

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Tamara Vujović

Razvoj PCR-testa za detekciju patogena *Saprolegnia parasitica*, uzročnika saprolegnioze

Zagreb, 2019.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Ane Bielen i neposrednim vodstvom Dore Pavić, mag. oecol. i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2018./2019.

## SADRŽAJ RADA

1. UVOD .....	1
1.1. Patogeni mikroorganizam <i>Saprolegnia parasitica</i> – uzročnik saprolegnioze.....	2
1.1.1. Taksonomski položaj vrste <i>S. parasitica</i> .....	2
1.1.2. Životni ciklus .....	3
1.1.3. Vrsta <i>S. parasitica</i> kao uzročnik saprolegnioze.....	5
1.2. Identifikacija vrsta unutar roda <i>Saprolegnia</i> .....	7
1.3. Lančana reakcija polimerazom (eng. <i>polymerase chain reaction</i> – PCR) i njezina primjena u dijagnostici i praćenju patogena .....	10
1.3.1. Princip umnažanja fragmenata molekule DNA lančanom reakcijom polimerazom .....	11
1.3.2. Primjena lančane reakcije polimerazom u praćenju patogena u akvakulturi.....	13
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA .....	15
3. MATERIJALI I METODE .....	16
3.1. Izolacija i uzgoj izolata oomiceta iz pastrvskog ribnjaka Ritterman.....	16
3.2. Izolacija genomske DNA.....	17
3.3. Oligonukleotidi.....	18
3.4. Lančana reakcija polimerazom (eng. <i>polymerase chain reaction</i> – PCR) .....	19
3.5. Elektroforeza u agaroznom gelu.....	22
3.6. Određivanje i računalna obrada sljedova nukleotida.....	23
4. REZULTATI.....	25
4.1. Izolacija i taksonomska identifikacija oomiceta iz roda <i>Saprolegnia</i> u pastrvskom ribnjaku Ritterman, Solin .....	25
4.2. Kreiranje parova oligonukleotida .....	28
4.3. Utvrđivanje optimalne temperature komplementarnog sparivanja za kreirane parove oligonukleotida .....	31
4.4. Određivanje donje granice osjetljivosti kreiranih parova oligonukleotida.....	32
4.5. Određivanje specifičnosti parova oligonukleotida .....	33

5. RASPRAVA.....	36
6. ZAKLJUČCI.....	41
7. ZAHVALE.....	42
8. POPIS LITERATURE .....	43
9. SAŽETAK.....	53
10. SUMMARY .....	54
DODACI .....	55

## 1. UVOD

Patogeni mikroorganizam *Saprolegnia parasitica* uzrokuje bolest saprolegniozu kod salmonidnih riba, uzrokujući primarne infekcije na odraslim ribama kao i na njihovim jajašcima te ličinkama (Shin i sur., 2017). Domaćini su mu neke vrste važne u slatkovodnoj akvakulturi (poput pastrve, soma i lososa), ali i niz vrsta divljih riba (primjerice, grgeč i jesetra). S ekonomskog stajališta, vrsta *S. parasitica* jedan je od najvažnijih patogena u salmonidnoj akvakulturi, jer na godišnjoj razini uzrokuje milijunske gubitke. Problemi vezani uz saprolegniozu rastu iz godine u godinu zbog nedostatnih mjera kontrole bolesti, ali i loših uvjeta uzgoja (Lone i Manohar, 2018). Naime, u prošlosti se saprolegnioza kontrolirala upotrebom malahitnog zelenila. Međutim, ono je 2002. godine zabranjeno zbog dokazanih kancerogenih i toksičnih učinaka, rezultirajući porastom incidencije infekcija (Torto-Alalibo i sur., 2005). Osim toga, uvjeti uzgoja u ribnjacima nerijetko nisu prikladni i uključuju uzgoj velikog broja riba u malom području, uzgoj na relativno visokim temperaturama te lošu kvalitetu vode (Lone i Manohar, 2018). Vrsta *S. parasitica* je oportunistički patogen te su infekcije češće u takvim lošim uvjetima uzgoja, koji dovode do povećanog stresa kod riba te time idealnog okruženja za razvoj bolesti (Shin i sur., 2017).

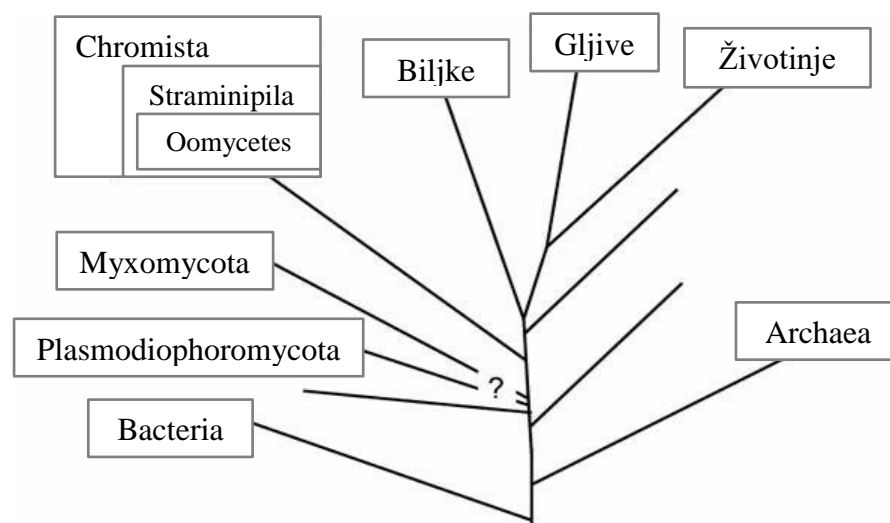
Zbog svega navedenog potrebno je pratiti pojavnost ovog patogena u akvakulturnim postrojenjima. Međutim, brza i pouzdana determinacija ove vrste otežana je zbog dugotrajnog i kompliciranog uzgoja patogena u čistoj kulturi. Osim toga, vrsta *Saprolegnia parasitica* je morfološki i mikroskopski vrlo slična vrstama *Saprolegnia australis*, *Saprolegnia diclina*, *Saprolegnia ferax* i *Saprolegnia furcata* (Markovskaja, 2006; Songe, 2015). Stoga se nakon uzgoja vrsta ne može pouzdano identificirati na temelju morfoloških karakteristika, već je potrebno izolirati DNA (eng. *deoxyribonucleic acid*) željenog mikroorganizma, provesti PCR-reakciju, određivanje redoslijeda nukleotida i naknadnu filogenetsku analizu.

Stoga je potrebno razviti brzu molekularnu metodu detekcije vrste *S. parasitica*, temeljenu na metodi lančane reakcije polimerazom uz korištenje specifičnih oligonukleotida. Nakon izolacije DNA, bilo iz taksonomski nepoznatog mikrobnog izolata, bilo iz uzorka bolesnog tkiva ribe ili primjerice iz uzorka vode u ribnjaku, jednostavnim i brzim PCR-testom moglo bi se utvrditi da li je u uzorku prisutna DNA vrste *S. parasitica*.

## 1.1. Patogeni mikroorganizam *Saprolegnia parasitica* – uzročnik saprolegnioze

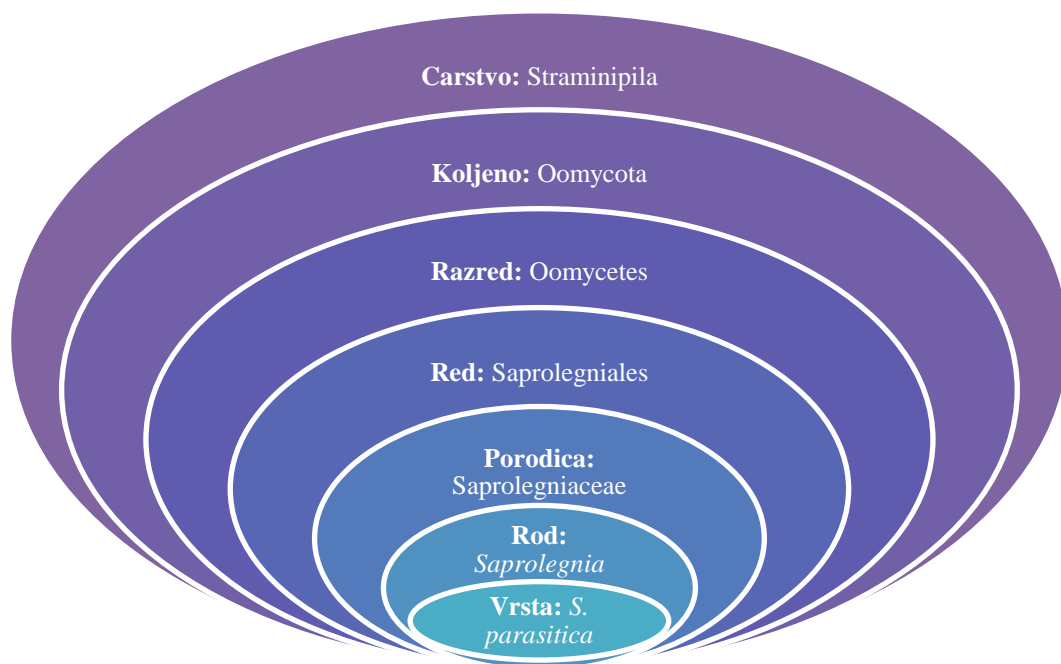
### 1.1.1. Taksonomski položaj vrste *S. parasitica*

Vrsta *Saprolegnia parasitica* spada u skupinu oomiceta (razred Oomycetes). Oomicete su eukariotski mikroorganizmi koji su u prošlosti bili svrstani u carstvo gljiva zbog nekih zajedničkih obilježja, poput hranjenja apsorcijom i tvorbe micelija. Međutim, prema modernoj revidiranoj klasifikaciji oni pripadaju carstvu Chromista (Slika 1.) te su srodnije algama nego gljivama. Razlika između ova dva carstva očituje se i u građi stanične stijenke koja je kod oomiceta izgrađena pretežito od beta-glukana i celuloze, dok je kod pravih gljiva osnovna građivna komponenta stanične stijenke hitin. Vegetativni micelij oomiceta je diploidan, dok gljive u većini slučajeva imaju haploidni talus. Nadalje, kriste u mitohondrijima oomiceta su tubularnog oblika, a kod gljiva pločastog. Osim navedenoga, za oomicete je još karakteristično da, za razliku od gljiva, imaju neseptirane hife (Fawke i sur., 2015).



**Slika 1.** Filogenetsko stablo na kojem je prikazan odnos između organizama iz razreda Oomycetes i carstva gljiva (Fungi) (preuzeto iz Heffer Link i sur., 2002).

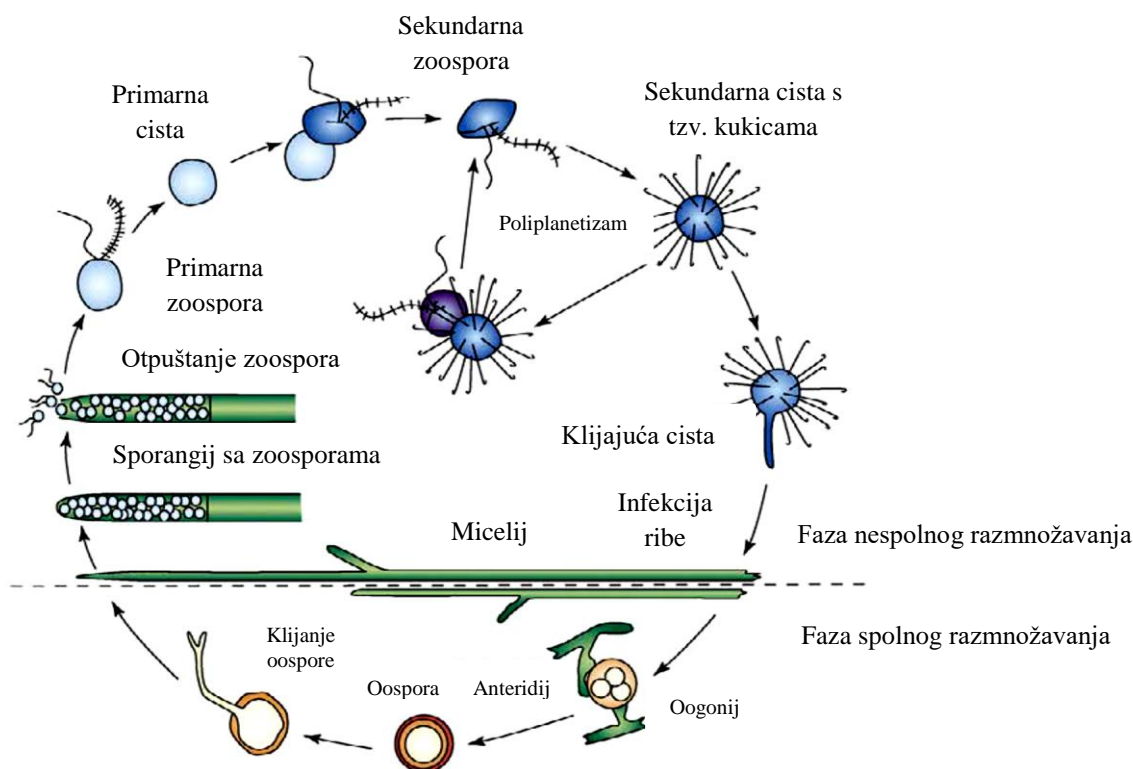
Mikroorganizmi iz razreda Oomycetes dijele se u šest redova: Peronosporales, Pythiales, Saprolegniales, Sclerosporales, Salilagenidiales i Leptomitales (Fry i Grünwald, 2010). Oomicete koje su patogeni riba i drugih životinja pripadaju redu Saprolegniales (podrazred Saprolegniomycetidae) unutar kojeg se nalaze tri glavna roda: *Saprolegnia*, *Achlya* i *Aphanomyces*. Najpoznatije vrste unutar roda *Saprolegnia* su: *S. diclina*, *S. ferax*, *S. australis* i *S. parasitica* (Sandoval-Sierra i sur., 2013; Earle i Hintz, 2014). Na Slici 2. prikazana je klasifikacija vrste *Saprolegnia parasitica* prema taksonomskim kategorijama.



**Slika 2.** Klasifikacija vrste *Saprolegnia parasitica* prema taksonomskim kategorijama (Songe, 2015).

### 1.1.2. Životni ciklus

Vrsta *Saprolegnia parasitica* je homotalična, što znači da ista jedinka posjeduje i muške i ženske spolne organe. Njezin životni ciklus prikazan je na Slici 3., a uključuje nesporno razmnožavanje tvorbom sporangija i slobodno pokretnih zoospora te spolno razmnožavanje u koje su uključene oospore, morfološki različite od zoospora (Songe, 2015).



**Slika 3.** Životni ciklus vrste *Saprolegnia parasitica* (preuzeto iz Lone i Manohar, 2018).

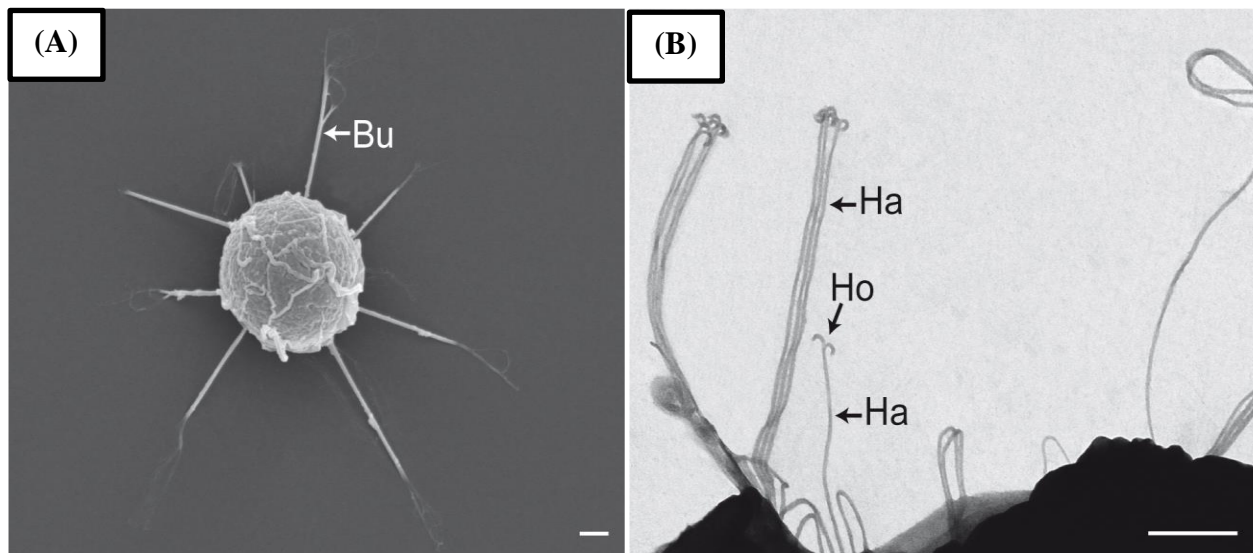
U fazi spolnog razmnožavanja, dolazi do tvorbe muškog (anteridij) i ženskog (oogonij) gametangija koji su haploidni. Oni se spajaju i dolazi do oplodnje. Rezultat oplodnje je tvorba zigote koja se naziva oospora. Nastala oospora okružena je debljom stijenkom koja ju štiti od štetnih vanjskih utjecaja poput suše ili ekstremnih temperatura.

Dio životnog ciklusa vrste *S. parasitica* koji uključuje nespolno razmnožavanje smatra se odgovornim za razvoj bolesti saprolegnioze. Sporulacija je potaknuta nedostatkom hranjivih tvari ili naglim padom temperature u okolini pri čemu na završecima hifa dolazi do tvorbe nespolnih sporangija sa zoosporama i potom otpuštanja zoospora u okolinu. Primarne zoospore pokreću se pomoću dva biča, međutim one su aktivne samo nekoliko minuta nakon čega se pretvore u primarnu cistu. Klijanjem primarne ciste dolazi do tvorbe sekundarnih pokretnih zoospora koje se smatraju glavnim infektivnim stadijem vrste *S. parasitica*. Za razliku od primarnih zoospora, sekundarne zoospore mogu ostati pokretne i do nekoliko dana, nakon čega dolazi do tvorbe sekundarnih cista koja se još nazivaju i citosporama. Sekundarne zoospore nekih vrsta roda *Saprolegnia* (uključujući *S. parasitica*) imaju sposobnost tvorbe sekundarnih cista i potom iz njih novih sekundarnih zoospora. Ta pojava naziva se poliplanetizam i može se ponavljati kroz nekoliko ciklusa, no u većini slučajeva dolazi do



klijanja sekundarne ciste u novi micelij (Torto-Alalibo i sur., 2005; Earle i Hintz, 2014; Songe, 2015; Lone i Manohar, 2018).

U nedavnom je istraživanju opisana uloga tzv. kukica odnosno dlačica koje se nalaze na površini sekundarnih cista i koje se razlikuju ovisno o vrsti unutar roda *Saprolegnia* (Rezinciuc i sur., 2018). Ove dlačice smatraju se odgovornima za vezanje patogena na površinu domaćina i općenita je pretpostavka da je dužina dlačica proporcionalna jačini vezanja cista na površinu domaćina, odnosno da duže dlačice znače čvršće vezanje i obrnuto. Budući da su kukice kod vrste *Saprolegnia parasitica* duže za 2  $\mu\text{m}$  u usporedbi s drugim vrstama istog roda i organizirane u snopove (Slika 4.), jačina kojom se ciste vrste *S. parasitica* vežu na površinu domaćina je tri puta veća od drugih ispitivanih vrsta iz roda *Saprolegnia* te se smatra da uslijed jačeg prianjanja cista na površinu domaćina dolazi do jačeg infektivnog djelovanja.



**Slika 4.** Fotografije sekundarne ciste vrste *Saprolegnia parasitica* snimljene pomoću skenirajućeg (A) i transmisijskog (B) elektronskog mikroskopa. Na fotografijama su prikazani snopovi (eng. *bundles* – Bu), pojedine dlačice (eng. *single hairs* – Ha) i tzv. kukice (eng. *hooks* – Ho) na vrhu dlačice (preuzeto iz Rezinciuc i sur., 2018).

### 1.1.3. Vrsta *S. parasitica* kao uzročnik saprolegnioze

Vrste iz roda *Saprolegnia* preživljavaju na kopnu, u vlažnim uvjetima i vodenim ekosustavima. Većinom su saprofitski mikroorganizmi, međutim neke su vrste patogeni biljaka i životinja pritom uzrokujući sve veći broj bolesti u prirodi i akvakulturi (Sandoval-

Sierra i sur., 2013). Bolest koju izazivaju neke vrste iz roda *Saprolegnia* naziva se saprolegnioza, a manifestira se pojavom vidljivih bijelo ili sivo obojenih područja s razvijenim filamentoznim micelijem na površini domaćina (Slika 5.) (Torto-Alalibo i sur., 2005). Među vrstama iz ovog roda, *Saprolegnia parasitica* ima najveći broj domaćina, a popis uključuje kalifornijsku pastrvu (*Oncorhynchus mykiss*), potočnu pastrvu (*Salmo trutta*), perzijsku jesetru (*Acipenser persicus*), veliku ozimicu (*Coregonus lavaretus holsatus*), australskog srebrnog grgeča (*Bidyanus bidyanus*), kanalskog soma (*Ictalurus punctatus*) i japanskog lososa (*Oncorhynchus masu*) kao i jajašca atlantskog (*Salmo salar*) te pacifičkog lososa (*Oncorhynchus nerka*) (Gozlan i sur., 2014).

Prisutnost saprolegnioze u vodenom okolišu karakteristična je za razdoblje od listopada do ožujka, kada je temperatura vode niža od 15 °C. Međutim, zamjetna stopa uginuća riba zabilježena je neposredno nakon navedenog perioda uslijed porasta temperature vode (Rahman i Choi, 2018). Naime, iako vrsta *Saprolegnia parasitica* ima prilično veliku toleranciju na temperaturne promjene u vodi (podnosi temperature od 3 do 33 °C) i nagla promjena u temperaturi vode nema osobitog utjecaja na patogene, ribe domaćini, koje su osjetljivije na temperaturne promjene, uslijed temperaturnog šoka postaju podložnije infekciji i posljedično sklonije uginuću (Warrilow i sur., 2014). Kod jajašaca (oplođenih i neoplođenih), rast micelija na njihovoj površini dovodi do smrti, dok kod odraslih riba *S. parasitica* djeluje invazivno na epidermalno tkivo, počevši najčešće od glave odakle se širi na ostatak tijela. Tijekom napredovanja bolesti zaražena riba postaje letargična i u njezinom organizmu dolazi do narušavanja homeostaze, a smrt u konačnici uzrokuje osmotski šok do kojeg dolazi uslijed smanjenja broja eritrocita (Wuensch i sur., 2018). Na Slici 5. prikazana je mlada jedinka lososa sa saprolegniozom (Earle i Hintz, 2014).



**Slika 5.** Mlada jedinka lososa zaražena vrstom *Saprolegnia parasitica*. Inficirano područje označeno je crvenim krugom (preuzeto iz Earle i Hintz, 2014).

Saprolegnioza predstavlja veliki problem u akvakulturi, osobito kod uzgoja ribljih jajašaca, uzrokujući milijunske štete u akvakulturi na globalnoj razini, posebice u Škotskoj, Skandinaviji, Čileu, Japanu, Kanadi i Sjedinjenim Američkim Državama (Torto-Alalibo i sur., 2005). U Hrvatskoj se uzgoj slatkovodnih riba, ponajprije kalifornijske pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) i u manjem udjelu potočne pastrve (*Salmo trutta fario*), odvija u 24 uzgajališta s godišnjom proizvodnjom od dvadesetak do nekoliko stotina tona (Zrnčić i sur., 2011). Globalno gledano, akvakultura je jedna od rijetkih grana primarne industrije koja kroz dulje razdoblje bilježi kontinuirani rast (De Silva, 2001). Međutim, s porastom broja uzgajališta raste i broj oboljenja riba koje se u njima uzgajaju, između ostaloga i pojavnost saprolegnioze (Gozlan i sur., 2014). Primjerice, u zadnjih desetak godina salmonidna akvakultura u Čileu doživjela je zamjetan uzlet i Čile je (nakon Norveške) drugi najveći proizvođač atlantskog lososa i kalifornijske pastrve. Međutim, nagli razvoj popraćen je i porastom broja oboljenja u uzgajalištima te su upravo vrste iz roda *Saprolegnia* jedne od glavnih uzročnika infekcija. Nadalje, smatra se da vrste iz roda *Saprolegnia* uzrokuju prosječno 10 % ukupnih ekonomskih gubitaka u slatkovodnoj akvakulturi, a ponekad i do 50 % ukupnih godišnjih gubitaka u uzgajalištima (Sandoval-Sierra i sur., 2014).

## **1.2. Identifikacija vrsta unutar roda *Saprolegnia***

Identifikacija vrsta unutar roda *Saprolegnia* je otežana budući da su morfološke razlike između različitih vrsta ograničene na varijacije u veličini, obliku i broju oospora nastalih tijekom spolnog razmnožavanja, dok je izgled micelija, sporangija i zoospora međusobno vrlo sličan (Slika 6.). Stoga se oospore smatraju jedinim pouzdanim izvorom morfoloških razlika unutar roda *Saprolegnia* na temelju kojih se vrši klasifikacija i identifikacija vrsta (Songe, 2015). Međutim, identifikacija na temelju oospora često nije moguća zbog nemogućnosti inicijacije spolnog razmnožavanja u *in vitro* uvjetima.

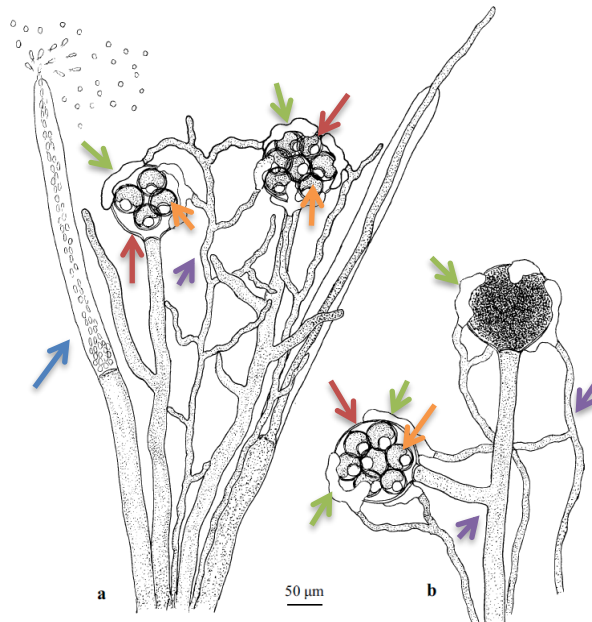
Stoga se danas identifikacija temelji prvenstveno na određivanju slijeda nukleotida ITS-regije (eng. *internal transcribed spacer*) i uspoređivanju dobivenog slijeda nukleotida s poznatim sljedovima u nukleotidnim bazama podataka (GenBank, Benson i sur., 2013). Međutim, i ova metoda identifikacije je podložna greškama jer je utvrđeno da su u bazama podataka prisutni mnogi pogrešno klasificirani nukleotidni sljedovi što može dovesti do daljnjih grešaka u klasifikaciji nepoznatih izolata iz roda *Saprolegnia* (Sandoval-Sierra i sur.,

2013). Nedavno provedenom detaljnom filogenetskom analizom gotovo 1000 nukleotidnih sljedova ITS-regije raznih izolata iz roda *Saprolegnia* identificirano je preko 20 filogenetskih klastera, uključujući klaster koji odgovara vrsti *S. parasitica* (Sandoval-Sierra i sur., 2013). Stoga se danas identifikacija vrsta iz roda *Saprolegnia* treba temeljiti na ovim revidiranim molekularnim podacima, kako je i učinjeno u ovom radu.

