

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Mia Schwerer

**Fenotipska i genotipska varijabilnost izolata roda *Saprolegnia* iz hrvatskih  
pastrvskih ribnjaka**

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta i Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Ane Bielen i prof. dr. sc. Ivane Maguire te neposrednim vodstvom Dore Pavić, mag. oecol. i Leone Lovrenčić, mag. biol. exp. Rad je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2020./2021.

## POPIS KRATICA

Acc. No.	Pristupni broj (engl. <i>accession number</i> )
<i>ALTS1</i>	Genski lokus koji kodira alanil-tRNA-sintetazu
<i>COXI</i>	Genski lokus koji kodira podjedinicu 1 citokrom c-oksidge
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DST	Diploidni tip sekvence (engl. <i>diploid sequence type</i> )
EDTA	Etilendiamintetraoctena kiselina (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
gDNA	Genomska DNA (engl. <i>genomic DNA</i> )
<i>GLUT</i>	Genski lokus koji kodira glutaminazu
ITS-regija	ITS-regija (engl. <i>internal transcribed spacer region</i> )
MLST	Tipizacija višestrukih lokusa (engl. <i>multilocus sequence typing</i> )
<i>NAD1</i>	Genski lokus koji kodira podjedinicu 1 NADH-dehidrogenaze
pb	Parovi baza
PCR	Lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
RAMS	Nasumična amplifikacija mikrosatelita (engl. <i>random amplified microsatellites</i> )
RAPD	Nasumična amplifikacija polimorfne DNA (engl. <i>random amplification of polymorphic DNA</i> )
<i>RPB2</i>	Genski lokus koji kodira podjedinicu B RNA-polimeraze II
RZE	Ponovno nastajanje zoospora iz cisti (engl. <i>repeated zoospore emergance</i> )
<i>SHMT</i>	Genski lokus koji kodira serin-hidroksimetil-transferazu
ST	Tip sekvence (engl. <i>sequence type</i> )
st. dev.	Standardna devijacija (engl. <i>standard deviation</i> )
<i>TUBB</i>	Genski lokus koji kodira beta-tubulin

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1. 1. Taksonomski položaj roda <i>Saprolegnia</i> .....	3
1. 2. Životni ciklus roda <i>Saprolegnia</i> .....	5
1. 3. Saprolegnioza .....	6
1. 4. Varijabilnost izolata unutar vrsta iz roda <i>Saprolegnia</i> .....	8
1. 4. 1. Fenotipska varijabilnost.....	8
1. 4. 2. Genotipska varijabilnost .....	8
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA.....	11
3. MATERIJALI I METODE.....	12
3. 1. Izolati roda <i>Saprolegnia</i> .....	12
3. 2. Uzgoj i praćenje rasta izolata.....	13
3. 3. Izolacija DNA .....	15
3. 4. Elektroforeza u agaroznom gelu .....	16
3. 5. Tipizacija višestrukih genskih lokusa (engl. <i>multilocus sequence typing</i> , MLST) s filogenetskom analizom .....	16
3. 6. Statističke analize .....	18
4. REZULTATI.....	19
4. 1. Varijabilnost brzine rasta micelija među izolatima iz roda <i>Saprolegnia</i> .....	19
4. 2. Genotipska varijabilnost izolata vrste <i>S. parasitica</i> analizirana tipizacijom višestrukih genskih lokusa .....	23
5. RASPRAVA .....	27
6. ZAKLJUČCI.....	30
7. ZAHVALE.....	31
8. POPIS LITERATURE .....	32
9. SAŽETAK .....	37
10. SUMMARY .....	38
11. ŽIVOTOPIS .....	39
12. PRILOZI .....	40

## 1. UVOD

Patogeni mikroorganizam *Saprolegnia parasitica* i ostale vodene plijesni iz roda *Saprolegnia* uzrokuju saprolegniozu, bolest koja zahvaća sve razvojne stadije riba, od jaja do odraslih jedinki (Cao i sur., 2012; Torto-Alalibo i sur., 2005). Najčešći domaćini patogena su salmonidne vrste riba kao što su kalifornijska pastrva (*Oncorhynchus mykiss*) i potočna pastrva (*Salmo trutta*) (Gozlan i sur., 2014). Iako se javlja i kod divljih populacija riba, saprolegnioza predstavlja poseban problem u slatkovodnoj akvakulturi (Hussein i sur., 2001) gdje zbog masovnih infekcija može doći do velikih gubitaka u uzgoju, koji u nekim slučajevima iznose i do 50 % (Rezinciuc i sur., 2014; Sandoval-Sierra, Martín i Diéguez-Uribeondo, 2014).

Unatoč velikim štetama koje uzrokuju ovi patogeni, epidemiološka istraživanja roda *Saprolegnia* su malobrojna, uglavnom zbog toga što su molekularne metode identifikacije različitih vrsta *Saprolegnia* spp. razvijene tek nedavno (Sandoval-Sierra, Martín i Diéguez-Uribeondo, 2014). Na temelju provedenih istraživanja utvrđeno je da je vrsta *Saprolegnia parasitica* najčešće povezana s izbijanjem epidemija odnosno ima najznačajniji štetan utjecaj, ali infekcije uzrokuju i vrste *S. ferax*, *S. delica*, *S. diclina*, *S. australis* te ponekad i *S. asterophora*, *S. torulosa* i *S. aenigmatica* (de la Bastide, Leung i Hintz, 2015; Pavić i sur., 2021; Rezinciuc i sur., 2014; Sakaguchi i sur., 2019; Sandoval-Sierra, Martín i Diéguez-Uribeondo, 2014; Sarowar, Cusack i Duston, 2019). Međutim, važno je naglasiti da su potrebna daljnja istraživanja u smjeru detaljnije fenotipske i genotipske karakterizacije izolata patogena, a ne samo identifikacija do razine vrste. Naime, nekoliko ranijih istraživanja demonstriralo je značajnu varijabilnost među izolatima iste vrste unutar roda *Saprolegnia*, uključujući varijacije u brzini radijalnog rasta micelija, klijavosti zoospora, intenzitetu lignolitičke, celulolitičke i hitinolitičke aktivnosti, ali i virulenciji te preferenciji prema različitim domaćinima (Bangyeekhun i sur. 2001; Diéguez-Uribeondo i sur., 2007; Masigol i sur., 2020; Matthews i Jo, 2020; Ravasi i sur., 2018; Sarowar, Cusack i Duston, 2019). Ovakve su studije malobrojne, ali presudne za utvrđivanje lokacija s najvećim rizikom od izbijanja bolesti odnosno onih na koje bi trebalo usmjeriti najveće napore u kontroli patogena.

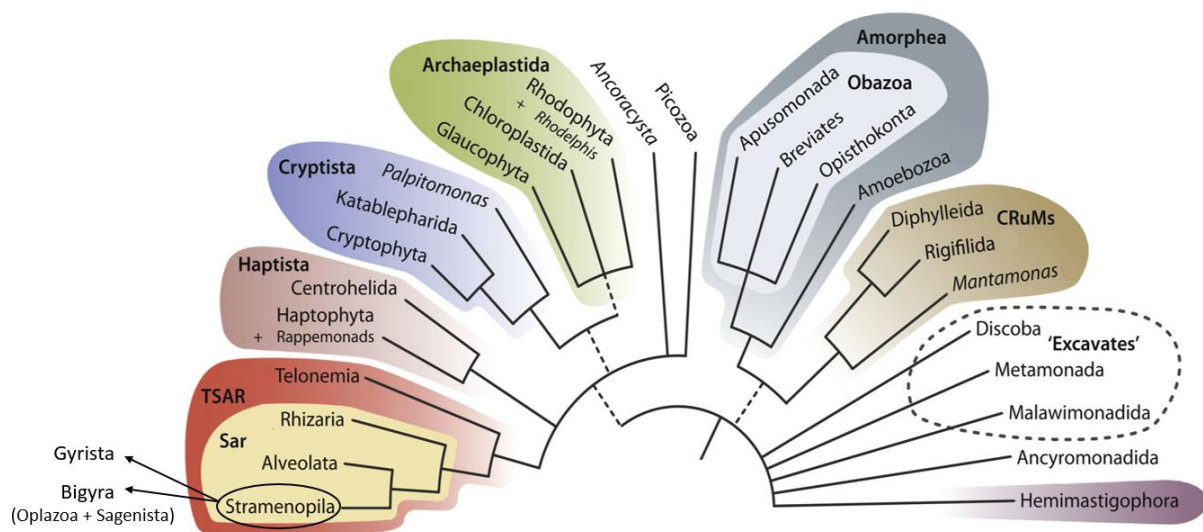
U Hrvatskoj su istraživanja saprolegnioze u samom začetku. U nedavnom su istraživanju Pavić i suradnika (2021) po prvi puta sakupljeni izolati roda *Saprolegnia* iz četiri hrvatska pastrvska ribnjaka (Solín, Kostanjevac, Radovan i Gračani) te njihovih uzvodnih i nizvodnih lokacija. Izolati su sakupljeni s riba koje su imale znakove saprolegnioze, kao i sa zdravih jedinki te iz vode. Sekvenciranjem ITS-regije (engl. *internal transcribed spacer*) izolati

su identificirani do razine vrste te je utvrđeno da pripadaju vrstama *S. australis*, *S. delica*, *S. ferax* i *S. parasitica*, a na većini bolesnih riba nađena je vrsta *S. parasitica*. Kao nastavak navedenog istraživanja, u ovom je radu po prvi put provedena fenotipska i genotipska karakterizacija izolata roda *Saprolegnia* iz hrvatskih pastrvskih ribnjaka te istražena ovisnost pojedinih genotipova izolata s lokacijom uzorkovanja i brzinom radijalnog rasta njihovih micelija.

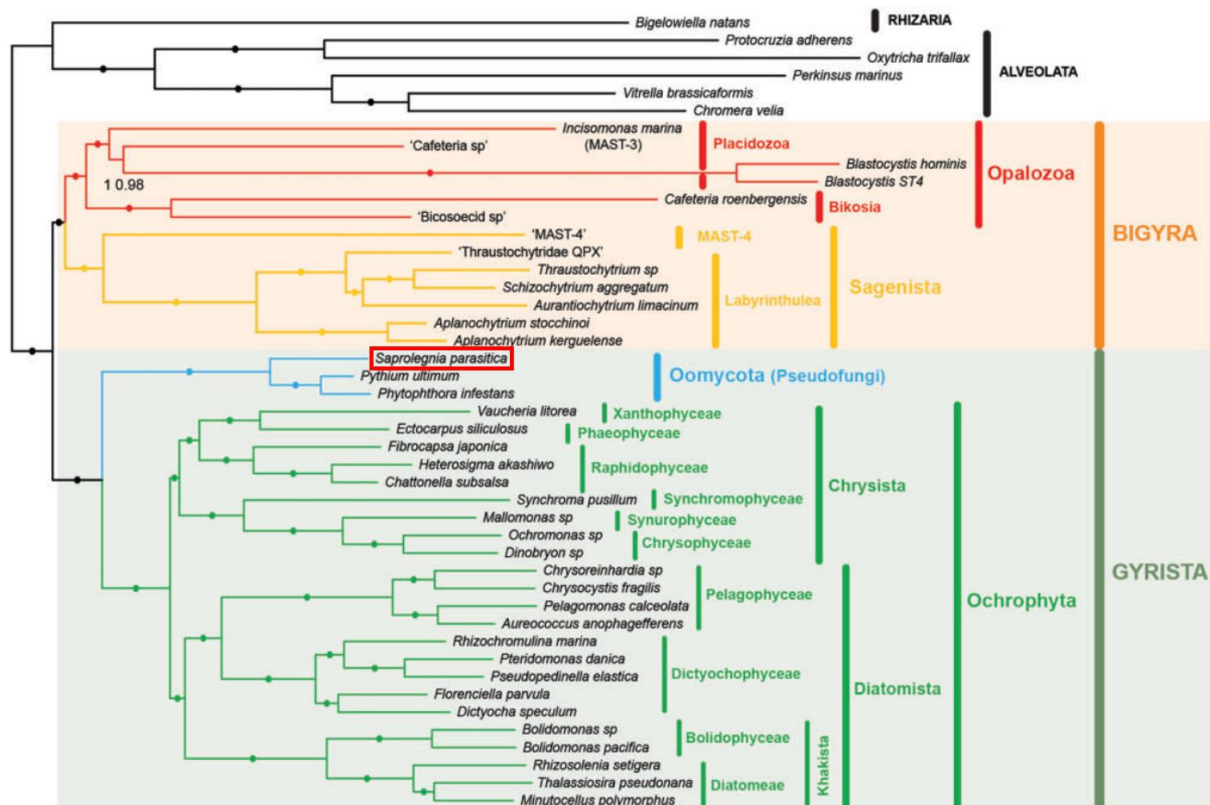
## 1. 1. Taksonomski položaj roda *Saprolegnia*

Mikroorganizmi iz roda *Saprolegnia* nastanjuju vodena staništa, prvenstveno kopnene slatkovodne ekosustave, a po načinu života su saprofiti i oportunistički patogeni slatkovodnih životinja, poput riba, vodozemaca i rakova (van den Berg i sur., 2013). U svijetu su najzastupljenije vrste ovog roda *Saprolegnia parasitica*, *Saprolegnia delica*, *Saprolegnia australis* i *Saprolegnia ferax* (Earle i Hintz, 2014), a te su vrste zastupljene i u hrvatskim pastrvskim ribnjacima (Pavić i sur., 2021).

Mikroorganizmi roda *Saprolegnia* (red Saprolegniales) spadaju u razred Oomycota (vodene plijesni) u kojem se osim reda Saprolegniales, nalazi i red Peronosporales koji većinom obuhvaća patogene biljaka (Görg i sur., 2017). Vodene plijesni su eukariotski mikroorganizmi koji su prije svrstavani u carstvo gljiva (Fungi), ali su temeljem novijih molekularnih i biokemijskih analiza premještene u carstvo Protista točnije u supergrupu TSAR u skupinu Stramenopila (Burki i sur., 2020; Earle i Hintz, 2014). TSAR je skraćenica od naziva skupina koje sačinjavaju ovu grupu, a to su Telonemia, Rhizaria, Alveolata i Stramenopila (Heterokonta) (Burki i sur., 2020). Na Slici 1 prikazano je filogenetsko stablo eukariota s naznačenom skupinom Stramenopila u koju pripadaju i vodene plijesni. Skupina Stramenopila se može podijeliti na podskupine Bigyria, u koju spadaju Opalozoa i Sagenista te Gyrista unutar koje su svrstane vodene plijesni. Filogenetsko stablo Stramenopila prikazano je na Slici 2.



Slika 1. Filogenetsko stablo eukariota. Različite boje označavaju supergrupe, a isprekidane linije manju sigurnost oko monofiletskog podrijetla skupine. Preuzeto i modificirano iz Burki i sur., 2020.



Slika 2. Filogenetsko stablo Stramenopila. Preuzeto iz Derelle i sur., 2016.

Unatoč filogenetskoj udaljenosti, vodene plijesni i gljive imaju niz zajedničkih značajki: tijelo im je građeno od hifa koje tvore micelij, heterotrofi su, spolno se razmnožavaju sporama te stvaraju nespodne zoospore (Beakes, Glockling i Sekimoto, 2012). S druge strane vodene plijesni za razliku od gljiva u sastavu stanične stijenke nemaju hitin, već se ona sastoji od celuloze i  $\beta$ -glukana (Mélida i sur., 2013), hife su im neseptirane odnosno nemaju pregrade (septe) (Mendoza i Vilela, 2013), diploidni su organizmi s velikim genomom, imaju zoospore s dva različita biča te stvaraju oospore (diploidne spore) (Thines, 2018).

