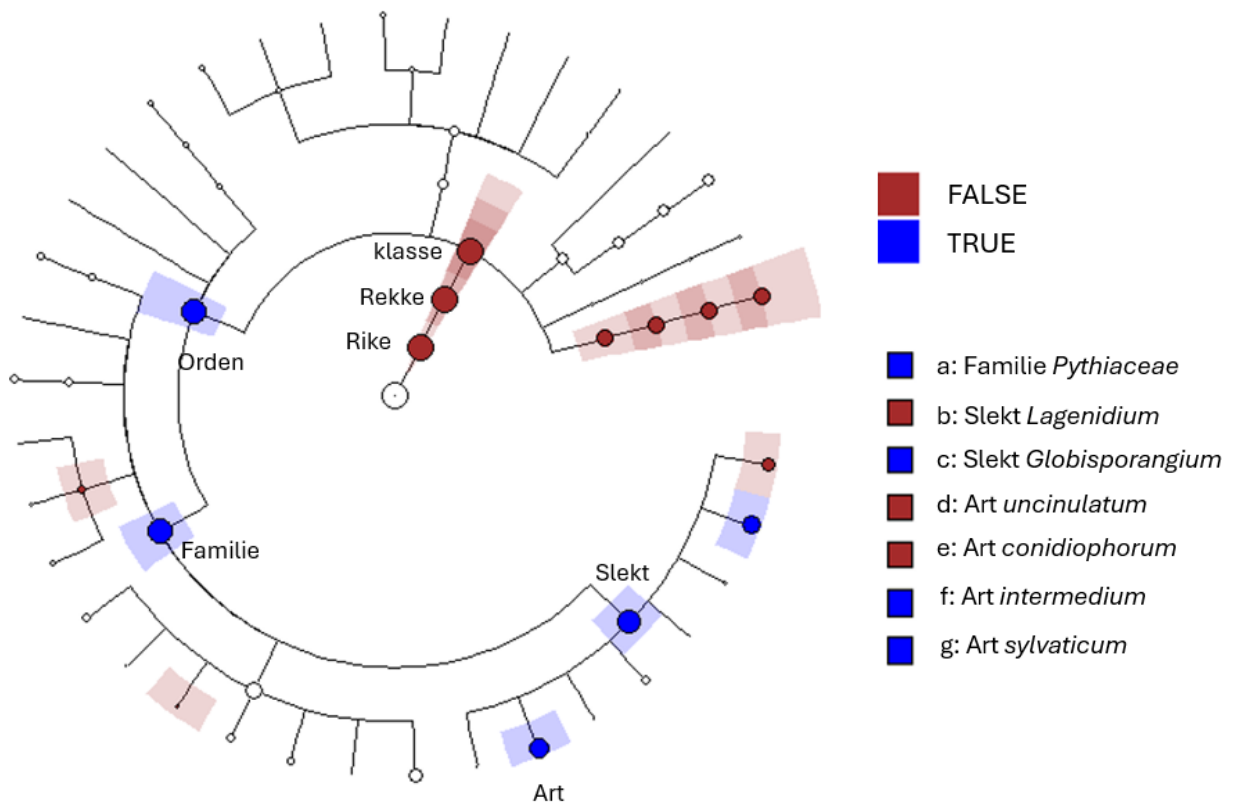
Plottet gitt ved random forest algoritmen viser at det er 4 ASVer som skiller seg tydelig ut og som skiller prøver fra dampa og ikke dampa jord. Disse ASV-ene er ASV 18 og ASV 3 som er bestemt til *Globisporangium sylvaticum*, ASV 22 som går til orden *Phythiales* og ASV 2 som er *Globisporangium intermedium*.



Figur 3.5.1 RandomForest plot som viser de mest påvirkende ASV-ene kjørt gjennom RandomForest algoritmen (Andy Liaw, 2002). ASV-ene som skiller seg ut er 18,3,22 og 2 hvor 18 og 3 er *Globisporangium sylvaticum*, 22 går kun til ordenen *Pythiales* og 2 er *Globisporangium intermedium*. Tallet på x-aksen viser hvor høy innvirkning disse ASV-ene har hatt etter mange random tree sekvenser.