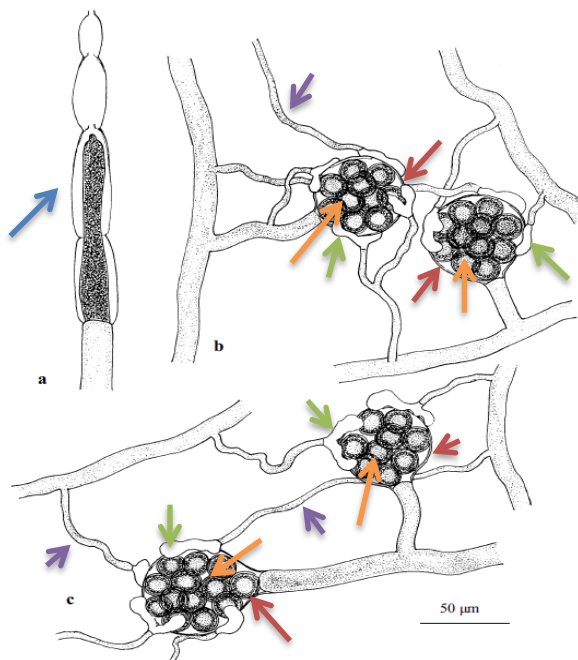
## Mikroorganizam

## Morfologija

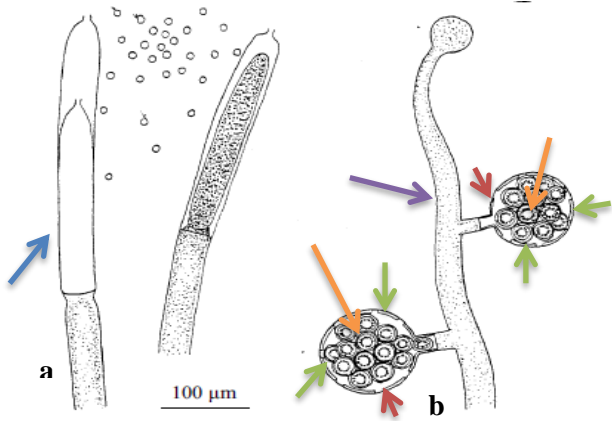
*Saprolegnia  
anisospora*



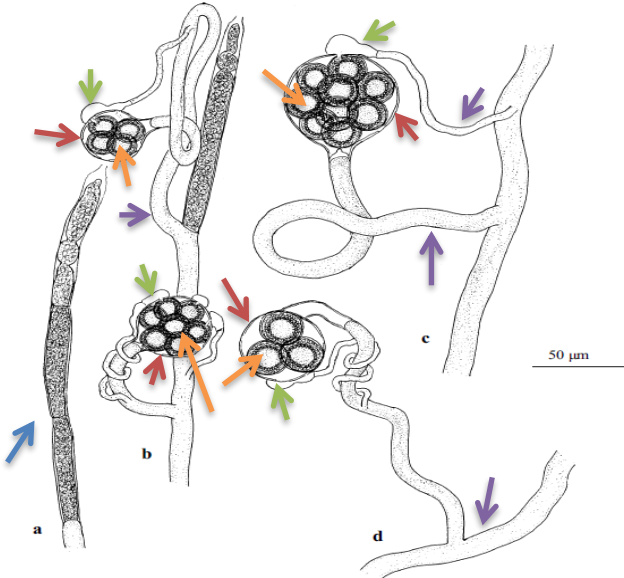
*Saprolegnia  
diclina*



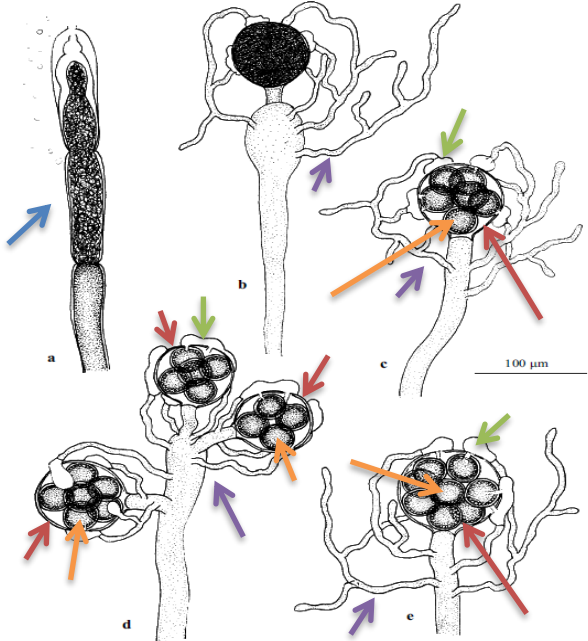
*Saprolegnia ferax*



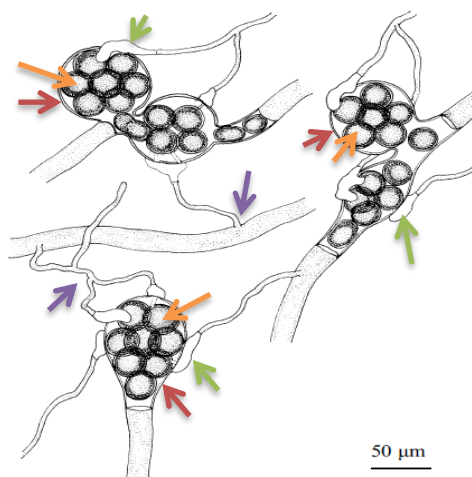
*Saprolegnia furcata*



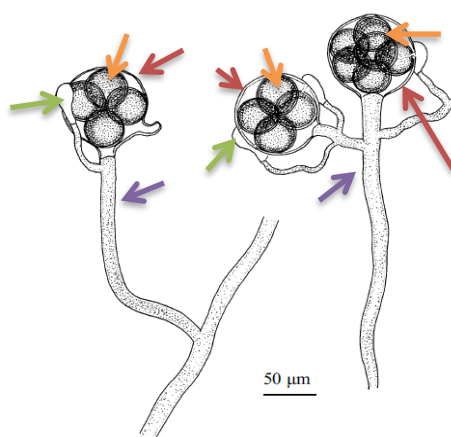
*Saprolegnia litoralis*



*Saprolegnia  
parasitica*



*Saprolegnia  
terrestris*



**Slika 6.** Prikaz morfoloških razlika između nekoliko vrsta iz roda *Saprolegnia* (preuzeto iz Markovskaja, 2006). Prikazani su **zoosporangiji**, **oogoniji** i **anteridiji** povezani **hifama** te **oospore**.

### 1.3. Lančana reakcija polimerazom (eng. *polymerase chain reaction* – PCR) i njezina primjena u dijagnostici i praćenju patogena

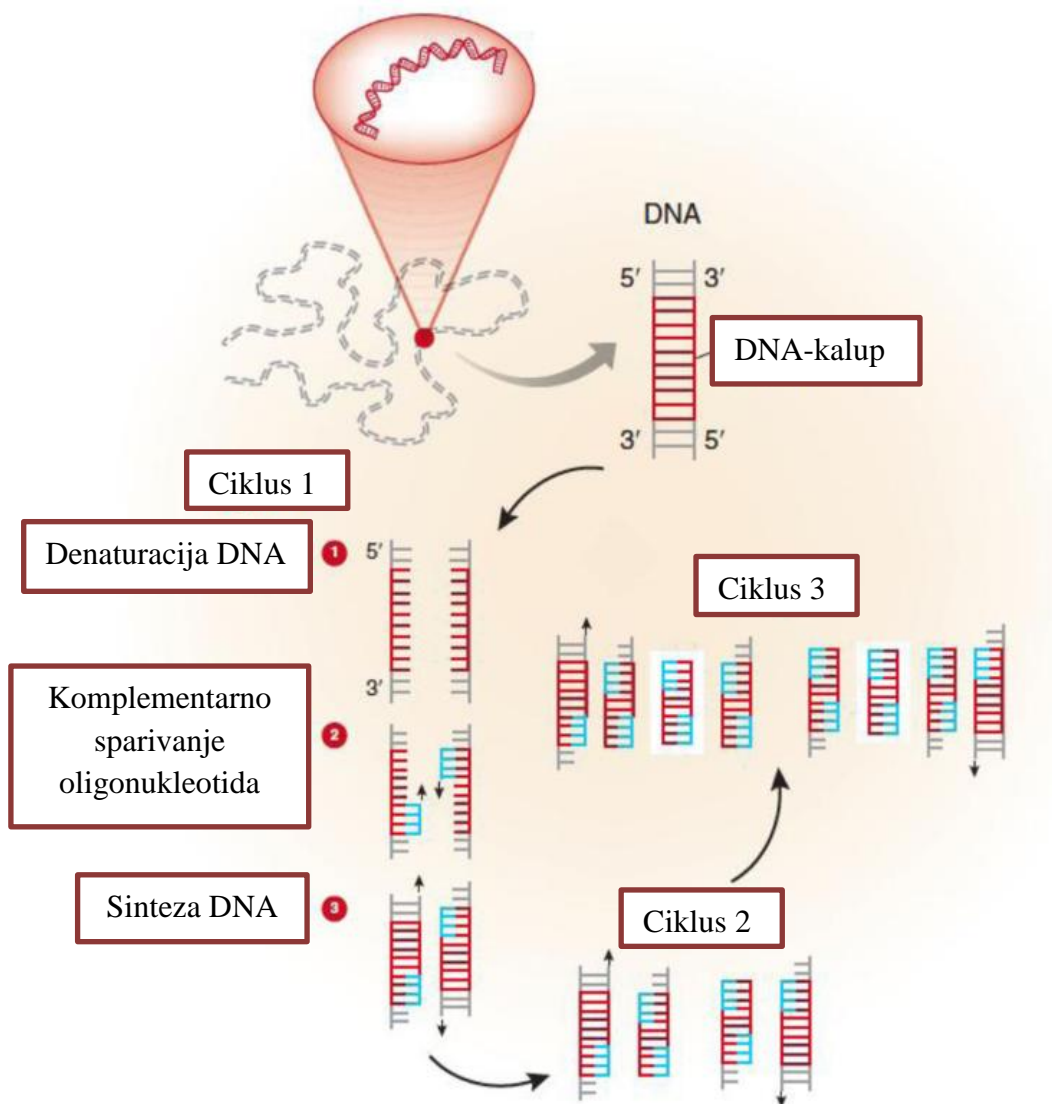
Lančana reakcija polimerazom (eng. *polymerase chain reaction* – PCR) vrlo je osjetljiva metoda umnažanja (amplifikacije) specifičnih dijelova DNA (Garibyan i Avashia, 2013), a ciljani DNA-fragment određuje se pomoću parova oligonukleotida (Strunjak-Perović i Topić Popović, 1999). PCR-metodu razvio je američki biokemičar Kary Mullis 1984. godine i za ovo otkriće je 1993. godine dobio Nobelovu nagradu (Joshi i Deshpande, 2011). S obzirom na to da je PCR-om moguće umnožiti točno određeni fragment DNA i tako dokazati njegovo prisustvo/odsustvo u uzorku, ova je metoda svoju primjenu našla u širokom rasponu grana poput kliničke medicine, dijagnostike nasljednih bolesti, forenzike, populacijske genetike,

sistematike, tipizacije tkiva, bioinženjerstva, prepoznavanja hrane dobivene genetičkim inženjerstvom, kontrole živežnih namirnica, evolucijske biologije te detekcije patogena u akvakulturi (Strunjak-Perović i Topić Popović, 1999).

### **1.3.1. Princip umnažanja fragmenata molekule DNA lančanom reakcijom polimerazom**

Svaka lančana reakcija polimerazom zahtijeva prisutnost DNA-kalupa, oligonukleotida, nukleotida i DNA-polimeraze. DNA-polimeraza je ključan enzim koji, nadovezujući se na oligonukleotide i prema informaciji u DNA-kalupu, povezuje pojedine nukleotide dajući PCR-produkt. Oligonukleotidi su kratki fragmenti DNA sa specifičnim redoslijedom nukleotida i par oligonukleotida u reakciji određuje DNA-produkt koji će se umnožiti. Oligonukleotid je polazište za daljnje produljivanje lanca pomoću DNA-polimeraze, međutim do povezivanja nukleotida i sinteze DNA dolazi jedino ako su redosljedi nukleotida u oligonukleotidu i DNA-kalupu međusobno komplementarni. Stoga je kreiranje specifičnih oligonukleotida jedan od osnovnih preduvjeta uspješne PCR-reakcije. PCR-reakcija (Slika 7.) sastoji se od tri glavna dijela: denaturacije DNA, komplementarnog sparivanja oligonukleotida i sinteze DNA. Reakcijska smjesa se u uređaju za PCR prvo zagrije na 90 – 98 °C, što dovodi do razdvajanja dva komplementarna lanca DNA-kalupa, odnosno denaturacije. Temperatura se nakon toga snizuje do temperature koja omogućuje vezanje oligonukleotida na ciljne (komplementarne) regije jednolančane DNA-kalupa (najčešće je to temperatura u rasponu 50 – 65 °C). Taj proces renaturacije naziva se komplementarno sparivanje (eng. *annealing*) oligonukleotida na DNA-kalup. Sljedeći korak je povišenje temperature na 72 °C, radnu temperaturu enzima DNA-polimeraze pri kojoj ona dodaje nukleotide na krajeve oligonukleotida i tako formira novi lanac DNA (Joshi i Deshpande, 2011, Strunjak-Perović i Topić Popović, 1999). Najčešće se koristi termostabilna DNA-polimeraza iz mikroorganizma *Thermus aquaticus* (*Taq*-polimeraza), zato što je brza, visoko procesivna i stabilna u širokom rasponu temperatura koje se izmjenjuju tijekom PCR-reakcije (Innis i sur., 1988). Svakim ponavljanjem ova tri koraka koji čine jedan ciklus, broj kopija DNA se udvostručava. Za otprilike jedan sat, dvadesetak ciklusa PCR-a može umnožiti traženi redosljed nukleotida milijun puta. PCR-reakcija provodi se u uređaju za PCR u kojem se temperatura tijekom reakcije povisuje i snizuje u skladu s prethodno određenim programom (eng. *thermocycler*), a broj ciklusa, vrijednosti temperatura koje se primjenjuju

tijekom reakcije, kao i trajanje pojedinih koraka i cijelog procesa, određuju se ovisno o ciljnoj regiji te svojstvima oligonukleotida i DNA-polimeraze (Garibyan i Avashia, 2013).



**Slika 7.** Shematski prikaz lančane reakcije polimerazom (preuzeto iz Garibyan i Avashia, 2013).

Nakon provedene PCR-reakcije, rezultat se najčešće analizira gel-elektroforezom. Tijekom elektroforeze u agaroznom gelu dolazi do izdvajanja umnoženog DNA-fragmenta (ako zaista postoji u uzorku) u obliku vrpce (eng. *bands*) koje su nakon bojanja DNA-interkalirajućim bojama vidljive pod UV-svjetlom. Veličina fragmenta određuje se usporedbom s komercijalno dostupnim standardima (Strunjak-Perović i Topić Popović, 1999).



### 1.3.2. Primjena lančane reakcije polimerazom u praćenju patogena u akvakulturi

Pomoću PCR-a moguće je dijagnosticirati niz virusnih, bakterijskih i parazitskih bolesti riba, školjaka i rakova. U posljednje vrijeme PCR postaje osnovna dijagnostička metoda, a prednosti ove tehnike u odnosu na standardne metode (uzgoj u kulturi i mikroskopsku identifikaciju patogena) su brzo dobivanje rezultata, visoka specifičnost i osjetljivost (Strunjak-Perović i Topić Popović, 1999).

U slatkovodnoj akvakulturi je uzimanje brisa s površine oboljelih riba i izolacija te uzgoj patogena dugotrajan postupak koji često ne uspije. Čak i kada se uspješno uzgoji uzročnik bolesti, to je često nedovoljno za pouzdanu identifikaciju do razine vrste (vidi Poglavlje 1.2.). Međutim, razvoj molekularnih tehnika rezultirao je razvojem dijagnostičkih metoda poput PCR-a koji se danas sve češće koristi za detekciju i identifikaciju patogena na temelju njihovih specifičnih redoslijeda nukleotida.

Iako metoda za molekularnu detekciju vrste *S. parasitica* još nije razvijena i cilj je ovog rada, testovi temeljeni na PCR-u i njegovim inačicama primjenjuju se za detekciju mnogih bakterijskih i virusnih patogena u pastrvskoj akvakulturi, poput bakterija *Flavobacterium columnare* i *Yersinia ruckeri* te virusa zarazne hematopoetske nekroze (ZHN), zarazne nekroze gušterače (ZNG) i virusne hemoragijske septikemije (VHS) (Kim i sur., 2013; Sandoval-Sierra i sur., 2013; Thoen i sur., 2015; Shin i sur., 2017; Lone i Manohar, 2018; Sarowar i sur., 2018).

Bakterija *Flavobacterium columnare* patogen je slatkovodnih riba, a jedna od vrsta riba koje su najpodložnije oboljenju jest upravo kalifornijska pastrva. Patogen *F. columnare* uzrokuje lezije na površini tijela riba, eroziju peraja i nekrozu škrge (Pulkkinen i sur., 2009). Za detekciju ovog bakterijskog patogena razvijen je PCR-test sa specifičnim oligonukleotidima kreiranima na temelju razlika u slijedu nukleotida u regiji 16S rRNA gena u odnosu na druge srodne vrste (Darwish i sur., 2004).

Vrsta *Yersinia ruckeri* je Gram-negativna bakterija i uzročnik jersinioze koju karakterizira pojava jakih krvarenja u usnoj šupljini kalifornijske pastrve. Iako se ova bolest u većini slučajeva kontrolira upotrebom cjepiva i antibiotika, danas se sve više koristi PCR-test za detekciju patogena na molekularnoj razini zbog brzine metode te njezine visoke osjetljivosti (Fernández i sur., 2007). Pritom se nukleotidni sljedovi specifični za vrstu *Y.*

*ruckeri* nalaze unutar 16S rRNA gena, najraširenijeg marker-gena za taksonomsku identifikaciju bakterija (Gibello i sur., 1999).

Virusi zarazne hematopoetske nekroze (ZHN) i zarazne nekroze gušterače (ZNG) važni su patogeni u uzgoju kalifornijskih pastrva (Vardić i sur., 2007). Virus zarazne hematopoetske nekroze pripada porodici *Rhabdoviridae* (rod *Novirhabdovirus*) i uzrokuje akutnu virusnu bolest mlađa te odraslih jedinki različitih vrsta salmonidnih riba, a virus zarazne nekroze gušterače pripada porodici *Birnaviridae* (rod *Aquabirnavirus*) i uzrokuje vrlo brzo uginuće zaraženih riba. Danas se za identifikaciju virusa zarazne hematopoetske nekroze i zarazne nekroze gušterače sve više koristi PCR, za koji su kreirani oligonukleotidi specifični za gen koji kodira za nukleokapsidni protein virusa, i qPCR (eng. *quantitative polymerase chain reaction*) za koji se koriste oligonukleotidi specifični za gen koji kodira za glikoprotein G (Miller i sur. 1998, Zrnčić i sur., 2011).

Što se tiče oomiceta, jedina vrsta važna za akvakulturu za koju su do sada razvijeni PCR- i qPCR-testovi je patogen slatkovodnih rakova *Aphanomyces astaci*, uzročnik račje kuge (Oidtmann i sur., 2006; Hochwimmer i sur., 2009; Vrålstad i sur., 2009). Molekularna detekcija temelji se na oligonukleotidima koji omogućuju specifično umnažanje ITS-regije 5.8 rRNA gena vrste *A. astaci* (Oidtmann i sur., 2006; Vrålstad i sur., 2009), odnosno dijelove gena koji kodiraju za hitinaze CHI2 i CHI3 (Hochwimmer i sur., 2009).

Budući da trenutno za detekciju patogenih oomiceta iz roda *Saprolegnia* ne postoje standardizirane metode detekcije na molekularnoj razini, cilj ovog rada bio je razviti PCR-test za brzu i učinkovitu metodu detekcije patogena *Saprolegnia parasitica*.

## 2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Vrsta *Saprolegnia parasitica* ima značajan negativni utjecaj na uzgoj pastrve i drugih salmonidnih vrsta riba, ali i na prirodne populacije domaćina. Saprolegnioza predstavlja globalni rastući problem, koji je dodatno porastao nedavnom zabranom upotrebe malahitnog zelenila kao mjere kontrole. Stoga je potrebno čim prije razviti učinkovite metode detekcije i praćenja patogena, koje predstavljaju prvi korak u učinkovitoj kontroli širenja bolesti (Liu i sur., 2015; Derevnina i sur., 2016). Postojeće metode detekcije i identifikacije ovog patogena dugotrajne su budući da se temelje na uzgoju i naknadnoj mikroskopskoj te molekularnoj identifikaciji izolata. Stoga je opći cilj ovog rada bio po prvi put razviti PCR-test za brzu molekularnu detekciju patogena *S. parasitica*.

Specifični ciljevi rada bili su:

1. izolirati i taksonomski determinirati oomicetne izolate iz pastrvskog ribnjaka Ritterman koji će služiti za testiranje specifičnosti PCR-testa,
2. kreirati parove oligonukleotida za specifično umnažanje dijelova ITS-regije vrste *S. parasitica*,
3. odrediti optimalne uvjete PCR-reakcije za svaki par oligonukleotida, odnosno optimalnu temperaturu komplementarnog sparivanja,
4. utvrditi donju granicu osjetljivosti svakog para oligonukleotida odnosno minimalnu količinu DNA-kalupa koja je dovoljna za dobivanje PCR-produkta,
5. testirati specifičnost odabranih parova oligonukleotida.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Izolacija i uzgoj izolata oomiceta iz pastrvskog ribnjaka Ritterman

Uzorkovanje je provedeno 29. studenog 2018. u pastrvskom ribnjaku Ritterman (Solin, Hrvatska). Sakupljene su ličinke stare 14 dana vidljivo obrasle micelijem te je u vodu postavljeno 5 zamki za oomicete sa sjemenkama konoplje (Slika 8.) (Seymour, 1970; Johnson i sur., 2002).



**Slika 8.** Primjer zamki za oomicete sa sjemenkama konoplje (Foto: Pavić D.).

Prilikom izrade zamki, sjemenke konoplje su prokuhane dvije minute u kipućoj destiliranoj vodi i nakon toga procijeđene te skalpelom prerezane na pola. Izrezane polovice stavljene su u zamke napravljene od žičane mrežice (do sedam polovica sjemenki konoplje po zamki). Potom su pripremljene zamke stavljene u staklenke i sterilizirane autoklaviranjem kroz 20 min pri temperaturi od 121 °C i tlaku od 1,2 bar. Na terenu, zamke su uronjene u vodu ribnjaka, potopljene pomoću utega i vezane plastičnim koncem. Nakon 13 dana (11. prosinca 2018.), zamke su izvađene, stavljene u sterilne staklenke, prelivene vodom iz ribnjaka i transportirane u laboratorij.

U laboratoriju su sakupljeni uzorci, odnosno inficirane ličinke i polovice sjemenki izvađene iz zamki te nasadeni na krutu hranjivu podlogu GY+OX+P.

Za pripremu hranjive podloge GY+OX+P se u 1 litri destilirane vode suspendira 12 g agara (Biolife, Italija), 5 g glukoze (Biolife, Italija) i 1 g kvašćevog ekstrakta (Biolife, Italija). Nakon sterilizacije autoklaviranjem kroz 20 min pri temperaturi od 121 °C i tlaku od 1,2 bar,

podloga se ohladi do temperature oko 60 °C i nakon toga joj se doda ukupno 20 mL otopine antibiotika. Otopina antibiotika priprema se tako da se pomiješa 10 mL metanola (Alkaloid, Sjeverna Makedonija), 8 mL destilirane vode, 2 mL 0,1 M otopine natrijeva hidroksida (4 g/L; eci d.o.o., Hrvatska), 10 mg oksolonične kiseline (0,010 g/L; Acros Organics, SAD) i 6 mg penicilina G (0,006 g/L; Sigma-Aldrich, Izrael) za 1 litru hranjive podloge. Prije dodavanja u podlogu, otopina antibiotika se sterilizira provlačenjem kroz filter promjera pora 0,4 µm (LLG, Njemačka). Antibiotici su dodani u hranjivu podlogu kako bi se smanjio rast bakterija, dok su oomicete otporne na oksoloničnu kiselinu i penicilin (Kasanah i Hamann, 2004).

Prije naciepljivanja na hranjivu podlogu, svaki je uzorak prvo ispran kako bi se smanjila količina bakterija: pomoću sterilne pincete uzorak je umočen u etanol i potom sterilnom Pasteurovom pipetom ispran tri puta s po 2 mL sterilne destilirane vode. Tako tretirani uzorci stavljeni su na krute hranjive podloge te uzgajani u termokabinetu (Eppendorf, Njemačka) pri 18 °C. Kako bi se oomicetni izolati pročistili od prisutnih bakterija, korištene su ploče s procjepom preko kojeg micelij može proći, a jednostanične bakterije ne mogu. Pritom je narasli micelij svaka dva dana presađivan na novu hranjivu podlogu, dok nije dobivena čista kultura.

Izolati su pohranjeni tako da su u bočice volumena 50 mL, prethodno do pola volumena napunjene destiliranom vodom, stavljene po dvije sjemenke konoplje. Bočice sa sjemenkama su zatvorene poklopcem, autoklavirane, ohlađene i potom čuvane u hladnjaku. Zatim su izrezana dva komadića agara s čistom kulturom koji su stavljeni u bočice, a one zatvorene poklopcem i pokrivene parafilmom. Ovako pripremljeni izolati čuvani su pri 18 °C (Smith i Onions, 1994). Osim izolata sakupljenih u pastrvskom ribnjaku Ritterman, u radu je korišten mikroorganizam *Saprolegnia parasitica*, soj CBS 223.65 koji je ustupila dr. sc. Roberta Galuppi (Sveučilište u Bologni, Italija).

### **3.2. Izolacija genomske DNA**

Za izolaciju genomske DNA, mikroorganizmi su uzgojeni u tekućoj hranjivoj podlozi PG1 (Unestam, 1965). Komadić agara s micelijem (d = 5 mm) stavljen je u 4 mL tekuće hranjive podloge, u jažicu pločice s 12 jažica (eng. *12-well plate*). Mikroorganizmi su potom uzgajani dva dana pri temperaturi od 18 °C. Nakon toga, porasli micelij je odvojen od ostatka

krute hranjive podloge, prebačen u kivetu volumena 1,5 mL i centrifugiran pri 10 000 x g kroz 15 minuta. Višak tekućine je izdvojen, a dobiveni talog korišten za izolaciju DNA.

Genomska DNA mikroorganizama izolirana je kompletom NucleoSpin® Microbial DNA (Macherey Nagel, Njemačka). Talog micelija resuspendiran je u 100 µL BE-puferu te prebačen u epruveticu sa zrcima tipa B (NucleoSpin® Bead Tube Type B) u koju je potom dodano 40 µL MG-puferu i 10 µL otopine proteinaze K. Kako bi došlo do lize stanica, zatvorena epruvetica stavljena je na vorteks (Corning, SAD) na 20 minuta pri amplitudi 30 Hz. Nakon toga, uzorak je centrifugiran kroz 30 sekundi pri 11 000 x g. U uzorak je dodano još 600 µL MG-puferu, promiješano vorteksiranjem kroz 3 sekunde te je uzorak ponovno centrifugiran kao ranije. Nakon toga, supernatant je pomoću pipete prebačen na kolonicu za vezanje DNA koja je stavljena u novu epruveticu. Nakon centrifugiranja u uvjetima kao ranije, kolonica je isprana s 500 µL BW-puferu i ponovno centrifugirana pri istim uvjetima. Zatim je kolonica isprana s 500 µL B5-puferu i dva puta uzastopno centrifugirana kao ranije, uz uklanjanje filtrata. U završnom koraku, kolonica je prebačena u kivetu volumena 1,5 mL, a elucija DNA s kolonice provedena je tako da je na kolonicu naneseo 100 µL BE-puferu za eluciju, a zatim provedeno centrifugiranje pri 11,000 x g u trajanju od 5 minuta. Nakon centrifugiranja, sakupljen je eluat koji sadrži DNA i kolona još jednom isprana s tim eluatom kako bi se dobila maksimalna koncentracija genomske DNA u krajnjem uzroku.