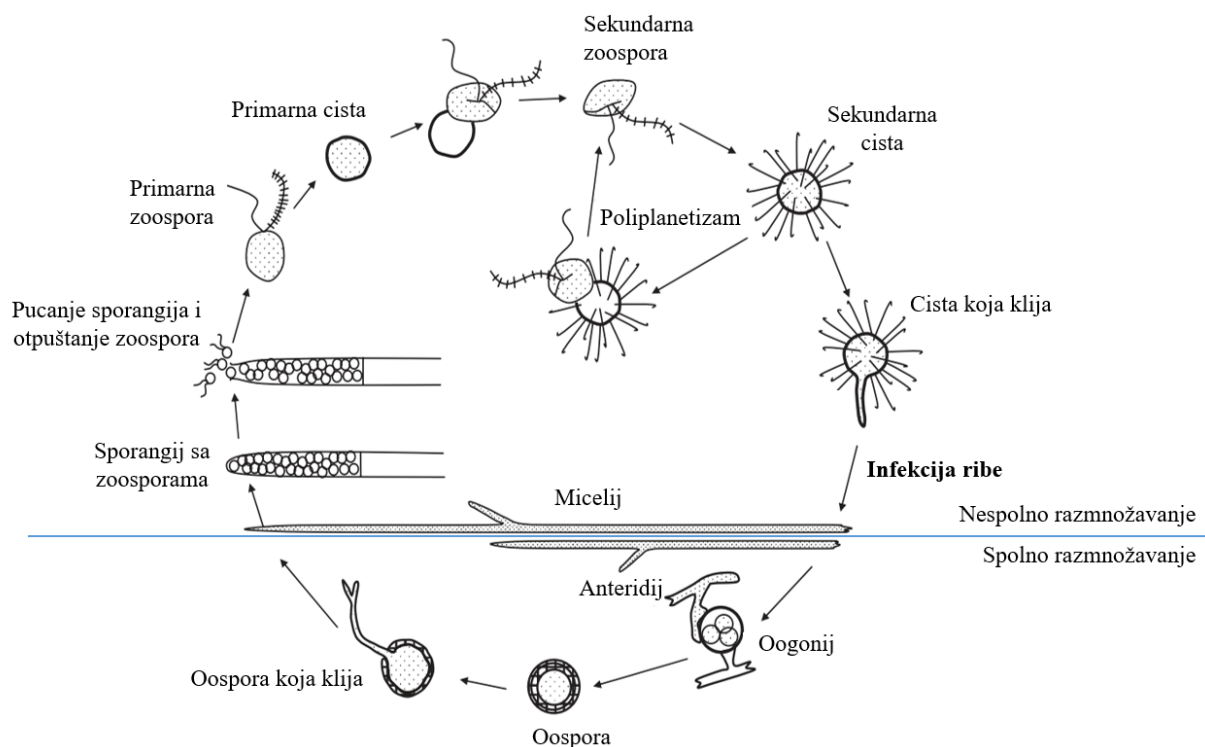


## 1. 2. Životni ciklus roda *Saprolegnia*

Kao i ostali organizmi iz skupine Oomycota, životni ciklus vrsta iz roda *Saprolegnia* uključuje spolno i nespolno razmnožavanje (Slika 3) (Van den Berg i sur., 2013).

Nespolan način razmnožavanja uključuje sporulaciju koju potiče nedostatak hranjiva i nagli pad temperature u okolišu. Na završecima hifa formiraju se sporangiji sa zoosporama. Primarne zoospore se zatim oslobađaju u okoliš i kreću se pomoću dva biča. Pokretne su samo nekoliko minuta i ubrzo prelaze u stadij primarne ciste. Iz primarnih cista se zatim oslobađaju sekundarne zoospore koje su pokretne nekoliko dana te se smatraju glavnim infektivnim stadijem. Sekundarne zoospore se pretvaraju u sekundarne ciste koje, ukoliko kemotaksijom nađu pogodni supstrat odnosno domaćina, klijanjem stvaraju novi micelij. Ukoliko se to ne dogodi, one mogu ponovno prijeći u stadij sekundarne zoospore koja zatim ponovno može prijeći u stadij sekundarne ciste. Taj kružni proces koji se može odvijati nekoliko puta naziva se poliplanetizam i pomaže patogenu u pronalasku pogodnog domaćina (van den Berg i sur., 2013; Bruno i Wood, 1999; van West, 2006).

Tijekom spolnog razmnožavanja stvaraju se posebne haploidne strukture, muški i ženski gametangiji, odnosno anteridiji i oogoniji. Kod vodenih plijesni anteridiji i oogoniji se nalaze na istoj hifi (homotalični organizmi). U oogonijima nastaju jajne stanice, čijom oplodnjom nastaju oospore, a one klijaju u micelij na kojem se formira zoosporangij s zoosporama te se tako zatvara životni ciklus (De La Cruz i sur., 2005).



Slika 3. Shematski prikaz životnog ciklusa vrste *Saprolegnia parasitica* koji obuhvaća nesporno i spolno razmnožavanje. Preuzeto i modificirano iz van West, 2006.

### 1. 3. Saprolegnioza

Ribe su kao stanovnici slatkovodnih ekosustava izuzetno važna karika u hranidbenoj mreži (Holmlund i Hammer, 1999), a osim toga uzgoj riba u akvakulturi diljem svijeta bilježi kontinuirani porast i predstavlja djelatnost od velike ekonomske važnosti (Sicuro, 2021).

Ribe su podložne mnogim bolestima čiji su uzročnici bakterije, virusi, gljive, protisti i Metazoa, a značajan udio bolesti riba u prirodnim populacijama i akvakulturi uzrokuju vodene plijesni (Gozlan i sur., 2014). Među vodenim plijesnima su za salmonidnu akvakulturu, uključujući pastrvske ribnjake i mrijestilišta, najznačajniji patogeni iz roda *Saprolegnia* koji uzrokuju saprolegniozu. Imaju širok spektar domaćina iz porodice pastrva (Salmonidae), a neki od njih su uzgojno važne vrste poput kalifornijske pastrve (*Oncorhynchus mykiss*), potočne pastrve (*Salmo trutta*) i atlantskog lososa (*Salmon salar*) (Gozlan i sur., 2014). Saprolegniozu uzrokuje vrsta *Saprolegnia parasitica* kao i neke druge vrste roda *Saprolegnia* (*S. australis*, *S. diclina* i *S. ferax*), a simptom bolesti je pojava filamentoznog sivo-bijelog micelija na jajima i/ili škrgama/koži zaraženih riba (Slika 4). U nekim slučajevima micelijem može biti prekriveno i do 80 % površine ribe što često dovodi do poremećaja osmotske ravnoteže i uginuća jedinke.

Kod inficiranih jaja također dolazi do pojave osmotskog šoka i uginuća nakon što hife probiju korionsku membranu (van den Berg i sur., 2013; Bruno, Van West i Beakes, 2011; Liu i sur., 2014).



Slika 4. Jedinka vrste *Salmon salar* zaražena patogenom *S. parasitica*. Micelij na škrgama kao jedan od vidljivih simptoma saprolegnioze označen je strelicom. Preuzeto iz Frenken i sur., 2019.

Saprolegnioza ne uzrokuje samo ekonomske gubitke, najčešće zbog pomora jaja u ribnjacima, već predstavlja i ekološki problem (Bonansea i sur., 2019). Naime, za potrebe kontrole bolesti koriste se toksične kemikalije štetne za ljudsko zdravlje, ali i vodene organizme. Prije se za suzbijanje saprolegnioze koristilo malahitno zelenilo, ali je danas njegova upotreba zabranjena zbog kancerogenog i toksičnog djelovanja (van West, 2006). Međutim, alternativna sredstva koja se trenutno koriste, poput formalina, bronopola i bakrovog sulfata, također imaju dokazane toksične i/ili kancerogene učinke (Cui i sur. 2011; Jacob i sur. 2016; Norliana i sur. 2009; Wooster i sur. 2005).

## **1. 4. Varijabilnost izolata unutar vrsta iz roda *Saprolegnia***

S obzirom na velike ekološke i ekonomske štete koje uzrokuju vrste roda *Saprolegnia*, bitna je detaljna karakterizacija uzročnika bolesti. Malobrojne postojeće studije ukazale su na značajnu varijabilnost među izolatima iste vrste unutar roda *Saprolegnia*, kako na fenotipskoj, tako i na genotipskoj razini.

### **1. 4. 1. Fenotipska varijabilnost**

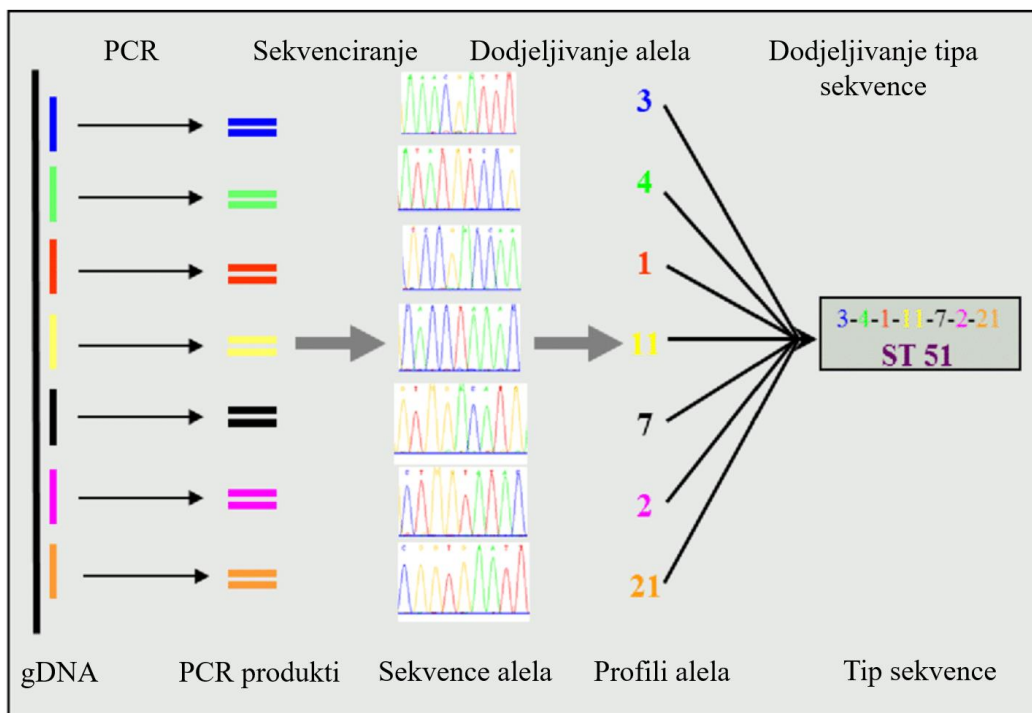
Značajna fenotipska varijabilnost između izolata iste vrste roda *Saprolegnia* do sada je utvrđena na različitim razinama: brzini radijalnog rasta micelija (Bangyeekhun i sur. 2001), razlikama u dimenzijama zoospora, cista i oospora (Sarowar, Cusack i Duston, 2019), brzini ponovnog nastanka zoospora iz cisti (engl. *repeated zoospore emergence*, RZE) (Bangyeekhun i sur. 2001; Diéguez-Uribeondo i sur., 2007), razini lignolitičke, celulolitičke i hitinolitičke aktivnosti (Masigol i sur., 2020) te preferencijama domaćina (Matthews i Jo, 2020). Sve ovo upućuje na to da bi se u budućim epidemiološkim istraživanjima saprolegnioze trebala posvetiti veća pažnja detaljnoj *in vitro* i *in vivo* karakterizaciji sojeva i prioritizaciji onih koji pokazuju veću virulenciju.

### **1. 4. 2. Genotipska varijabilnost**

Osim fenotipske varijabilnosti u nekoliko je istraživanja (Bangyeekhun i sur., 2003; Bastide i sur. 2018; Naumann, 2014; Ravasi i sur., 2018) demonstrirana i genotipska varijabilnost izolata iz roda *Saprolegnia*, iako su metode genotipizacije vrste *S. parasitica* i srodnih vrsta tek u razvoju. Bangyeekhun i suradnici (2003) su metodom nasumične amplifikacije polimorfne DNA (engl. *random amplification of polymorphic DNA*, RAPD) podijelili izolate iz roda *Saprolegnia* u nekoliko skupina te zaključili da je pomoću tehnike RAPD moguće karakterizirati genske varijacije i da taj podatak može biti koristan u praćenju širenja zaraze. Nadalje, Bastide i suradnici (2018) su korištenjem degeneriranih početnica za PCR koje sadrže kratke ponavljajuće sljedove napravili genske markere za mikrosatelite (engl. *random amplified microsatellites*, RAMS), a istu metodu je upotrijebio i Naumann (2014) kako bi pomoću ciljanih regija s mikrosatelitnim ponavljanjima detektirao varijacije između različitih izolata unutar iste vrste. Navedenim istraživanjima analizirana je genetska raznolikost izolata iz roda *Saprolegnia* porijeklom iz Kanade.

Nedavno je u svrhu istraživanja epidemiologije te praćenja različitih populacija vrsta roda *Saprolegnia* razvijena metoda genotipizacije višestrukih lokusa (engl. *multilocus sequence typing*, MLST) ovog roda (Ravasi i sur., 2018). To je metoda kojom se karakteriziraju izolati

iste vrste na temelju sekvenci određenih fragmenata genoma, najčešće sedam održavateljskih gena (engl. *housekeeping genes*) (Pérez-Losada i sur., 2013). Održavateljski geni određene vrste su konstitutivni geni koji su toj vrsti neophodni kako bi obavljala osnovne stanične funkcije i preživjela (Richly, Chinnery i Leister, 2003), a u MLST-metodi se koriste jer su visoko konzervirani odnosno rijetko mutiraju (She i sur., 2009). Kako bi se provela MLST-analiza prvo je potrebno izolirati genomsku DNA izolata i metodom lančane reakcije polimerazom umnožiti genske regije održavateljskih gena specifičnih za tu vrstu (Slika 5) (Macheras i sur., 2014). Genske regije od 450 do 500 parova baza se sekvenciraju i dobivene sekvence se uspoređuju kako bi se detektirale razlike u sekvencama različitih izolata (Pérez-Losada i sur., 2013). Temeljem podataka o sekvencama alela svakog održavateljskog gena dobiva se profil alela, iz kojeg se onda definira tip sekvence (engl. *sequence type*, ST) određenog izolata. Tipovi sekvence više izolata iste vrste se uspoređuju i na temelju tih informacija se karakteriziraju različiti sojevi neke vrste (Maiden i sur., 2013). Prednost ove metode je to što su dobiveni podaci, odnosno sekvence, univerzalne i izolati mogu biti lako uspoređeni s onima čije se informacije o sekvencama nalaze u online-bazama podataka. Svakim danom razvija se sve više takvih baza podataka za različite vrste (Jolley i sur., 2018), kao što je ona za vrstu *Saprolegnia parasitica* (Ravasi i sur., 2018).



Slika 5. Shematski prikaz MLST-a. Preuzeto i modificirano iz Ruppitsch, 2016. gDNA – genomsku DNA.