LEfSE:

Analysene viser at artene slekten *Globisporangium* sammen med artene *intermedium* og *sylvaticum*, samt familien *Pythiaceae* blir fremhevet som biomarkører ved damping, det vil si at de dominerer etter damping. I motsetning er slekten *Lagenidium* og artene *uncinulatum* og *conidiophorum* biomarkører i udampa jord (figur 3.5.2).



Figur 3.5.2 Er taksonomisk oversikt over biomarkører gitt ved LEfSE algoritmen (Asya, 2024). TRUE er dampet og FALSE er udampet. En ser at slekten *Globisporangium* har flest biomarkører etter damping, mens slekten *Lagenidium* har flest i udampet prøver.

Diskusjon

4.1 Oppsummering av resultater:

DNA-konsentrasjonen endrer seg for dampa og udampa prøver. Med tiden øker DNA-konsentrasjonen i de dampa prøvene betraktelig, men de når fremdeles ikke naturlig nivåer etter 3 måneder (figur 3.1.1). Det ble funnet *Phytophthora fragariae* i qPCR og i DNA meta-strekkoding og den ble funnet i både dampa og udampa prøver.

Samfunnet av Oomyceter endres etter damping (figur 3.4.1). De dampa samfunnene har mye flere likheter med hverandre enn de udampa samfunnene.

Før damping er en stor andel av artene ukjente, mens etter damping synker andelen ukjente artene og blir erstattet. Mengden arter øker etter damping og en får et mer variert antall arter, dominert av generalister som *Globisporangium sylvaticum* (figur 3.3.3) og (figur 3.3.4). Algoritmiske tester som LEfSE og RandomForest viser at etter damping er det hovedsakelig *Globisporangium sylvaticum*, og *Globisporangium intermedium* som er de dominerende artene.

4.2 Utvikle en testprosedyre for å dokumentere om *Phytophthora fragariae* er til stede i jorda

Dokumentasjonen for *P. fragariae* i dette prosjektet var lav med kun få treff ved hjelp qPCR og DNA meta-strekkoding. Det kan være flere grunner til at mengden *P. fragariae* var så lav. *P. fragariae* smitter på røttene til planten og disse var fjernet fra prøveområde minimum 4 måneder før behandlingen ble utført. I tillegg var jorda harva, noe som kan ha påvirket mengden *P. fragariae*, og også de andre oomycetene. Andre prosjekter har brukt metode som «baiting» for å lokke arten med vertsplanter (Rossmann et al., 2021) noe som sannsynligvis ville økt mengden positive prøver. I en DNA basert test for tilstedeværelse og kvantifisering av mengde *P. fragariae* ville man kanskje unngå å bruke baiting siden dette kanskje vil gi unaturlige høye verdier av *P. fragariae*.

Av qPCR og DNA meta-strekkoding som ble gjort ble det kun funnet *Phytophthora fragariae* i 7 prøver for qPCR og 3 prøver i DNA meta-strekkoding. Disse var i både behandla dampa og udampa prøver som gir inntrykk av at damping som metode ikke har ideell effekt for fjerning av arten. En av grunnene til dette kan være at arten har tykt skall i hvilesporene som gjør at den tåler

høye temperaturer (C.J.Hickman, 2024). Basert på funnene i jordprøvene og tidligere forskning ved bruk av primere for ITS regionen av *Phytophthora fragariae* burde det være mulig å lage en prosedyre for å overvåke arten ved hjelp av DNA. Arten dukket opp med spesifikk primer i qPCR, men det kan hende at andre omstendigheter gjorde at mengden var for lav til å få resultater som kan brukes til å si noe om mengden av DNA. Forskning som (Bonants et al., 1997) og (Agler et al., 2016) viser at det burde være mulig å skape en testprosedyre.