Rezultat izolacije DNA analiziran je elektroforezom u agaroznom gelu (detaljno opisano u Poglavlju 3.5.), a koncentracija izolirane DNA određena je fluorimetrijski pomoću uređaja Quantus (Promega, SAD) uz korištenje ONE dsDNA boje (Promega, SAD).

### 3.3. Oligonukleotidi

Oligonukleotidi korišteni u ovom radu navedeni su u Tablici 1.

Uz svaki oligonukleotid navedena je njegova predviđena  $T_m$ -vrijednost (eng. *melting temperature* –  $T_m$ ), koja se definira kao temperatura pri kojoj je 50 % oligonukleotida vezano na komplementarni slijed nukleotida DNA-kalupa, a preostalih 50 % je u jednolančanom obliku. Dužina kreiranih oligonukleotida utječe na  $T_m$ -vrijednost – što je oligonukleotid duži,  $T_m$ -vrijednost mu je viša. Osim toga, na  $T_m$ -vrijednost utječe i GC-sastav, pa tako oligonukleotidi dužine 20 parova baza s udjelom G + C od 50 % imaju  $T_m$ -vrijednost u

temperaturnom rasponu 56 – 62 °C i uglavnom je  $T_m$ -vrijednost oligonukleotida s većim udjelom G + C viša. Predviđanje  $T_m$ -vrijednosti je potrebno radi određivanja optimalne temperature komplementarnog sparivanja (eng. *annealing temperature*) na DNA-kalup u lančanoj reakciji polimerazom (Dieffenbach i sur., 1993).

**Tablica 1.** Korišteni oligonukleotidi.

Uzvodni oligonukleotidi (eng. <i>forward</i> – F)					
Oznaka oligo-nukleotida	Nukleotidni slijed 5'→3'	$T_m$ [°C]		Dužina oligo-nukleotida (pb)	Izvor
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	63		22	White i sur., 1990
333F	CAAACCTTGTTTCATTTCTTGATTGGGATG	65		29	Ovaj rad
Nizvodni oligonukleotidi (eng. <i>reverse</i> – R)					
Oznaka oligo-nukleotida	Nukleotidni slijed 5'→3'	$T_m$ [°C]		Dužina oligo-nukleotida (pb)	Izvor
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	58		20	White i sur., 1990
567R	CYTGTACTTTGACAACAGACTCGC	66	68	24	Ovaj rad
	Y = T				
590R	CCAACTCYCCTTACGTGCC	66	69	19	Ovaj rad
	Y = T				

$T_m$ -vrijednost (eng. *melting temperature*) svakog oligonukleotida predviđena je pomoću računalnog programa  $T_m$ -kalkulator (*T<sub>m</sub> Calculator*; <https://tmcaculator.neb.com/#!/batch>); pb – parovi baza.

### 3.4. Lančana reakcija polimerazom (eng. *polymerase chain reaction* – PCR)

U ovom su radu, tijekom provođenja lančane reakcije polimerazom korišteni parovi oligonukleotida A i B te par ITS (Tablica 2.).

**Tablica 2.** Korištene kombinacije oligonukleotida.

Oznaka para oligonukleotida	Oznaka uzvodnog oligonukleotida	Oznaka nizvodnog oligonukleotida	Očekivana veličina fragmenta (pb)	Ciljna regija
A	333F	567R	257	ITS-regija <i>S. parasitica</i>
B	333F	590R	275	ITS-regija <i>S. parasitica</i>
ITS	ITS5	ITS4	707 (Leung, 2012)	ITS-regija svih vrsta roda <i>Saprolegnia</i> i drugih oomiceta korištenih u ovom radu

Sastav reakcijske smjese za PCR naveden je u Tablici 3., dok su u Tablici 4. navedeni uvjeti PCR-reakcija. Sve PCR-reakcije provedene su u uređaju Alpha Cyclor 1 (PCRmax, Ujedinjeno Kraljevstvo).

**Tablica 3.** Sastav reakcijske smjese za PCR:

a) za parove oligonukleotida A i B,

Komponenta reakcijske smjese za PCR	Volumen (μL)	Konačna koncentracija komponente u reakcijskoj smjesi
DNA-kalup	1	≤ 0,2 ng/μL
EmeraldAmp® PCR 2X Master Mix (TAKARA, Japan)	12,5	1X
10 μM uzvodni oligonukleotid	0,5	0,2 μM
10 μM nizvodni oligonukleotid	0,5	0,2 μM
dH <sub>2</sub> O	10,5	/
Ukupni volumen	25	/



**b)** za ITS-par oligonukleotida.

Komponenta reakcijske smjese za PCR	Volumen (μL)	Konačna koncentracija komponente u reakcijskoj smjesi
DNA-kalup	1	≤ 0,2 ng/μL
EmeraldAmp® PCR 2X Master Mix (TAKARA, Japan)	25	1X
10 μM ITS5 uzvodni oligonukleotid	1	0,2 μM
10 μM ITS4 nizvodni oligonukleotid	1	0,2 μM
dH <sub>2</sub> O	22	/
Ukupni volumen	50	/

**Tablica 4.** Uvjeti lančane reakcije polimerazom:

**a)** za parove oligonukleotida A i B,

		Vrijeme	Temperatura
30 ciklusa	Početna denaturacija DNA	10 min	98 °C
	Denaturacija DNA	10 s	98 °C
	Komplementarno sparivanje početnica*	30 s	64 °C
	Sinteza DNA	30 s	72 °C
	Završna sinteza DNA	5 min	72 °C

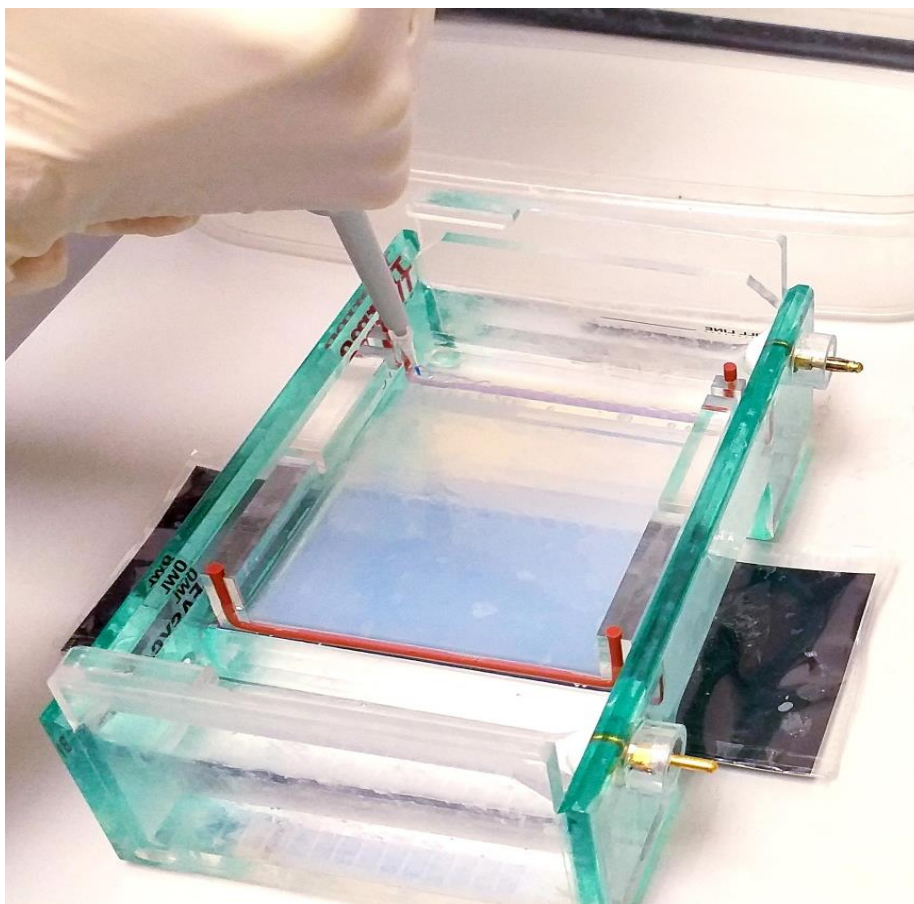
\*Određivanje optimalne temperature komplementarnog sparivanja parova kreiranih oligonukleotida opisano je u Rezultatima (Poglavlje 4.2.).

**b)** za ITS-par oligonukleotida.

		Vrijeme	Temperatura
40 ciklusa	Početna denaturacija DNA	5 min	98 °C
	Denaturacija DNA	30 s	98 °C
	Komplementarno sparivanje početnica	30 s	56 °C
	Sinteza DNA	1 min	72 °C
	Završna sinteza DNA	10 min	72 °C

### 3.5. Elektroforeza u agaroznom gelu

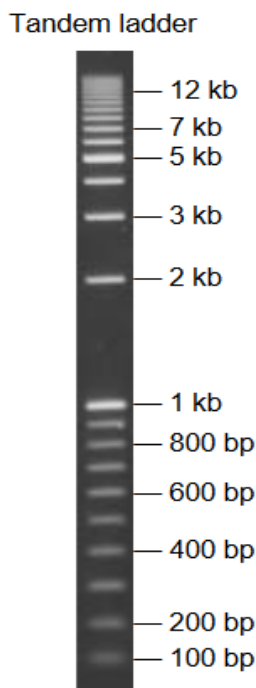
Elektroforeza u agaroznom gelu korištena je za vizualizaciju uzoraka genomske DNA i rezultata lančane reakcije polimerazom (Slika 9.). Elektroforeza u agaroznom gelu učinkovita je metoda razdvajanja fragmenata molekula nukleinskih kiselina čije se veličine kreću od 100 pb do 25 kpb (Lee i sur., 2012). Pritom se razdvajanje fragmenata prema veličini (pb) odvija pod utjecajem istosmjernog električnog polja.



**Slika 9.** Elektroforeza u agaroznom gelu – nanošenje uzorka u jažice gela (Foto: Vujović T.).

Elektroforeza genomske DNA provodila se u 1 %-tnom gelu, dok se elektroforeza produkata lančane reakcije polimerazom provodila u 2 %-tnom agaroznom gelu pri naponu od 100 V kroz 45 minuta u aparaturi Owl Easy Cast B1 Mini Gel Electrophoresis System (Thermo Fisher Scientific, SAD). Za pripremu gela korištena je agarozna (Sigma-Aldrich, SAD) otopljena u TAE puferu (40 mM TRIS (hidroksimetil) aminometan; 20 mM octena kiselina; 1 mM etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA)). Nakon što se otopina agaroze ohladila na oko 60 °C, dodana je boja GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain (Lonza, Švicarska) za vizualizaciju fragmenata. Pripremljena otopina izlivena je u kadicu za elektroforezu.

Nakon provedene elektroforeze, razdvojeni fragmenti DNA promatrani su pod UV-svjetlom (UV transiluminator UVIpure, UVITEC Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo) i fotografirani. Na Slici 10. prikazan je molekularni standard koji je služio za provjeru veličine dobivenih fragmenata.



**Slika 10.** Molekularni standard SimplyLoad™ Tandem DNA ladder (Lonza,

### 3.6. Određivanje i računalna obrada sljedova nukleotida

Nukleotidni sljedovi ITS-regije oomiceta korišteni u ovom radu dobiveni su:

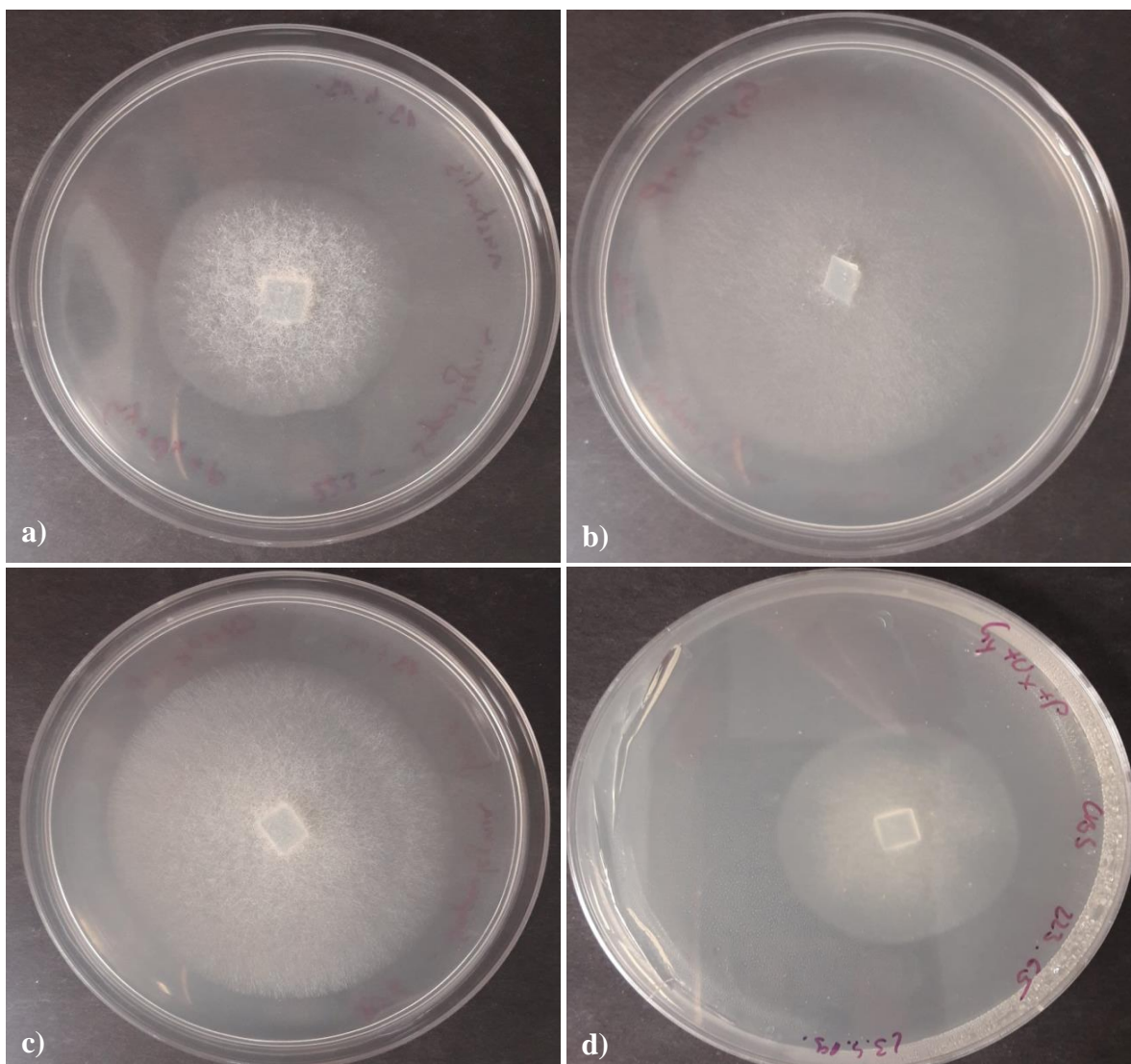
- i. određivanjem redoslijeda nukleotida PCR-produkata, za izolate dobivene u ovom radu. Određivanje redoslijeda nukleotida PCR-produkata provedeno je uz pomoć početnice ITS4 u komercijalnom servisu Microsynth (Austrija), a PCR-produkti su prije određivanja redoslijeda nukleotida pročišćeni. Nakon određivanja redoslijeda nukleotida, kromatogrami su uređeni u programu GeneStudio (GeneStudio, Inc.) i spremljeni u fasta formatu.
- ii. preuzimanjem iz NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) baze podataka, za redoslijede nukleotida izolata opisanih u literaturi (Sandoval-Sierra i sur., 2013). Pri tome je korišten alat *Batch Entrez* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/batchentrez>), a redoslijedi nukleotida su preuzeti putem tzv. pristupnih brojeva (eng. *accession number* – Acc. No.).

Višestruko sravnjenje nukleotidnih sljedova (eng. *multiple sequence alignment*) napravljeno je u programu MAFFT, <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/> (Kato i Standley, 2013), a naknadne manipulacije sravnjenih nukleotidnih sljedova izvršene su u programima SeaView (Gouy i sur., 2010) i BioEdit (Hall, 2011). Filogenetska analiza provedena je metodom Bayesianovog zaključivanja pomoću Mr. Bayes programa (Ronquist i Huelsenbeck, 2003) sa 100 000 iteracija. Dobiveno filogenetsko stablo uređeno je pomoću programa iTOL (Letunic i Bork, 2016).

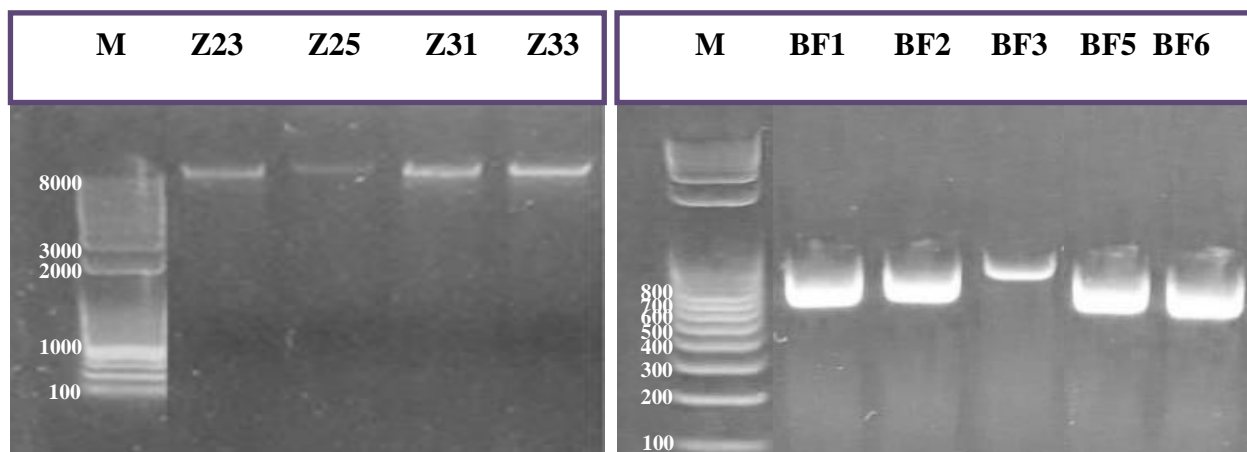
## 4. REZULTATI

### 4.1. Izolacija i taksonomska identifikacija oomiceta iz roda *Saprolegnia* u pastrvskom ribnjaku Ritterman, Solin

Sakupljeni izolati poslužili su za kasnije testiranje specifičnosti razvijenog PCR-testa za detekciju vrste *S. parasitica* (Poglavlje 4.5.). Uzorkovanjem te naknadnim uzgojem u kulturi i pročišćavanjem sakupljeno je 16 izolata oomiceta iz ribnjaka Ritterman (Solin, Hrvatska) – 5 sa ličinki (oznake: BF1, BF2, BF3, BF5 i BF6) i 11 sa zamki (oznake: Z12, Z14, Z15, Z16, Z23, Z25, Z31, Z33, Z41, Z42 i Z43) (Slika 11.).

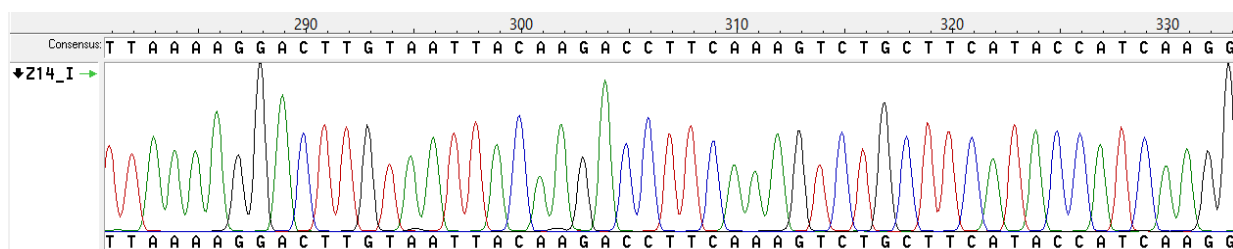


**Slika 11.** Prikaz uzgoja čistih svih vrsta oomiceta iz roda *Saprolegnia* detektiranih u sakupljenim izolatima: **a)** *S. australis* (oznake: Z23, Z25 i Z31); **b)** *S. delica* (oznake: BF5, Z14 i Z33); **c)** *S. ferax* (BF6 i Z12) i **d)** *S. parasitica* (oznake: BF1, BF2, BF3, Z15, Z16, Z41, Z42 i Z43).

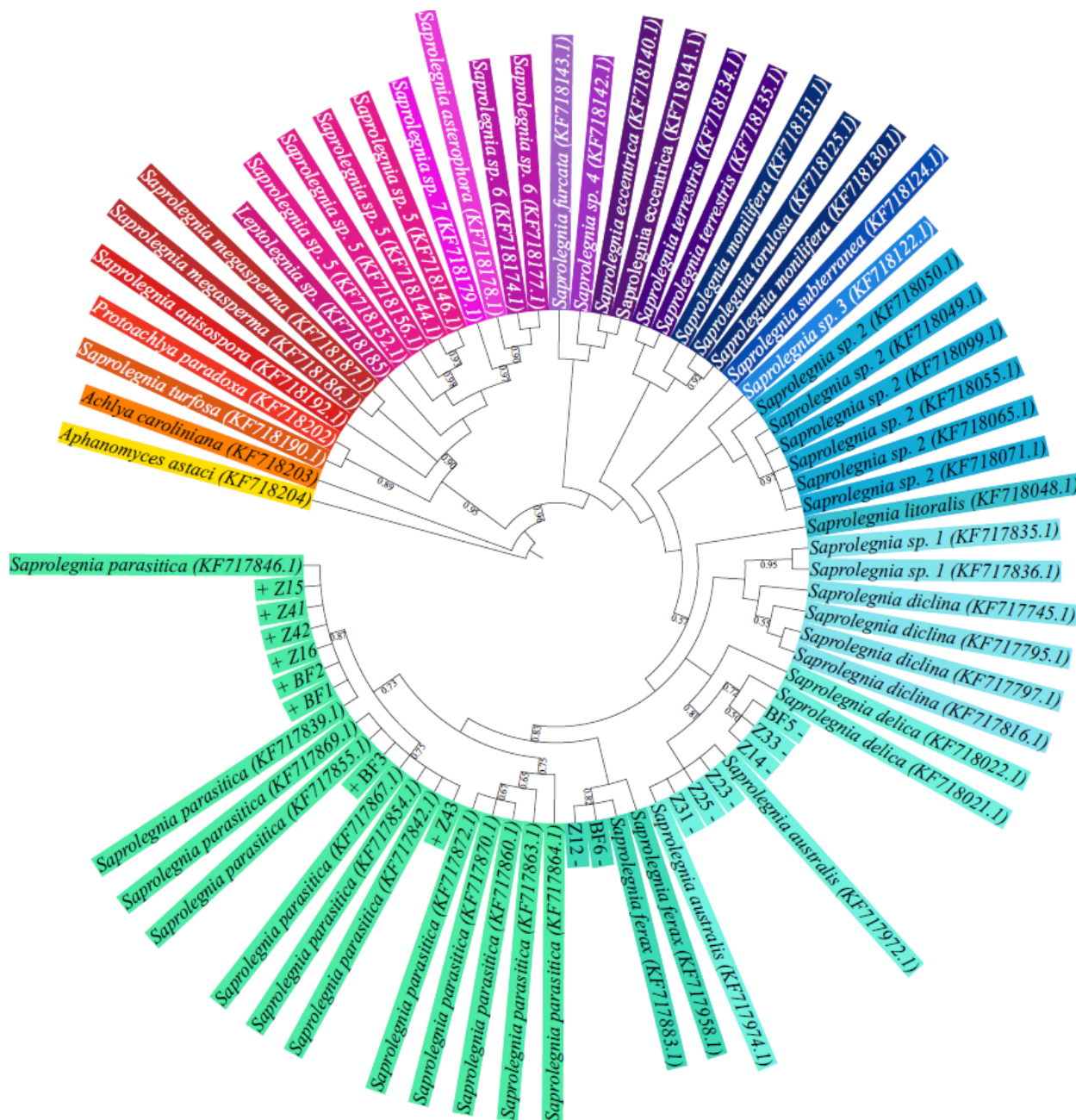


**Slika 12.** a) Genomska DNA nekoliko izolata korištenih u ovom radu; b) primjeri PCR-produkata odnosno umnožene ITS-regije nekoliko izolata korištenih u ovom radu. **M:** molekularni standard SimplyLoad™ Tandem DNA ladder (Lonza, Švicarska). Na gel je nanoseno po 8  $\mu$ L genomske DNA, odnosno po 2  $\mu$ L PCR-produkata.

Kako bi se utvrdila njihova taksonomska pripadnost provedena je analiza ITS-regije (eng. *internal transcribed spacer*) 5.8S rRNA gena sakupljenih izolata u nekoliko koraka: (i) izolirana je genomska DNA svakog izolata (Slika 12a.), (ii) lančanom reakcijom polimerazom umnožena je ITS-regija svakog izolata uz par oligonukleotida ITS5 i ITS4 (Slika 12b.), (iii) u komercijalnom servisu određen je slijed nukleotida ITS-regije svakog izolata (Slika 13.) te su (iv) filogenetskom analizom uspoređeni redosljedni nukleotida izolata i redosljedni nukleotida različitih poznatih vrsta iz roda *Saprolegnia* (Slika 14.). Prema rezultatima filogenetske analize sakupljeni izolati su identificirani, kako je navedeno u Tablici 6. Od ukupno 16 izolata, osam je pripadalo vrsti *S. parasitica* (oznake: BF1, BF2, BF3, Z15, Z16, Z41, Z42 i Z43, klaster 3 prema klasifikaciji Sandoval-Sierra i sur. (2013)), tri vrsti *S. australis* (oznake: Z23, Z25 i Z31, klaster 5), tri vrsti *S. delica* (oznake: BF5, Z14 i Z33, klaster 6) i dva vrsti *S. ferax* (oznake: BF6 i Z12, klaster 4).



**Slika 13.** Primjer kromatograma u programu GeneStudio (GeneStudio, Inc.) na kojem je prikazan slijed nukleotida ITS-regije izolata Z14 (*Saprolegnia delica*).



**Slika 14.** Filogenetsko stablo načinjeno na temelju ITS-regije gena koji kodira za 5.8S rRNA vrste *S. parasitica* i još 22 različite vrste roda *Saprolegnia*, zatim vrsta *Leptolegnia* sp., *Protoachlya paradoxa*, *Achlya caroliniana* i *Aphanomyces astaci* (Sandoval-Sierra i sur., 2013), te izolata iz ribnjaka Ritterman. Znak „+“ pored naziva mikroorganizama predstavlja pozitivan, a znak „-“ negativan rezultat PCR-testa za detekciju vrste *S. parasitica* opisanog u Poglavlju 4.5. Na mjestima grananja prikazane su pouzdanosti grananja.

## 4.2. Kreiranje parova oligonukleotida

Prvi korak u razvoju PCR-testa za detekciju patogena pastrve *Saprolegnia parasitica* bio je kreiranje oligonukleotida koji specifično umnažaju dijelove ITS-regije 5.8S rRNA gena vrste *Saprolegnia parasitica*.