Nedavno razvijena MLST-shema za vrstu *S. parasitica* (Ravasi i sur., 2018) uključuje sedam genskih lokusa; *ALTS1* koji kodira za alanil-tRNA-sintetazu, *COX1* za podjedinicu 1 citokrom c-oksidge, *GLUT* za glutaminazu, *NAD1* za podjedinicu 1 NADH-dehidrogenaze, *RPB2* za podjedinicu B RNA-polimeraze II, *SHMT* za serin-hidroksimetil-transferazu i *TUBB* za beta-tubulin. Od navedenih gena *ALTS1*, *GLUT*, *RPB2*, *SHMT* i *TUBB* su jezgrini geni, a *COX1* i *NAD1* mitohondrijski. Koristeći ovaj pristup, Ravasi i suradnici (2018) su identificirali genotipove 77 izolata vrste *Saprolegnia parasitica* porijeklom iz švicarskih pastrvskih ribnjaka i po sličnosti ih podijelili u 15 različitih diploidnih tipova sekvenci (engl. *diploid sequence type*, DST). Uočeno je kako većinu epidemija uzrokuju upravo izolati svrstani u DST3, a to je ujedno bio i najrašireniji genotip, pronađen na svim lokacijama uzorkovanja. Uz DST3 široko je rasprostranjen i DST7 koji je pronađen u tri od četiri lokacije uzorkovanja. Osim široko rasprostranjenih DST-ova postoje i oni koji su specifični za određenu geografsku lokaciju, a takvih je pronađeno osam (DST4, DST5, DST6, DST8, DST11, DST12, DST13, DST14). Ovom metodom dobiveni su podatci o varijabilnosti izolata unutar vrste te njihovoj rasprostranjenosti što može pomoći u boljem razumijevanju epidemiologije i širenja infekcije na određenom području.

## 2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Mikroorganizmi iz roda *Saprolegnia*, kao što je vrsta *Saprolegnia parasitica*, patogeni su riba i drugih slatkovodnih organizama, i kao takvi predstavljaju velik ekološki problem u slatkovodnim staništima, ali i uzrokuju značajne ekonomske gubitke u salmonidnoj akvakulturi. Unatoč takvim negativnim učincima, molekularna epidemiologija roda *Saprolegnia* je do danas velikim dijelom neistražena (Ravasi i sur., 2018). Stoga je opći cilj ovog rada bio utvrditi fenotipsku i genotipsku varijabilnost izolata iste vrste unutar roda *Saprolegnia*, i to analizirajući izolate vrsta *S. australis*, *S. delica*, *S. ferax* i *S. parasitica* iz postojeće banke porijeklom iz hrvatskih pastrvskih ribnjaka (Pavić i sur., 2021).

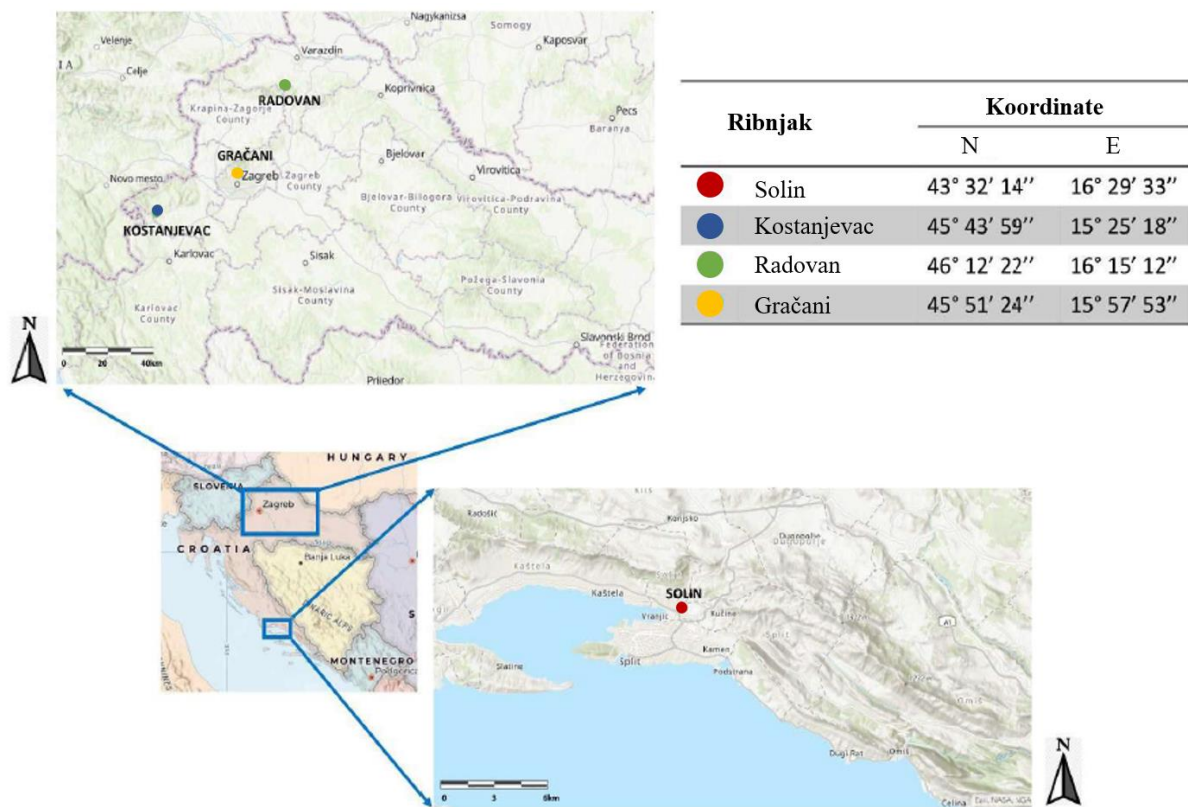
Specifični ciljevi rada bili su:

1. analizirati fenotipsku varijabilnost, odnosno utvrditi razlike u brzini rasta micelija između različitih vrsta roda *Saprolegnia* kao i između različitih izolata iste vrste,
2. analizirati genotipsku varijabilnost izolata vrste *S. parasitica* tipizacijom višestrukih lokusa (MLST) te utvrditi kojem diploidnom tipu sekvenci (DST) pripada svaki izolat,
3. utvrditi eventualnu povezanost utvrđenih DST-ova vrste *S. parasitica* i različitih lokacija (ribnjaka),
4. utvrditi eventualnu povezanost utvrđenih DST-ova vrste *S. parasitica* i brzine rasta njihovih micelija.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3. 1. Izolati roda *Saprolegnia*

U ovom je radu analizirano 110 izolata iz roda *Saprolegnia*, od čega 45 vrste *Saprolegnia australis*, 20 vrste *Saprolegnia delica*, sedam vrste *Saprolegnia ferax* i 38 vrste *Saprolegnia parasitica*. Izolati su prikupljeni u sklopu ranijeg istraživanja Pavić i suradnika (2021) na četiri različita ribnjaka u Republici Hrvatskoj, od čega su tri na području kontinentalne Hrvatske (Kostanjevac, Radovan i Gračani), a jedan u primorskoj Hrvatskoj (Solin) (Slika 6). U ribnjacima Gračani, Radovan i Solin uzgaja se kalifornijska pastrva, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792), a u Kostanjevcu potočna pastrva, *Salmo trutta* (Linneaus, 1758). Šifre i vrste kojima pripadaju izolati te lokacije uzorkovanja i vrste domaćina svakog izolata navedene su u Prilogu 1.A – D.



Slika 6. Karta Republike Hrvatske s označenim lokacijama ribnjaka na kojima je provedeno uzorkovanje. Preuzeto i modificirano iz Pavić i sur. 2021.

Izolati iz roda *Saprolegnia* uzorkovani su s uzoraka tkiva i iz vode. Uzorci tkiva riba sakupljeni su iz embrionalnih stadija, odnosno jaja i ličinki koje su bile vidljivo obrasle micelijem nalik saprolegniji, te odraslih jedinki koje su imale lezije s naznakama rasta micelija.



Izolati iz vode prikupljeni su pomoću zamki sa sjemenkama konoplje, i to iz vode samog ribnjaka te uzvodno i nizvodno od ribnjaka. Čiste kulture svih izolata pohranjene su pri 18 °C na komadiću agara (površine 3 x 3 cm) u autoklaviranim bočicama volumena 50 mL s 20 – 30 mL destilirane vode i dvije konopljne sjemenke (Smith i Onions, 1994).

### 3. 2. Uzgoj i praćenje rasta izolata

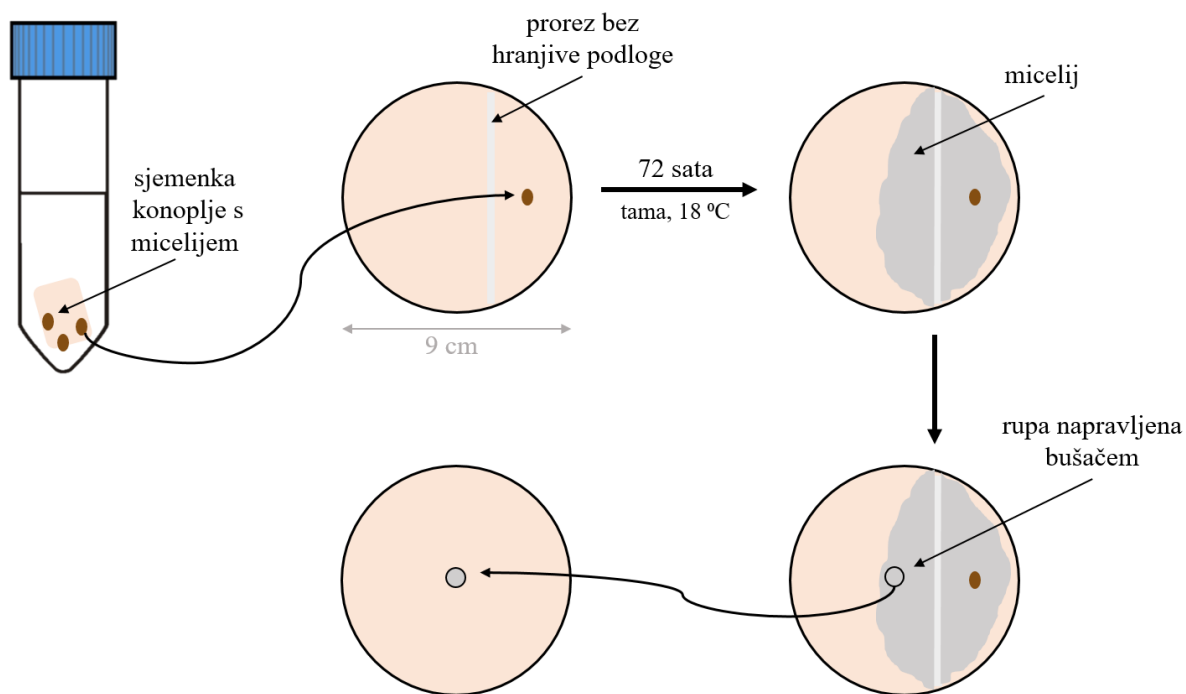
Za uzgoj izolata korištena je kruta hranjiva podloga GY + P + OX [glukoza (engl. *glucose*), ekstrakt kvasca (engl. *yeast extract*) + penicilin (engl. *penicillin*) + oksolinska kiselina (engl. *oxolinic acid*)]. Podloga je pripremljena tako da su u destiliranoj vodi resuspendirani agar, glukoza i ekstrakt kvasca (Tablica 1). Nakon autoklaviranja na 121 °C pri 2 atm 20 minuta i hlađenja na otprilike 50 °C podlozi je dodana otopina antibiotika te je izlivena u Petrijeve zdjelice promjera devet cm. Pripremljene ploče s krutom hranjivom podlogom su do upotrebe skladištene na temperaturi od 4 °C.

Tablica 1. Sastav hranjive podloge GY + P + OX.

Komponenta	Količina
Destilirana voda	1 L
Bacto agar (Biolife, Italija)	12 g
Glukoza (Biolife, Italija)	5 g
Ekstrakt kvasca (Biolife, Italija)	1 g
Otopina antibiotika [sterilizirana provlačenjem kroz filter veličine pora 0,45 µm (LLG, Njemačka)]	20 mL
Metanol (Alkaloid, Sjeverna Makedonija)	10 mL
Destilirana voda	8 mL
0,1 M NaOH (4 gL <sup>-1</sup> ; ECI d.o.o., Hrvatska)	2 mL
Oksolinska kiselina (0,010 gL <sup>-1</sup> ; Acros Organics, SAD)	10 mg
Penicilin G (0,006 gL <sup>-1</sup> ; Sigma-Aldrich, Izrael)	6 mg

Prilikom uzgoja izolata, sjemenka konoplje obrasla micelijem je sterilnom pincetom stavljena na hranjivu podlogu s procjepom (Slika 7). Svrha nacjepljivanja na podlogu s procjepom je održavanje čistoće izolata budući da micelij može prijeći uski procjep, dok bakterije ne mogu, pa se micelij na taj način pročišćava ukoliko je došlo do kontaminacije bakterijama. Nakon tri dana inkubacije pri 18 °C u termokabinetu (Innova, Eppendorf, Njemačka) s ruba naraslog micelija uzeti su komadići agara promjera 4 x 4 mm te nasađeni na sredinu tri nove ploče (triplikat) kako je prikazano na Slici 7.

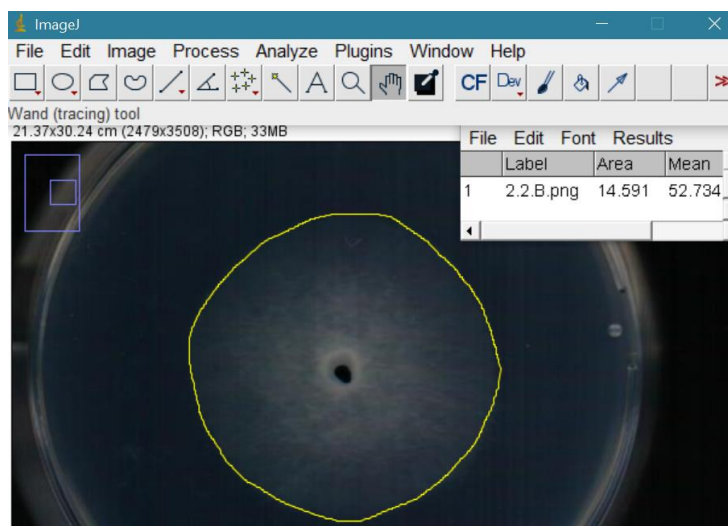
Rast micelija izolata praćen je tijekom četiri dana u termokabinetu pri 18 °C, odnosno ploče su skenirane (HP LaserJet 200 color MFP M276 PCL 6) dva, tri i četiri dana nakon nacjepljivanja.



Slika 7. Shematski prikaz tijeka nacjepljivanja izolata.

Dobivene fotografije su unesene u računalni program ImageJ v1.53e (Rueden i sur., 2017) pomoću kojeg je izmjerena površina micelija (Slika 8). Brzina rasta micelija određena je zadnji (4.) dan uzgoja prema formuli:

$$brzina\ rasta\ [cm^2\ dan^{-1}] = \frac{površina\ micelija\ [cm^2]}{ukupno\ vrijeme\ rasta\ [dan]}$$



Slika 8. Mjerenje površine micelija sa slike pomoću programa ImageJ v1.53e.