4.3 Effekten av damping på *Phytophthora fragariae* og andre oomyceter:

Selv om det er mulig å lage en testprosedyre så vil damping som behandling ikke nødvendigvis gi ønsket resultat av å kvitte seg med den patogene arten. Damping endret artssammensetning av oomyceter og det var stor forskjell mellom dampa og ikke dampa prøver. I figur 3.3.3 og figur 3.3.4 kan en se at *Globisporangium sylvaticum* og *Globisporangium intermedium* er de artene som viser den største forskjellen mellom dampa og ikke dampa prøver. Dette ble også støttet av RandomForest analysen som pekte på disse to artene som de som klart best skilte dampa og ikke dampa jord. Det er viktig å påpeke at selv om antall sekvenser er lik mellom dampa og udampa prøver så vil konsentrasjonen av DNA være mindre etter damping (figur 3.1.1) og (tabell 3.1.1). Det vil si at selv om (figur 3.3.3) og (figur 3.3.4) viser lik relativ abundance for dampa og udampa så vil konsentrasjonen i de dampa være lavere enn de udampa. Damping som behandling kan bidra til at arter som *G.sylvaticum* vil få mindre konkurranse og vil kunne dominere. *G.sylvaticum* er en patogen art. Den kan forårsake rotråte og andre sykdommer alt etter verten (Zhang et al., 2023). Arten angriper kjente grønnsakplanter som gulrot (*Daucus carota*), epletre (*Malus pumila*) og agurk (*Cucumis sativus*) (Pettitt, 2015). *G.intermedium* arten har også vært linket til rotråte for kiwifrukt (*Actinidia deliciosa*) (Türkkan et al, 2022), men spiller også en viktig del i karbonsyklusen i tempererte skoger (Li et al., 2021). Begge artene produserer oosporer som har tykk vegg (Uzuhashi et al., 2010). Fordi *Phytophthora fragariae* også produserer tykk vegg hos sine oosporer kan det virke som at dette hindrer dampingen fra å ødelegge celleveggene.

Med Bray-Curtis PCoA (figur 3.4.1) testen kan en se at samfunnsmessig så er det mye mindre variasjon i de dampa kontra de udampa. Denne endringen av samfunnet kan gi plass til andre arter som en heller ikke vil ha. Andre dampforsøk gjort på sopp og bakterier viser også tendenser

til endring i artssammensetning (Feurhuber et al., 2019). Dette er analyser som er gjort kun tre måneder etter og det vil derfor være viktig å følge med på de langvarige effektene av dampingen. Ved bruk av LEfSE algoritmen (figur 3.5.2) kan en se biomarkører både før og etter damping. Artene som er biomarkører i udampa jord er *Pythium uncinulatum* og *Pythium conidiophroum* hvor begge artene er patogene. *Pythium uncinulatum* er knyttet til sykdom i salat (*Lactuca sativa*) og *Pythium conidiophroum* er knyttet til sykdom på bønner (*Phaseolus vulgaris*) (Blok & van der Plaats-Niterink, 1978; Li et al., 2014). Disse ser i motsetning til *G.sylvaticum* og *G.intermedium* å forvinne etter damping noe som viser at det er variasjon i hvor godt Oomyceter tåler damping.

Det at *G.sylvaticum* og *G.intermedium* begge registrerer som biomarkører etter damping styrker påstanden om at de får mindre konkurranse, mer ideelle forhold og kan lettere holde seg over en tidsperiode på 3 måneder. Alle faktorene over er vurderinger en kanskje burde ta før en velger å bruke damping som metode. Mange patogene arter blir svekket som *P.conidiophroum* mens andre styrkes som *G.sylvaticum*. Det vil være viktig i årene fremover å utvikle alternative metoder for å bli kvitt disse patogene oomyceterne.

Konklusjon

Damping som metode endre sammensetningen av oomyceter i jorden. Selv om dampingen er effektiv vil enkelte generalister, og muligens arter som lager tykk og bestandig cellevegg bli mer vanlige. Dette kan muligens ha uheldig effekt med tanke på dyrking av ulike matrelaterte arter.

Jeg kan ikke konkludere om nytten av en DNA metode for detektering av *Phytophthora fragariae* spesifikt siden det var for få positive prøver. Det ser likevel ut som vi kunne detektere relativt små konsentrasjoner av *Phytophthora fragariae* både ved hjelp av qPCR og DNA meta-strekkoding. Det vil derfor være viktig å gå videre med disse metodene og undersøke jord der infeksjonstrykket er litt høyere.