U tu je svrhu prvo napravljena bioinformatička analiza poznatih nukleotidnih sljedova ITS-regije vrste *S. parasitica* (12 nukleotidnih sljedova) i još 22 različite vrste roda *Saprolegnia*: *S. diclina* (4 nukleotidna slijeda), *S. sp. (1)* (2 nukleotidna slijeda), *S. ferax* (2 nukleotidna slijeda), *S. australis* (2 nukleotidna slijeda), *S. delica* (2 nukleotidna slijeda), *S. litoralis* (1 nukleotidni slijed), *S. sp. (2)* (6 nukleotidnih sljedova), *S. sp. (3)* (1 nukleotidni slijed), *S. subterranea* (1 nukleotidni slijed), *S. torulosa* (1 nukleotidni slijed), *S. monilifera* (2 nukleotidna slijeda), *S. terrestris* (2 nukleotidna slijeda), *S. eccentrica* (2 nukleotidna slijeda), *S. sp. (4)* (1 nukleotidni slijed), *S. furcata* (1 nukleotidni slijed), *S. sp. (5)* (4 nukleotidna slijeda), *S. sp. (6)* (2 nukleotidna slijeda), *S. asterophora* (1 nukleotidni slijed), *S. sp. (7)* (1 nukleotidni slijed), *S. megasperma* (2 nukleotidna slijeda), *S. turfosa* (1 nukleotidni slijed), *S. anisospora* (1 nukleotidni slijed) te vrsta *Leptolegnia sp.* (1 nukleotidni slijed), *Protoachlya paradoxa* (1 nukleotidni slijed), *Achlya caroliniana* (1 nukleotidni slijed) i *Aphanomyces astaci* (1 nukleotidni slijed) (Sandoval-Sierra i sur., 2013). Vrste iz roda *Saprolegnia* odabrane su tako da pokrivaju različite filogenetske skupine (klasteri 1 – 23) opisane u znanstvenom radu Sandoval-Sierra i sur. (2013). U konstruiranom višestrukom sravnjenju nukleotidnih sljedova (Dodatak 1.) odabrani su dijelovi koji su specifični za vrstu *Saprolegnia parasitica*, odnosno koji se razlikuju između *S. parasitica* i drugih vrsta iz roda *Saprolegnia* te filogenetski udaljenijih oomiceta. Na temelju tih dijelova sravnjenja kreirani su oligonukleotidi jedinstveni za vrstu *S. parasitica* (Tablica 5.).



**Tablica 5.** Segmenti višestrukog sravnjenja ITS-nukleotidnih sljedova vrsta iz roda *Saprolegnia* i drugih vrsta oomiceta. Dijelovi višestrukog sravnjenja specifični za ciljnu vrstu *S. parasitica*, temeljem kojih su kreirani oligonukleotidi, označeni su narančastim okvirom. Plavom bojom označene su nukleotidne baze koje se unutar određenog stupca u sravnjenju razlikuju između *S. parasitica* i drugih vrsta mikroorganizama. Čitavo višestruko sravnjenje nukleotidnih sljedova nalazi se u Dodatku 1.

a) uzvodni oligonukleotid 333F,

Mikroorganizam	Acc. No.*	Oligonukleotid 333F (položaj 333 – 361)
<i>Saprolegnia diclina</i>	KF717745	CAA ACTTGTTCA TTTCTTGA-T GGAATG
<i>Saprolegnia diclina</i>	KF717795	CAA ACTTGTTCA TTTCTTGA-T GGAATG
<i>Saprolegnia diclina</i>	KF717797	CAA ACTTGTTCA TTTCTTGA-T GGAATG
<i>Saprolegnia diclina</i>	KF717816	CAA ACTTGTTCA TTTCTTGA-T GGAATG
<i>Saprolegnia</i> sp. (1)	KF717835	CAA CTTGTTCA TTTCTTGATT GGGATG
<i>Saprolegnia</i> sp. (1)	KF717836	CAA CTTGTTCA TTTCTTGATT GGGATG
<i>Saprolegnia parasitica</i>	KF717839	CAA ACTTGTTCA TTTCTTGATT GGGATG
<i>Saprolegnia parasitica</i>	KF717842	CAA ACTTGTTCA TTTCTTGATT GGGATG
<i>Saprolegnia parasitica</i>	KF717846	CAA ACTTGTTCA TTTCTTGATT GGGATG
<i>Saprolegnia parasitica</i>	KF717854	CAA ACTTGTTCA TTTCTTGATT GGGATG
<i>Saprolegnia parasitica</i>	KF717855	CAA ACTTGTTCA TTTCTTGATT GGGATG
<i>Saprolegnia parasitica</i>	KF717860	CAA ACTTGTTCA TTTCTTGATT GGGATG
<i>Saprolegnia parasitica</i>	KF717863	CAA ACTTGTTCA TTTCTTGATT GGGATG
<i>Saprolegnia parasitica</i>	KF717864	CAA ACTTGTTCA TTTCTTGATT GGGATG
<i>Saprolegnia parasitica</i>	KF717867	CAA ACTTGTTCA TTTCTTGATT GGGATG
<i>Saprolegnia parasitica</i>	KF717869	CAA ACTTGTTCA TTTCTTGATT GGGATG
<i>Saprolegnia parasitica</i>	KF717870	CAA ACTTGTTCA TTTCTTGATT GGGATG
<i>Saprolegnia parasitica</i>	KF717872	CAA ACTTGTTCA TTTCTTGATT GGGATG
<i>Saprolegnia ferax</i>	KF717883	CAA CTTGTTCA TTTCTTGATT GAGATG
<i>Saprolegnia ferax</i>	KF717958	CAA CTTGTTCA TTTCTTGATT GAGATG
<i>Saprolegnia australis</i>	KF717972	CAA CTTGTTCA TTTCTTGA-T GGTITG
<i>Saprolegnia australis</i>	KF717974	CAA CTTGTTCA TTTCTTGA-T GGTITG
<i>Saprolegnia delicata</i>	KF718021	CAA CTTGTTCA TTTCTTGA-T GGTATG
<i>Saprolegnia delicata</i>	KF718022	CAA CTTGTTCA TTTCTTGA-T GGTATG
<i>Saprolegnia litoralis</i>	KF718048	CAA CTTGTTCA TTTCTTCACT GGGATG
<i>Saprolegnia</i> sp. (2)	KF718049	CAA CTTGTTCA TTTTCAA- - - - -TG
<i>Saprolegnia</i> sp. (2)	KF718050	CAA CTTGTTCA TTTTCAA- - - - -TG
<i>Saprolegnia</i> sp. (2)	KF718055	CAA CTTGTTCA TTTTCAA- - - - -TG
<i>Saprolegnia</i> sp. (2)	KF718065	CAA CTTGTTCA TTTTCAA- - - - -TG
<i>Saprolegnia</i> sp. (2)	KF718071	CAA CTTGTTCA TTTTCAA- - - - -TG
<i>Saprolegnia</i> sp. (2)	KF718099	CAA CTTGTTCA TTTTCAA- - - - -TG
<i>Saprolegnia</i> sp. (3)	KF718122	CAA ACTTGTTCA TTTTGCAA- - - - -TG
<i>Saprolegnia subterranea</i>	KF718124	CAA ACTTGTTCA TTTCTTCAAG GGGATG
<i>Saprolegnia torulosa</i>	KF718125	CAA AATTGTTCA TTTCTTCAAT GAGATG
<i>Saprolegnia monilifera</i>	KF718130	CAA AATTGTTCA TTTCTTCAAT GAGATG
<i>Saprolegnia monilifera</i>	KF718131	CAA AATTGTTCA TTTCTTCAAT GAGATG
<i>Saprolegnia terrestris</i>	KF718134	CAA AATTGTTTA TTTCTTCAAT GAAATG
<i>Saprolegnia terrestris</i>	KF718135	CAA AATTGTTTA TTTCTTCAAT GAAATG
<i>Saprolegnia eccentrica</i>	KF718140	CAA AGTTGTTCA TTTATT- - - - -TG
<i>Saprolegnia eccentrica</i>	KF718141	CAA AGTTGTTCA TTTATT- - - - -TG
<i>Saprolegnia</i> sp. (4)	KF718142	CAA AATTGTTCA TTTATT- - - - -TG
<i>Saprolegnia furcata</i>	KF718143	CAA AATTGTTCA TTTT- - - - -TG
<i>Saprolegnia</i> sp. (5)	KF718144	CAA ACTTGTTCA TTTATT- - - - -TG
<i>Saprolegnia</i> sp. (5)	KF718146	CAA ACTTGTTCA TTTATT- - - - -TG
<i>Saprolegnia</i> sp. (5)	KF718152	CAA ACTTGTTCA TTTATT- - - - -TG
<i>Saprolegnia</i> sp. (5)	KF718156	CAA ACTTGTTCA TTTATT- - - - -TG
<i>Saprolegnia</i> sp. (6)	KF718174	CAA ACTTGTTCA TTTATT- - - - -TG
<i>Saprolegnia</i> sp. (6)	KF718177	CAA ACTTGTTCA TTTATT- - - - -TG
<i>Saprolegnia asterophora</i>	KF718178	CAA ACTTGTTCA TTTATT- - - - -TG
<i>Saprolegnia</i> sp. (7)	KF718179	CAA ACTTGTTCA TTTATT- - - - -TG
<i>Saprolegnia megasperma</i>	KF718186	CAA AATTGTTCA TTTATT- - - - -TG
<i>Saprolegnia megasperma</i>	KF718187	CAA AATTGTTCA TTTATT- - - - -TG
<i>Saprolegnia turfosa</i>	KF718190	CAA AATTGTTCA TTTA- - - - -TG
<i>Saprolegnia anisospora</i>	KF718192	CAA AATTGTTCA TTTA- - - - -TG
<i>Leptolegnia</i> sp.	KF718185	CAA AATTGTTCA TTTATT- - - - -TG
<i>Protoachlya paradoxa</i>	KF718202	CAA AATTGTTT CTTTTG- - - - -GA
<i>Achlya caroliniana</i>	KF718203	CAA ACC AATTGTTCA TTTATT- - - - -TG
<i>Aphanomyces astaci</i>	KF718204	CAA AATTGTTT TCTTTGGA- - - - -CG

\*Acc. No. – eng. accession number.

b) nizvodni oligonukleotidi 567R i 590R.

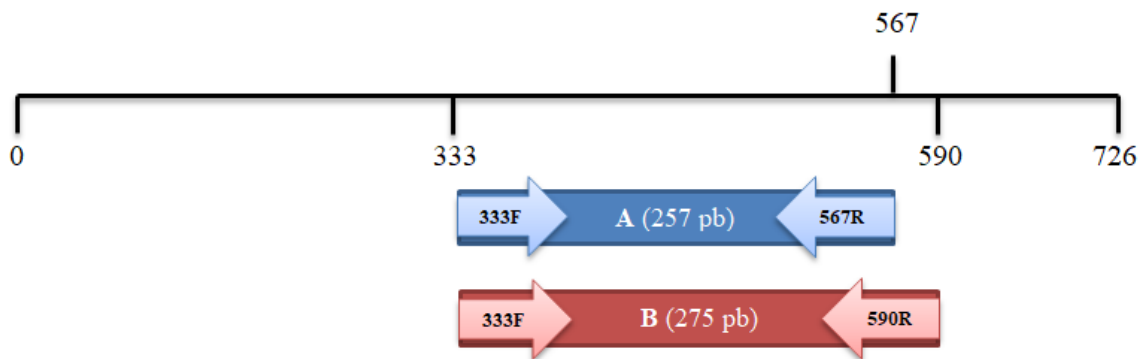
Mikroorganizam	Acc. No.*	Oligonukleotid 567R (položaj 567 – 590)	Oligonukleotid 590R (položaj 590 – 608)
<i>Saprolegnia diclina</i>	KF717745	GCGAGTCTG- TTGT <b>TTAAGC</b> ACGG	GGCGCG TAAGGGGA-- GTAGG
<i>Saprolegnia diclina</i>	KF717795	GCGAGTCTG- TTGT <b>TTAAGC</b> ACGG	GGCGCG TAAGGGGA-- GTAGG
<i>Saprolegnia diclina</i>	KF717797	GCGAGTCTG- TTGT <b>TCAAGC</b> ACGG	GGCGCG TAAGGGGA-- GTAGG
<i>Saprolegnia diclina</i>	KF717816	GCGAGTCTG- TTGT <b>TCAAGC</b> ACGG	GGCGCG TAAGGGGA-- GTAGG
<i>Saprolegnia</i> sp. (1)	KF717835	GCGAGTCTG- TTGT <b>TTAAGC</b> ACGG	GGCGCG TAAGGGGA-- <b>G</b> CAGG
<i>Saprolegnia</i> sp. (1)	KF717836	GCGAGTCTG- TTGT <b>TTAAGC</b> ACGG	GGCGCG TAAGGGGA-- <b>G</b> CAGG
<i>Saprolegnia parasitica</i>	KF717839	GCGAGTCTG- TTGTCAAAGT ACAA	GGCAGC TAAGGRGA-- GTTGG
<i>Saprolegnia parasitica</i>	KF717842	GCGAGTCTG- TTGTCAAAGT ACAA	GGCAGC TAAGGRGA-- GTTGG
<i>Saprolegnia parasitica</i>	KF717846	GCGAGTCTG- TTGTCAAAGT ACAA	GGCAGC TAAGGRGA-- GTTGG
<i>Saprolegnia parasitica</i>	KF717854	GCGAGTCTG- TTGTCAAAGT ACAA	GGCAGC TAAGGRGA-- GTTGG
<i>Saprolegnia parasitica</i>	KF717855	GCGAGTCTG- TTGTCAAAGT ACAA	GGCAGC TAAGGRGA-- GTTGG
<i>Saprolegnia parasitica</i>	KF717860	GCGAGTCTG- TTGTCAAAGT ACAA	GGCAGC TAAGGRGA-- GTTGG
<i>Saprolegnia parasitica</i>	KF717863	GCGAGTCTG- TTGTCAAAGT ACAA	GGCAGC TAAGGRGA-- GTTGG
<i>Saprolegnia parasitica</i>	KF717864	GCGAGTCTG- TTGTCAAAGT ACAG	GGCAGC TAAGGRGA-- GTTGG
<i>Saprolegnia parasitica</i>	KF717867	GCGAGTCTG- TTGTCAAAGT ACAG	GGCAGC TAAGGRGA-- GTTGG
<i>Saprolegnia parasitica</i>	KF717869	GCGAGTCTG- TTGTCAAAGT ACAG	GGCAGC TAAGGRGA-- GTTGG
<i>Saprolegnia parasitica</i>	KF717870	GCGAGTCTG- TTGTCAAAGT ACAG	GGCAGC TAAGGRGA-- GTTGG
<i>Saprolegnia parasitica</i>	KF717872	GCGAGTCTG- TTGTCAAAGT ACAG	GGCAGC TAAGGRGA-- GTTGG
<i>Saprolegnia ferax</i>	KF717883	GCGAGTCTG- TTGT <b>TTAAGC</b> ACAG	<b>G</b> ACAGC TAAGG <b>A</b> GA-- <b>G</b> T <b>G</b> AG
<i>Saprolegnia ferax</i>	KF717958	GCGAGTCTG- TTGT <b>TTAAGC</b> ACAG	<b>G</b> ACAGC TAAGG <b>A</b> GA-- <b>G</b> T <b>G</b> AG
<i>Saprolegnia australis</i>	KF717972	GCGAG <b>G</b> CTG- TTGT <b>TTAAGC</b> ACAG	GGCAGC TAAG <b>T</b> GGA-- <b>G</b> T <b>A</b> GG
<i>Saprolegnia australis</i>	KF717974	GCGAG <b>G</b> CTG- TTGT <b>TTAAGC</b> ACAG	GGCAGC TAAG <b>T</b> GGA-- <b>G</b> T <b>A</b> GG
<i>Saprolegnia delica</i>	KF718021	GCGAGTCTG- TTGT <b>TTAAGC</b> ACAG	GGCAGC TAAGGGGA-- <b>G</b> T <b>A</b> GG
<i>Saprolegnia delica</i>	KF718022	GCGAGTCTG- TTGT <b>TTAAGC</b> ACAG	GGCAGC TAAGG <b>A</b> GA-- <b>G</b> T <b>A</b> GG
<i>Saprolegnia litoralis</i>	KF718048	GCGAG <b>G</b> CTG <b>T</b> TT <b>G</b> CG <b>C</b> GA <b>T</b> <b>G</b> CAA	<b>A</b> GG <b>C</b> G TAAGG <b>A</b> GA-- <b>G</b> T <b>G</b> T <b>G</b>
<i>Saprolegnia</i> sp. (2)	KF718049	GCGAGTCTG- TTGT <b>TTAAGC</b> <b>C</b> CAG	<b>G</b> AC <b>C</b> G <b>T</b> TT <b>C</b> G <b>A</b> GA-- <b>G</b> CT <b>T</b> G
<i>Saprolegnia</i> sp. (2)	KF718050	GCGAGTCTG- TTGT <b>TTAAGC</b> <b>C</b> CAG	GGCGCG <b>T</b> TT <b>C</b> G <b>A</b> GA-- <b>G</b> CT <b>T</b> G
<i>Saprolegnia</i> sp. (2)	KF718055	GCGAGTCTG- TTGT <b>TTAAGC</b> <b>C</b> CAG	<b>G</b> AC <b>C</b> G <b>T</b> TT <b>C</b> G <b>A</b> GA-- <b>G</b> CT <b>T</b> G
<i>Saprolegnia</i> sp. (2)	KF718065	GCGAGTCTG- TTGT <b>TTAAGC</b> <b>C</b> CAG	<b>G</b> AC <b>C</b> G <b>T</b> TT <b>C</b> G <b>A</b> GA-- <b>G</b> CT <b>T</b> G
<i>Saprolegnia</i> sp. (2)	KF718071	GCGAGTCTG- TTGT <b>TTAAGC</b> <b>C</b> CAG	<b>G</b> AC <b>C</b> G <b>T</b> TT <b>C</b> G <b>A</b> GA-- <b>G</b> CT <b>T</b> G
<i>Saprolegnia</i> sp. (2)	KF718099	GCGAGTCTG- TTGT <b>TTAAGC</b> <b>C</b> CAG	<b>G</b> AC <b>C</b> G <b>T</b> TT <b>C</b> G <b>A</b> GA-- <b>G</b> CT <b>T</b> G
<i>Saprolegnia</i> sp. (3)	KF718122	GCGAGTCTG- TTGT <b>TTAAGC</b> ACAA	GGCAGC <b>G</b> T <b>C</b> T <b>G</b> A <b>A</b> -- <b>G</b> CT <b>T</b> G
<i>Saprolegnia subterranea</i>	KF718124	GCGAG <b>G</b> T <b>C</b> G- <b>G</b> T <b>G</b> CT <b>G</b> G <b>A</b> A <b>G</b> <b>G</b> CAA	GGCAGC <b>G</b> G <b>A</b> T <b>G</b> G <b>A</b> -- <b>G</b> T <b>A</b> T <b>G</b>
<i>Saprolegnia torulosa</i>	KF718125	GCGAG <b>G</b> T <b>T</b> G- TTGT <b>C</b> A <b>G</b> A <b>G</b> <b>G</b> CAA	<b>G</b> A <b>T</b> G <b>C</b> G <b>G</b> A <b>C</b> T <b>A</b> A <b>A</b> -- <b>T</b> T <b>G</b> T <b>G</b>
<i>Saprolegnia monilifera</i>	KF718130	GCGAG <b>G</b> T <b>T</b> G- TTGT <b>C</b> A <b>G</b> A <b>G</b> <b>G</b> CAA	<b>G</b> A <b>T</b> G <b>C</b> G <b>G</b> A <b>T</b> T <b>A</b> A <b>A</b> -- <b>T</b> T <b>G</b> T <b>G</b>
<i>Saprolegnia monilifera</i>	KF718131	GCGAG <b>G</b> T <b>T</b> G- TTGT <b>C</b> A <b>G</b> A <b>G</b> <b>G</b> CAA	<b>G</b> A <b>T</b> G <b>C</b> G <b>G</b> A <b>A</b> T <b>A</b> A <b>A</b> -- <b>T</b> T <b>G</b> T <b>G</b>
<i>Saprolegnia terrestris</i>	KF718134	GCGAG <b>G</b> T <b>T</b> G- TTGT <b>T</b> A <b>G</b> A <b>G</b> <b>G</b> CAA	<b>G</b> A <b>T</b> G <b>C</b> G <b>A</b> A <b>A</b> T <b>A</b> A <b>A</b> -- <b>T</b> T <b>A</b> T <b>G</b>
<i>Saprolegnia terrestris</i>	KF718135	GCGAG <b>G</b> T <b>T</b> G- TTGT <b>T</b> A <b>G</b> A <b>G</b> <b>G</b> CAA	<b>G</b> A <b>T</b> G <b>C</b> G <b>A</b> A <b>A</b> T <b>A</b> A <b>A</b> -- <b>T</b> T <b>A</b> T <b>G</b>
<i>Saprolegnia eccentrica</i>	KF718140	<b>G</b> A <b>G</b> A <b>G</b> A <b>T</b> T <b>G</b> - TT <b>G</b> C <b>T</b> G <b>G</b> A <b>A</b> G <b>G</b> CAA	<b>G</b> A <b>T</b> G <b>C</b> G <b>G</b> A <b>G</b> T <b>C</b> G <b>A</b> G-- <b>T</b> T <b>G</b> T <b>T</b>
<i>Saprolegnia eccentrica</i>	KF718141	<b>G</b> A <b>G</b> A <b>G</b> A <b>T</b> T <b>G</b> - TT <b>G</b> C <b>T</b> G <b>G</b> A <b>A</b> G <b>G</b> CAA	<b>G</b> A <b>T</b> G <b>C</b> G <b>G</b> A <b>G</b> T <b>C</b> G <b>A</b> G-- <b>T</b> T <b>G</b> T <b>T</b>
<i>Saprolegnia</i> sp. (4)	KF718142	<b>G</b> A <b>G</b> A <b>G</b> A <b>T</b> T <b>G</b> - TT <b>G</b> C <b>T</b> G <b>G</b> A <b>A</b> G <b>G</b> CAA	<b>G</b> A <b>T</b> G <b>C</b> G <b>G</b> A <b>G</b> T <b>T</b> G <b>A</b> G-- <b>T</b> T <b>A</b> T <b>C</b>
<i>Saprolegnia furcata</i>	KF718143	<b>G</b> A <b>G</b> A <b>G</b> A <b>T</b> T <b>G</b> - TT <b>A</b> C <b>T</b> G <b>G</b> A <b>A</b> G <b>G</b> CAG	<b>G</b> A <b>T</b> G <b>C</b> G <b>A</b> G <b>T</b> C <b>G</b> A <b>A</b> T-- <b>T</b> T <b>G</b> T <b>T</b>
<i>Saprolegnia</i> sp. (5)	KF718144	<b>G</b> A <b>C</b> G <b>G</b> T <b>T</b> G- T <b>G</b> C <b>G</b> G <b>A</b> A <b>G</b> <b>G</b> CAG	<b>G</b> A <b>T</b> T <b>G</b> G <b>A</b> - <b>G</b> T <b>T</b> G <b>T</b> A-- <b>T</b> T <b>T</b> T <b>A</b>
<i>Saprolegnia</i> sp. (5)	KF718146	<b>G</b> A <b>C</b> G <b>G</b> T <b>T</b> G- T <b>G</b> C <b>G</b> G <b>A</b> A <b>G</b> <b>G</b> CAG	<b>G</b> A <b>T</b> T <b>G</b> G <b>A</b> A <b>G</b> T <b>T</b> G <b>T</b> A-- <b>T</b> T <b>T</b> T <b>A</b>
<i>Saprolegnia</i> sp. (5)	KF718152	<b>G</b> A <b>C</b> G <b>G</b> T <b>T</b> G- T <b>G</b> C <b>G</b> G <b>A</b> A <b>G</b> <b>G</b> CAG	<b>G</b> A <b>T</b> T <b>G</b> G <b>A</b> G <b>G</b> T <b>T</b> G <b>T</b> A-- <b>T</b> T <b>T</b> T <b>A</b>
<i>Saprolegnia</i> sp. (5)	KF718156	<b>G</b> A <b>C</b> G <b>G</b> T <b>T</b> G- T <b>G</b> C <b>G</b> G <b>A</b> A <b>G</b> <b>G</b> CAG	<b>G</b> A <b>T</b> T <b>G</b> G <b>A</b> A <b>G</b> T <b>T</b> G <b>T</b> A-- <b>T</b> T <b>T</b> T <b>A</b>
<i>Saprolegnia</i> sp. (6)	KF718174	<b>G</b> A <b>A</b> G <b>A</b> G <b>T</b> T <b>G</b> - Y <b>G</b> G <b>C</b> G <b>G</b> A <b>A</b> G <b>T</b> <b>G</b> TAG	<b>A</b> A <b>T</b> G <b>G</b> G <b>A</b> G <b>G</b> T <b>T</b> G <b>A</b> A-- <b>T</b> A <b>G</b> T <b>A</b>
<i>Saprolegnia</i> sp. (6)	KF718177	<b>G</b> A <b>A</b> G <b>A</b> G <b>T</b> T <b>G</b> - C <b>G</b> G <b>C</b> G <b>G</b> A <b>A</b> G <b>T</b> <b>G</b> TAG	<b>A</b> A <b>T</b> G <b>G</b> G <b>A</b> G <b>G</b> T <b>T</b> G <b>A</b> A-- <b>T</b> A <b>G</b> T <b>A</b>
<i>Saprolegnia asterophora</i>	KF718178	<b>G</b> A <b>T</b> G <b>G</b> T <b>T</b> G- C <b>G</b> G <b>C</b> G <b>G</b> A <b>A</b> G <b>T</b> <b>G</b> CAG	<b>G</b> A <b>T</b> T <b>G</b> G <b>A</b> G <b>G</b> T <b>T</b> G <b>A</b> A-- <b>T</b> A <b>G</b> T <b>A</b>
<i>Saprolegnia</i> sp. (7)	KF718179	<b>G</b> A <b>T</b> G <b>G</b> T <b>T</b> G- C <b>G</b> G <b>C</b> G <b>G</b> A <b>A</b> G <b>T</b> <b>G</b> CAG	<b>G</b> A <b>T</b> T <b>G</b> G <b>A</b> G <b>G</b> T <b>T</b> G <b>A</b> A-- <b>T</b> A <b>G</b> T <b>A</b>
<i>Saprolegnia megasperma</i>	KF718186	<b>G</b> A <b>G</b> A <b>G</b> T <b>T</b> G- <b>G</b> T <b>A</b> C <b>T</b> G <b>G</b> A <b>A</b> G <b>G</b> CAA	<b>G</b> A <b>T</b> G <b>C</b> G <b>T</b> T <b>T</b> T <b>C</b> A <b>A</b> A-- <b>T</b> A <b>G</b> T <b>A</b>
<i>Saprolegnia megasperma</i>	KF718187	<b>G</b> A <b>G</b> A <b>G</b> T <b>T</b> G- <b>G</b> T <b>A</b> C <b>T</b> G <b>G</b> A <b>A</b> G <b>G</b> CAA	<b>G</b> A <b>T</b> G <b>C</b> G <b>T</b> T <b>T</b> T <b>C</b> A <b>A</b> A-- <b>T</b> A <b>G</b> T <b>A</b>
<i>Saprolegnia turfosa</i>	KF718190	<b>G</b> A <b>T</b> G <b>G</b> T <b>T</b> G- <b>G</b> T <b>A</b> C <b>T</b> T <b>G</b> A <b>A</b> G <b>G</b> CAA	<b>G</b> A <b>T</b> G <b>C</b> G <b>T</b> T <b>G</b> T <b>T</b> G <b>A</b> A-- <b>T</b> A <b>A</b> T <b>A</b>
<i>Saprolegnia anisospora</i>	KF718192	<b>G</b> A <b>G</b> A <b>G</b> T <b>T</b> G- <b>A</b> T <b>G</b> C <b>T</b> A <b>G</b> A <b>G</b> <b>A</b> CA <b>T</b>	<b>G</b> A <b>T</b> G <b>C</b> G <b>A</b> T <b>C</b> T <b>C</b> G <b>A</b> A-- <b>T</b> A <b>G</b> T <b>A</b>
<i>Leptolegnia</i> sp.	KF718185	<b>G</b> A <b>C</b> G <b>A</b> T <b>T</b> T <b>G</b> - <b>G</b> T <b>G</b> - <b>T</b> G <b>A</b> C <b>G</b> C <b>G</b> CAG	<b>G</b> A <b>T</b> T <b>C</b> G <b>A</b> T <b>T</b> T <b>T</b> G <b>A</b> A-- <b>-</b> T <b>G</b> T <b>A</b>
<i>Protoachlya paradoxa</i>	KF718202	<b>G</b> C <b>G</b> T <b>G</b> T <b>T</b> G- TT <b>G</b> T <b>C</b> <b>G</b> A <b>G</b> C <b>A</b> T <b>G</b>	<b>A</b> A <b>T</b> G <b>C</b> G <b>T</b> T <b>G</b> T <b>A</b> G <b>A</b> G <b>T</b> - <b>T</b> G <b>T</b> C <b>T</b>
<i>Achlya caroliniana</i>	KF718203	<b>T</b> A <b>G</b> A <b>T</b> G <b>T</b> G <b>T</b> - <b>G</b> T <b>A</b> T <b>T</b> G <b>A</b> A <b>G</b> T <b>A</b> T <b>G</b> A	<b>A</b> A <b>T</b> A <b>A</b> G <b>G</b> A <b>G</b> T <b>T</b> T <b>A</b> T <b>A</b> A <b>T</b> G <b>A</b> T <b>A</b>
<i>Aphanomyces astaci</i>	KF718204	<b>A</b> A <b>G</b> A <b>G</b> T <b>T</b> T <b>G</b> - <b>G</b> T <b>A</b> G <b>T</b> T <b>G</b> A <b>A</b> G <b>G</b> CAG	<b>A</b> A <b>T</b> G <b>C</b> G <b>G</b> A <b>G</b> T <b>C</b> G <b>A</b> A-- <b>T</b> A <b>G</b> T <b>A</b>

Acc. No. – eng. accession number.