### 3. 3. Izolacija DNA

U svrhu izolacije genomske DNA, micelij na komadiću agara promjera 5 X 5 cm stavljen je u 4 mL tekuće hranjive podloge PG1 (Unestam, 1965). Hranjiva podloga PG1 priprema se korištenjem pet različitih otopina, pri čemu je potrebno svaku komponentu posebno pripremiti, sterilizirati i na kraju ih pomiješati u točno određenim volumenima prema zadanom redoslijedu:

- Otopina 1 sadrži 3 g Bacto peptona (Biolife, Italija) otopljenog u 100 mL destilirane vode.
- Otopina 2 sadrži 6 g D (+) glukoza monohidrata (Kemika, Hrvatska) otopljenog u 100 mL destilirane vode.
- Otopina 3 sadrži 1,70 g  $MgCl_2 \times 6 H_2O$  (Gram-mol, Hrvatska), 1,45 g  $CaCl_2 \times 2 H_2O$  (Gram-mol, Hrvatska), 0,20 g  $FeCl_3 \times 6 H_2O$  (Sigma Aldrich, Njemačka), 3,70 g KCl (Kemika, Hrvatska), 0,55 g dinatrijeve soli etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) (Sigma Aldrich, Njemačka) otopljenih u 1 000 mL destilirane vode.
- Otopina 4 je fosfatni pufer čiji je pH = 7,0, a dobije se miješanjem 611 mL sterilne otopine A: 0,067 M (9,5 g/L)  $Na_2HPO_4$  (Kemika, Hrvatska) i 389 mL sterilne otopine B: 0,067 M (9,2 g/L)  $NaH_2PO_4 \times 2 H_2O$  (Gram-mol, Hrvatska).
- Otopina 5 je otopina antibiotika ampicilina i oksolinske kiseline koja se priprema na način da se 500 mg ampicilin-natrijeve soli (Sigma Aldrich, Njemačka) otopi u 25 mL deionizirane vode te se 500 mg oksolinske kiseline (Sigma Aldrich, Njemačka) otopi u 2,5 mL 1 M NaOH i razrijedi s 25 mL deionizirane vode.

Otopine 1 – 4 se zasebno autoklaviraju pri temperaturi 121 °C kroz 15 minuta te potom ohlade na temperaturu od približno 45 °C. Nakon toga se otopine pomiješaju, pri čemu treba paziti na redoslijed dodavanja otopina kako ne bi došlo do pojave taloga: u 600 mL deionizirane vode polako se dodaje 100 mL otopine 4, zatim jednaki volumen otopine 3, pa otopina 1 i 100 mL otopine 2 te se na kraju doda 500 µL otopine 5.

Nakon uzgoja izolata u termokabinetu u tekućoj hranjivoj podlozi PG1 dva dana pri 18 °C, porasli micelij je odvojen u kivetu volumena 1,5 mL i centrifugiran 15 minuta pri 10 000 x g (centrifuga Tehtnica® Centric200R, Slovenija). Iz taloga micelija je izolirana genomska DNA kompletom NucleoSpin® Microbial DNA (Macherey Nagel, Njemačka), prema protokolu proizvođača. Ukratko, resuspendirani talog micelija u BE-puferu prvo je tretiran proteinazom K uz MG-pufer kako bi došlo do lize stanica, a zatim je tretiran trima puferima: MG-puferom,

BW-puferom i B5-puferom. Završna elucija provedena je BE-puferom, a krajnji produkti izolacije analizirani su elektroforezom u agaroznom gelu. Uzorci izolirane DNA pohranjeni su pri -20 °C do provođenja PCR reakcije.

### **3. 4. Elektroforeza u agaroznom gelu**

Za vizualizaciju uzoraka genomske DNA i produkata lančane reakcije polimerazom korištena je elektroforeza u 1 %-tnom odnosno 2 %-tnom agaroznom gelu. Gel je pripremljen otapanjem agaroze (Sigma-Aldrich, SAD) u TAE-puferu [40 mM TRIS (hidroksimetil) aminometan; 20 mM octena kiselina; 1 mM EDTA] te je nakon hlađenja na otprilike 60 °C dodana boja GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain (Lonza, Švicarska) za vizualizaciju fragmenata DNA. U jažice gela nanosena su po 2 µL molekularnog standarda SimplyLoad™ Tandem DNA ladder (Lonza, Švicarska) te 8 µL genomske DNA odnosno po 3 µL PCR-produkata. Elektroforeza je provedena u TAE-puferu pri naponu od 100 V tijekom 60 minuta u aparaturi Owl Easy Cast B1 Mini Gel Electrophoresis System (Thermo Fisher Scientific, SAD). DNA fragmenti su po završetku elektroforeze vizualizirani pod UV-svjetlom (UV transiluminator UVIpure, UVITEC Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo) te fotografirani.

### **3. 5. Tipizacija višestrukih genskih lokusa (engl. *multilocus sequence typing*, MLST) s filogenetskom analizom**

Genotipizacija metodom tipizacije višestrukih genskih lokusa (MLST) provedena je samo na izolatima vrste *S. parasitica* (38 izolata) budući da je ta vrsta najčešće povezana s pojavom saprolegnioze (de la Bastide, Leung i Hintz, 2015) te da je za nju ranije razvijena MLST-shema (Ravasi i sur. 2018). U radu su za genotipizaciju korištena sljedeća tri gena: mitohondrijski geni *COXI* (prva podjedinica citokrom c-oksidge) i *NADI* (prva podjedinica NADH-dehidrogenaze) i nuklearni gen *SHMT* (serin-hidroksimetil-transferaza). Navedeni geni svih izolata umnoženi su lančanom reakcijom polimerazom (PCR) korištenjem početnica navedenih u Tablici 2. Sastav reakcijske smjese za PCR naveden je u Tablici 3. U slučajevima kada amplifikacija nije bila uspješna, povećana je koncentracija početnica u reakcijskoj smjesi s 0,2 na 0,3 µM te volumen genomske DNA kalupa s 2 na 4 µL. Uvjeti PCR-a bili su; početna denaturacija 10 minuta pri 94 °C, zatim 40 ciklusa koji uključuju denaturaciju DNA 1 minutu pri 95 °C, komplemetarno sparivanje početnica 1 minutu pri 58 °C za gene *NADI* i *SHMT* odnosno pri 60 °C za gen *COXI* i sintezu DNA 1 minutu pri 72 °C. Nakon toga je slijedila završna sinteza DNA u trajanju od 7 minuta pri 72 °C. Sve PCR-reakcije provedene su u uređaju Apha Cyler 1 (PCRmax, Ujedinjeno Kraljevstvo).

Tablica 2. Oligonukleotidne početnice korištene za umnažanje gena patogena *S. parasitica*.

Gen	Početnice [F, uzvodna (engl. <i>forward</i> ); R, nizvodna (engl. <i>reverse</i> )]	Veličina amplikona (pb)	Početak (5') i kraj (3') sekvence	Veličina lokusa (pb)
<i>COXI</i>	F; AACCTGGAAATCAAATTTTATGGG R; ATCACCTCCACCTGAAGGATCA	559	AAATCATC, ATACTTCA	508
<i>NADI</i>	F; CCTAATGTTGTAGGTACTTTTGG R; GAAACTAATTCAGCTTCAGCTT	523	GTAGGTAC, GATTACC	491
<i>SHMT</i>	F; CAAGCCGCTCAAGGAGAC R; CGTGTCGTAGTCGATCAAGC	486	CCGGTCCT, CGGGCTTG	450

Tablica 3. Sastav reakcijske smjese za PCR.

Komponenta reakcijske otopine za PCR	Volumen
DNA-kalup	2 – 4 $\mu$ L
EmeraldAmp® PCR 2X Master Mix (TAKARA, Japan)	12,5 $\mu$ L
10 $\mu$ M uzvodna početnica (Metabion international AG, Njemačka)	0,5 – 0,75 $\mu$ L*
10 $\mu$ M nizvodna početnica (Metabion international AG, Njemačka)	0,5 – 0,75 $\mu$ L*
dH <sub>2</sub> O	do ukupnog volumena od 25 $\mu$ L

\*konačna koncentracija početnica u reakcijskoj smjesi bila je od 0,2 do 0,3  $\mu$ M

Nadalje, nukleotidni sljedovi gena *COXI*, *NADI* i *SHMT* 38 izolata vrste *S. parasitica* određeni su Sanger sekvenciranjem u komercijalnom servisu Microsynth (Austrija). Sekvenciranje je provedeno u oba smjera uz pomoć početnica navedenih u Tablici 2, s time da su PCR-produkti prije određivanja redosljeda nukleotida pročišćeni. Dobiveni kromatogrami uređeni su u programu GeneStudio (GeneStudio, Inc.) i to tako da su manje kvalitetni dijelovi sekvenci uklonjeni, uzvodne i nizvodne sekvence preklopljene, a rezultirajuća zajednička sekvenca skraćena na duljinu navedenu u Tablici 2 i spremljena u fasta formatu. Nakon toga, iz NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) baze podataka preuzete su referentne sekvence genskih lokusa za gene *COXI*, *NADI* i *SHMT* izolata opisanih u literaturi (Ravasi i sur., 2018). Pri tome je korišten alat *Batch Entrez* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/batchentrez>), a redosljedi nukleotida su preuzeti putem pristupnih brojeva (engl. *accession number* – Acc. No.).

Sekvence sva tri gena svih 38 izolata vrste *S. parasitica* analiziranih u ovom radu kao i 15 referentnih izolata (DST1 – DST15 opisani u radu Ravasi i sur., 2018) konkatenirane su u programu BioEdit (Hall, 2011) sljedećim redosljedom: *COXI*, *NADI*, *SMHT*. Višestruko

sraunjenje konkateniranih nukleotidnih sljedova (eng. *multiple sequence alignment*) kao i naknadne manipulacije sraunjenih nukleotidnih sljedova napravljeno je u programu BioEdit (Hall, 2011). Filogenetska analiza provedena je u programu MEGA *version X* (Kumar i sur., 2018) metodom najveće vjerojatnosti (engl. *maximum likelihood method*, MLM) i Tamura-Nei modelom, a kao podrška granjanju unutar stabla korištena je metoda *bootstrap* na temelju 1 000 ponavljanja. Dobiveno filogenetsko stablo uređeno je pomoću programa iTOL (Letunic i Bork, 2016). Iz filogenetskog stabla je na temelju sličnosti s 15 referentnih DST-ova određen DST svakog izolata analiziranog ovim istraživanjem.

### 3. 6. Statističke analize

Dobiveni rezultati statistički su obrađeni korištenjem programa R (R Core Team *version 3.2.0*).

U svrhu utvrđivanja distribucije podataka najprije je provedeno testiranje korištenjem Shapiro-Wilk testa. Budući da je Shapiro-Wilk test pokazao da distribucija podataka odstupa od normalne, u daljnjoj je analizi korišten neparametrijski Kruskal-Wallis test kako bi se utvrdile razlike u brzini rasta micelija različitih vrsta unutar roda *Saprolegnia* (*S. australis*, *S. delica*, *S. fearx* i *S. parasitica*) te u brzini rasta micelija s obzirom na utvrđene DST-ove vrste *S. parasitica*. Kruskal-Wallis test ispituje nultu hipotezu da broj od  $k$  uzoraka dolazi iz iste populacije ili iz identičnih populacija s obzirom na srednju vrijednost. Ako je vjerojatnost da je izračunata vrijednost  $H$  jednaka ili manja od granice značajnosti  $\alpha$ , nulta hipoteza se odbacuje. Primjenom Kruskal-Wallis testa možemo zaključiti postojanje razlika među testiranim skupinama podataka, ali ne možemo znati koje se točno skupine razlikuju. S tim ciljem, dodatno je proveden Kruskal-Wallisov *post hoc* Dunn test s Bonferronijevom korekcijom kako bi se utvrdilo koje se ispitane grupe međusobno značajno razlikuju. U svrhu utvrđivanja eventualne povezanosti DST-ova vrste *S. parasitica* i različitih lokacija (ribnjaka) primijenjen je  $\chi^2$ -test (hi-kvadrat test) budući da su obje ispitivane varijable kategoričke.  $\chi^2$ -test ispituje nultu hipotezu da su dvije varijable nezavisne.

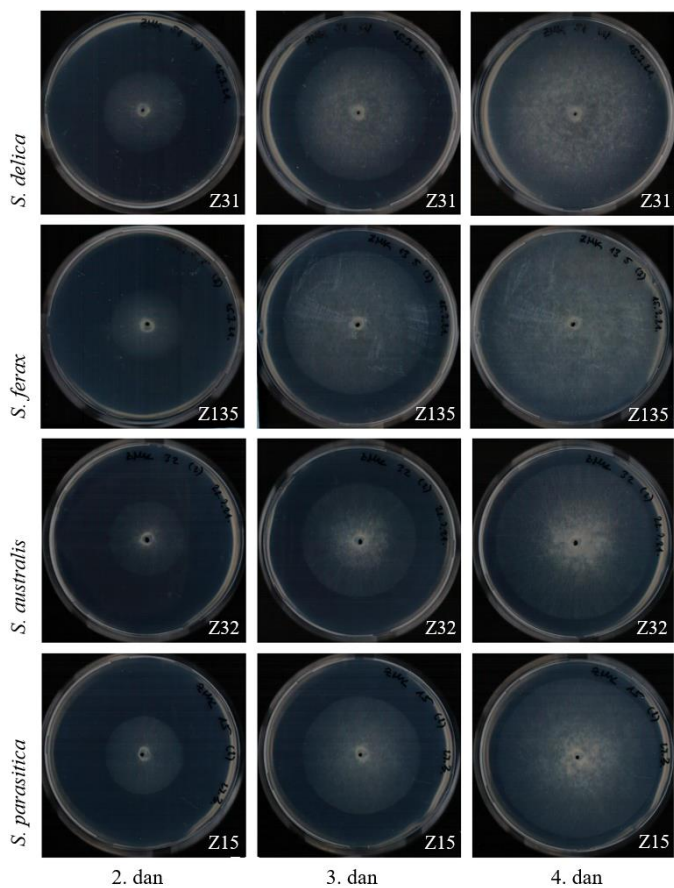
## 4. REZULTATI

U ovom je radu po prvi puta istražena fenotipska i genotipska varijabilnost izolata roda *Saprolegnia* iz hrvatskih pastvrskih ribnjaka. Kao pokazatelj fenotipske varijabilnosti praćena je brzina rasta micelija (Poglavlje 4. 1.), a u svrhu istraživanja genotipske varijabilnosti provedena je tipizacija višestrukih genskih lokusa s filogenetskom analizom (Poglavlje 4. 2.).