Bibliografi

- A. Bergjord, A. E., Arne Hermansen, Helge Sjørnsen, Bonsak Hammeraas, Christer Magnusson, Leif Sundheim (1999). Damping av jord mot sopp, ugrass og nematoder. <http://hdl.handle.net/11250/2580797>
- Aarnes, H. (2020). Oomyceter. In *Botanisk- og plantefysiologisk leksikon*. UIO.no: Universitet i Oslo.
- Agler, M. T., Ruhe, J., Kroll, S., Morhenn, C., Kim, S.-T., Weigel, D., & Kemen, E. M. (2016). Microbial Hub Taxa Link Host and Abiotic Factors to Plant Microbiome Variation. *PLOS Biology*, 14(1), e1002352. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002352>
- Almasri, F. (2018). *Allyl Isothiocyanate (AITC) for Soil Disinfestation in California Strawberries*. University of California, Davis.
- Andy Liaw, W. M. (2002). Classification and Regression by randomForest. <https://CRAN.R-project.org/doc/Rnews>
- Anne Chao, P. C. L., S. Agatha, W. Foissner. (2006). A statistical approach to estimate soil ciliate diversity and distribution based on data from five continents. <https://doi.org/10.1111/j.2006.0030-1299.14814.x>
- Arne Bardalen, L. A. L., Hege Ulfeng. (2021). *Jordvernets begrunnelser* (Nabio rapport 72). Nibio. <https://nibio.brage.unit.no/nibio-xmlui/handle/11250/2738064>
- Artsdatabank. (2021). *Arealbruk, Dyrka mark*. World bank. Retrieved 09.04.2024 from <https://fn.no/Statistikk/dyrka-jordomraade>
- Asya, K. (2024). R implementation of the LEfSE method for microbiome biomarker discovery. <https://doi.org/10.18129/B9.bioc.lefser>
- Baggio, J. S., Marin, M. V., & Peres, N. A. (2021). Phytophthora Crown Rot of Florida Strawberry: Inoculum Sources and Thermoherapy of Transplants for Disease Management. *Plant Disease*, 105(11), 3496-3502. <https://doi.org/10.1094/pdis-11-20-2476-re>
- Bardalen, A. (2018). Klimarisiko og norsk matproduksjon. In *Klimarisiko og norsk matproduksjon*: NIBIO.
- Blok, I., & van der Plaats-Niterink, A. J. (1978). Pythium uncinulatum sp. nov. and P. tracheiphilum pathogenic to lettuce. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 84(4), 135-147. <https://doi.org/10.1007/BF01976302>
- Bonants, P., Weerd, M. H.-d., van Gent-Pelzer, M., Lacourt, I., Cooke, D., & Duncan, J. (1997). Detection and identification of Phytophthora fragariae Hickman by the polymerase chain reaction. *European Journal of Plant Pathology*, 103(4), 345-355. <https://doi.org/10.1023/A:1008640227432>
- C.J.Hickman, E. (2024). *Phytophthora fragariae*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1982.tb01963.x>
- Cao Y et al, D. Q., Wang D, Zhang P, Liu Y, Niu C (2022). microbiomeMarker: an R/Bioconductor package for microbiome marker identification and visualization. <https://doi.org/doi:10.1093/bioinformatics/btac438>
- Dasgupta, S., & Robinson, E. J. Z. (2022). Attributing changes in food insecurity to a changing climate. *Scientific Reports*, 12(1), 4709. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08696-x>
- Dybdal, W. T. (2017). Dødelig skogssykdom sprer seg langs norske elver. 8. <https://www.nibio.no/nyheter/ddelig-skogssykdom-sprer-seg-langs-norske-elver>
- Feurhuber, M., Burian, P., Magno, M., Miranda, M., & Hochenauer, C. (2019). Development of a spatially and timely resolved CFD model of a steam sterilizer to predict the load temperature and the theoretical inactivation of bacteria based on sterilization parameters. *Physics in medicine*, 8, 100020. <https://doi.org/10.1016/j.phmed.2019.100020>
- FieldSaver. In.