Odabrana su ukupno tri oligonukleotida, jedan uzvodni (333F) (Tablica 5a.) i dva nizvodna (567R i 590R) (Tablica 5b.), kojima se mogu umnožiti dva različita PCR-produkta. Pri kombiniranju parova oligonukleotida vođeno je računa o tome da se predviđene T<sub>m</sub>-

vrijednosti parova oligonukleotida ne razlikuju više od nekoliko Celzijevih stupnjeva (°C), kako bi se u naknadnim PCR-reakcijama lakše dobila optimalna temperatura komplementarnog sparivanja oba oligonukleotida na DNA-kalup (Dieffenbach i sur., 1993).

Na Slici 15. nalazi se shematski prikaz kreiranih parova oligonukleotida A i B na kojem su označeni uzvodni i nizvodni oligonukleotidi pojedinog para te očekivane veličine produkata.

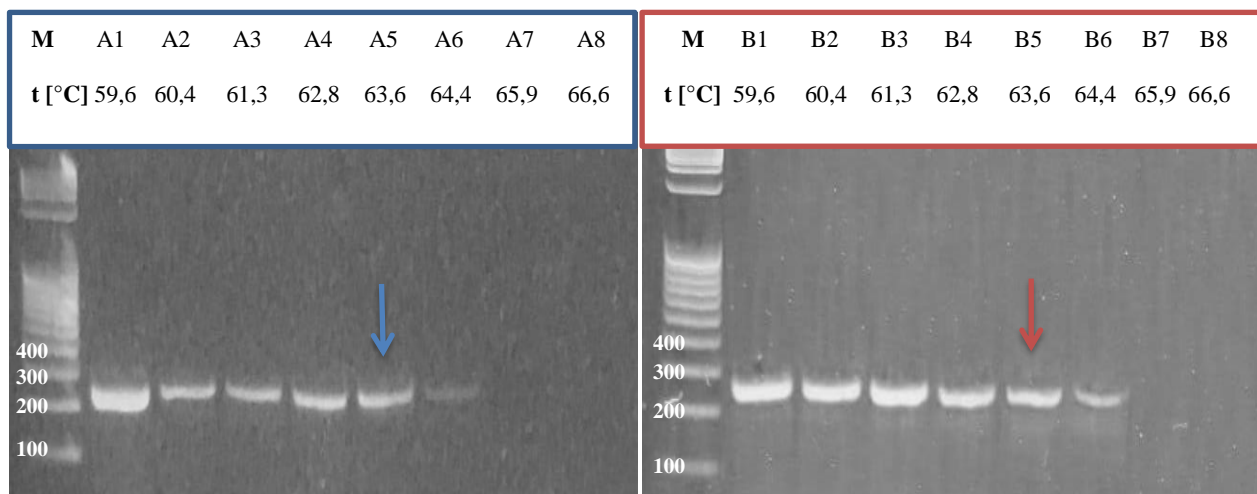


**Slika 15.** Shematski prikaz kreiranih oligonukleotida i veličina njihovih produkata (navedene u zagradama). Crna linija označava ITS-regiju 5.8S rRNA gena vrste *Saprolegnia parasitica*. Plavom bojom označen je par oligonukleotida A, a crvenom B.

#### 4.3. Utvrđivanje optimalne temperature komplementarnog sparivanja za kreirane parove oligonukleotida

U svrhu određivanja optimalne temperature komplementarnog sparivanja svakog para oligonukleotida tijekom umnažanja željenih fragmenata PCR-om, za svaki je par oligonukleotida testiran raspon temperatura komplementarnog sparivanja, kao što je prikazano na Slici 16. Određivanje optimalne temperature komplementarnog sparivanja oligonukleotida od izrazite je važnosti za uspješno provođenje PCR-reakcije. Naime, ako je temperatura komplementarnog sparivanja previsoka, parovi oligonukleotida će slabo prijanjati i prinos neće biti zadovoljavajući. Nasuprot tome, preniska temperatura komplementarnog sparivanja uzrokovat će nespecifično sparivanje oligonukleotida s DNA-kalupom i umnažanje nespecifičnih fragmenata DNA.

Optimalna temperatura komplementarnog sparivanja oligonukleotida je najviša temperatura pri kojoj se amplifikacija uspješno odvija. Iz Slike 16. je vidljivo da je optimalna temperatura komplementarnog sparivanja za oba para oligonukleotida oko 64 °C i da dobivene veličine fragmenata odgovaraju očekivanim veličinama za svaki par oligonukleotida („A“ – 257 pb i „B“ – 275 pb).

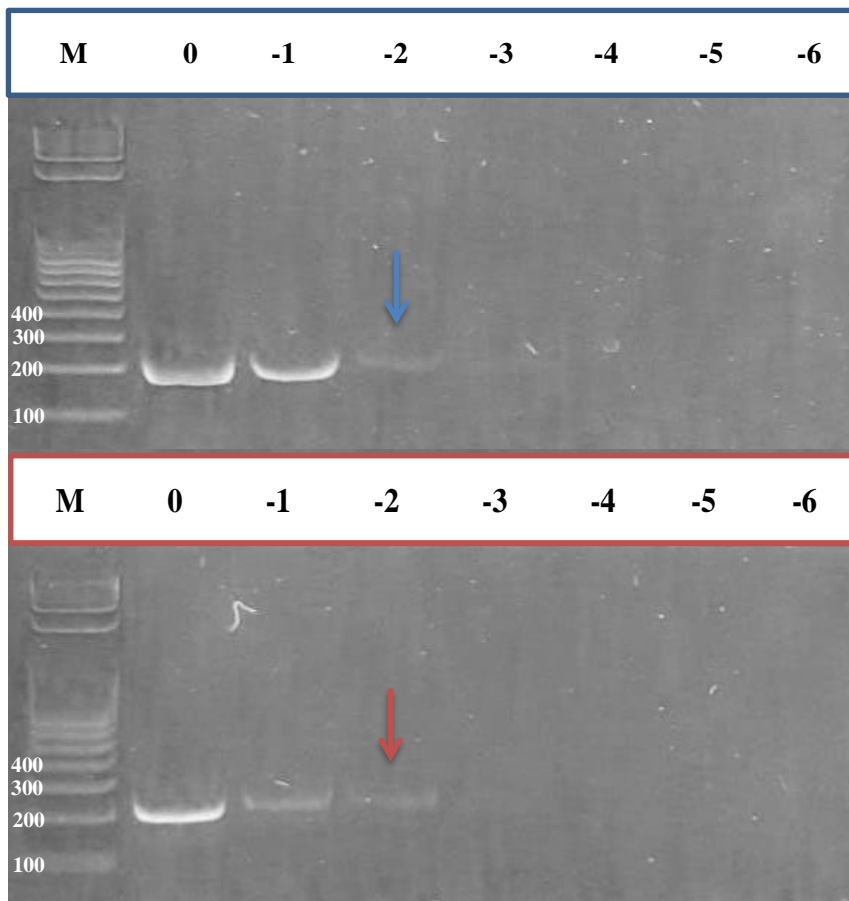


**Slika 16.** Određivanje optimalne temperature vezanja svakog para oligonukleotida.

**M:** molekularni standard SimplyLoad™ Tandem DNA ladder (Lonza, Švicarska). Za oba para oligonukleotida („A“ – označeno plavom strelicom (lijevo) i „B“ – označeno crvenom strelicom (desno)) optimalna temperatura iznosila je 63,6 °C, odnosno približno 64 °C. Na gel je nanoseno po 2 µL PCR-produkata.

#### 4.4. Određivanje donje granice osjetljivosti kreiranih parova oligonukleotida

Kako bi se utvrdila najmanja količina genomske DNA vrste *Saprolegnia parasitica* koja se može detektirati, provedene su PCR-reakcije s različitom količinom DNA-kalupa – od 1 ng do 1 fg u reakcijskoj smjesi (Slika 17.). Pritom je kod oba para ispitivanih oligonukleotida (A i B) intenzitet vrpce opadao sa smanjenjem količine genomske DNA. Donja granica osjetljivosti za oba para oligonukleotida bila je 10 pg.



**Slika 17.** Određivanje donje granice osjetljivosti parova oligonukleotida A (gornja slika; označeno plavom bojom) i B (donja slika; označeno crvenom bojom). **M:** molekularni standard SimplyLoad™ Tandem DNA ladder (Lonza, Švicarska). U kolonama od 0 do -6 prikazani su PCR-produkti dobiveni s različitim količinama genomske DNA vrste *Saprolegnia parasitica* u reakciji: **0** (1 ng); **-1** (100 pg); **-2** (10 pg); **-3** (1 pg); **-4** (100 fg); **-5** (10 fg); **-6** (1 fg). Na gel je nanoseno po 2  $\mu$ L PCR-produkata.

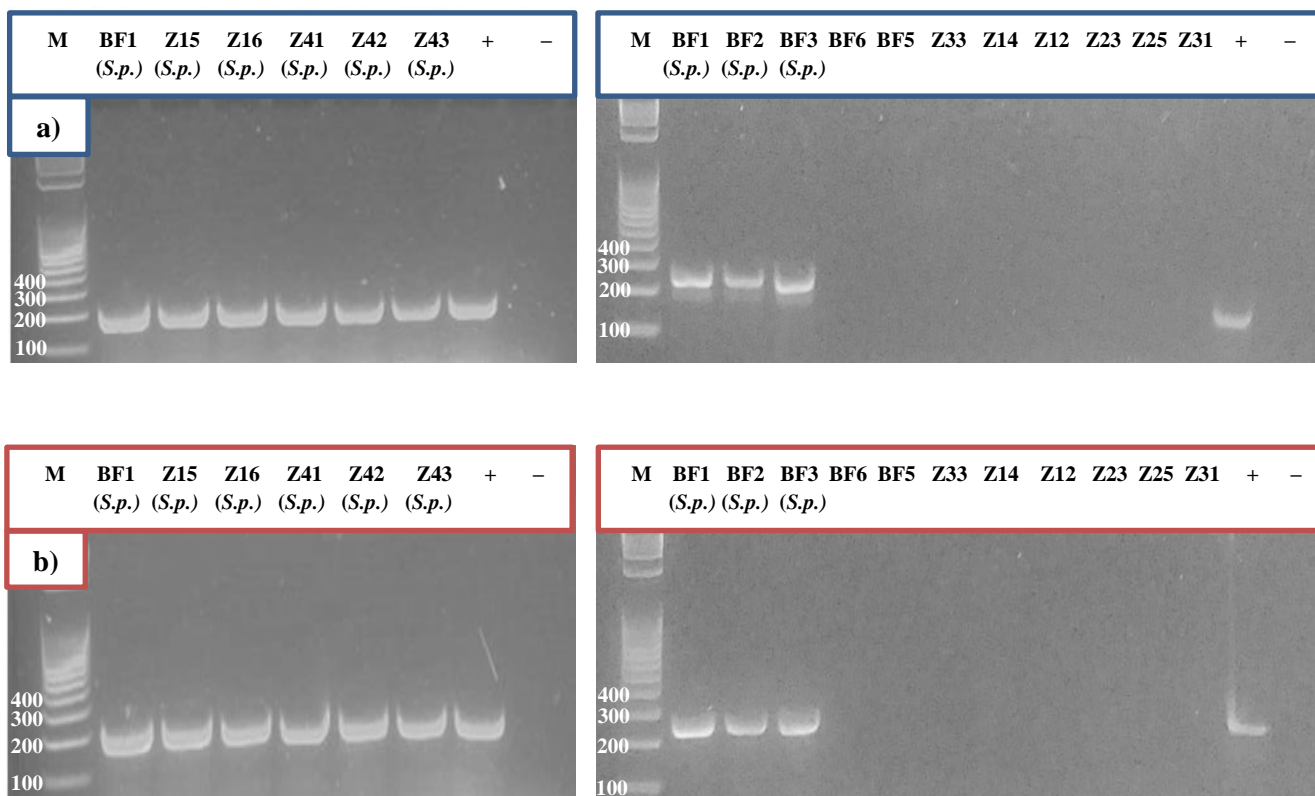
#### 4.5. Određivanje specifičnosti parova oligonukleotida

U svrhu ispitivanja specifičnosti kreiranih parova oligonukleotida, provedeni su PCR-testovi s genomskom DNA različitih vrsta oomiceta iz roda *Saprolegnia* sakupljenih u ribnjaku Ritterman kao kalupom (Tablica 6.). U Tablici 6. vidljivo je da su PCR-testovi svih vrsta *Saprolegnia parasitica* korištenih u ovom radu dali pozitivan rezultat s oba para oligonukleotida, dok je korištenjem genomske DNA drugih vrsta iz roda *Saprolegnia* rezultat bio negativan.

**Tablica 6.** Detekcija patogena *Saprolegnia parasitica* PCR-testom. Znak „+“ predstavlja pozitivan, a znak „-“ negativan rezultat PCR-testa.

Oznaka	Vrsta	Uzorak sakupljen sa zametka (A) ili iz vode (B)	PCR-test (par oligonukleotida A)	PCR-test (par oligonukleotida B)
<b>BF1</b>	<i>Saprolegnia parasitica</i>	A	+	+
<b>BF2</b>	<i>Saprolegnia parasitica</i>	A	+	+
<b>BF3</b>	<i>Saprolegnia parasitica</i>	A	+	+
<b>BF5</b>	<i>Saprolegnia delica</i>	A	-	-
<b>BF6</b>	<i>Saprolegnia ferax</i>	A	-	-
<b>Z12</b>	<i>Saprolegnia ferax</i>	B	-	-
<b>Z14</b>	<i>Saprolegnia delica</i>	B	-	-
<b>Z15</b>	<i>Saprolegnia parasitica</i>	B	+	+
<b>Z16</b>	<i>Saprolegnia parasitica</i>	B	+	+
<b>Z23</b>	<i>Saprolegnia australis</i>	B	-	-
<b>Z25</b>	<i>Saprolegnia australis</i>	B	-	-
<b>Z31</b>	<i>Saprolegnia australis</i>	B	-	-
<b>Z33</b>	<i>Saprolegnia delica</i>	B	-	-
<b>Z41</b>	<i>Saprolegnia parasitica</i>	B	+	+
<b>Z42</b>	<i>Saprolegnia parasitica</i>	B	+	+
<b>Z43</b>	<i>Saprolegnia parasitica</i>	B	+	+

Na Slici 18. prikazani su rezultati PCR-testa u prisutnosti odabranih uzoraka s parom oligonukleotida A (Slika 18a.) i s parom oligonukleotida B (Slika 18b.).



**Slika 18.** Rezultat PCR-testa za detekciju patogena *Saprolegnia parasitica* s parom oligonukleotida A (**a**) i s parom oligonukleotida B (**b**) korištenjem DNA različitih vrsta iz roda *Saprolegnia* kao kalupa. U prvom redu nalaze se oznake izolata, a u drugom redu su kraticom *S. p.* označeni izolati kod kojih je utvrđeno da se radi o vrsti *Saprolegnia parasitica* (ostale oznake izolata i puni nazivi vrsta na koje se te oznake odnose nalaze se u Tablici 6.). **M:** molekularni standard SimplyLoad™ Tandem DNA ladder (Lonza, Švicarska); „+“: pozitivna kontrola (genomska DNA tipskog soja patogena *S. parasitica*); „-“: negativna kontrola (dH<sub>2</sub>O). Na gel je nanoseno po 2 μL PCR-produkata.

## 5. RASPRAVA

Standardne metode izolacije i identifikacije mikroorganizama, temeljene na uzgoju u kulturi, imaju brojne nedostatke, prvenstveno dugotrajnost provođenja analize i posljedično nemogućnost pravovremene detekcije patogena u svrhu sprječavanja širenja bolesti (Lazcka i sur., 2007; Baron, 2011). Posljednjih dvadesetak godina, s razvojem molekularnih metoda, razvijaju se brojne nove visokoosjetljive molekularne metode za brzu detekciju patogena temeljene na metodi lančane reakcije polimerazom i drugim izvedenim metodama, poput kvantitativne lančane reakcije polimerazom (eng. *quantitative polymerase chain reaction* – qPCR) i LAMP (eng. *loop mediated isothermal amplification*). Ovakve su metode prvo primijenjene za detekciju patogena u humanoj medicini, a danas sve više pronalaze svoju primjenu u detekciji velikog broja okolišnih patogena (Girones i sur., 2010; Lévesque, 2011; Zeng i sur., 2018), što je i bio cilj ovog rada.

Patogene vrste oomiceta iz redova Peronosporales, Pythiales, Saprolegniales, Sclerosporales, Salilagenidiales i Leptomitales smatraju se ekološki značajnim biljnim i životinjskim okolišnim patogenima (Fry i Grünwald, 2010; McGowan i Fitzpatrick, 2017). Među oomicetama su tradicionalno najistraženiji biljni patogeni iz rodova *Peronospora*, *Phytophthora* i *Pythium*, pa je za njih razvijen niz molekularnih metoda detekcije (Fry i Grünwald, 2010). Primjerice, za detekciju patogena *Peronospora variabilis* razvijena je PCR-metoda, dok su za molekularnu detekciju vrsta *Phytophthora cactorum*, *Ph. citricola*, *Ph. kernoviae*, *Ph. nicotianae*, *Ph. quercina* i *Ph. sojae* te *Pythium ultimum* razvijene qPCR-metode detekcije (Lievens i sur., 2006; Schena i sur., 2006; Bienapfl i sur., 2011; Li i sur., 2013; Testen i sur., 2014). Životinjski patogeni oomiceti, poput onih iz rodova *Aphanomyces* i *Saprolegnia*, manje su istraženi, ali su i za neke od njih razvijene molekularne metode detekcije (Lévesque, 2011). Primjerice, za neke slatkovodne vrste iz roda *Aphanomyces* poput *A. astaci* (patogen slatkovodnih rakova) i *A. invadans* (patogen morskih i slatkovodnih vrsta riba) postoje metode detekcije bazirane na PCR-u i qPCR-u (Oidtmann i sur., 2006; Vandersea i sur., 2006; Vrålstad i sur., 2009; Earle i Hintz, 2014; Pavić i sur., 2019). Osim toga, Gachon i sur. (2009) razvili su qPCR-test za detekciju i kvantifikaciju vrste *Euychasma dicksonii*, oomicetnog patogena smeđih algi. Molekularne metode se već više godina masovno koriste u praćenju patogena *A. astaci* u okolišu i akvakulturi te su u potpunosti zamijenile raniju morfološku detekciju ove vrste (Cammà i sur., 2010; Jussila i sur., 2011; Kokko i sur., 2012; Filipová i sur., 2013; Kušar i sur., 2013; Maguire i sur., 2016; Svoboda i sur., 2017). Međutim, za vrstu *Saprolegnia parasitica* takvi testovi još nisu razvijeni, unatoč tome što se



radi o patogenoj vrsti koja uzrokuje velike štete u akvakulturi (Earle i Hintz, 2014). Razlog tome je najvjerojatnije to što taksonomija unutar roda *Saprolegnia* do nedavno (2013. godine) nije bila riješena te u bazama podataka postoji velik broj redoslijeda nukleotida ovog roda koji su svrstani u pogrešnu vrstu (Sandoval-Sierra i sur., 2013.). Stoga je cilj ovog rada bio po prvi put razviti PCR-test za brzu detekciju patogena *Saprolegnia parasitica*, uzročnika saprolegnioze.

Prvi korak u razvoju PCR-testa bio je odabir ciljne nukleotidne regije u genomu vrste *S. parasitica*, unutar koje će se odabrati sljedovi nukleotida specifični za tu vrstu. U ovom je radu kao ciljna regija korištena ITS-regija (eng. *internal transcribed spacer* – ITS) unutar gena koji kodira za 18S rRNA. Ova se regija najčešće koristi za molekularnu detekciju oomicetnih patogena na razini vrste (Oidtmann i sur., 2006; Schena i sur., 2006; Vrålstad i sur., 2009; Cammà i sur., 2010; Bienapfl i sur., 2011; Jussila i sur., 2011; Li i sur., 2013) te su za tu regiju dostupni brojni redoslijedi nukleotida u bazama podataka. Osim toga, temeljem ITS-regije su nedavno Sandoval-Sierra i suradnici (2013) revidirali sistematiku unutar roda *Saprolegnia*. Međutim, unutar višestrukog sravnjenja ITS-regije različitih oomiceta bilo je teško pronaći dovoljno duge redoslijede nukleotida specifične za vrstu *S. parasitica*. Primjerice, kreirani oligonukleotid 333F sadržava samo jedan nukleotid razlike od iste nukleotidne regije srodne vrste *Saprolegnia* sp. (1) te samo dva nukleotida razlike od vrsta *S. diclina* i *S. ferax*. To ukazuje na moguće probleme specifičnosti koje se u ovom radu pokušalo otkloniti povišenjem temperature komplementarnog sparivanja oligonukleotida na DNA-kalup do maksimalnih 64 °C. Iako su rezultati prikazani u ovom radu pokazali željenu specifičnost kreiranih parova oligonukleotida (tj. do amplifikacije je došlo samo kada je u reakciji bila prisutna genomska DNA vrste *S. parasitica*, a ne kada je kao kalup stavljena DNA vrsta *S. australis*, *S. delica* i *S. ferax*), bilo bi poželjno dodatno potvrditi specifičnost metode korištenjem genomske DNA filogenetski srodnih vrsta koje u ovom radu nisu bile dostupne (*S. diclina*, *Saprolegnia* sp. (1), *S. litoralis*, *S. torulosa* i *S. monilifera*). Također, u budućnosti bi bilo poželjno pronaći nove ciljne redoslijede nukleotida unutar kojih bi se detektiralo više razlika kod različitih vrsta roda *Saprolegnia* odnosno koji bi pokazali bolju razlučivost na razini vrste. Primjerice, donedavno su se za detekciju biljnog patogena *Pythium insidiosum* koristili dijelovi ITS-regije rDNA specifični za tu vrstu (Schurko i sur., 2003; Grooters i Gee, 2008). Međutim, zbog nedovoljne specifičnosti oligonukleotida za umnažanje ITS-regije, Keeratjarut i sur. (2015) razvili su qPCR-metodu za detekciju vrste *P. insidiosum* kod koje se za identifikaciju koriste specifični dijelovi regije gena koji kodira za ekso-1,3-β-

glukanazu. Također, u svrhu poboljšanja specifičnosti i skraćivanja vremena potrebnog za provedbu PCR-testa za detekciju životinjskog patogena *A. astaci*, razvijen je PCR-test s novim oligonukleotidima koji, za razliku od korištenih parova oligonukleotida specifičnih za ITS-regiju, specifično umnožavaju dijelove gena koji kodiraju za hitinaze CHI2 i CHI3 (Hochwimmer i sur., 2009).

U usporedbi s tim, osjetljivost PCR-testa za detekciju vrste *Aphanomyces astaci* iznosila je 100 fg (Oidtmann i sur., 2006). Nadalje, donja granica osjetljivosti parova oligonukleotida korištenih u PCR-testu za detekciju vrste *Aphanomyces piscicida*, patogene vrste oomiceta koje napadaju slatkovodne vrste riba, iznosila je 1 pg (Phadee i sur., 2004). Uzrok razlika u osjetljivosti parova oligonukleotida za detekciju vrsta iz roda *Aphanomyces* (Phadee i sur., 2004; Oidtmann i sur., 2006) i vrste *Saprolegnia parasitica* (ovaj rad) mogao bi se objasniti činjenicom da je u ovom radu, kako bi se povećala specifičnost, korištena najviša moguća temperatura komplementarnog sparivanja oligonukleotida na DNA-kalup (64 °C), što je vjerojatno dovelo do određenog smanjenja osjetljivosti reakcije. U usporedbi s tim, Oidtmann i suradnici (2006) pri određivanju osjetljivosti koristili su temperaturu komplementarnog sparivanja oligonukleotida na DNA-kalup od 59 °C, iako je pokusima u našoj grupi nedavno pokazano da se ta temperatura može povisiti na 61 °C bez smanjenja specifičnosti (Pavić i sur., 2019). Može se pretpostaviti da bi osjetljivost para oligonukleotida Oidtmann i suradnika (2006) također bila manja pri višoj temperaturi komplementarnog sparivanja oligonukleotida na DNA-kalup. Osim toga, za PCR-test Oidtmanna i sur. (2006) je nedavno utvrđeno da pri temperaturi komplementarnog sparivanja od 59 °C nespecifično detektira vrstu *A. fenicicus*, novootkrivenu vrstu srodnu ciljnoj vrsti *A. astaci* (Viljamaa-Dirks i Heinikainen, 2019).

Budući da je u ovom radu demonstrirana mogućnost primjene razvijenog PCR-testa za detekciju patogena *S. parasitica* na uzorcima genomske DNA izolirane iz čistih kultura izolata, potrebno je daljnjim istraživanjima ispitati uspješnost ove metode i na drugim vrstama uzoraka, primjerice uzorcima DNA iz zaraženog tkiva (lezije bolesnih riba) i uzoraka okolišne DNA (eng. *environmental DNA* – eDNA) iz vode. Na taj bi se način zaobišla dugotrajna izolacija patogena u čistoj kulturi, što bi ujedno bila i najveća prednost razvijene metode. Tako se primjerice vrsta *A. astaci* može detektirati qPCR-om na uzorcima DNA izoliranim iz komadića kutikule zaraženog raka (Vrålstad i sur., 2009), iz obriska epibiontske zajednice s površine kutikule rakova (Pavić i sur., 2019), kao i iz eDNA izolirane iz vode (Strand i sur.,

2014; Wittwer i sur., 2018). Još jedan primjer je detekcija biljnih oomicetnih patogena iz roda *Phytophthora* upotrebom eDNA iz tla (Català i sur., 2015).