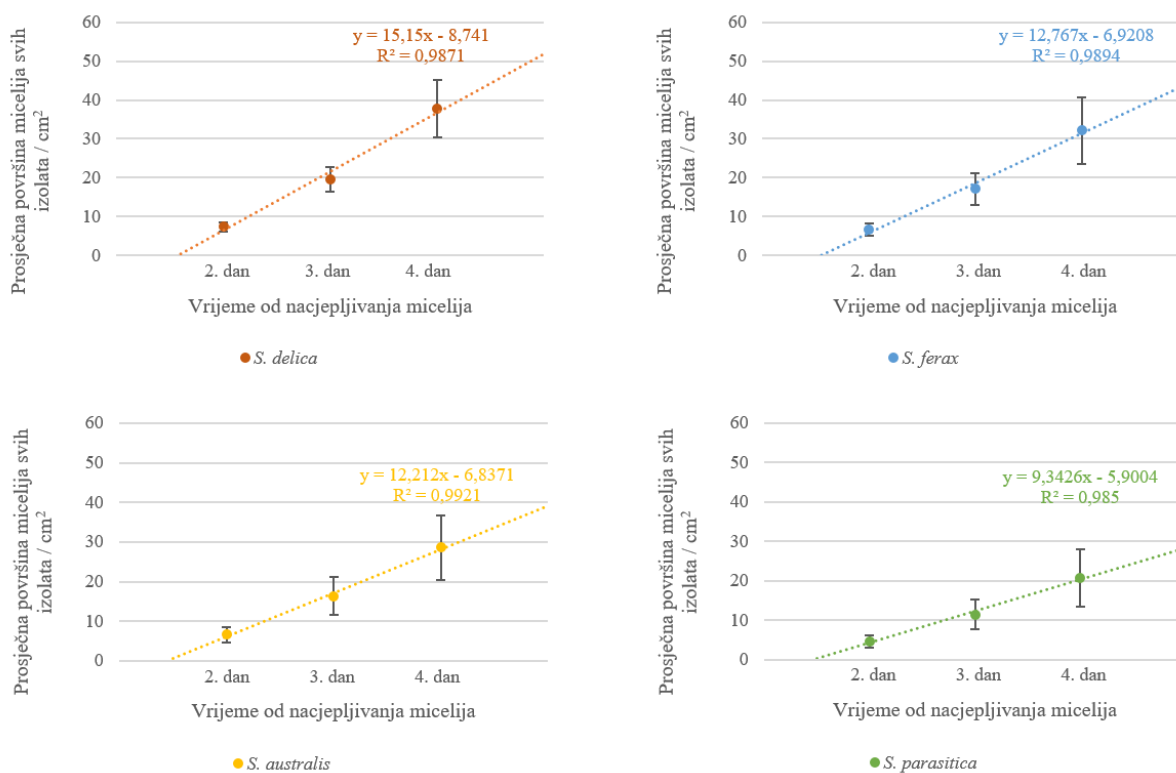
### 4. 1. Varijabilnost brzine rasta micelija među izolatima iz roda *Saprolegnia*

Praćenjem rasta micelija ukupno 110 izolata koji pripadaju u četiri različite vrste iz roda *Saprolegnia* utvrđeno je da je vrsta *S. delica* imala prosječno najbrži rast od 9,42 cm<sup>2</sup> dan<sup>-1</sup>. Izolati vrste *S. ferax* rasli su prosječnom brzinom od 8,04 cm<sup>2</sup> dan<sup>-1</sup>, a vrste *S. australis* 7,14 cm<sup>2</sup> dan<sup>-1</sup>, dok su izolati vrste *S. parasitica* s prosječnom brzinom od 5,21 cm<sup>2</sup> dan<sup>-1</sup> imali najsporiji rast (Slike 9 i 10). Utvrđene razlike u brzinama rasta micelija različitih vrsta bile su statistički značajne ( $p < 0,05$ , Kruskal-Wallis test).

Nadalje, uočene su razlike i u brzini rasta među različitim izolatima iste vrste, odnosno nisu svi izolati iste vrste rasli jednakom brzinom (Slike 11 – 14). Za vrstu *S. delica* brzina rasta varirala je od 5,58 cm<sup>2</sup> dan<sup>-1</sup> do 12,52 cm<sup>2</sup> dan<sup>-1</sup> (Slika 11), za *S. ferax* od 4,90 cm<sup>2</sup> dan<sup>-1</sup> do 10,90 cm<sup>2</sup> dan<sup>-1</sup> (Slika 12), za *S. australis* od 2,11 cm<sup>2</sup> dan<sup>-1</sup> do 10,30 cm<sup>2</sup> dan<sup>-1</sup> (Slika 13) i za *S. parasitica* od 2,86 cm<sup>2</sup> dan<sup>-1</sup> do 10,47 cm<sup>2</sup> dan<sup>-1</sup> (Slika 14). Najveće varijacije u brzini rasta unutar vrste uočene su kod *S. australis*, a najmanje kod *S. ferax*. Prosječna brzina rasta micelija svakog izolata navedena je u Prilogu 1.A – D.

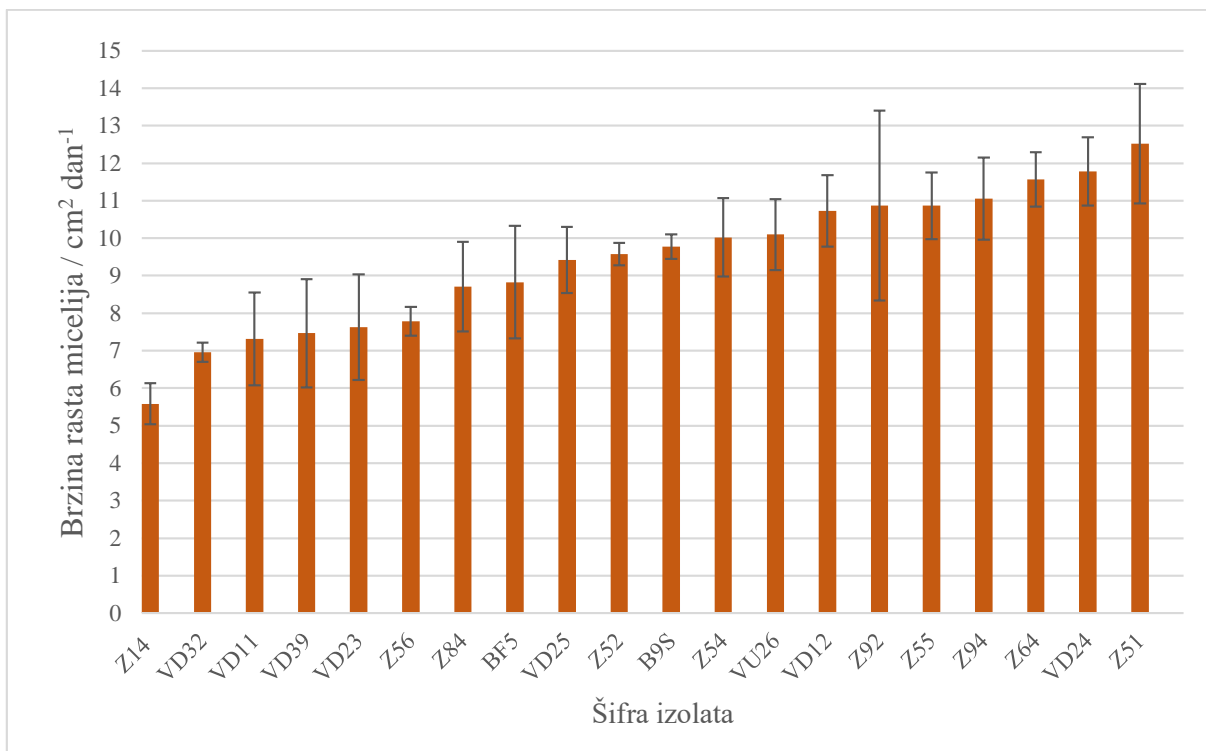


Slika 9. Rast micelija različitih vrsta iz roda *Saprolegnia* pri 18 °C.

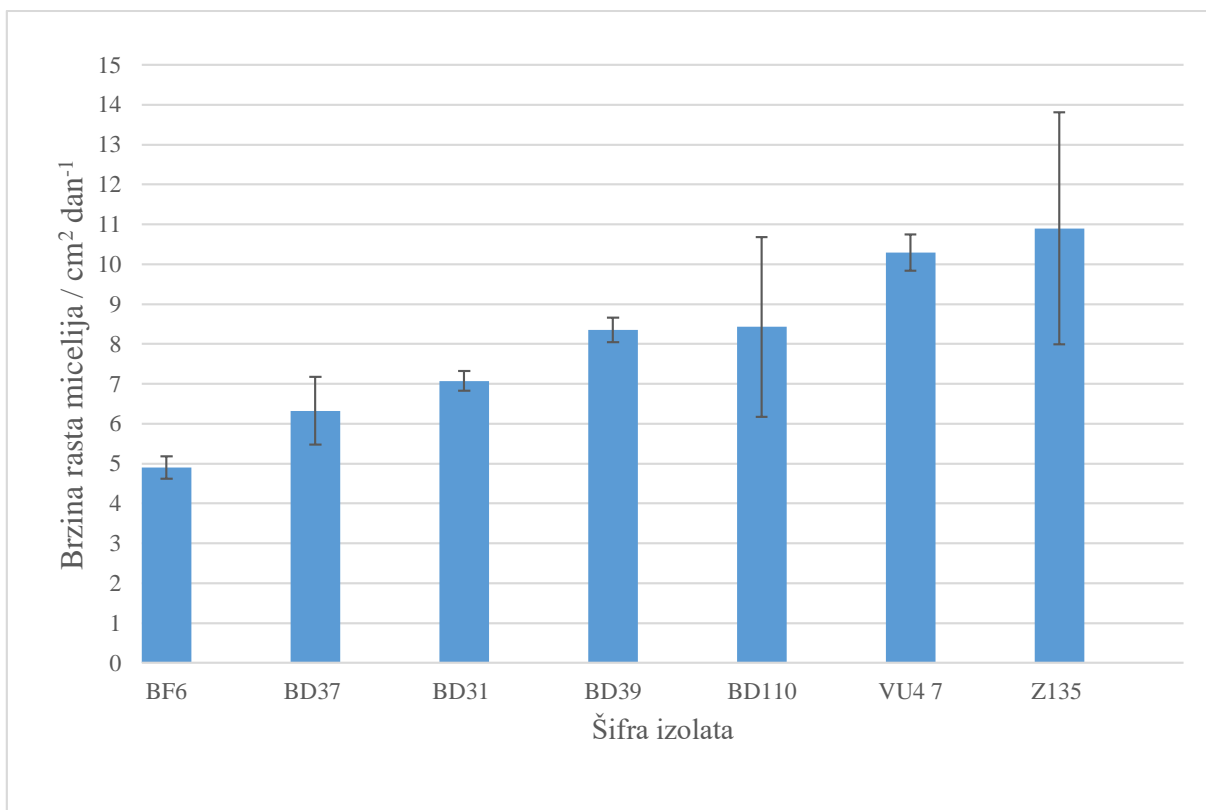


Slika 10. Grafički prikaz rasta micelija različitih vrsta iz roda *Saprolegnia* pri 18 °C.

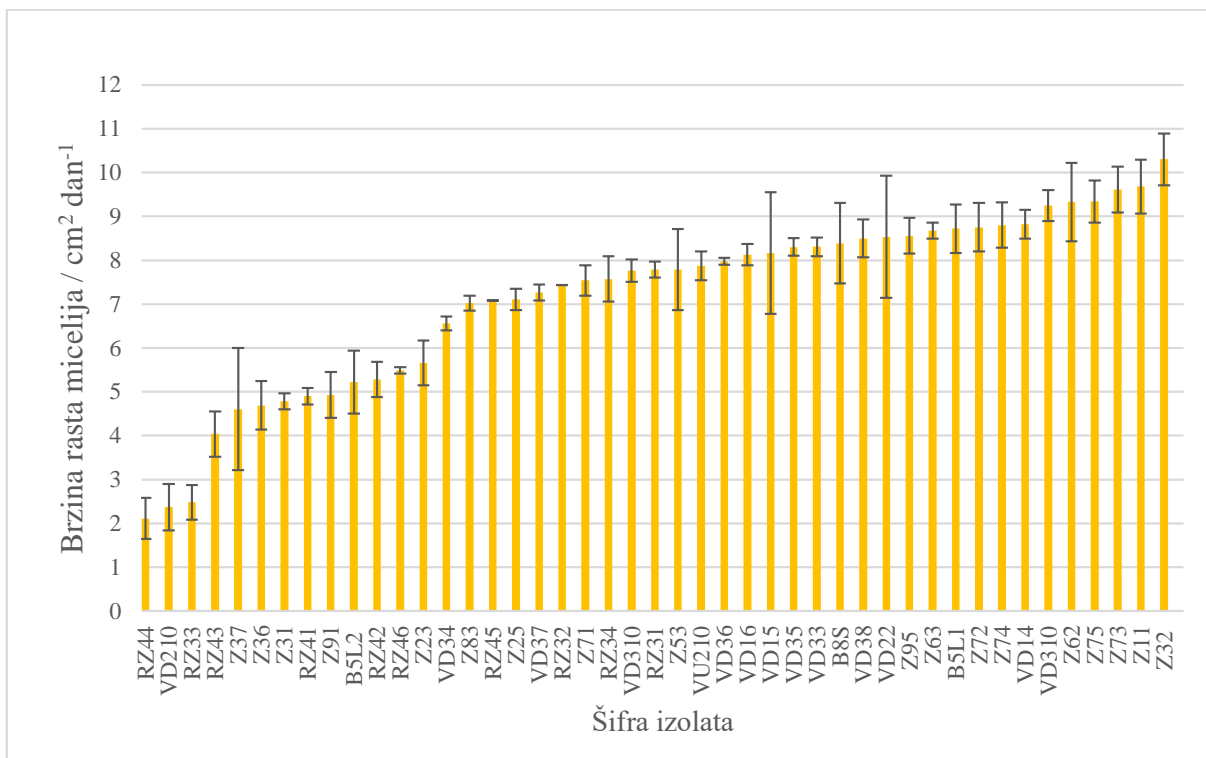




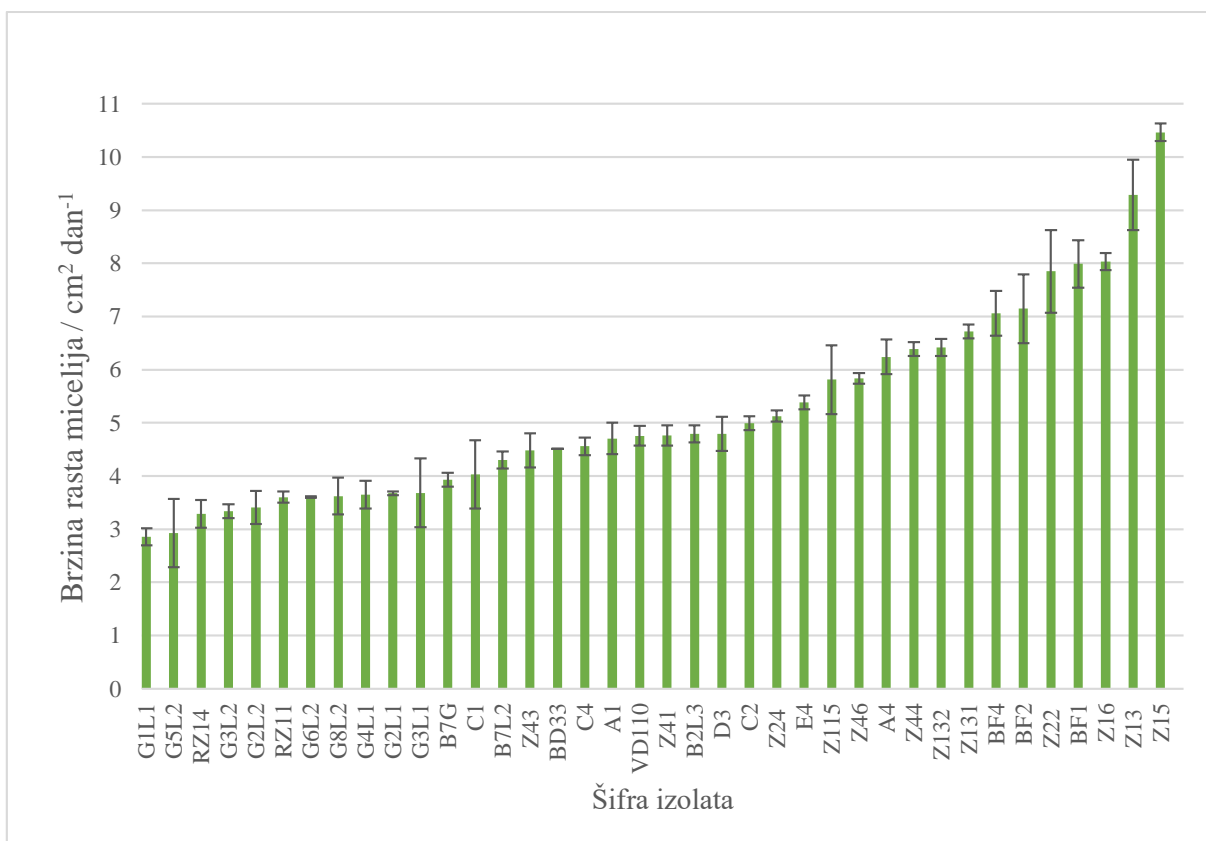
Slika 11. Prosječna brzina rasta micelija izolata vrste *Saprolegnia delica* ± st. dev. (n = 3).