- Hadley, W. (2016). *Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.
<https://ggplot2.tidyverse.org>
- Henriksen, B. (2024). *Plantesjukdommer*. Nibio. Retrieved 26.02 from
<https://www.nibio.no/tema/plantehelse/plantesjukdommer>
- Ian F. Spellerberg, P. J. F. (2003). A tribute to Claude Shannon (1916–2001) and a plea for more rigorous use of species richness, species diversity and the ‘Shannon–Wiener’ Index.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1466-822X.2003.00015.x>
- IonTorrent. (2024). Prepare Amplicon Libraries without Fragmentation Using the Ion Plus Fragment Library Kit [Guide]. (MAN0006846). https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0006846_PrepAmpliconLibr_using_IonPlusFragLibraryKit_UB.pdf
- Jari Oksanen, G. L. S., F. Guillaume Blanchet, Roeland Kindt, Pierre Legendre,, Peter R. Minchin, R. B. O. H., Peter Solymos, M. Henry H. Stevens, Eduard Szoecs,, Helene Wagner, M. B., Michael Bedward, Ben Bolker, Daniel Borcard, Gustavo, Carvalho, M. C., Miquel De Caceres, Sebastien Durand, Heloisa Beatriz, Antoniazi Evangelista, R. F., Michael Friendly, Brendan Furneaux, Geoffrey, Hannigan, M. O. H., Leo Lahti, Dan McGlinn, Marie-Helene Ouellette, Eduardo Ribeiro, & Cunha, T. S., Adrian Stier, Cajo J.F. Ter Braak and James Weedon. (2022). *Vegan. Community Ecology Package. R package version 2.6-4*. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Kari Romstad et al, A.-C. S., Helén Ihlebek Hauger. (2012). *Samfunnsøkonomisk analyse av forvaltningstiltak mot rød marg i jordbær*. https://mattilsynet-xp7prod.enonic.cloud/_/attachment/inline/6f3cf90d-9a37-4013-a45f-f534ed638ea0:3a62d75b46f90f4b33d207691642e611adc53c04/Samfunns%C3%B8konomisk%20analyse%20av%20forvaltningstiltak%20mot%20r%C3%B8d%20marg%20i%20jordb%C3%A6r.pdf
- klimapanel, F. (2023). Europe’s contrasting summer. <https://climate.copernicus.eu/esotc/2023/europes-contrasting-summer>
- Li, M., Hieno, A., Motohashi, K., Suga, H., & Kageyama, K. (2021). *Pythium intermedium*, a species complex consisting of three phylogenetic species found in cool-temperate forest ecosystems. *Fungal Biology*, 125(12), 1017-1025.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.funbio.2021.07.004>
- Li, Y. P., You, M. P., & Barbetti, M. J. (2014). Species of *Pythium* Associated with Seedling Root and Hypocotyl Disease on Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) in Western Australia. *Plant Disease*, 98(9), 1241-1247. <https://doi.org/10.1094/pdis-12-13-1231-re>
- Mann, H. B., & Whitney, D. R. (1947). On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *The Annals of Mathematical Statistics*, 18(1), 50-60.
<http://www.jstor.org/stable/2236101>
- Martin Pettersson, M. B. B. o. V. T. (2020). *Phytophthora*. Nibio.
https://www.nibio.no/nyheter/alarmerende-mange-funn-av-phytophthora-i-importerte-planter/_/attachment/inline/80da706f-2b6b-460d-b55e-e6ac18d378d9:f6b9fc53780b95d5d6fe2293f478b8f9efa97e13/Phytophthora%20spp.pdf
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE*, 8(4), e61217.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Miljodirektoratet. (2024). *Klimatilpasning i landbruk og reindrift*.
<https://www.miljodirektoratet.no/ansvarsomrader/klimate-for-myndigheter/klimateilpasning/klimateilpasning-i-sektorer/landbruk/>