Nadalje, kreirani specifični parovi nukleotida opisani u ovom radu mogu biti temelj za razvoj naprednih metoda detekcije, poput qPCR, ddPCR i LAMP-metode. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom (qPCR) sve se više koristi kao zamjena za standardne PCR-testove. Ova metoda je brža od standardne PCR-metode jer se primjenjuje manji broj ciklusa, a detekcija produkata vrši unutar zatvorenog uređaja pa nije potrebno provoditi naknadne postupke detekcije PCR-produkata na agaroznom gelu. Osim toga, detekcija produkata vrši se temeljem fluorescencije pa je qPCR osjetljivija metoda od standardnog PCR-a (Mackay, 2004). Kako je već spomenuto, ova metoda se već koristi za detekciju nekih oomicetnih patogena, npr. biljnih patogenih oomiceta poput *Phytophthora sansomeana* i *Ph. sojae* te životinjskog patogena *A. astaci* (Vrålstad i sur., 2009; Rojas i sur., 2017). Nadalje, droplet digital PCR (eng. *droplet digital polymerase chain reaction* – ddPCR) je nedavno razvijena kvantitativna PCR-tehnologija tvrtke Bio-Rad (SAD) (<http://www.labena.hr/index.php/prodajni-segmenti/laboratorijska-oprema/microplate-sistemi/bio-rad-droplet-digital-pcr>). Ova metoda se sve više primjenjuje zato što je reproducibilna, osjetljiva te, za razliku od qPCR-a, omogućuje apsolutnu kvantifikaciju neovisnu o baždarnoj krivulji. Osim toga, manje je podložna utjecaju inhibitora (Dube i sur., 2008; Hoshino i Inagaki, 2012; Pinheiro i sur., 2012; Hindson i sur., 2013). Droplet digital PCR već se koristi za detekciju i kvantifikaciju biljnog oomicetnog patogena *Phytophthora nicotianae* u okolišnim uzorcima (Blaya i sur., 2016). LAMP-metoda (eng. *loop mediated isothermal amplification* – LAMP) još je jedna od vodećih metoda molekularne detekcije kod koje se umnažanje željenih redosljeda nukleotida odvija u izotermalnim uvjetima. Prednosti ove metode naspram drugih PCR-metoda opisanih u ovom poglavlju jesu neovisnost o skupim laboratorijskim uređajima, visoka specifičnost, iznimno visoki prinosi u kratkom vremenu te jednostavna vizualna detekcija rezultata detekcije (Notomi i sur., 2000). LAMP-metoda se već uvelike koristi za identifikaciju različitih vrsta patogenih bakterija i virusa, ali i patogenih oomiceta iz rodova *Phytophthora* i *Pythium* (*Ph. capsici*, *Ph. pseudolactucae*, *Pythium irregulare*, *Pythium uncinulatum* te *Pythium spinosum*) (Ushikubo, 2004; Kumar i sur., 2017; Dong, 2015; Feng i sur., 2018; Keikha, 2018).

Zaključno, u ovom je radu opisan brz i učinkovit PCR-test za detekciju patogene vrste *Saprolegnia parasitica* u čistoj kulturi različitih izolata oomiceta. Potrebna su daljnja istraživanja kojima bi se demonstrirala primjena razvijene PCR-metode za detekciju patogena

u okolišnim uzorcima DNA, bez prethodne izolacije mikroorganizma u čistoj kulturi. Osim toga, kreirani specifični parovi nukleotida opisani u ovom radu mogu biti temelj za razvoj naprednih metoda detekcije, poput qPCR i ddPCR.

## 6. ZAKLJUČCI

U ovom je radu prvi put razvijen PCR-test za brzu i učinkovitu detekciju patogena *Saprolegnia parasitica* na molekularnoj razini.

Glavni zaključci su:

1. Kreirana su ukupno tri oligonukleotida jedinstvena za vrstu *S. parasitica* – jedan uzvodni (333F) i dva nizvodna (567R i 590R), kojima se mogu specifično umnožiti dva različita PCR-produkta, dužine 257 parova baza (par oligonukleotida A) i 275 parova baza (par oligonukleotida B).
2. Najniža količina genomske DNA vrste *S. parasitica* koju je bilo moguće detektirati u reakcijskoj smjesi iznosila je 10 pg.
3. Razvijeni PCR-test pokazao je visoku specifičnost: PCR-reakcije provedene s genomskom DNA vrste *Saprolegnia parasitica* kao kalupom dale su pozitivan rezultat s oba para oligonukleotida, dok je korištenjem genomske DNA drugih srodnih vrsta iz roda *Saprolegnia* (*S. australis*, *S. delica* i *S. ferax*) rezultat bio negativan.

Daljnijim istraživanjima potrebno je potvrditi primjenjivost razvijenog PCR-testa na različitim vrstama uzoraka, primjerice uzorcima DNA iz zaraženog tkiva (lezije bolesnih riba) i uzoraka okolišne DNA (eng. *environmental DNA* – eDNA) iz vode, zato što bi se tako preskočio dugotrajan i često neuspješan dio izolacije patogena u čistoj kulturi, što je ujedno jedna od najvećih prednosti razvijene metode. Zaključno, opisani PCR-test pokazao se pouzdanom i učinkovitom metodom identifikacije vrste *S. parasitica* na molekularnoj razini koja bi se u budućnosti mogla koristiti kao standardizirana metoda za detekciju i praćenje (monitoring) patogena *S. parasitica* u ribogojilištima.

## **7. ZAHVALE**

Zahvaljujem se svojoj mentorici Ani Bielen na pruženoj prilici, ukazanom povjerenju i velikodušnoj pomoći pri izradi ovog rada. Zahvaljujem joj na uloženom vremenu i strpljenju za moje brojne upite pri izradi ovog rada.

Također, želim se zahvaliti Dori Pavić na dragocjenim savjetima i velikoj pomoći pri radu u laboratoriju.

Izrada ovog rada financirana je iz uspostavnog istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost "Interakcije slatkovodnih patogenih oomiceta i okoliša (InteractOomyc)", UIP-2017-05-6267, voditeljice A. Bielen.

## 8. POPIS LITERATURE

Baron E. J. (2011) Conventional versus Molecular Methods for Pathogen Detection and the Role of Clinical Microbiology in Infection Control. *Journal of Clinical Microbiology* **49(9)**: 43.

Benson D. A., Cavanaugh M., Clark K., Karsch-Mizrachi I., Lipman D. J., Ostell J., Sayers E. W. (2013) Genbank. *Nucleic Acids Research* **41**: 36-42.

Bienapfl J. C., Malvick D. K., Percich J. A. (2011) Specific molecular detection of *Phytophthora sojae* using conventional and real-time PCR. *Fungal Biology* **115(8)**: 733-740.

Blaya J., Lloret E., Santísima-Trinidad A. B., Ros M., Pascual J. A. (2016) Molecular methods (digital PCR and real-time PCR) for the quantification of low copy DNA of *Phytophthora nicotianae* in environmental samples. *Pest Management Science* **72(4)**: 747-753.

Cammà C., Ferri N., Zezza D., Marcacci M., Paolini A., Ricchiuti L., Lelli R. (2010) Confirmation of crayfish plague in Italy: detection of *Aphanomyces astaci* in white clawed crayfish. *Diseases of Aquatic Organisms* **89**: 265-268.

Català S., Pérez-Sierra A., Abad-Campos P. (2015) The Use of Genus-Specific Amplicon Pyrosequencing to Assess *Phytophthora* Species Diversity Using eDNA from Soil and Water in Northern Spain. *PLoS ONE* **10(3)**: e0119311.

Darwish A. M., Ismaiel A. A., Newton J. C., Tang J. (2004) Identification of *Flavobacterium columnare* by a species-specific polymerase chain reaction and renaming of ATCC43622 strain to *Flavobacterium johnsoniae*. *Molecular and Cellular Probes* **18(6)**: 421-427.

De Silva S. S. (2001) A Global Perspective of Aquaculture in the New Millennium. U: Aquaculture in the Third Millennium, 1. izd., Subasinghe R. P., Bueno P., Phillips M. J., Hough C., McGladdery S. E., Arthur J. R., ur., Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific. str. 431-459.

Derevnina L., Petre B., Kellner R., Dagdas Y. F., Sarowar M. N., Giannakopoulou A., De la Concepcion J. C., Chaparro-Garcia A., Pennington H. G., van West P., Kamoun S. (2016)

Emerging oomycete threats to plants and animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **371**: 20150459.

Dieffenbach C. W., Lowe T. M. J., Dveksler G. S. (1993) General concepts for PCR primer design. *Genome Research* **3**: 30-37.

Dong Z., Liu P., Li B., Chen G., Weng Q., Chen Q. (2015) Loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Phytophthora capsici*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **37(4)**: 485-494.

Dube S., Qin J., Ramakrishnan R. (2008) Mathematical Analysis of Copy Number Variation in a DNA Sample Using Digital PCR on a Nanofluidic Device. *PLoS ONE* **3(8)**: e2876.

Earle G., Hintz W. (2014) New Approaches for Controlling *Saprolegnia parasitica*, the Causal Agent of a Devastating Fish Disease. *Tropical Life Sciences Research* **25(2)**: 101-109.

Fawke S., Doumane M., Schornack S. (2015) Oomycete interactions with plants: infection strategies and resistance principles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **79 (3)**: 263 – 280.

Feng W., Hieno A., Kusunoki M., Suga H., Kageyama K. (2018) LAMP Detection of Four Plant-Pathogenic Oomycetes and Its Application in Lettuce Fields. *Plant Disease* **103(2)**: 298-307.

Fernández L., Méndez J., Guijarro J. A. (2007) Molecular virulence mechanisms of the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. *Veterinary Microbiology* **125(1-2)**: 1-10.

Filipová L., Petrusek A., Matasová K., Delaunay C., Grandjean F. (2013) Prevalence of the Crayfish Plague Pathogen *Aphanomyces astaci* in Populations of the Signal Crayfish *Pacifastacus leniusculus* in France: Evaluating the Threat to Native Crayfish. *PLoS ONE* **8(7)**: e70157.

Fry W.E., Grünwald N.J. (2010) Introduction to Oomycetes. The Plant Health Instructor; <<https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/PathogenGroups/Pages/IntroOomycetes.aspx>> Pristupljeno 25. travnja 2019.

Gachon C. M. M., Strittmatter M., Müller D. G., Kleinteich J., Küpper F. C. (2009) Detection of Differential Host Susceptibility to the Marine Oomycete Pathogen *Eurychasma dicksonii*



by Real-Time PCR: Not All Algae Are Equal. *Applied and Environmental Microbiology* **75(2)**: 322-328.

Garibyan L., Avashia N. (2013) Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *Journal of Investigative Dermatology* **133(3)**: 1-4.

Gibello A., Blanco M. M., Moreno M. A., Cutuli M. T., Domenech A., Domínguez L., Fernández-Garayzábal (1999) Development of a PCR Assay for Detection of *Yersinia ruckeri* in Tissues of Inoculated and Naturally Infected Trout. *Applied and Environmental Microbiology* **65(1)**: 346-350.

Girones R., Ferrús M. A., Alonso J. L., Rodriguez-Manzano J., Calgua B., de Abreu Corrêa A., Hundesa A., Carratala A., Bofill-Mas S. (2010) Molecular detection of pathogens in water – The pros and cons of molecular techniques. *Water Research* **44(15)**: 4325-4339.

Gouy M., Guindon S. i Gascuel O. (2010) SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* **27(2)**: 221-224.

Gozlan R. E., Marshall W. L., Lilje O., Jessop C. N., Gleason F. H., Andreou D. (2014) Current ecological understanding of fungal-like pathogens of fish: what lies beneath?. *Frontiers in Microbiology* **5(62)**: 1-16.

Grooters A. M., Gee M. K. (2008) Development of a Nested Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection and Identification of *Pythium insidiosum*. *Journal of Veterinary Medicine* **16(2)**: 147-152.

Hall T. (2011) BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences* **2(1)**: 60-61.

Heffer Link V., Powelson M.L., Johnson K.B. (2002) Oomycetes. The Plant Health Instructor, <<https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/LabExercises/Pages/Oomycetes.aspx>> Pristupljeno 12. veljače 2019.

Hindson C. M., Chevillet J. R., Briggs H. A., Gallichotte E. N., Ruf I. K., Hindson B. J., Vessella R. L., Tewari M. (2013) Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nature Methods* **10(10)**: 1003-1005.

- Hochwimmer G., Tober R., Bibars-Reiter R., Licek E., Steinborn R. (2009) Identification of two GHI8 chitinase family genes and their use as targets for detection of the crayfish-plague oomycete *Aphanomyces astaci*. *BMC Microbiology* **9**: 184.
- Hoshino T., Inagaki F. (2012) Molecular quantification of environmental DNA using microfluidics and digital PCR. *Systematic and Applied Microbiology* **35(6)**: 390-395.
- Innis M. A., Myambo K. B., Gelfand D. H., Brow M. A. D. (1988) DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85(24)**: 9436-9440.
- Johnson Jr. T. W., Seymour R. L., Padgett D. E. (2002) Biology and Systematics of the Saprolegniaceae, 1. izd., University of North Carolina at Wilmington, Department of Biological Sciences. str. 1028.
- Joshi M., Deshpande J. D. (2011) Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application. *International Journal of Biomedical Research* **2(1)**: 81-97.
- Jussila J., Makkonen J., Vainikka A., Kortet R., Kokko H. (2011) Latent crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) infection in a robust wild noble crayfish (*Astacus astacus*) population. *Aquaculture* **321(1-2)**: 17 – 20.
- Kasanah N., Hamann M. T. (2004) Development of antibiotics and the future of marine microorganisms to stem the tide of antibiotic resistance. *Current Opinion in Investigational Drugs* **5(8)**: 827-837.
- Katoh K. i Standley D.M. (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* **30**: 772-780.
- Keeratijarut A., Lohnoo T., Yingyong W., Rujirawat T., Srichunrusami C., Onpeaw P., Chongtrakool P., Brandhorst T. T., Krajaejun T. (2015) Detection of the oomycete *Pythium insidiosum* by real-time PCR targeting the gene coding for exo-1,3- $\beta$ -glucanase. *Journal of Medical Microbiology* **64(9)**: 971-977.
- Keikha M. (2018) LAMP Method as One of the Best Candidates for Replacing with PCR Method. *The Malaysian Journal of Medical Sciences* **25(1)**: 121-123.

- Kim W. S., Choi S. Y., Kim D. H., Oh M. J. (2013) A survey of fish viruses isolated from wild marine fishes from the coastal waters of southern Korea. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **25(6)**: 750-755.
- Kokko H. I., Koistinen L., Harlioglu M., Makkonen J. (2012) Recovering Turkish narrow clawed crayfish (*Astacus leptodactylus*) populations carry *Aphanomyces astaci*. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* **402(404)**: 12.
- Kumar Y., Bansal S., Jaiswal P. (2017) Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A Rapid and Sensitive Tool for Quality Assessment of Meat Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **16(6)**: 1359-1378.
- Kušar D., Vrezec A., Ocepek M., Jenčič V. (2013) *Aphanomyces astaci* in wild crayfish populations in Slovenia: first report of persistent infection in a stone crayfish *Austropotamobius torrentium* population. *Diseases of Aquatic Organisms* **103(2)**: 157-169.
- Lazcka O., Del Campo F. J., Muñoz F. X. (2007) Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* **22(7)**: 1205-1217.
- Lee P. Y., Costumbrado J., Hsu C.-Y., Kim Y. H. (2012) Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments* **62**: e3923.
- Letunic I., Bork P. (2016) Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Research* **44(1)**: 242-245.
- Leung W. L. (2012) The oomycete *Saprolegnia parasitica*: molecular tools for improved taxonomy and species identification. Diplomski rad. Department of Biology, University of Victoria, Victoria, British Columbia, Canada.
- Lévesque C. A. (2011) Fifty years of oomycetes—from consolidation to evolutionary and genomic exploration. *Fungal Diversity* **50**: 35 – 46.
- Li M., Inada M., Watanabe H., Suga H., Kageyama K. (2013) Simultaneous detection and quantification of *Phytophthora nicotianae* and *P. cactorum*, and distribution analyses in strawberry greenhouses by duplex real-time PCR. *Microbes and Environments* **28(2)**: 195-203.

- Lievens B., Brouwer M., Vanachter A. C. R. C., Cammue B. P. A., Thomma B. P. H. J. (2006) Real-time PCR for detection and quantification of fungal and oomycete tomato pathogens in plant and soil samples. *Plant Science* **171(1)**: 155-165.
- Liu Y., Rzeszutek E., van der Voort M., Wu C.-H., Thoen E., Skaar I., Bulone V., Dorrestein P. C., Raaijmakers J. M., de Bruijn I. (2015) Diversity of Aquatic *Pseudomonas* Species and Their Activity against the Fish Pathogenic Oomycete *Saprolegnia*. *PLoS ONE* **10(8)**: e0136241.
- Lone S. A., Manohar S. (2018) *Saprolegnia parasitica*, A Lethal Oomycete Pathogen: Demands to be Controlled. *Journal of Infection and Molecular Biology* **6(2)**: 36-44.
- Mackay I. M. (2004) Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection* **10(3)**: 190-212.
- Maguire I., Jelić M., Klobučar G., Delpy M., Delaunay C., Grandjean F. (2016) Prevalence of the pathogen *Aphanomyces astaci* in freshwater crayfish populations in Croatia. *Diseases of Aquatic Organisms* **118(1)**: 45-53.
- Makkonen J., Strand D. A., Kokko H., Vrålstad T., Jussila J. (2013) Timing and quantifying *Aphanomyces astaci* sporulation from the noble crayfish suffering from the crayfish plague. *Veterinary Microbiology* **162(2-4)**: 750-755.
- Markovskaja S. (2006) Saprolegniaceae (Peronosporomycetes) in Lithuania. II. The genus *Saprolegnia*. *Botanica Lithuanica* **12(2)**: 97-112.
- McGowan J., Fitzpatrick D. A. (2017) Genomic, Network, and Phylogenetic Analysis of the Oomycete Effector Arsenal. *mSphere* **2(6)**: e00408-17.
- Miller T. A., Rapp J., Wasthuber U., Hoffmann R. W., Enzmann P.-J. (1998) Rapid and sensitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction based detection and differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses in organ samples and cultured cells. *Diseases of Aquatic Organisms* **34(1)**: 13-20.
- Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* **28(12)**: e63.

Oidtman B., Geiger S., Steinbauer P., Culas A., Hoffmann R. W. (2006) Detection of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish by polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms* **72(1)**: 53-64.

Pavić D., Čanković M., Sviličić Petrić I., Makkonen J., Hudina S., Maguire I., Vladušić T., Šver L., Hrašćan R., Orlić K., Dragičević P., Bielen A. (2019) Non-invasive method for monitoring of *Aphanomyces astaci*, the causative agent of crayfish plague. U postupku recenzije u *Journal of Invertebrate Pathology*.

Phadee P., Kurata O., Hatai K. (2004) A PCR Method for the Detection of *Aphanomyces piscicida*. *Fish Pathology* **39(1)**: 25-31.

Pinheiro L. B., Coleman V. A., Hindson C. M., Herrmann J., Hindson B. J., Bhat S., Emslie K. R. (2012) Evaluation of Droplet Digital Polymerase Chain Reaction Format for DNA Copy Number Quantification. *Analytical Chemistry* **84(2)**: 1003-1011.

Pulkkinen K., Suomalainen L.-R., Read A. F., Ebert D., Rintamäki, Valtonen E. T. (2009) Intensive fish farming and the evolution of pathogen virulence: the case of columnaris disease in Finland. *Proceedings of The Royal Society* **227(1681)**: 593-600.

Rahman H. S., Choi T.-J. (2018) The efficacy of Virkon-S for the control of saprolegniasis in common carp, *Cyprinus carpio* L. *PeerJ*. 6: e5706.

Rezinciuc S., Sandoval-Sierra J. V., Ruiz-León Y., van West P., Diéguez-Uribeondo J. (2018) Specialized attachment structure of the fish pathogenic oomycete *Saprolegnia parasitica*. *PLoS ONE* **13(1)**: e0190361.

Rojas J. A., Miles T. D., Coffey M. D., Martin F. N., Chilvers M. I. (2017) Development and Application of qPCR and RPA Genus- and Species-Specific Detection of *Phytophthora sojae* and *P. sansomeana* Root Rot Pathogens of Soybean. *Plant Disease* **101(7)**: 1171-1181.

Ronquist F. i Huelsenbeck J.P. (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19(12)**: 1572–1574.

Sandoval-Sierra J. V., Latif-Eugenin F., Martín M. P., Zaror L., Diéguez-Uribeondo J. (2014) *Saprolegnia* species affecting the salmonid aquaculture in Chile and their associations with fish developmental stage. *Aquaculture* **434**: 462-469.

- Sandoval-Sierra J. V., Martín M. P., Diéguez-Uribeondo J. (2013) Species identification in the genus *Saprolegnia* (Oomycetes): Defining DNA-based molecular operational taxonomic units. *Fungal Biology* **118(7)**: 559-578.
- Sarowar M. N., Hossain M. J., Nasrin T., Naznin T., Hossain Z., Rahman M. M. (2018) Molecular identification of oomycete species affecting aquaculture in Bangladesh. *Aquaculture and Fisheries*; <<https://doi.org/10.1016/j.aaf.2018.12.003>> Pristupljeno 17. travnja 2019.
- Schena L., Hughes K. J. D., Cooke D. E. L. (2006) Detection and quantification of *Phytophthora ramorum*, *P. kernoviae*, *P. citricola* and *P. quercina* in symptomatic leaves by multiplex real-time PCR. *Molecular Plant Pathology* **7(5)**: 365-379.
- Schurko A. M., Mendoza L., Lévesque A., Désaulniers N. L., De Cock A. W. A. M., Klassen G. R. (2003) A molecular phylogeny of *Pythium insidiosum*. *Mycological Research* **(107)5**: 537-544.
- Seymour R. L. (1970) The genus *Saprolegnia*. *Nova Hedwigia* **19(1-2)**: 1-124.
- Shin S., Kulatunga D. C. M., Dananjaya S. H. S., Nikapitiya C., Lee J., Zoysa M. D. (2017) *Saprolegnia parasitica* Isolated from Rainbow Trout in Korea: Characterization, Anti-*Saprolegnia* Activity and Host Pathogen Interaction in Zebrafish Disease Model. *Micobiology* **45(4)**: 297-311.
- Smith D., Onions A. H. S. (1994) The preservation and maintenance of living fungi, 2. izd., CAB International. str. 122.
- Songe M. M. (2015) Pathogenicity and infectivity of *Saprolegnia* species in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and their eggs. Doktorska disertacija. Faculty of Veterinary Medicine and Biosciences, Norwegian University of Life Sciences, Oslo, Norway.
- Strand D. A., Jussila J., Johnsen S. I., Viljamaa-Dirks S., Edsman L., Wiik-Nielsen J., Viljugrein H., Engdahl F., Vrålstad T. (2014) Detection of crayfish plague spores in large freshwater systems. *Journal of Applied Ecology* **51(2)**: 544-553.
- Strunjak-Perović I., Topić Popović N. (1999) PCR kao dijagnostička metoda u akvakulturi. *Ribarstvo* **57(4)**: 181-188.

- Subasinghe R., Soto D., Jia J. (2009) Global aquaculture and its role in sustainable development. *Reviews in Aquaculture* **1(1)**: 2-9.
- Svoboda J., Mrugała A., Kozubíková-Balcarová E., Petrušek A. (2017) Hosts and transmission of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci*: A review. *Journal of Fish Diseases* **40(1)**: 127-140.
- Testen A. L., del Mar Jiménez-Gasco M., Ochoa J. B., Backman P. A. (2014) Molecular Detection of *Peronospora variabilis* in Quinoa Seed and Phylogeny of the Quinoa Downy Mildew Pathogen in South America and the United States. *Ecology and Epidemiology* **104(4)**: 379-386.
- Thoen E., Vrålstad T., Rolén E., Kristensen R., Evensen Ø., Skaar I. (2015) *Saprolegnia* species in Norwegian salmon hatcheries: field survey identifies *S. diclina* sub-clade IIIB as the dominating taxon. *Diseases of Aquatic Organisms* **114(3)**: 189-198.
- Torto-Alalibo T., Tian M., Gajendran K., Waugh M. E., van West P., Kamoun S. (2005) Expressed sequence tags from the oomycete fish pathogen *Saprolegnia parasitica* reveal putative virulence factors. *BMC Microbiology* **5**: 46.
- Unestam T. (1965) Studies on the Crayfish Plague Fungus *Aphanomyces astaci*: Some Factors Affecting Growth *in vitro*. *Physiologia Plantarum* **18(2)**: 483-505.
- Ushikubo H. (2004) Principle of LAMP method – a simple and rapid gene amplification method. *Uirusu* **54(1)**: 107-112.
- Vandersea M. W., Litaker R. W., Yonish B., Sosa E., Landsberg J. H., Pullinger C., Moon-Butzin P., Green J., Morris J. A., Kator H., Noga E. J., Tester P. A. (2006) Molecular Assays for Detecting *Aphanomyces invadans* in Ulcerative Mycotic Fish Lesions. *Applied and Environmental Microbiology* **72(2)**: 1551-1557.
- Vardić I., Kapetanović D., Valić D., Kurtović B., Teskeredžić Z., Teskeredžić E. (2007) Genotyping of isolated viruses from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Croatia. *Ribarstvo* **65(3)**: 87-97.

Viljamaa-Dirks S., Heinikainen S. (2019) A tentative new species *Aphanomyces fennicus* sp. nov. interferes with molecular diagnostic methods for crayfish plague. *Journal of Fish Diseases* **42(3)**: 413-422.

Vrålstad T., Knutsen A. K., Tengs T., Holst-Jensen A. (2009) A quantitative TaqMan<sup>®</sup> MGB real-time polymerase chain reaction based assay for detection of the causative agent of crayfish plague *Aphanomyces astaci*. *Veterinary Microbiology* **137(1-2)**: 146-155.

Warrilow A. G. S., Hull C. M., Rolley N. J., Parker J. E., Nes W. D., Smith S. N., Kelly D. E., Kelly S. L. (2014) Clotrimazole as a Potent Agent for Treating the Oomycete Fish Pathogen *Saprolegnia parasitica* through Inhibition of Sterol 14 $\alpha$ -Demethylase (CYP51). *Applied and Environmental Microbiology* **80(19)**: 6154-6166.

White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990) Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. U: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, 1. izd, Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J., ur., Academic Press, New York. str. 315-322.

Wittwer C., Stoll S., Strand D., Vrålstad T., Nowak C., Thines M. (2018) eDNA-based crayfish plague monitoring is superior to conventional trap-based assessments in year-round detection probability. *Hydrobiologia* **807(1)**: 87-97.

Wuensch A., Trusch F., Ibrahım N. A., van West P. (2018) *Galleria melonella* as an experimental *in vivo* host model for the fish-pathogenic oomycete *Saprolegnia parasitica*. *Fungal Biology* **122(2-3)**: 182-189.

Zeng L., Wang L., Hu J. (2018) Current and Emerging Technologies for Rapid Detection of Pathogens. U: Biosensing Technologies for the Detection of Pathogens - A Prospective Way for Rapid Analysis, 1. izd., Rinken T., Kivirand K., ur., <<https://www.intechopen.com/books/biosensing-technologies-for-the-detection-of-pathogens-a-prospective-way-for-rapid-analysis/current-and-emerging-technologies-for-rapid-detection-of-pathogens>> Pristupljeno 1. svibnja 2019.