Slika 12. Prosječna brzina rasta micelija izolata vrste *Saprolegnia ferax* ± st. dev. (n = 3).



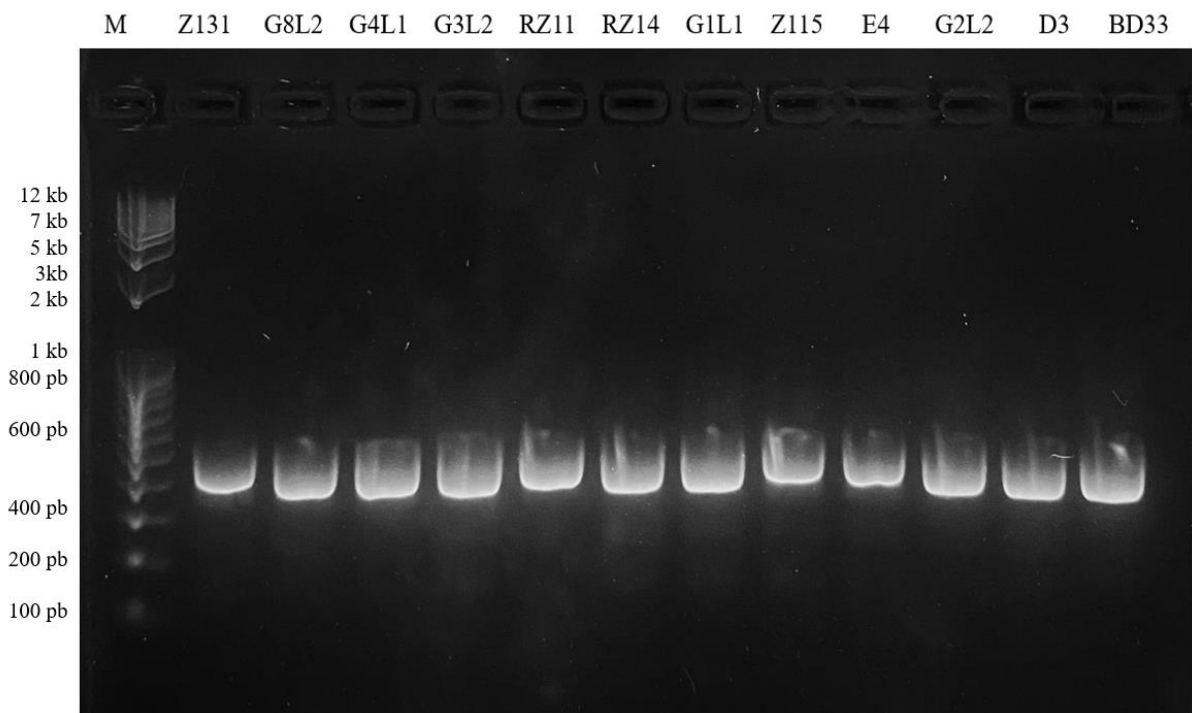
Slika 13. Prosječna brzina rasta micelija izolata vrste *Saprolegnia australis* ± st. dev. (n = 3).



Slika 14. Prosječna brzina rasta micelija izolata vrste *Saprolegnia parasitica* ± st. dev. (n = 3).

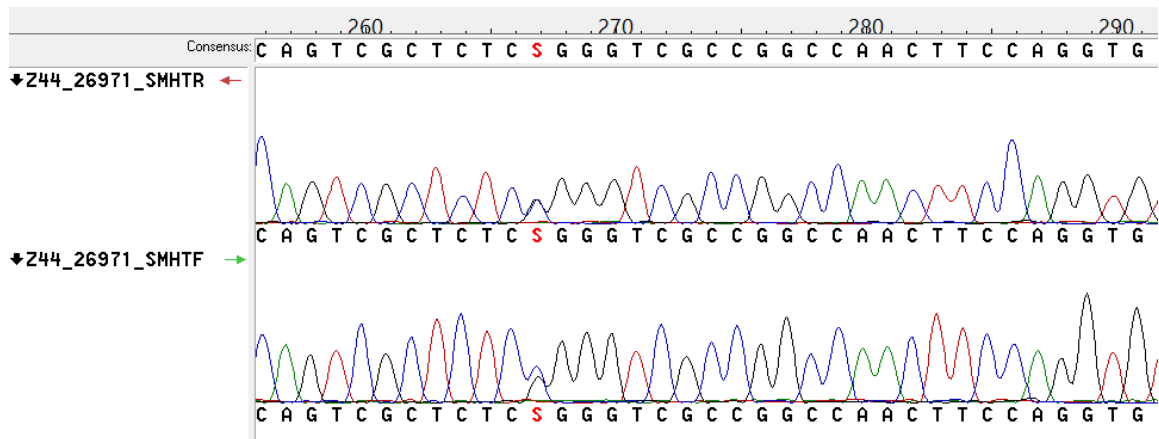
## 4. 2. Genotipska varijabilnost izolata vrste *S. parasitica* analizirana tipizacijom višestrukih genskih lokusa

Genotipska varijabilnost vrste *S. parasitica* analizirana je tipizacijom genskih lokusa *COX1*, *NAD1* i *SHMT*. PCR-om su dobiveni genski fragmenti očekivanih veličina (Tablica 2) svih 38 izolata. Na Slici 15 prikazan je primjer uspješne amplifikacije fragmenta gena *COX1*, odnosno dobiveni su PCR-amplikoni očekivane duljine od oko 550 pb.



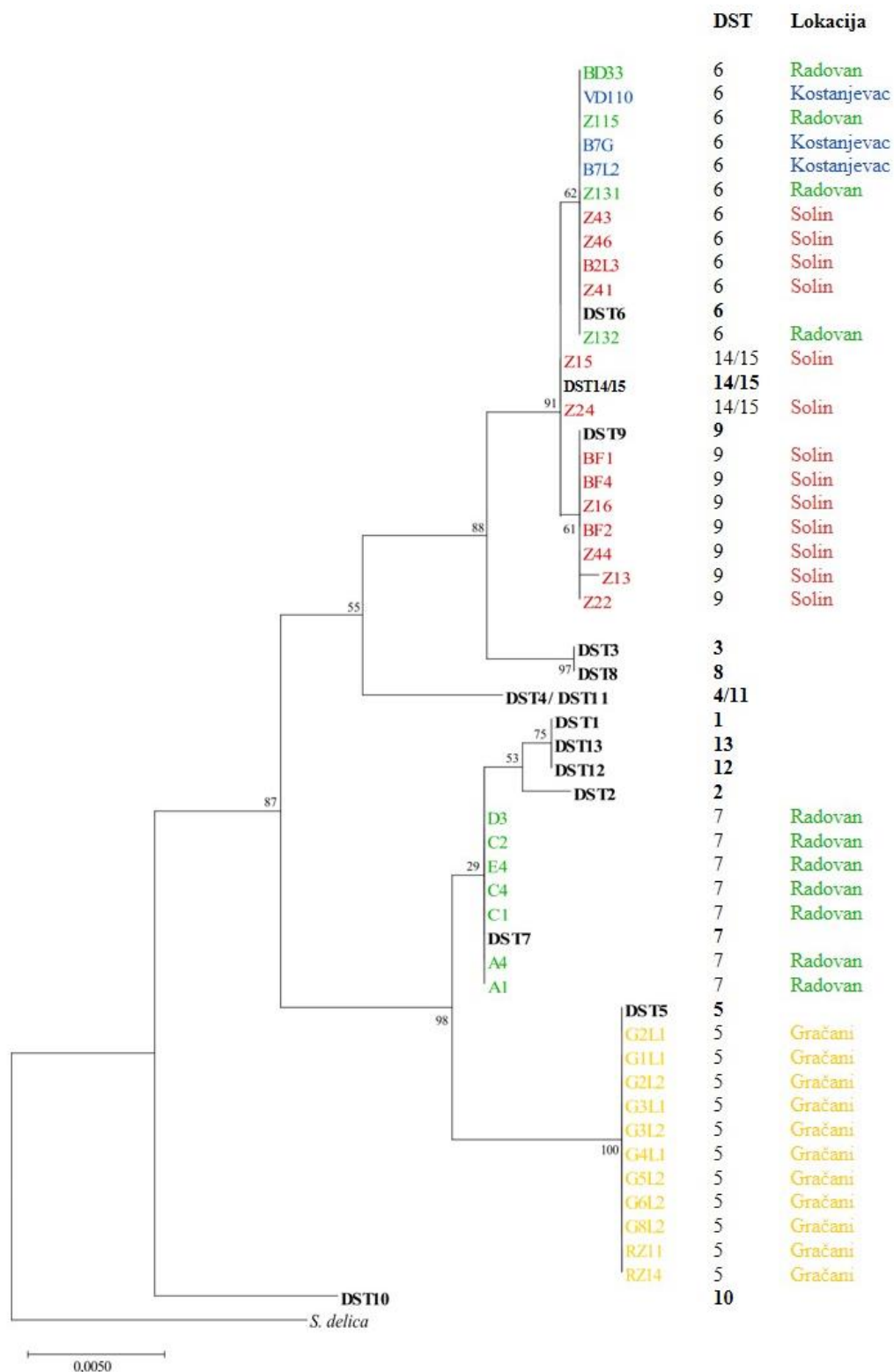
Slika 15. Primjer rezultata amplifikacije gena *COX1*. M označava standard, a ostale oznake različite izolate. Kod svih PCR-produkata vidljiva je elektroforetska pruga čija je procijenjena duljina 550 pb što odgovara očekivanoj duljini PCR-amplikona za gen *COX1*.

Tijekom analize dobivenih sekvenci kod gena *SHMT* uočena su višestruka heterozigotna mjesta (između nula i pet heterozigotnih pozicija po alelu), odnosno mjesta s dva podjednako visoka kromatografska maksimuma koja se pojavljuju na istoj poziciji i u uzvodnoj i u nizvodnoj sekvenci (Slika 16). Za preostala dva analizirana gena svi su izolati bili homozigotni.

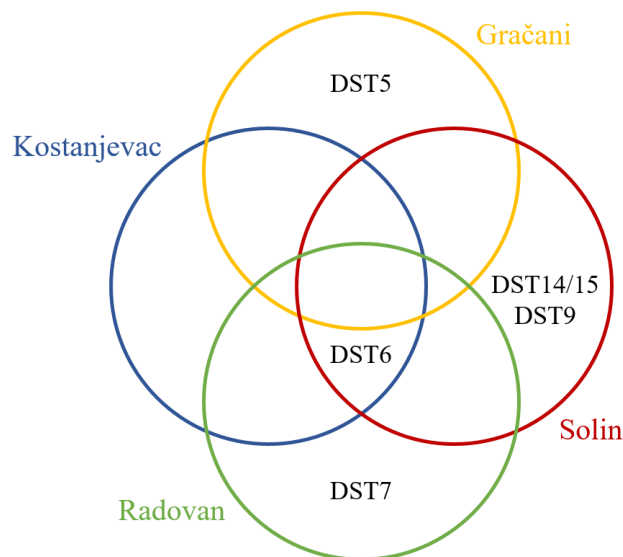


Slika 16. Primjer dijela preklopljenog uzvodnog i nizvodnog kromatograma *SHMT* gena izolata Z44 (*S. parasitica*). Na 267. paru nukleotida vidljivo je da je to mjesto heterozigotno G/C (označeno kao S prema IUPAC nomenklaturi).

Dobivene sekvence su filogenetskom analizom uspoređene sa sekvencama 15 DST-ova opisanih u literaturi (Ravasi i sur., 2018) (Slika 17) te je prema dobivenom grupiranju svakom izolatu dodijeljen odgovarajući DST, osim u slučaju izolata Z15 i Z24 za koje se na temelju tri gena analizirana u ovom radu moglo utvrditi kojem od dva srodna DST-a pripadaju pa su određeni kao DST14/15. Izolati patogena *S. parasitica* iz hrvatskih pastrvskih ribnjaka svrstani su u pet različitih DST-ova: DST5 i DST6 pronađeni su kod 11 izolata, DST7 i DST9 kod sedam te DST14/15 kod dva. Iako se DST-ovi nisu statistički značajno razlikovali među lokacijama (ribnjacima) ( $p < 0,05$ ,  $\chi^2$ -test), neki od njih su ipak bili specifični za određenu lokaciju. Primjerice, genotip DST5 je nađen samo u ribnjaku Gračani te su svi izolati porijeklom iz tog ribnjaka bili određeni kao DST5, i oni izolirani sa životinja i oni iz vode. Nadalje, genotip DST7 nađen je samo u ribnjaku Radovan i to samo na uzorcima zaraženih jaja. Nasuprot tome, genotip DST6 bio je najrašireniji te je nađen u izolatima i sa životinja i iz vode u čak tri ribnjaka, od kojih su dva u središnjoj (Kostanjevac i Radovan), a jedan u primorskoj Hrvatskoj (Solin). U ribnjaku Solin nađeno je najviše različitih izolata: DST6, DST9 te DST14/15. Rasprostranjenost DST-ova po lokacijama odnosno ribnjacima prikazana je Vennovim dijagramom na Slici 18.



Slika 17. Filogenetsko stablo dobiveno na temelju konkateniranih sekvenci gena *COX1*, *NAD1* i *SHMT* konstruirano metodom najveće vjerojatnosti (engl. *maximum likelihood method*, MLM). Pored čvorova su prikazane podrške grananjima u obliku *bootstrap* vrijednosti. Duljina grana sukladna je broju supstitucijskih promjena (mjerna crta označava 0,0050 supstitucije).



Slika 18. Vennov dijagram koji prikazuje geografsku rasprostranjenost pet DST-ova izolata *S. parasitica* sakupljenih u četiri hrvatska ribnjaka (Gračani, Kostanjevac, Solin i Radovan).

Na kraju je utvrđeno da su se genotipovi različitih izolata vrste *S. parasitica* statistički značajno razlikovali prema brzini radijalnog rasta micelija ( $p < 0,05$ , Kruskal-Wallis test). Primjerice, izolati genotipa DST5 imali su statistički značajno sporiji rast od ostalih izolata. Izolati fenotipa DST6 i DST7 međusobno se nisu statistički značajno razlikovali u brzini radijalnog rasta micelija, ali su se razlikovali od svih ostalih genotipova, a isti slučaj je i s izolatima fenotipa DST9 i DST14/15. Možemo uočiti kako pet različitih genotipova tvore tri grupe prema brzini rasta micelija; prvu grupu čini DST5, drugu DST6 i DST7, a treću DST9 i DST14/15.

## 5. RASPRAVA

Metode za molekularnu identifikaciju vrsta i sojeva unutar roda *Saprolegnia* još su u razvoju (Diéguez-Uribeondo i sur., 2007; Ravasi i sur., 2018; Sarowar i sur., 2019) pa su i epidemiološka istraživanja ovih patogena malobrojna (van den Berg i sur., 2013; Masigol i sur., 2020; Pavić i sur., 2021; Ravasi i sur., 2018). U ovom su radu primjenom nedavno razvijene MLST-sheme za vrstu *S. parasitica* (Ravasi i sur., 2018) genotipizirani izolati ove vrste iz četiri hrvatska ribnjaka (Gračani, Kostanjevac, Radovan i Solin). Dobiveni rezultati su prvi ove vrste u Hrvatskoj, dok je na svjetskoj razini slično istraživanje provedeno još samo u Švicarskoj na izolatima sakupljenima u pastrvskim mrjestilištima i ribnjacima te rijekama i jezerima (Ravasi i sur., 2018.).