- Newton, A., Duncan, J., Augustin, N. H., Guy, D., & Cooke, D. (2010). Survival, distribution and genetic variability of inoculum of the strawberry red core pathogen, *Phytophthora fragariae* var. *fragariae*, in soil. *Plant pathology*, 59(3), 472-479.
- Nibio. (2024). Kart. In. https://kilden.nibio.no/?topic=jordsmonn&zoom=11&x=6632429.56&y=582242.61&bgLayer=farger&epsg=25832&layers=jordkvalitet&layers_opacity=0.75&layers_visibility=true.
- Olsen, A. K. B., Engødegård, A., Hermansen, A., Sjørnsen, H., Hammeraas, B., Magnusson, C., & Sundheim, L. (1999). Damping av jord mot sopp ugras og nematoder. En litteraturoversikt. In: *Planteforsk*.
- Pettersson M et al, A. M., Børja I, Nordén B, Nordén J, Perminow JIS og Talgø V. (2023). *Eggsporesopper: Vurdering av rød marg Phytophthora fragariae for Fastlands-Norge med havområder*. <https://artsdatabanken.no/lister/fremmedartslista/2023/471>
- Pettitt, T. (2015). A desk study to review global knowledge on best practice for oomycete root-rot detection and control. *Agriculture and Horticulture Development Board 2015*. https://projectbluearchive.blob.core.windows.net/media/Default/Research%20Papers/Horticulture/CP%20126_Report_Final_2015.pdf
- Qiagen. (2022). *QIAGEN DNeasy PowerMax Soil Kit v1*. <https://doi.org/10.17504/protocols.io.6qpvr4ke3gmk/v1>
- Rossmann, S., Lysøe, E., Skogen, M., Talgø, V., & Brurberg, M. B. (2021). DNA Metabarcoding Reveals Broad Presence of Plant Pathogenic Oomycetes in Soil From Internationally Traded Plants [Original Research]. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.637068>
- S. Uzuhashi, S. N., H.M.A. Abdelzaher, M. Tojo. (2019). Phylogeny and morphology of new species of *Globisporangium*. <https://doi.org/10.3114/fuse.2019.03.02>
- Schreiner, O., & Lathrop, E. C. (1912). The chemistry of steam heated soils. *Journal of the American Chemical Society*, 34(9), 1242-1259.
- SoilSteam. (2024). SoilSteam. Retrieved 04.11.2024 from <https://soilsteam.no/>
- Stav, H. (2022). *Stagnosol*. Nibio. Retrieved 07.04.2024 from <https://www.nibio.no/tema/jord/jordkartlegging/jordsmonnkart/jordsmonnklassifikasjon/stagnosol>
- ThermoScientific. (2018). Thermo Scientific Phusion High-Fidelity PCR Master Mix [Protocol]. *Pub. No. MAN0012771*. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012771_Phusion_HiFi_PCR_MasterMix_100rxn_UG.pdf
- Thines, M. (2018). Oomycetes. *Current Biology*, 28(15), R812-R813. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.062>
- Tojo et al, M. F., Natsumi; Yagi, Hironori; Yamashita, Yuki; Tokura, Katsuyuki; Kida, Kenichi; Hakoda, Akiho; Herrero, Maria-Luz; Hoshino, Tamotsu; Uchida, Masaki. (2021). Identification and Isolation Pattern of *Globisporangium* spp. from a *Sanionia* Moss Colony in Ny-Ålesund, Spitsbergen Is., Norway from 2006 to 2018. *MDPI*. https://nibio.brage.unit.no/nibio-xmlui/bitstream/handle/11250/2827790/2021_10.3390.microorganisms9091912_oa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Türkkan et al, G. Ö., Gürsel Karaca, Ismail, Espair, Sibel Dervis. (2022). Characterization and Pathogenicity of *Pythium*-like Species Associated with Root and Collar Rot of Kiwifruit in Turkey <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-21-0961-RE>
- Uzuhashi, S., Tojo, M., & Kakishima, M. (2010). Phylogeny of the genus *Pythium* and description of new genera. *Mycoscience*, 51(5), 337-365. <https://doi.org/10.1007/S10267-010-0046-7>
- Volk, E., Jennings, K., Fennimore, S. F., & Hoffmann, M. (2023). Preplant Application of Allyl Isothiocyanate Controls Weeds and Pathogens in Eastern North Carolina Strawberry (*Fragaria xananassa* cv. Camarosa) with and without Addition of Soil-applied Steam. *HortScience*, 58(10), 1242-1249. <https://doi.org/10.21273/hortsci17321-23>

Zhang, J., Sun, X., Ao, N., Zou, H., Shao, H., Kageyama, K., & Feng, W. (2023). Host Range and Loop-Mediated Isothermal Amplification Detection of *Globisporangium sylvaticum* from Guizhou, China. *J Fungi (Basel)*, 9(7), 752. <https://doi.org/10.3390/jof9070752>