Zrnčić S., Oraić D., Hostnik P., Bergman S. M. (2011) Zarazna hematopoetska nekroza pastrva na hrvatskom ribogojilištu: utvrđivanje i iskorjenjivanje. *Veterinarska stanica* **42(6)**: 505-510.



## 9. SAŽETAK

Tamara Vujović

Razvoj PCR-testa za detekciju patogena *Saprolegnia parasitica*, uzročnika saprolegnioze

Patogeni mikroorganizam *Saprolegnia parasitica* (Oomycetes) uzrokuje bolest saprolegniozu kod salmonidnih riba poput pastrve i lososa, rezultirajući milijunskim gubicima u akvakulturi. S obzirom da se postojeće metode identifikacije patogena temelje na uzgoju izolata u kulturi, postupku koji je dugotrajan i često ne uspije, cilj ovog rada bio je razviti PCR-test za detekciju patogena *S. parasitica*. U tu svrhu, prvo su dizajnirani parovi oligonukleotida specifični za ITS-regiju (eng. *internal transcribed spacer*) 5.8S rRNA gena vrste *S. parasitica*. Načinjeno je višestruko sravnjenje 58 poznatih nukleotidnih sljedova ITS-regije različitih vrsta oomiceta te su na temelju razlika u dijelovima sravnjenja kreirana ukupno tri oligonukleotida jedinstvena za vrstu *S. parasitica*: jedan uzvodni (333F) i dva nizvodna (567R i 590R). Nakon toga je eksperimentalno demonstrirana učinkovitost PCR-reakcije s navedenim oligonukleotidima i genomskom DNA vrste *S. parasitica* (CBS 233.65) kao kalupom. Uz korištenje para nukleotida 333F i 567R dobiven je produkt očekivane veličine 257 parova baza (pb), dok je korištenjem para 333F i 590R dobiven produkt dugačak 275 pb. Nadalje, optimalna temperatura komplementarnog sparivanja za oba para oligonukleotida iznosila je 64 °C, a donja granica osjetljivosti bila je 10 pg genomske DNA vrste *S. parasitica*. Na kraju je provedeno testiranje specifičnosti oligonukleotidnih parova. U tu svrhu, sakupljeni su oomicetni izolati iz vode i jajašaca u pastrvskom ribnjaku Ritterman (Solin, Hrvatska). Izolati su uzgojeni u čistoj kulturi te taksonomski identificirani određivanjem redoslijeda nukleotida ITS-regije i naknadnom filogenetskom analizom. Utvrđeno je da 8 od 16 sakupljenih izolata pripada vrsti *S. parasitica*, dok su ostali bili *S. australis*, *S. delica* i *S. ferax*. Iz svih izolata izolirana je genomaska DNA te je korištena kao kalup u PCR-reakcijama s kreiranim parovima oligonukleotida. Time je potvrđena željena specifičnost PCR-testa: do uspješne amplifikacije PCR-produkata došlo je samo kada je u reakciji bila prisutna DNA vrste *S. parasitica*, dok je u slučaju korištenja genomske DNA drugih srodnih vrsta amplifikacija izostala. Zaključno, nakon što se dodatno demonstrira primjena ovdje razvijenog PCR-testa za detekciju vrste *S. parasitica* na okolišnim uzorcima, upotreba testa u ribogojilištima omogućila bi rano otkrivanje prisutnosti patogena čime bi se smanjili ekonomski gubici i poboljšali uvjeti uzgoja riba.

Ključne riječi: ITS-regija, lančana reakcija polimerazom, Oomycetes, praćenje patogena

## 10. SUMMARY

Tamara Vujović

Development of PCR assay for detection of *Saprolegnia parasitica*, causative agent of saprolegniosis

Pathogenic oomycete *Saprolegnia parasitica* causes saprolegniosis, a disease of salmonid fish including trout and salmon, that leads to significant economic losses in aquaculture. Current methods for pathogen detection, i.e. isolation and cultivation of pure oomycete cultures, are time-consuming and often unsuccessful. Therefore, the aim of this study was to develop PCR assay for detection of *S. parasitica* based on ITS (*internal transcribed spacer*) region of 5.8S rRNA gene sequence. Firstly, multiple sequence alignment (MSA) of 58 ITS sequences from various oomycetes, including *S. parasitica*, was used to design *S. parasitica*-specific primer pairs. *S. parasitica*-specific regions of MSA were identified and three different primers were designed – one forward (333F) i two reverse (567R and 590R). Next, the effectiveness of the primer pairs was demonstrated *in vitro* by performing PCR-reactions with genomic *S. parasitica* (CBS 233.65) DNA as a template. As expected, primers 333F and 567R amplified 257 bp PCR products and primers 333F and 590R amplified 275 bp PCR products. For both primer pairs, optimal annealing temperature was determined to be 64 °C and the lower limit of detection was 10 pg of *S. parasitica* genomic DNA. The specificity of the assay was demonstrated by using oomycetes isolated from water and eggs in trout fish farm Ritterman (Solin, Croatia). Taxonomic identity of the collected isolates was determined by sequencing of ITS amplicons followed by phylogenetic analysis. Eight out of 16 collected isolates were identified to be *S. parasitica*, while others were *S. australis*, *S. delica* and *S. ferax*. Genomic DNA from all 16 isolates was used as a template in PCR-reactions with the designed primer pairs. The expected specificity of the PCR assay was confirmed: the amplification was successful when *S. parasitica* genomic DNA was used in PCR-reactions, while no amplicon was obtained when genomic DNA of different *Saprolegnia* species was used. In conclusion, after the additional demonstration of the method effectiveness with environmental DNA samples, the newly developed PCR assay can be applied to *S. parasitica* monitoring in fish farms. This will enable the early detection of the pathogen and help to decrease the economic losses and to improve the farming conditions.

Key words: ITS region, Oomycetes, polymerase chain reaction, PCR-based monitoring

## DODACI

**Dodatak 1.** Čitavo višestruko sravnjenje ITS-sljedova nukleotida vrsta iz roda *Saprolegnia* i drugih vrsta oomiceta. Dijelovi višestrukog sravnjenja specifični za ciljnu vrstu *S. parasitica* nalaze se unutar crnih okvira (oligonukleotid 333F (položaj 333 – 361), oligonukleotid 567R (položaj 567 – 590) i oligonukleotid 590R (položaj 590 – 608)).

1

1_KF717745.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTACTC	T	TTATGAGGC	TCGGGTGCC	CTC	-----
1_KF717795.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTACTC	T	TTATGAGGC	TCGGGTGCC	CTC	-----
1_KF717797.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTACTC	T	TTATGAGGC	TCGGGTGCC	CTC	-----
1_KF717816.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTACTC	T	TTATGAGGC	TCGGGTGCC	CTC	-----
2_KF717835.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTACTC	T	TTATGAGGC	TCGGGTGCC	CTC	-----
2_KF717836.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTACTC	T	TTATGAGGC	TCGGGTGCC	CTC	-----
3_KF717839.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTACTC	T	TTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
3_KF717846.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTACTC	T	TTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
3_KF717842.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTACTC	T	TTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
3_KF717854.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTACTC	T	TTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
3_KF717867.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTACTC	T	TTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
3_KF717855.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTACTC	T	TTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
3_KF717869.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTACTC	T	TTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
3_KF717860.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTACTC	T	TTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
3_KF717870.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTACTC	T	TTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
3_KF717863.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTACTC	T	TTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
3_KF717864.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTACTC	T	TTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
3_KF717872.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTACTC	T	TTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
4_KF717883.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTACTC	T	TTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
4_KF717958.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTACTC	T	TTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
5_KF717972.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ACGTACTC	T	TTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
5_KF717974.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ACGTACTC	T	TTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
6_KF718021.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTACTC	T	TTATGAGGC	TCGGGTGCC	CTC	-----
6_KF718022.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTACTC	T	TTATGAGGC	TCGGGTGCC	CTC	-----
7_KF718048.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTACTC	T	GTATGAGGC	TCGGGTGCC	CTC	-----
8_KF718049.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ACGTACAC	T	TTATGAGGC	TCGGGTGCC	CTC	-----
8_KF718099.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ACGTACAC	T	TTATGAGGC	TCGGGTGCC	CTC	-----
8_KF718055.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ACGTACAC	T	TTATGAGGC	TCGGGTGCC	CTC	-----
8_KF718065.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ACGTACAC	T	TTATGAGGC	TCGGGTGCC	CTC	-----
8_KF718071.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ACGTACAC	T	TTATGAGGC	TCGGGTGCC	CTC	-----
8_KF718050.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ACGTACAC	T	TTATGAGGC	TCGGGTGCC	CTC	-----
9_KF718122.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTACGC	T	GTATGAGGC	TCGGGTGCC	CTC	-----
11_KF718125.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTATTG	T	GTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
12_KF718130.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTATTG	T	GTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
12_KF718131.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTATTG	T	GTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
13_KF718134.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTATTG	T	GTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
13_KF718135.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTATTG	T	GTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
14_KF718140.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTATTG	T	GTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
14_KF718141.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTATTG	T	GTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
15_KF718142.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTATTG	T	GTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
16_KF718143.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTATTG	T	GTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
21_KF718186.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTATTG	T	GTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
21_KF718187.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTATTG	T	GTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
23_KF718192.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTATTG	T	GTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
22_KF718190.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTATTG	T	GTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
10_KF718124.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTACTC	T	GTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
17_KF718144.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTATTG	T	GTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
17_KF718146.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTATTG	T	GTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
17_KF718156.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTATTG	T	GTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
17_KF718152.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTATTG	T	GTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
18_KF718174.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTATTG	T	GTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
18_KF718177.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTATTG	T	GTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
19_KF718178.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTATTG	T	GTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
20_KF718179.1	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTATTG	T	GTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
Protoachlya	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTACTC	T	GTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
Leptolegnia	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ACGTACTC	T	GTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
Aphanomyces	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTATTG	T	GTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----
Achlya	CATTACCACA	CCAAAAACA	CCCCAGGTGA	ATSTATTG	T	GTATGAGGC	TTGGGTGCC	CTT	-----

1_KF717745.1	----GTGGCA	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AG	CCGATGTCAA	FTTGAATCC	-TTTTAAACT
1_KF717795.1	----GTGGCA	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AG	CCGATGTCAA	FTTGAATCC	-TTTTAAACA
1_KF717797.1	----GTGGCA	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AG	CCGATGTCAA	FTTGAATCC	-TTTTAAACG
1_KF717816.1	----GTGGCA	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AG	CCGATGTCAA	FTTGAATCC	-TTTTAAACR
2_KF717835.1	----GTGGCA	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AG	CCGATGTCAA	FTTGAATCC	-TTTTAAACT
2_KF717836.1	----GTGGCA	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AG	CCGATGTCAA	FTTGAATCC	-TTTTAAACT
3_KF717839.1	----GTGGCA	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AG	CCGATGTCAA	FTTGAATCC	-TTTTAAAAAT
3_KF717846.1	----GTGGCA	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AG	CCGATGTCAA	FTTGAATCC	-TTTTAAAAAT
3_KF717842.1	----GTGGCA	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AG	CCGATGTCAA	FTTGAATCC	-TTTTAAAAAT
3_KF717854.1	----GTGGCA	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AG	CCGATGTCAA	FTTGAATCC	-TTTTAAAAAT
3_KF717867.1	----GTGGCA	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AG	CCGATGTCAA	FTTGAATCC	-TTTTAAAAAT
3_KF717855.1	----GTGGCA	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AG	CCGATGTCAA	FTTGAATCC	-TTTTAAAAAT
3_KF717869.1	----GTGGCA	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AG	CCGATGTCAA	FTTGAATCC	-TTTTAAAAAT
3_KF717860.1	----GTGGCA	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AG	CCGATGTCAA	FTTGAATCC	-TTTTAAAAAT
3_KF717870.1	----GTGGCA	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AG	CCGATGTCAA	FTTGAATCC	-TTTTAAAAAT
3_KF717863.1	----GTGGCA	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AG	CCGATGTCAA	FTTGAATCC	-TTTTAAAAAT
3_KF717864.1	----GTGGCA	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AG	CCGATGTCAA	FTTGAATCC	-TTTTAAAAAT
3_KF717872.1	----GTGGCA	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AG	CCGATGTCAA	FTTGAATCC	-TTTTAAAAAT
4_KF717883.1	----GTGGCG	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AG	CCGATGTCAA	FTTGAATCC	-TTTTAAACT
4_KF717958.1	----GTGGCA	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AG	CCGATGTCAA	FTTGAATCC	-TTTTAAACT
5_KF717972.1	----GTGGCA	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AG	CCGATGTCAA	FTTGAATCC	-TTTTAAACA
5_KF717974.1	----GTGGCA	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AG	CCGATGTCAA	FTTGAATCC	-TTTTAAACA
6_KF718021.1	----GTGGCG	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AG	CCGATGTCAA	FTTGAATCC	-TTTTAAACA
6_KF718022.1	----GTGGCA	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AG	CCGATGTCAA	FTTGAATCC	-TTTTAAACA
7_KF718048.1	----GTGGCA	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGG-AG	CCGATGTCTA	FTTGAATCC	-TTTTAACTT
8_KF718049.1	----GCGGCA	GCTAACCGAA	GGTTT	----TGC AAGA-AG	CCGATGTCTA	FTTGAATCC	-TTTTAACC A
8_KF718099.1	----GYGGCA	GCTAACCGAA	GGTTT	----TGC AAGA-AG	CCGATGTCTA	FTTGAATCC	-TTTTAACC A
8_KF718055.1	----GYGGCA	GCTAACCGAA	GGTTT	----TGC AAGA-AG	CCGATGTCTA	FTTGAATCC	-TTTTAACC A
8_KF718065.1	----GTGGCA	GCTAACCGAA	GGTTT	----TGC AAGA-AG	CCGATGTCTA	FTTGAATCC	-TTTTAACC A
8_KF718071.1	----GCGGCA	GCTAACCGAA	GGTTT	----TGC AAGA-AG	CCGATGTCTA	FTTGAATCC	-TTTTAACC A
8_KF718050.1	----GTGGCA	GCTAACCGAA	GGTTT	----TGC AAGA-AG	CCGATGTCTA	FTTGAATCC	-TTTTAACC A
9_KF718122.1	----GTGGCA	GCTAACCGAA	GGTTT	----TGC AAGA-AG	CCGATGTCTA	FTTGAATCC	-TTTTAAATT
11_KF718125.1	----CAGCG	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AG	CCGATGTCTA	FTTGAATCC	-TTTTAACAT
12_KF718130.1	----CAGCG	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AG	CCGATGTCTA	FTTGAATCC	-TTTTAACAT
12_KF718131.1	----CAGCG	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AG	CCGATGTCTA	FTTGAATCC	-TTTTAACAT
13_KF718134.1	----CAGCG	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AG	CCGATGTCTA	FTTGAATCC	-TTTTAAATA
13_KF718135.1	----CAGCG	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AG	CCGATGTCTA	FTTGAATCC	-TTTTAAATA
14_KF718140.1	----GGAGCG	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-GA	CCGATGTAAC	FTTGAATCC	-TTTTATAAA
14_KF718141.1	----GGAGCG	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-GA	CCGATGTAAC	FTTGAATCC	-TTTTATAAA
15_KF718142.1	----GGAGCG	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-GA	CCGATGTAAC	FTTGAATCC	-TTTTATAAA
16_KF718143.1	----GGAGCG	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AA	CCGATGTAAC	FTTGAATCC	-TTTTATAAA
21_KF718186.1	----GGAGCG	ACTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AA	CCGATGTATT	FTTGAATCC	-TTTTAAAAA
21_KF718187.1	----GGAGCG	ACTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AA	CCGATGTATT	FTTGAATCC	-TTTTAAAAA
23_KF718192.1	----GGAGCG	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AA	CCGATGTATT	FTTGAATCC	-TTTTACTAA
22_KF718190.1	----GGAGCG	ACTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AA	CCGATGTATT	FTTGAATCC	-TTTTAATAA
10_KF718124.1	----GKGG	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AG	CCGATGAAAT	FTTGAATCC	-TTTGAACCA
17_KF718144.1	----GGGCGA	GCTTGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-GA	CCGATGTACT	FTTGAATCC	-TTTTAAAAA
17_KF718146.1	----GGGCGA	GCTTGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-GA	CCGATGTACT	FTTGAATCC	-TTTTAAAAA
17_KF718156.1	----GGGCGA	GCTTGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-GA	CCGATGTACT	FTTGAATCC	-TTTTAAAAA
17_KF718152.1	----GGGTGA	GCTTGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-GA	CCGATGTACT	FTTGAATCC	-TTTTAAAAA
18_KF718174.1	----GGGTGA	GCTTGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-GA	CCGATGTACT	FTTGAATCC	-TTTTATAAA
18_KF718177.1	----GGGTGA	GCTTGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-GA	CCGATGTACT	FTTGAATCC	-TTTTATAAA
19_KF718178.1	----GGGTGA	GCTTGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-GA	CCGATGTACT	FTTGAATCC	-TTTTATAAA
20_KF718179.1	----GGGTGA	GCTTGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-GA	CCGATGTACT	FTTGAATCC	-TTTTAAAAA
Protoachlya	----GGAGCG	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AA	CCGATGTCTA	FTTGAATCC	-TTTTAACCT
Leptolegnia	----GGGGTA	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGAAAGG-AA	CCGATGTAAA	FTTGAATCC	-TTTTATCTA
Aphanomyces	----GGAGCG	GCTAGCCGAA	GGTTT	----CGCAAGA-AG	CCGATGTACT	FTTGAATCC	-TTTTAAATAA
Achlya	----AGTSTA	GCTAGCCGAA	GGTTT	----TAAGAGAGAA	CTGATSTTA	FTTGAATCC	-TTTTATATT







**Oligonukleotid 333F**  
(položaj 333 – 361 ITS-regije  
vrste *S. parasitica*)

351

1_KF717745.1	GTGAACACAA	ACTTGTTCA	TTTCTTGA-T	GGAAATGAAGC	AGACTGTGAA	G-GTC----	TGTGAATACA
1_KF717795.1	GTGAACACAA	ACTTGTTCA	TTTCTTGA-T	GGAAATGAAGC	AGACTGTGAA	G-GTC----	TGTGAATACA
1_KF717797.1	GTGAACACAA	ACTTGTTCA	TTTCTTGA-T	GGAAATGAAGC	AGAYTGTGAA	G-GTC----	TGTGAATACA
1_KF717816.1	GTGAACACAA	ACTTGTTCA	TTTCTTGA-T	GGAAATGAAGC	AGAYTGTGAA	G-GTC----	TGTGAATACA
2_KF717835.1	GTGAACACAA	CCTTGTTCA	TTTCTTGATT	GGGATGAAGC	AGACTGTGAA	G-GTC----	TGTAAATACA
2_KF717836.1	GTGAACACAA	CCTTGTTCA	TTTCTTGATT	GGGATGAAGC	AGACTGTGAA	G-GTC----	TGTAAATACA
3_KF717839.1	GTGAACACAA	ACTTGTTCA	TTTCTTGATT	GGGATGAAGC	AGACTGTGAA	G-GTC----	TGTAAATACA
3_KF717846.1	GTGAACACAA	ACTTGTTCA	TTTCTTGATT	GGGATGAAGC	AGACTGTGAA	G-GTC----	TGTAAATACA
3_KF717842.1	GTGAACACAA	ACTTGTTCA	TTTCTTGATT	GGGATGAAGC	AGACTGTGAA	G-GTC----	TGTAAATACA
3_KF717854.1	GTGAACACAA	ACTTGTTCA	TTTCTTGATT	GGGATGAAGC	AGACTGTGAA	G-GTC----	TGTAAATACA
3_KF717867.1	GTGAACACAA	ACTTGTTCA	TTTCTTGATT	GGGATGAAGC	AGACTGTGAA	G-GTC----	TGTAAATACA
3_KF717855.1	GTGAACACAA	ACTTGTTCA	TTTCTTGATT	GGGATGAAGC	AGACTGTGAA	G-GTC----	TGTAAATACA
3_KF717869.1	GTGAACACAA	ACTTGTTCA	TTTCTTGATT	GGGATGAAGC	AGACTGTGAA	G-GTC----	TGTAAATACA
3_KF717860.1	GTGAACACAA	ACTTGTTCA	TTTCTTGATT	GGGATGAAGC	AGACTGTGAA	G-GTC----	TGTAAATACA
3_KF717870.1	GTGAACACAA	ACTTGTTCA	TTTCTTGATT	GGGATGAAGC	AGACTGTGAA	G-GTC----	TGTAAATACA
3_KF717863.1	GTGAACACAA	ACTTGTTCA	TTTCTTGATT	GGGATGAAGC	AGACTGTGAA	G-GTC----	TGTAAATACA
3_KF717864.1	GTGAACACAA	ACTTGTTCA	TTTCTTGATT	GGGATGAAGC	AGACTGTGAA	G-GTC----	TGTAAATACA
3_KF717872.1	GTGAACACAA	ACTTGTTCA	TTTCTTGATT	GGGATGAAGC	AGACTGTGAA	G-GTC----	TGTAAATACA
4_KF717883.1	GTGAACACAA	CCTTGTTCA	TTTCTTGATT	GAGATGGAGC	AGAATGTGAA	G-GTC----	TGTAAATACA
4_KF717958.1	GTGAACACAA	CCTTGTTCA	TTTCTTGATT	GAGATGGAGC	AGAATGTGAA	G-GTC----	TGTAAATACA
5_KF717972.1	GTGAACACAA	CCTTGTTCA	TTTCTTGATT	GGTTTGGAGC	AGACTTTGAA	G-GTC----	TGTACTTGCA
5_KF717974.1	GTGAACACAA	CCTTGTTCA	TTTCTTGATT	GGTTTGGAGC	AGACTTTGAA	G-GTC----	TGTACTTGCA
6_KF718021.1	GTGAACACAA	CCTTGTTCA	TTTCTTGATT	GGTATGAAGC	AGACTTTGAA	G-GTC----	TGTAAATACA
6_KF718022.1	GTGAACACAA	CCTTGTTCA	TTTCTTGATT	GGTATGAAGC	AGACTTTGAA	G-GTC----	TGTAAATACA
7_KF718048.1	GTGAACACAA	CCTTGTTCA	TTTCTTCACT	GGGATGAAGC	AGACTGTGAA	G-GTC----	TGTCTTTTCA
8_KF718049.1	GTGAACACAA	GCTTGTTCA	TTTTTCAA-	---TGGAGC	AGACTGTGAG	G-GTC----	TGTCTTTTCA
8_KF718099.1	GTGAACACAA	GCTTGTTCA	TTTTTCAA-	---TGGAGC	AGACTGTGAG	G-GTC----	TGTCTTTTCA
8_KF718055.1	GTGAACACAA	GCTTGTTCA	TTTTTCAA-	---TGGAGC	AGACTGTGAG	G-GTC----	TGTCTTTTCA
8_KF718065.1	GTGAACACAA	GCTTGTTCA	TTTTTCAA-	---TGGAGC	AGACTGTGAG	G-GTC----	TGTCTTTTCA
8_KF718071.1	GTGAACACAA	GCTTGTTCA	TTTTTCAA-	---TGGAGC	AGACTGTGAG	G-GTC----	TGTCTTTTCA
8_KF718050.1	GTGAACACAA	GCTTGTTCA	TTTTTCAA-	---TGGGGC	AGACTGTGAG	G-GTC----	TGTCTTTTCA
9_KF718122.1	GTGAACACAA	ACTTGTTCA	TTTTTCAA-	---TGGAGC	AGACTGTGAG	G-GTC----	TGTCTTTTCA
11_KF718125.1	GTAAAAACAA	AATTGTTCA	TTTCTTCATT	GAGATGAAGC	AGAATGTGAA	G-GTC----	TGTCTTTTCA
12_KF718130.1	GTAAAAACAA	AATTGTTCA	TTTCTTCATT	GAGATGAAGC	AGAATGTGAA	G-GTC----	TGTCTTTTCA
12_KF718131.1	GTAAAAACAA	AATTGTTCA	TTTCTTCATT	GAGATGGAGC	AGAATGTGAA	G-GTC----	TGTCTTTTCA
13_KF718134.1	GTAAAAACAA	AATTGTTCA	TTTCTTCATT	GAAATGAAGC	AGAATGTGAA	G-GTC----	TGTCTTTTCA
13_KF718135.1	GTAAAAACAA	AATTGTTCA	TTTCTTCATT	GAAATGAAGC	AGAATGTGAA	G-GTC----	TGTCTTTTCA
14_KF718140.1	GTTAACACAA	AGTTGTTCA	TTTATT---	---TGAAGC	AGAATGTGAA	G-GTC----	TGTCTTTTCA
14_KF718141.1	GTTAACACAA	AGTTGTTCA	TTTATT---	---TGAAGC	AGAATGTGAA	G-GTC----	TGTCTTTTCA
15_KF718142.1	GTTAACACAA	AGTTGTTCA	TTTATT---	---TGAAGC	AGAATGTGAA	G-GTC----	TGTCTTTTCA
16_KF718143.1	GTTAACACAA	AGTTGTTCA	TTTATT---	---TGAAGC	AGAATGTGAA	G-GTC----	TGTCTTTTCA
21_KF718186.1	GTTAATACAA	AATTGTTCA	TTTATT---	---TGAAGC	AGAATGTGAA	G-GTC----	TGTCTTTTCA
21_KF718187.1	GTTAATACAA	AATTGTTCA	TTTATT---	---TGAAGC	AGAATGTGAA	G-GTC----	TGTCTTTTCA
23_KF718192.1	GTTAATACAA	AATTGTTCA	TTTATT---	---TGAAGC	AGAATGTGAA	G-GTC----	TGTCTTTTCA
22_KF718190.1	GTTAATACAA	AATTGTTCA	TTTATT---	---TGAAGC	AGAATGTGAA	G-GTC----	TGTCTTTTCA
10_KF718124.1	GTGAACACAA	ACTTGTTCA	TTTCTTAGG	GGGATGAAGC	AGACTTTGAA	G-GTC----	TGTCTTTTCA
17_KF718144.1	GTTAATACAA	ACTTGTTCA	TTTATT---	---TGAAGC	AGAATGTGGA	G-GTC----	TGTCTTTTCA
17_KF718146.1	GTTAATACAA	ACTTGTTCA	TTTATT---	---TGAAGC	AGAATGTGGA	G-GTC----	TGTCTTTTCA
17_KF718156.1	GTTAATACAA	ACTTGTTCA	TTTATT---	---TGAAGC	AGAATGTGGA	G-GTC----	TGTCTTTTCA
17_KF718152.1	GTTAATACAA	ACTTGTTCA	TTTATT---	---TGAAGC	AGAATGTGGA	G-GTC----	TGTCTTTTCA
18_KF718174.1	GTTAATACAA	ACTTGTTCA	TTTATT---	---TGAAGC	AGAATGTGGA	G-GTC----	TGTCTTTTCA
18_KF718177.1	GTTAATACAA	ACTTGTTCA	TTTATT---	---TGAAGC	AGAATGTGGA	G-GTC----	TGTCTTTTCA
19_KF718178.1	GTTAATACAA	ACTTGTTCA	TTTATT---	---TGAAGC	AGAATGTGGA	G-GTC----	TGTCTTTTCA
20_KF718179.1	GTTAATACAA	ACTTGTTCA	TTTATT---	---TGAAGC	AGAATGTGGA	G-GTC----	TGTCTTTTCA
Protoachlya	GTTAATACAA	AATTGTTTT	TTTTTTG---	---GAGAGC	AGACTTTGTT	G-GTC----	TGTCTTTTCA
Leptolegnia	GTTAATACAA	AATTGTTCA	TTTATT---	---TGAAGC	AGACTTTGAA	G-GTC----	TGTCTTTTCA
Aphanomyces	GTTAATACAA	AATTGTTTT	TTTTTTG---	---GGAAGC	AGAATGTGAA	G-GTC----	TGTCTTTTCA
Achlya	GTTCAAAAC	AATTGTTCA	TTTATT---	---TGAAGC	AGAATGTGAA	G-GTC----	TGTCTTTTCA