Osim genotipske strukture izolata u ovom je radu istražena i njihova fenotipska varijabilnost na temelju brzine radijalnog rasta micelija te je utvrđeno da ona značajno varira ovisno o vrsti unutar roda *Saprolegnia* (*S. delica* > *S. ferax* > *S. australis* > *S. parasitica*), ali i među različitim izolatima iste vrste ovog roda. Ovo potvrđuje rezultate ranijeg istraživanja Bangyeekhun i suradnika (2001) koji su utvrdili značajne razlike u brzini rasta micelija među genetski sličnim izolatima iz roda *Saprolegnia* porijeklom s kanalskog soma *Ictalurus punctatus*. Dobivena raznolikost u brzinama rasta izolata iste vrste upućuje na postojanje višestrukih genotipova kod testiranih vrsta, a time i na raznolikost fenotipskih obilježja ovih patogena za koje se može pretpostaviti da uključuju i razlike u virulenciji. Izražena fenotipska varijabilnost unutar roda *Saprolegnia* utvrđena je i u ranije provedenim istraživanjima u kojima su mjerene različite fenotipske karakteristike, kao što su razlike u dimenzijama zoospora, cista i oospora (Sarowar, Cusack i Duston, 2019), brzina ponovnog nastanka zoospora iz cisti (RZE) (Bangyeekhun i sur., 2001; Diéguez-Uribeondo i sur., 2007), razina lignolitičke, celulolitičke i hitinolitičke aktivnosti (Masigol i sur., 2020) te preferencija prema domaćinu (Matthews i Jo, 2020). Stoga je jasno kako fenotipske karakteristike izolata roda *Saprolegnia* ne ovise isključivo o vrsti već postoje izražene razlike i na subspecijskoj razini, upućujući na važnost genotipizacije izolata ovog roda.

U drugom dijelu istraživanja, vrsta *S. parasitica* odabrana je za detaljnu genotipizaciju budući da je to vrsta koja je najčešće povezana s pojavom saprolegnioze (de la Bastide, Leung i Hintz, 2015; Torto-Alalibo i sur., 2005) te vrsta na kojoj je do sada rađeno najviše istraživanja (Anokhina, Tolkacheva i Korneeva, 2021; Emara, Gaafar i Shetaia, 2020). Koristeći MLST identificirano je pet različitih genotipova (DST-a) u 38 izolata sakupljenih s četiri lokacije. Također potvrđeni su rezultati Ravasi i suradnika (2018) da postoje heterozigotna mjesta u

genskom lokusu *SHMT* koja ukazuju na činjenicu da je vrsta *S. parasitica* diploid. Prema rezultatima Ravasi i suradnika (2018), u švicarskim ribnjacima/mrjestilištima i vodotocima uzorkovanim u razdoblju od 2015. do 2017. godine, najšire rasprostranjen genotip bio je DST3. Međutim, u ovom istraživanju on nije detektiran na prostoru Hrvatske. S druge strane, genotip DST6, koji je nađen na samo jednoj lokaciji u Švicarskoj, u Hrvatskoj je najšire rasprostranjen te je nađen i u ribnjacima jadranskoga (Solin) i crnomorskoga sliva (Gračani i Kostanjevac). Mogući razlozi široke distribucije određenih genotipova mogu biti antropogeno širenje ili lakši opstanak u slučaju da se radi o virulentnijim sojevima. Nasuprot tome, izolati genotipa DST5 su u oba istraživanja nađeni na geografski uskom području, odnosno na samo jednoj lokaciji što upućuje na to da se izolati tog genotipa otežano šire, što može biti uzrokovano određenim geografskim barijerama i/ili fiziološkim karakteristikama samih sojeva. Osim toga, devet DST-ova koji su nađeni na prostoru Švicarske nisu nađeni u Hrvatskoj što također upućuje na mogućnost/činjenicu da određeni sojevi nisu široko rasprostranjeni.

Nadalje, u ovom je istraživanju po prvi put analizirana povezanost fenotipskih pokazatelja (poput brzine radijalnog rasta micelija) i utvrđenih genotipova te je utvrđena statistički značajna razlika u brzini rasta micelija između izolata različitih genotipova. Primjerice, micelij izolata iz Gračana genotipa DST5 je najsporije rastao, a većina izolata iz Solina koji pripadaju genotipu DST9 bili su bržeg rasta od drugih izolata. Uočena je i određena selektivnost prema razvojnom stadiju domaćina, odnosno svi izolati koji pripadaju genotipu DST7 bili su porijeklom s jaja temeljem čega se može pretpostaviti da je DST7 veće virulencije za jaja nego za odrasle jedinke.

U nastavku istraživanja trebalo bi provesti detaljniju genotipsku (sekvenciranje svih sedam gena MLST-sheme Ravasi i sur., 2018) i fenotipsku karakterizaciju izolata iz hrvatskih pastrvskih ribnjaka (dodatna *in vitro* i *in vivo* testiranja). Analizom dodatnih genskih lokusa moguće je da će se utvrditi razlike između nekih izolata i ranije opisanih švicarskih DST-ova. Osim toga, izolati kojima se u okviru ovog rada nije moglo utvrditi točan genotip (izolati Z15 i Z24) će se dodatnim analizama vjerojatno moći odrediti kao DST14 ili DST15. Nadalje, kako bi se utvrdile potencijalne razlike u virulenciji među genotipovima potrebno je provesti dodatna *in vitro* istraživanja, kao što su istraživanja intenziteta sporulacije (Fernández-Benítez i sur., 2011) i pojave ponovnog nastanka zoospora iz cisti (Bangyeekhun i sur. 2001; Diéguez-Uribeondo i sur., 2007). Također, trebali bi se provesti i *in vivo* pokusi u kojima bi se jedinke domaćina (različite vrste riba, različiti razvojni stadiji – jaja, ličinke, odrasle jedinke) zarazile različitim sojevima patogena i pratila pojava simptoma bolesti te mortalitet. Na temelju



rezultata takvih istraživanja u budućnosti bilo bi moguće mjere kontrole bolesti usmjeriti prema određenim prioritiziranim sojevima, koji su virulentniji i stoga se može pretpostaviti da uzrokuju veće štete.

## 6. ZAKLJUČCI

U ovom je radu po prvi puta provedena fenotipska i genotipska karakterizacija izolata različitih vrsta iz roda *Saprolegnia* s područja Hrvatske te je istražena ovisnost pojedinih genotipova s lokacijom uzorkovanja i brzinom radijalnog rasta micelija.

Temeljem dobivenih rezultata doneseni su sljedeći zaključci:

1. vrste iz roda *Saprolegnia* značajno se razlikuju u brzinama radijalnog rasta micelija: *S. delica* kao najbrža, te nakon nje redom *S. ferax*, *S. australis* i *S. parasitica*,
2. izolati unutar pojedine vrste roda *Saprolegnia* također se razlikuju u brzini radijalnog rasta micelija, što je barem djelomično određeno genotipom,
3. izolati iz hrvatskih ribnjaka pripadaju u pet različitih genotipova (DST-ova), od kojih su među analiziranim izolatima najzastupljeniji DST5 i DST6,
4. većina DST-ova su geografski uže lokalizirani (DST5, DST7, DST9 i DST14/15), dok je DST6 široko rasprostranjen.

Zaključno, fenotipskom i genotipskom analizom varijabilnosti te njihovom međusobnom usporedbom karakterizirani su izolati *Saprolegnia* spp. s prostora Hrvatske što doprinosi boljem razumijevanju epidemiologije ovih patogena na svjetskoj razini te može poslužiti u budućim pokušajima kontrole i prevencije saprolegnioze.

## **7. ZAHVALE**

Velike zahvale mentorici prof. dr. sc. Ivani Maguire na stručnom vodstvu te uloženom trudu i vremenu te izv. prof. dr. sc. Ani Bielen na pruženoj prilici, strpljenju i tome što je uvijek bila dostupna i spremna pomoći.

Zahvaljujem Dori Pavić na brojnim pruženim savjetima, smjericama i ugodnoj radnoj atmosferi u laboratoriju te Leoni Lovrenčić i Dorotei Grbin na pristupačnosti, velikoj pomoći i korisnim savjetima pri izradi ovog rada.

Također želim se zahvaliti obitelji i prijateljima na podršci i motivaciji.

## 8. POPIS LITERATURE

- Anokhina, E. P., Tolkacheva, A. A. i Korneeva, O. S. (2021) „Saprolegnosis: Dissemination in aquaculture and control methods“, IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 640(6). doi: 10.1088/1755-1315/640/6/062027.
- Bangyeekhun, E., Quiniou, S. M. A., Bly, J. E. i Cerenius, L. (2001) „Characterisation of *Saprolegnia* sp. isolates from channel catfish“, Diseases of Aquatic Organisms, 45(1), str. 53–59. doi: 10.3354/dao045053.
- Bangyeekhun, E., Pylkkö P., Vennerström P., Kuronen H. i Cerenius L. (2003) „Prevalence of a single fish-pathogenic *Saprolegnia* sp. clone in Finland and Sweden“, Diseases of Aquatic Organisms, 53(1), str. 47–53. doi: 10.3354/dao053047.
- de la Bastide, P. Y., Leung, W. L. i Hintz, W. E. (2015) „Species composition of the genus *Saprolegnia* in fin fish aquaculture environments, as determined by nucleotide sequence analysis of the nuclear rDNA ITS regions“, Fungal Biology. 119(1), str. 27–43. doi: 10.1016/j.funbio.2014.10.006.
- Beakes, G. W., Glockling, S. L. i Sekimoto, S. (2012) „The evolutionary phylogeny of the oomycete „fungi“, Protoplasma, 249(1), str. 3–19. doi: 10.1007/s00709-011-0269-2.
- van den Berg, A. H., McLaggan, D., Diéguez-Uribeondo, J. i van West, P. (2013) „The impact of the water moulds *Saprolegnia diclina* and *Saprolegnia parasitica* on natural ecosystems and the aquaculture industry“, Fungal Biology Reviews, 27(2), str. 33–42. doi: 10.1016/j.fbr.2013.05.001.
- Bonansea, M., Mancini, M., Ledesma, M., Ferrero, S., Rodriguez, C. i Pinotti, L. (2019) „Remote sensing application to estimate fish kills by *Saprolegniasis* in a reservoir“, Science of the Total Environment. 669, str. 930–937. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.02.442.
- Bruno, D. W., Van West, P. i Beakes, G. W. (2011) „Newcastle University e-prints Use Policy“: Fish Diseases and Disorders, (January), str. 669–720.
- Burki, F., Roger, A. J., Brown, M. W. i Simpson, A. G. B. (2020) „The New Tree of Eukaryotes“, Trends in Ecology and Evolution. 35(1), str. 43–55. doi: 10.1016/j.tree.2019.08.008.

- Burki, F., Roger, A. J., Brown, M. W. i Simpson, A. G. B. (2016) „A Phylogenomic Framework to Study the Diversity and Evolution of Stramenopiles (=Heterokonts)“, *Molecular Biology and Evolution*, 33(11), str. 2890–2898. doi: 10.1093/molbev/msw168.
- Carcía de la Cruz, R., Palma López, D. J., García Espinoza, R., del Pilar Rodríguez, M. G. i González Hernández, H. (2005) „Effect of legumes rotation on pineapple root diseases in Huimanguillo, Tabasco, Mexico“, *Acta Horticulturae*, 666, str. 247–256. doi: 10.17660/actahortic.2005.666.27.
- Diéguez-Uribeondo, J., Fregeneda-Grandes, J. M., Cerenius, L., Pérez-Iniesta, E., Allergancedo, J. M., Tellería, M. T., Söderhäll, K. i Martín, M. P. (2007) „Re-evaluation of the enigmatic species complex *Saprolegnia diclina*-*Saprolegnia parasitica* based on morphological, physiological and molecular data“, *Fungal Genetics and Biology*, 44(7), str. 585–601. doi: 10.1016/j.fgb.2007.02.010.
- Earle, G. i Hintz, W. (2014) „New approaches for controlling *Saprolegnia parasitica*, the causal agent of a devastating fish disease“, *Tropical Life Sciences Research*, 25(2), str. 101–109.
- Emara, E. K. M., Gaafar, A. Y. i Shetaia, Y. M. (2020) „*In vitro* screening for the antifungal activity of some Egyptian plant extracts against the fish pathogen *Saprolegnia parasitica*“, *Aquaculture Research*, 51(11), str. 4461–4470. doi: 10.1111/are.14791.
- Fernández-Benítez, M. J., Ortiz-Santaliestra, M. E., Lizana, M. i Diéguez-Uribeondo, J. (2011) „Differences in susceptibility to *Saprolegnia* infections among embryonic stages of two anuran species“, *Oecologia*, 165(3), str. 819–826. doi: 10.1007/s00442-010-1889-5.
- Frenken, T., Agha, R., Schmeller, D. S., van West, P. i Wolinska, J. (2019) „Biological Concepts for the Control of Aquatic Zoosporic Diseases“, *Trends in Parasitology*. 35(7), str. 571–582. doi: 10.1016/j.pt.2019.04.003.
- Görg, M., Ploch, S., Kruse, J., Kummer, V., Runge, F., Choi, Y. J. i Thines, M. (2017) „Revision of *Plasmopara* (Oomycota, Peronosporales) parasitic to *Impatiens*“, *Mycological Progress*, 16(8), str. 791–799. doi: 10.1007/s11557-017-1316-y.
- Gozlan, R. E., Marshall, W. L., Lilje, O., Jessop, C. N., Gleason, F. H. i Andreou, D. (2014) „Current ecological understanding of fungal-like pathogens of fish: What lies beneath?“, *Frontiers in Microbiology*, 5, str. 1–16. doi: 10.3389/fmicb.2014.00062.