1_KF717745.1	AGTCCTTCTA	AACGA-TGGT	ACCTATGAGT	CCTCGTGAGA	TGTAT---	TA	TTTAAAGGTA	TGCCTGGGCT
1_KF717795.1	AGTCCTTCTA	AACGA-TGGT	ACCTATGAGT	CCTCGTGAGA	TGTAT---	TA	TTTAAAGGTA	TGCCTGGGCT
1_KF717797.1	AGTCCTTCTA	AACGA-CGGT	ACCTATGAGT	CCTCGTGAGA	TGTAT---	TA	TTTAAAGGTA	TGCCTGGGCT
1_KF717816.1	AGTCCTTCTA	AACGA-YGGT	ACCTATGAGT	CCTCGTGAGA	TGTAT---	TA	TTTAAAGGTA	TGCCTGGGCT
2_KF717835.1	AGTCCTTCTA	AACGA-TGGT	ACCTATGAGT	CCTCGTGAGA	TGTAT---	TA	TTTAAAGGTA	TGCCTGGGCT
2_KF717836.1	AGTCCTTCTA	AACGA-TGGT	ACCTATGAGT	CCTCGTGAGA	TGTAT---	TA	TTTAAAGGTA	TGCCTGGGCT
3_KF717839.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CGGT	ACCTATGAGT	CCTAGTGAGA	TGTAT---	TA	TTTAAAGGTA	TGCCTGGGCT
3_KF717846.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CGGT	ACCTATGAGT	CCTAGTGAGA	TGTAT---	TA	TTTAAAGGTA	TGCCTGGGCT
3_KF717842.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CGGT	ACCTATGAGT	CCTCGTGAGA	TGTAT---	TA	TTTAAAGGTA	TGCCTGGGCT
3_KF717854.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CGGT	ACCTATGAGT	CCTMGTGAGA	TGTAT---	TA	TTTAAAGGTA	TGCCTGGGCT
3_KF717867.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CGGT	ACCTATGAGT	CCTMGTGAGA	TGTAT---	TA	TTTAAAGGTA	TGCCTGGGCT
3_KF717855.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CGGT	ACCTATGAGT	CCTMGTGAGA	TGTAT---	TA	TTTAAAGGTA	TGCCTGGGCT
3_KF717869.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CGGT	ACCTATGAGT	CCTMGTGAGA	TGTAT---	TA	TTTAAAGGTA	TGCCTGGGCT
3_KF717860.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CGGT	ACCTATGAGT	CCTTGTGAGA	TGTAT---	TA	TTTAAAGGTA	TGCCTGGGCT
3_KF717870.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CGGT	ACCTATGAGT	CCTTGTGAGA	TGTAT---	TA	TTTAAAGGTA	TGCCTGGGCT
3_KF717863.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CGGT	ACCTATGAGT	CCTTGTGAGA	TGTAT---	TA	TTTAAAGGTA	TGCCTGGGCT
3_KF717864.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CGGT	ACCTATGAGT	CCTTGTGAGA	TGTAT---	TA	TTTAAAGGTA	TGCCTGGGCT
3_KF717872.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CGGT	ACCTATGAGT	CCTTGTGAGA	TGTAT---	TA	TTTAAAGGTA	TGCCTGGGCT
4_KF717883.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CGGT	ACCTATGAGT	CCTCGTGAGA	TGTAT---	TA	TTTAAAGGTA	TGCCTGGGCT
4_KF717958.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CGGT	ACCTATGAGT	CCTCGTGAGA	TGTAT---	TA	TTTAAAGGTA	TGCCTGGGCT
5_KF717972.1	AGTCCTTTTA	AACGA-TGGT	ACCTATGAGT	CCTCGTGAGA	TGTAT---	TA	TTTAAAGGTA	TGCCTGGGCT
5_KF717974.1	AGTCCTTTTA	AACGA-TGGT	ACCTATGAGT	CCTCGTGAGA	TGTAT---	TA	TTTAAAGGTA	TGCCTGGGCT
6_KF718021.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CGGT	ACCTATGAGT	CCTCGTGAGA	TGTAT---	TA	TTTAAAGGTA	TGCCTGGGCT
6_KF718022.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CGGT	ACCTATGAGT	CCTCGTGAGA	TGTAT---	TA	TTTAAAGGTA	TGCCTGGGCT
7_KF718048.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CGGT	ACCTGTGAGT	CCTCGTGAGA	TGTAT---	TA	TACAAAGGTA	TGCATGGGCT
8_KF718049.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CGGT	ACCTGTGAGT	CCTTGTGAGG	TGCAT---	TA	AATAAAGGTA	TGCCTGTGCT
8_KF718099.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CGGT	ACCTGTGAGT	CCTTGTGAGG	TGCAT---	TA	AATAAAGGTA	TGCCTGTGCT
8_KF718055.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CGGT	ACCTGTGAGT	CCTTGTGAGG	TGCAT---	TA	AATAAAGGTA	TGCCTGTGCT
8_KF718065.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CGGT	ACCTGTGAGT	CCTTGTGAGG	TGCAT---	TA	AATAAAGGTA	TGCCTGTGCT
8_KF718071.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CGGT	ACCTGTGAGT	CCTTGTGAGG	TGCAT---	TA	AATAAAGGTA	TGCCTGTGCT
8_KF718050.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CGGT	ACCTGTGAGT	CCTTGTGAGG	TGCAT---	TA	AATAAAGGTA	TGCCTGTGCT
9_KF718122.1	AGTCCTTCTA	AACGA-CGGT	ACCTGTGAGT	CCTTGTGAGA	TGTAT---	TA	AATAAAGGTA	TGCCTGTGCT
11_KF718125.1	AGTCCTTTCA	AACGA-CGGT	ACCTGTGAGT	CCTTGTGAGA	TGTAT---	TA	CTTAAAGGTA	TGCATGAGCT
12_KF718130.1	AGTCCTTTCA	AACGA-CGGT	ACCTGTGAGT	CCTTGTGAGA	TGTAT---	TA	TTTAAAGGTA	TGCATGAGCT
12_KF718131.1	AGTCCTTTCA	AACGA-CGGT	ACCTGTGAGT	CCTTGTGAGA	TGTAT---	TA	TTTAAAGGTA	TGCATGAGCT
13_KF718134.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CGGT	ACCTGTGAGT	CCTTGTGAGA	TGTAT---	TA	TTTAAAGGTA	TGCATGAGCT
13_KF718135.1	AGTCCTTTTA	AACGA-TGGT	ACCTGTGAGT	CCTTGTGAGA	TGTAT---	TA	TTTAAAGGTA	TGCATGAGCT
14_KF718140.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CGGT	ACCTGTAGCT	CCTCGTGAGA	TGTAT---	TA	TACAAAGGTA	TTGATGAGTT
14_KF718141.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CGGT	ACCTGTAGCT	CCTCGTGAGA	TGTAT---	TA	TACAAAGGTA	TTGATGAGTT
15_KF718142.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CGGT	ACCTGTAGCT	CCTTGTGAGG	TGTAT---	TA	TACAAAGGTA	TTGATGAGTT
16_KF718143.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CGGT	ACCTGTAGCT	CCTTGTGAGA	TGTAT---	TA	TTCAAAGGTA	TTTATGAGTT
21_KF718186.1	AGTCCTTTCA	AATGAGTATT	ACCTGTAGCT	CCTCGTGGGA	TGCAT---	TA	TATAAAGGTA	TTTATGATTT
21_KF718187.1	AGTCCTTTCA	AATGAGTATT	ACCTGTAGCT	CCTCGTGGGA	TGCAC---	TA	TATAAAGGTA	TTTATGATTT
23_KF718192.1	AGTCCTTTCA	AATGAGTATT	ACCTGTAGCT	CCTCGTGGGA	TGCAC---	TA	TATAAAGGTA	TATATGATTT
22_KF718190.1	AGTCCTTTCA	AATGAGTATT	ACCTGTAGCT	CCTTGTGGGA	TGCAC---	AA	TATAAAGGTA	TATATGATTT
10_KF718124.1	AGTCCTTTGA	AACGA-TGGT	ACCTGTGAGT	CCTCGTGAGA	TGTAT---	TA	CACAAAGGTA	TGCATGGGCT
17_KF718144.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CACT	ACCTGTAGCT	CCTCGTGGGA	TATAC---	AA	TATAAAGGTA	ACTATGATTT
17_KF718146.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CACT	ACCTGTAGCT	CCTCGTGGGA	TATAC---	AA	TATAAAGGTA	ACTATGATTT
17_KF718156.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CACT	ACCTGTAGCT	CCTCGTGGGA	TATAC---	AA	TATAAAGGTA	ACTATGATTT
17_KF718152.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CACT	ACCTGTAGCT	CCTCGTGGGA	TATAC---	AA	TATAAAGGTA	ACTATGATTT
18_KF718174.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CACT	ACCTGTAGCT	CCTTGTGGGA	TATAC---	AA	TATACAGGTT	ACTATGATTT
18_KF718177.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CACT	ACCTGTAGCT	CCTTGTGGGA	TATAC---	AA	TATACAGGTT	ACTATGATTT
19_KF718178.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CACT	ACCTGTAGCT	CCTCGTGGGA	TATAC---	AA	TATACAGGTT	ACTATGATTT
20_KF718179.1	AGTCCTTTTA	AACGA-CACT	ACCTGTAGCT	CCTCGTGGGA	TATAC---	AA	TATAAAGGTT	ACTATGATTT
Prötoachlya	AGTCATTGA	AATGAGTATT	GCCTGTAGT	CCTCGTGGGA	TGCAC---	AA	TACAAAGGTA	CCTGACATTC
Leptolegnia	AGTCCTTTCA	AATGAGTATT	ACCTGTAGCT	CCTCGTGGCT	TGTAT---	TA	TATAAAGGTA	TATACGGTTT
Aphanomyces	AGTCCTTTTA	AATGA-CGGT	CCCTGTATAG	CTGTCGAGG-	TGCAT---	TA	TACAAAGGTA	TATATGATTC
Achlya	AGTCCTTTTA	AATGAAAGCT	ACCTATATA-	CAACGTAAGA	AGCATACCA		TATAAAGGTA	TGTATCTTTT

1 KF717745.1 C-CTTTCGAG A--GTCCTTGT G-TGGCGACA CACA-GG-TT CAAAGAGAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 1\_KF717795.1 C-CTTTCGAG A--GTCCTTGT G-TGGCGACA CACA-GG-TT CAAAGAGAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 1\_KF717797.1 C-CTTTCGAG A--GTCCTTGT G-TGGCGACA CACA-GG-TT CAAAGAGAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 1\_KF717816.1 C-CTTTCGAG A--GTCCTTGT G-TGGCGACA CACA-GG-TT CAAAGAGAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 2\_KF717835.1 C-CTTTCGAG A--GTCCTTGT G-TGGCGACA CACA-GG-TT CAAAGAGAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 2\_KF717836.1 C-CTTTCGAG A--GTCCTTGT G-TGGCGACA CACA-GG-TT CAAAGAGAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 3\_KF717839.1 C-CTTTCGAA A--GTCCTTGT G-TGGCGACA CACA-GCACT CAAAGAGAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 3\_KF717846.1 C-CTTTCGAA A--GTCCTTGT G-TGGCGACA CACA-GCACT CAAAGAGAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 3\_KF717842.1 C-CTTTCGAA A--GTCCTTGT G-TGGCGACA CACA-GCACT CAAAGAGAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 3\_KF717854.1 C-CTTTCGAA A--GTCCTTGT G-TGGCGACA CACA-GCACT CAAAGAGAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 3\_KF717867.1 C-CTTTCGAA A--GTCCTTGT G-TGGCGACA CACA-GCACT CAAAGAGAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 3\_KF717855.1 C-CTTTCGAA A--GTCCTTGT G-TGGCGACA CACA-GCACT CAAAGAGAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 3\_KF717869.1 C-CTTTCGAA A--GTCCTTGT G-TGGCGACA CACA-GCACT CAAAGAGAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 3\_KF717860.1 C-CTTTCGAG A--GTCCTTGT G-TGGCGACA CACA-GCACT CAAAGAGAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 3\_KF717870.1 C-CTTTCGAG A--GTCCTTGT G-TGGCGACA CACA-GCACT CAAAGAGAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 3\_KF717863.1 C-CTTTCGAG A--GTCCTTGT G-TGGCGACA CACA-GCACT CAAAGAGAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 3\_KF717864.1 C-CTTTCGAG A--GTCCTTGT G-TGGCGACA CACA-GCACT CAAAGAGAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 3\_KF717872.1 C-CTTTCGAG A--GTCCTTGT G-TGGCGACA CACA-GCACT CAAAGAGAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 4\_KF717883.1 T-CTTTCGAG A--GTTTTGT G-TGGCGACA CACA-GCATT CAAAGAGAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 4\_KF717958.1 T-CTTTCGAG A--GTTTTGT G-TGGCGACA CACA-GCATT CAAAGAGAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 5\_KF717972.1 C-CTTTCGAG A--GTCCTTGT G-TGGCGACA CGCA-GCATT CAAAGAGAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 5\_KF717974.1 C-CTTTCGAG A--GTCCTTGT G-TGGCGACA CACA-GCATT CAAAGAGAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 6\_KF718021.1 C-CTTTCGAG A--GTCCTTGT G-TGGCGACA CACA-GCATT CAAAGAGAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 6\_KF718022.1 C-CTTTCGAG A--GTCCTTGT G-TGGCGACA CACA-GCATT CAAAGAGAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 7\_KF718048.1 C-CTTTCGAG A--GTTTTGT G-TGGAAACA CGCA-GCATT CAAAGAGAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 8\_KF718049.1 T-GGATCGAG A--GTCCTTGT G-TGGTAGCA CACA-GTATT CAAAGAGAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 8\_KF718099.1 T-GGATCGAG A--GTCCTTGT G-TGGTAGCA CACA-GTATT CAAAGAGAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 8\_KF718055.1 T-GGATCGAG A--GTCCTTGT G-TGGTAGCA CACA-GTATT CAAAGAGAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 8\_KF718065.1 T-GGATCGAG A--GTCCTTGT G-TGGTAGCA CGCA-GTATT CAAAGAGAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 8\_KF718071.1 T-GGATCGAG A--GTCCTTGT G-TGGTAGCA CGCA-GTATT CAAAGAGAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 8\_KF718050.1 T-GGATCGAG A--GTCCTTGT G-TGGTAGCA CACA-GCATT CAAAGAGAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 9\_KF718122.1 T-GGATCGAG A--GTCCTTGT G-TGGTAGCA CACA-GCATT CAAAGAGAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 11\_KF718125.1 T-ACATCGAG A--GTCCTTGT G-TGATGACA CACA-ACATT CAAAGAAAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 12\_KF718130.1 T-ACATCGAG A--GTTTTGT G-TGATGACA CACA-GCATT CAAAGAAAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 12\_KF718131.1 T-ACATCGAG A--GTTTTGT G-TGATGACA CACA-GCATT CAAAGAAAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 13\_KF718134.1 T-ATTTCGAG A--GTTTTGT G-TGATGGCA CACA-GCATT CAAAGAAAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 13\_KF718135.1 T-ATTTCGAG A--GTTTTGT G-TGATGGCA CACA-GCATT CAAAGAAAGA GCAAAATCGGG GTAGTTTTGC  
 14\_KF718140.1 CGATTTTCGAA A--GTCCTTGT G-TGATGGTA TGCA-GTTTT CGAGGGATGA ACGAATTGCG GTAGTTTTGC  
 14\_KF718141.1 CGATTTTCGAA A--GTCCTTGT G-TGATGGTA TGCA-GTTTT CGAGGGATGA ACGAATTGCG GTAGTTTTGC  
 15\_KF718142.1 CGATTTTCGAA A--GTCCTTGT G-TGATGGTA TGCA-GTTTT CGAGGGATGA ACGAATTGCG GTAGTTTTGC  
 16\_KF718143.1 CGATTTTCGAA A--GTCCTTGT G-TGATGGTA TACA-GT-TT CGACGGGAAGA ACGAATTGCG GTAGTTTTGC  
 21\_KF718186.1 TGATTTTCGAA A--GTCCTTGT G-TGATGGTG CACA-GC-TT TGAAGGAAAA ATAATTGCG GTAGTTTTGC  
 21\_KF718187.1 TGATTTTCGAA A--GTCCTTGT G-TGATGGTG CACA-GC-TT TGAAGGAAAA ATAATTGCG GTAGTTTTGC  
 23\_KF718187.1 TGATTTTCGAA A--GTCCTTGT G-TGATGGTA TACA-TATTTT CGAAGGAAGA ATGAATTGCG GTAGTTTTGC  
 22\_KF718190.1 TGATTTTCGAA A--GTTTTGT G-TGAAGGTG CACA-GC-TT TGAAGGAAAA ATAATTGCG GTAGTTTTGC  
 10\_KF718124.1 CGATTTTCGAC A--GTCCTTGT G-TGAAAGCA CCGG-ACACT CAAAGAAAGA GCAAAATAGCG GTAGTTTTGC  
 17\_KF718144.1 CAATTTCTAA G--GTTCTTGT T-CGAC--TG TAGC-AGCTT GGAAGGAGGA ATACATTGCG GTAGTTTTGC  
 17\_KF718146.1 CAATTTCTAA G--GTTCTTGT T-CGAC--TG TAGC-AGCTT GGAAGGAGGA ATACATTGCG GTAGTTTTGC  
 17\_KF718156.1 CAATTTCTAA G--GTTCTTGT T-CGAC--TG TAGC-AGCTT GGAAGGAGGA ATACATTGCG GTAGTTTTGC  
 17\_KF718152.1 CAATTTCTAA G--GTTCTTGT T-CGAC--TG TAGC-AGCTT GGAAGGAGGA ATACATTGCG GTAGTTTTGC  
 18\_KF718174.1 CAATTTCTAA A--GTTCTTGT T-CAAC--TG TAAC-GGCTT GGAAGGAGGA ATAATTGCG GTAGTTTTGC  
 18\_KF718177.1 CAATTTCTAA A--GTTCTTGT T-CAAC--TG TAAC-GGCTT GGAAGGAGGA ATAATTGCG GTAGTTTTGC  
 19\_KF718178.1 CAATTTCTGA G--GTTCTTGT T-CAAC--TG TAAC-AGCTT GGAAGGAGGA ATAATTGCG GTAGTTTTGC  
 20\_KF718179.1 CAATTTCTGA G--GTTCTTGT T-CAAC--TG TAAC-AGCTT GGAAGGAGGA ATAATTGCG GTAGTTTTGC  
 Protoachlya T-GCCTCGAA A--GTTTTGT G-TGATGGTA TACA-ATTTT CGACGGGAGGA ATAATTGCG GTAGTTTTGC  
 Leptolegnia CAATTTCTTG A--GTTCTTGT G-TGAA---A CATG-GGCTT TGAAGGTGGA ATGAATTGCG GTAGTTTTGC  
 Aphanomyces TGATTTTCGAA T--GTTTTGT GTTGAATTTT CACA-ACCTT TGAAGGAGG ATAATTGCG GTAGTTTTGC  
 Achlya GAATTTCAAT A--GTTTTGT A-TGAATTTT CATG-AC-GT TGAAGTAAA ATGAATTGCG GTAGTTTTGC

**Oligonukleotid 567R**  
(položaj 567 – 590 ITS-regije  
vrste *S. parasitica*)

561

1_KF717745.1	TTGTA	CTTCG	GTATG	GAGTGG	GC-AT	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCA	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
1_KF717795.1	TTGTA	CTTCG	GTATG	GAGTGG	GC-AT	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCA	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
1_KF717797.1	TTGTA	CTTCG	GTATG	GAGTGG	GC-AT	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCA	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
1_KF717816.1	TTGTA	CTTCG	GTATG	GAGTGG	GC-AT	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCA	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
2_KF717835.1	TTGTA	CTTCG	GTATG	GAGTGG	GC-AT	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
2_KF717836.1	TTGTA	CTTCG	GTATG	GAGTGG	GC-AT	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
3_KF717839.1	TTGTA	CTTCG	GTACG	GAGTGG	AC-AC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
3_KF717846.1	TTGTA	CTTCG	GTACG	GAGTGG	AC-AC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
3_KF717842.1	TTGTA	CTTCG	GTACG	GAGTGG	AC-AC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
3_KF717854.1	TTGTA	CTTCG	GTACG	GAGTGG	AC-AC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
3_KF717867.1	TTGTA	CTTCG	GTACG	GAGTGG	AC-AC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
3_KF717855.1	TTGTA	CTTCG	GTACG	GAGTGG	AC-AC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
3_KF717869.1	TTGTA	CTTCG	GTACG	GAGTGG	AC-AC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
3_KF717860.1	TTGTA	CTTCG	GTACG	GAGTGG	AC-AC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
3_KF717870.1	TTGTA	CTTCG	GTACG	GAGTGG	AC-AC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
3_KF717863.1	TTGTA	CTTCG	GTACG	GAGTGG	AC-AC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
3_KF717864.1	TTGTA	CTTCG	GTACG	GAGTGG	AC-AC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
3_KF717872.1	TTGTA	CTTCG	GTACG	GAGTGG	AC-AC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
4_KF717883.1	TTGTA	CTTCG	GTACG	GAGTGG	AC-AC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
4_KF717958.1	TTGTA	CTTCG	GTACG	GAGTGG	AC-AC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
5_KF717972.1	TTGTG	CTTCG	GTACG	GAGTGG	AC-AT	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
5_KF717974.1	TTGTG	CTTCG	GTACG	GAGTGG	AC-AT	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
6_KF718021.1	TTGTA	CTTCG	GTACG	GAGTGG	AC-AT	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
6_KF718022.1	TTGTA	CTTCG	GTACG	GAGTGG	AC-AC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
7_KF718048.1	TTGTA	CTTCG	GTACG	GAGTGG	AC-AC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
8_KF718049.1	TTGTG	CTTCG	GTACG	GAGTAG	AC-AT	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
8_KF718099.1	TTGTG	CTTCG	GTACG	GAGTAG	AC-AT	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
8_KF718055.1	TTGTG	CTTCG	GTACG	GAGTAG	AC-AT	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
8_KF718065.1	TTGTG	CTTCG	GTACG	GAGTAG	AC-AT	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
8_KF718071.1	TTGTG	CTTCG	GTACG	GAGTAG	AC-AT	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
8_KF718050.1	TTGTG	CTTCG	GTACG	GAGTAG	AC-AT	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
9_KF718122.1	TTGTG	CTTCG	GACG	GAGTAG	AC-AC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
11_KF718125.1	TTGTG	CTTCG	GTACG	GAGTGG	AC-AC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
12_KF718130.1	TTGTG	CTTCG	GTACG	GAGTGG	AC-AC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
12_KF718131.1	TTGTG	CTTCG	GTACG	GAGTGG	AC-AC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
13_KF718134.1	TTGTG	CTTCG	GTACG	GAGTGG	AC-AC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
13_KF718135.1	TTGTG	CTTCG	GTACG	GAGTGG	AC-AC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
14_KF718140.1	TTGTG	CTTCG	GTACG	GAGTGG	AC-AC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
14_KF718141.1	TTGTG	CTTCG	GTACG	GAGTGG	AC-AC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
15_KF718142.1	TTGTA	CTTCG	GTACG	GAGTGG	AC-AC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
16_KF718143.1	TTGTA	CTTCG	GTACG	GAGTGG	AC-AC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	TCTG-	TTGTT	TAAGC
21_KF718186.1	TTGTG	CTTCG	GTACG	GGTGA	ACAAC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GAGG	AGTTG	GTACT	GGAAG
21_KF718187.1	TTGTG	CTTCG	GTACG	GGTGA	ACAAC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GAGG	AGTTG	GTACT	GGAAG
23_KF718192.1	TTGTA	CTTCG	GTACG	GAGTGA	ACAAT	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GAGG	AGTTG	GTACT	GGAAG
22_KF718190.1	TTGTG	CTTCG	GTACG	GGTGA	ACAAC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GATG	GGTTG	GTACT	GGAAG
10_KF718124.1	TTGTG	CTTCG	GACG	GAGTGG	AC-AC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GOGAG	GGTTG	GTGCT	GGAAG
17_KF718144.1	TTGAG	TTTCG	GCTC	GAGTGA	AC-ATCA	ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GACG	GGTTG	TGG	CGAAGC
17_KF718146.1	TTGAG	TTTCG	GCTC	GAGTGA	AC-ATCA	ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GACG	GGTTG	TGG	CGAAGC
17_KF718156.1	TTGAG	TTTCG	GCTC	GAGTGA	AC-ATCA	ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GACG	GGTTG	TGG	CGAAGC
17_KF718152.1	TTGAG	TTTCG	GCTC	GAGTGA	AC-ATCA	ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GACG	GGTTG	TGG	CGAAGC
18_KF718174.1	TTGAG	TTTCG	GCTC	GAGTGA	AC-ATCA	ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GAGG	AGTTG	YGG	CGAAGT
18_KF718177.1	TTGAG	TTTCG	GCTC	GAGTGA	AC-ATCA	ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GAGG	AGTTG	CGG	CGAAGT
19_KF718178.1	TTGAG	TTTCG	GCTC	GAGTGA	AC-ATCA	ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GATG	GGTTG	CGG	CGAAGT
20_KF718179.1	TTGAG	TTTCG	GCTC	GAGTGA	AC-ATCA	ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GATG	GGTTG	CGG	CGAAGT
Prötoachlya	TTGTA	CTTCG	GACG	GGGTAG	AC-ATC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GCGT	GGTTG	TTG	CCGAGC
Leptolegnia	TTGTA	CTTCG	GTACG	GGGTGG	ATCAC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	GACG	GGATT	GTC	TTGACGC
Aphanomyces	TTGTG	CTTCG	GACG	GGGTGA	ACAAC	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	AAGG	GGTTT	GTAGT	GGAAG
Achlya	TTGTA	CTTCG	GTACG	GAGTGA	ACAAT	--ATA	TTGCT	TTTT--	TGTGA	TTTCT	TAGAT	TTGCT	GTATT	GGAGT



701

1_KF717745.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
1_KF717795.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
1_KF717797.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
1_KF717816.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
2_KF717835.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
2_KF717836.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
3_KF717839.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
3_KF717846.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
3_KF717842.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
3_KF717854.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
3_KF717867.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
3_KF717855.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
3_KF717869.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
3_KF717860.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
3_KF717870.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
3_KF717863.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
3_KF717864.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
3_KF717872.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
4_KF717883.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
4_KF717958.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
5_KF717972.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
5_KF717974.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
6_KF718021.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
6_KF718022.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
7_KF718048.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
8_KF718049.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
8_KF718099.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
8_KF718055.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
8_KF718065.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
8_KF718071.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
8_KF718050.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
9_KF718122.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
11_KF718125.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
12_KF718130.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
12_KF718131.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
13_KF718134.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
13_KF718135.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
14_KF718140.1	A	CTCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
14_KF718141.1	A	CTCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
15_KF718142.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
16_KF718143.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
21_KF718186.1	T	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
21_KF718187.1	T	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
23_KF718192.1	T	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
22_KF718190.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
10_KF718124.1	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
17_KF718144.1	T	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAG
17_KF718146.1	T	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAG
17_KF718156.1	T	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAG
17_KF718152.1	T	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAG
18_KF718174.1	T	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAG
18_KF718177.1	T	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAG
19_KF718178.1	T	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAG
20_KF718179.1	T	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAG
Prötoachlya	A	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA
Leptolegnia	A	CTCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAG
Aphanomyces	AC	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAGA
Achlya	--	ATCCAA	TT	TGGAC	CGAT	ATCAAA