- Holmlund, C. M. i Hammer, M. (1999) „Ecosystem services generated by fish populations“, *Ecological Economics*, 29(2), str. 253–268. doi: 10.1016/S0921-8009(99)00015-4.
- Hussein, M. M. A., Hatai, K. i Nomura, T. (2001) „Saprolegniosis in salmonids and their eggs in Japan“, *Journal of Wildlife Diseases*, 37(1), str. 204–207. doi: 10.7589/0090-3558-37.1.204.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C. i Tamura K. (2018) „MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms“, *Molecular Biology and Evolution*, **35**, str. 1547–1549.
- Macheras, E., Konjek, J., Roux, A. L., Thiberge, J. M., Bastian, S., Leão, S. C., Palaci, M., Sivadon-Tardy, V. i sur. (2014) „Multilocus sequence typing scheme for the *Mycobacterium abscessus* complex“, *Research in Microbiology*, 165(2), str. 82–90. doi: 10.1016/j.resmic.2013.12.003.
- Maiden, M. C. J., van Rensburg, M. J. J., Bray, J. E., Earle, S. G., Ford, S. A., Jolley, K. A. i McCarthy, N. D. (2013) „MLST revisited: The gene-by-gene approach to bacterial genomics“, *Nature Reviews Microbiology*, 11(10), str. 728–736. doi: 10.1038/nrmicro3093.
- Masigol, H., Khodaparast, S. A., Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R., Rojas-Jimenez, K., Woodhouse, J. N., Neubauer, D. i Grossart, H.-P. (2020) „Taxonomical and functional diversity of Saprolegniales in Anzali lagoon, Iran“, *Aquatic Ecology*. 54(1), str. 323–336. doi: 10.1007/s10452-019-09745-w.
- Mélida, H., Sandoval-Sierra, J. V., Diéguez-Uribeondo, J. i Bulone, V. (2013) „Analyses of extracellular carbohydrates in oomycetes unveil the existence of three different cell wall types“, *Eukaryotic Cell*, 12(2), str. 194–203. doi: 10.1128/EC.00288-12.
- Mendoza, L. i Vilela, R. (2013) „The mammalian pathogenic oomycetes“, *Current Fungal Infection Reports*, 7(3), str. 198–208. doi: 10.1007/s12281-013-0144-z.
- Naumann, C. (2014) „Use of random amplified microsatellites (RAMS) to discern genotypes of *Saprolegnia parasitica* isolates on the west coast of British Columbia“, *Diplomski rad*. Kadana: Sveučilište Victoria.
- Pavić, D., Miljanović, A., Grbin, D., Šver, L., Vladušić, T., Galuppi, R., Tedesco, P. i Bielen, A. (2021) „Identification and molecular characterization of oomycete isolates from trout

- farms in Croatia, and their upstream and downstream water environments“, *Aquaculture*, 540, str. 736652. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.736652.
- Pérez-Losada, M., Cabezas, P., Castro-Nallar, E. i Crandall, K. A. (2013) „Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology“, *Infection, Genetics and Evolution*, 16, str. 38–53. doi: 10.1016/j.meegid.2013.01.009.
- R Core Team (2017) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Ravasi, D., De Respinis, S. i Wahli, T. (2018) „Multilocus sequence typing reveals clonality in *Saprolegnia parasitica* outbreaks“, *Journal of Fish Diseases*, 41(11), str. 1653–1665. doi: 10.1111/jfd.12869.
- Rezinciuc, S., Sandoval-Sierra, J. V. i Diéguez-Uribeondo, J. (2014) „Molecular identification of a bronopol tolerant strain of *Saprolegnia australis* causing egg and fry mortality in farmed brown trout, *Salmo trutta*“, *Fungal Biology*, 118(7), str. 591–600. doi: 10.1016/j.funbio.2013.11.011.
- Richly, E., Chinnery, P. F. i Leister, D. (2003) „Evolutionary diversification of mitochondrial proteomes: Implications for human disease“, *Trends in Genetics*, 19(7), str. 356–362. doi: 10.1016/S0168-9525(03)00137-9.
- Rueden, C. T., Schindelin, J., Hiner, M. C., DeZonia, B. E., Walter, A. E., Arena, E. T. i Eliceiri, K. W. (2017) „ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data“, *BMC Bioinformatics*, 18(1), str. 1–26. doi: 10.1186/s12859-017-1934-z.
- Ruppitsch, W. (2016) „Molecular typing of bacteria for epidemiological surveillance and outbreak investigation“, *Bodenkultur*, 67(4), str. 199–224. doi: 10.1515/boku-2016-0017.
- Sakaguchi, S. O., Ogawa, G., Kasai, H., Shimizu, Y., Kitazato, H., Fujikura, K. i Takishita, K. (2019) „Molecular identification of water molds (oomycetes) associated with chum salmon eggs from hatcheries in Japan and possible sources of their infection“, *Aquaculture International*, 27(6), str. 1739–1749. doi: 10.1007/s10499-019-00427-w.
- Sandoval-Sierra, J. V., Latif-Eugenin, F., Martín, M. P., Zaror, L. i Diéguez-Uribeondo, J. (2014) „*Saprolegnia* species affecting the salmonid aquaculture in Chile and their

- associations with fish developmental stage“, *Aquaculture*, 434, str. 462–469. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.09.005.
- Sandoval-Sierra, J. V., Martín, M. P. i Diéguez-Uribeondo, J. (2014) „Species identification in the genus *Saprolegnia* (Oomycetes): Defining DNA-based molecular operational taxonomic units“, *Fungal Biology*, 118(7), str. 559–578. doi: 10.1016/j.funbio.2013.10.005.
- Sarowar, M. N., Cusack, R. i Duston, J. (2019) „*Saprolegnia* molecular phylogeny among farmed teleosts in Nova Scotia, Canada“, *Journal of Fish Diseases*, 42(12), str. 1745–1760. doi: 10.1111/jfd.13090.
- Sarowar, M. N., Hossain, M. J., Nasrin, T., Naznin, T., Hossain, Z. i Rahman, M. M. (2019). Molecular identification of oomycete species affecting aquaculture in Bangladesh. *Aquaculture and Fisheries*, 4(3), 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2018.12.003>
- She, X., Rohl, C. A., Castle, J. C., Kulkarni, A. V., Johnson, J. M. i Chen, R. (2009) „Definition, conservation and epigenetics of housekeeping and tissue-enriched genes“, *BMC Genomics*, 10, str. 1–12. doi: 10.1186/1471-2164-10-269.
- Sicuro, B. (2021) „World aquaculture diversity: origins and perspectives“, *Reviews in Aquaculture*, 13, str. 1619–1634. doi: 10.1111/raq.12537.
- Thines, M. (2018) „Oomycetes“, *Current Biology*, 28(15), str. R812–R813. doi: 10.1016/j.cub.2018.05.062.
- Torto-Alalibo, T., Tian, M., Gajendran, K., Waugh, M. E., van West, P. i Kamoun, S. (2005) „Expressed sequence tags from the oomycete fish pathogen *Saprolegnia parasitica* reveal putative virulence factors“, *BMC Microbiology*, 5, str. 1–13. doi: 10.1186/1471-2180-5-46.
- van West, P. (2006) „*Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem“, *Mycologist*, 20(3), str. 99–104. doi: 10.1016/j.mycol.2006.06.004.



## 9. SAŽETAK

Mia Schwerer

### Fenotipska i genotipska varijabilnost izolata roda *Saprolegnia* iz hrvatskih pastrvskih ribnjaka

Patogeni mikroorganizam *Saprolegnia parasitica* i ostale vodene plijesni roda *Saprolegnia*, kao što su *S. australis*, *S. delica* i *S. ferax*, uzročnici su bolesti saprolegnioze koja uzrokuje ekološke štete kod divljih populacija salmonidnih riba te ekonomske gubitke u akvakulturi. Unatoč takvim negativnim učincima, molekularna epidemiologija roda *Saprolegnia* je do danas velikim dijelom neistražena. Stoga je u ovom radu po prvi puta analizirana fenotipska i genotipska varijabilnosti izolata iz roda *Saprolegnia* uzorkovanih na hrvatskim ribnjacima. Fenotipska varijabilnost utvrđena je mjerenjem brzine radijalnog rasta micelija 110 izolata te je pokazano kako postoje statistički značajne varijacije između vrsta: prosječno su najbrže rasli izolati vrste *S. delica* ( $9,42 \text{ cm}^2 \text{ dan}^{-1}$ ), zatim *S. ferax* ( $8,04 \text{ cm}^2 \text{ dan}^{-1}$ ) pa *S. australis* ( $7,14 \text{ cm}^2 \text{ dan}^{-1}$ ), dok su najsporijeg rasta bili izolati vrste *S. parasitica* ( $5,21 \text{ cm}^2 \text{ dan}^{-1}$ ). Nadalje, utvrđena je i značajna varijabilnost u brzini rasta među izolatima iste vrste. Najveće varijacije u brzini rasta unutar vrste uočene su kod *S. australis*, a najmanje kod *S. ferax*. U drugom dijelu istraživanja je sekvenciranjem genskih lokusa *COX1*, *NAD1* i *SHMT* određena genotipska varijabilnost 38 izolata *S. parasitica* kao najvirulentnije vrste. Od 15 ranije opisanih genotipova među izolatima iz Hrvatske detektirano je njih pet: DST5 (11 izolata), DST6 (11 izolata), DST7 (7 izolata), DST9 (7 izolata) i DST14/15 (2 izolata). Geografski najrasprostranjeniji je bio genotip DST6, koji je nađen na tri od četiri analizirana ribnjaka, dok su ostali genotipovi detektirani u samo po jednom ribnjaku. Nadalje, genotipovi su se međusobno značajno razlikovali u brzini rasta micelija. Primjerice, izolati DST5 rasli su sporije od drugih genotipova. Zaključno, rezultati ovog istraživanja doprinjet će boljem razumijevanju uzročnika saprolegnioze, a uz dodatna istraživanja mogu pomoći u usmjeravanju budućih aktivnosti kontrole bolesti prema genotipovima veće virulencije.

Ključne riječi: brzina rasta micelija, MLST, Oomycota, saprolegnioza

## 10. SUMMARY

Mia Schwerer

### **Phenotypic and genetic variability of *Saprolegnia* isolates from Croatian trout farms**

The pathogenic microorganism *Saprolegnia parasitica* and other aquatic oomycetes of the genus *Saprolegnia*, such as *S. australis*, *S. delica*, and *S. ferax*, cause saprolegniosis, which leads to environmental damage in wild populations of salmonid fish and economic damage in aquaculture. Despite these negative impacts, the molecular epidemiology of *Saprolegnia* spp. remains largely unexplored. Therefore, in this work, phenotypic and genetic variability of *Saprolegnia* isolates from Croatian trout farms was analyzed for the first time. Phenotypic variability was determined by measuring the mycelial growth rate of 110 isolates, and it was shown that there are statistically significant differences between species. On average, isolates of *S. delica* grew the fastest ( $9.42 \text{ cm}^2 \text{ day}^{-1}$ ), followed by *S. ferax* ( $8.04 \text{ cm}^2 \text{ day}^{-1}$ ) and *S. australis* ( $7.14 \text{ cm}^2 \text{ day}^{-1}$ ), while isolates of *S. parasitica* were the slowest ( $5.21 \text{ cm}^2 \text{ day}^{-1}$ ). In addition, significant variability in mycelial growth rate was observed between isolates of the same species. The greatest intraspecific growth rate variation was observed in *S. australis* and the least in *S. ferax*. In the second part of the study, the genetic variability of 38 *S. parasitica* isolates, as the most virulent species, was determined by sequencing the *COX1*, *NAD1* and *SHMT* gene loci. Of the 15 genotypes previously described, five were detected among isolates from Croatia: DST5 (11 isolates), DST6 (11 isolates), DST7 (7 isolates), DST9 (7 isolates) and DST14/15 (2 isolates). The most widespread genotype was DST6, which was found in three out of four sampled trout farms, while the other genotypes were detected in only one trout farm. In addition, the genotypes differed significantly from each other in mycelial growth rate. For example, the DST5 isolates grew more slowly than the other genotypes. In conclusion, the results of this study contribute to a better understanding of the causes of saprolegniosis and, with further research, may help direct future disease control efforts to specific genotypes with higher virulence.

Keywords: mycelial growth rate, MLST, Oomycota, saprolegniosis

## 11. ŽIVOTOPIS

Mia Schwerer rođena je 28. rujna 2000. godine u Zagrebu. Završila je dvojezični program XVIII. Gimnazije u Zagrebu na njemačkom jeziku i trenutno je studentica druge godine preddiplomskog studija molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Od 2016. godine volontira kao mentorica u Znanstveno edukacijskom centru Višnjan gdje u sklopu programa *Youth science camp* osmišljava i provodi sedmodnevne projekte za djecu osnovnoškolske dobi. Tijekom prve godine studija bila je uključena u rad studentske udruge eSTUDENT te je kao suvoditeljica tima Popularizacija znanosti sudjelovala u organizaciji dvaju projekata; Mozak voli zdravo, u sklopu kojeg je organizirana jednodnevna konferencija i brojne radionice te Znanost za sve, koji obuhvaća organizaciju znanstvenih predavanja za studente i osmišljanje znanstvenih radionica za djecu. Također, od rujna 2020. godine aktivna je članica Udruge studenata biologije – BIUS, a u siječnju 2021. godine postala je glavna urednica studentskog časopisa *In Vivo*.

## 12. PRILOZI

Prilog 1.A. Šifre izolata vrste *S. australis*, informacije o lokaciji i vremenu uzorkovanja, brzini rasta micelija i GenBank pristupni broj ITS-sekvence.

Šifra izolata	Vrsta	Lokacija	Datum	Vrsta domaćina	Stadij domaćina	Brzina rasta / cm <sup>2</sup> dan <sup>-1</sup>	GenBank pristupni broj
B5L1	<i>S. australis</i>	Kostanjevac	prosinac 2018.	<i>Salmo trutta</i>	Odrasla riba	10,80	MT555940
B5L2	<i>S. australis</i>	Kostanjevac	prosinac 2018.	<i>Salmo trutta</i>	Odrasla riba	7,00	MT555941
B8S	<i>S. australis</i>	Kostanjevac	prosinac 2018.	<i>Salmo trutta</i>	Odrasla riba	10,15	MT555937
RZ31	<i>S. australis</i>	Gračani	prosinac 2019.	–	Voda	8,71	MT555993
RZ32	<i>S. australis</i>	Gračani	prosinac 2019.	–	Voda	10,37	MT555994
RZ33	<i>S. australis</i>	Gračani	prosinac 2019.	–	Voda	3,33	MT555995
RZ34	<i>S. australis</i>	Gračani	prosinac 2019.	–	Voda	8,94	MT555996
RZ41	<i>S. australis</i>	Gračani	prosinac 2019.	–	Voda	6,26	MT555999
RZ42	<i>S. australis</i>	Gračani	prosinac 2019.	–	Voda	6,03	MT556000
RZ43	<i>S. australis</i>	Gračani	prosinac 2019.	–	Voda	5,30	MT556001
RZ44	<i>S. australis</i>	Gračani	prosinac 2019.	–	Voda	2,77	MT556002
RZ45	<i>S. australis</i>	Gračani	prosinac 2019.	–	Voda	9,41	MT556003
RZ46	<i>S. australis</i>	Gračani	prosinac 2019.	–	Voda	6,41	MT556004
VU210	<i>S. australis</i>	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	10,75	MT555960
Z53	<i>S. australis</i>	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	9,89	MT555920
Z62	<i>S. australis</i>	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	10,84	MT555925
Z63	<i>S. australis</i>	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	10,87	MT555926
Z71	<i>S. australis</i>	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	8,62	MT555930
Z72	<i>S. australis</i>	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	9,91	MT555931
Z73	<i>S. australis</i>	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	10,85	MT555932
Z74	<i>S. australis</i>	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	10,82	MT555933
Z75	<i>S. australis</i>	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	10,77	MT555934
Z83	<i>S. australis</i>	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	9,41	MT555945
Z91	<i>S. australis</i>	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	5,90	MT555972
Z95	<i>S. australis</i>	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	10,92	MT555976
VD14	<i>S. australis</i>	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	10,41	MT555953
VD15	<i>S. australis</i>	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	10,35	MT555954
VD16	<i>S. australis</i>	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	9,54	MT555955
VD22	<i>S. australis</i>	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	10,16	MT555946
VD210	<i>S. australis</i>	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	3,20	MT555951
VD31	<i>S. australis</i>	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	9,36	MT555906
VD33	<i>S. australis</i>	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	10,30	MT555912
VD34	<i>S. australis</i>	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	8,57	MT555913
VD35	<i>S. australis</i>	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	9,59	MT555914
VD36	<i>S. australis</i>	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	9,23	MT555915
VD37	<i>S. australis</i>	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	8,77	MT555916
VD38	<i>S. australis</i>	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	9,93	MT555917
VD310	<i>S. australis</i>	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	10,89	MT555959
Z11	<i>S. australis</i>	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	11,08	MT555881
Z23	<i>S. australis</i>	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	6,81	MT555870
Z25	<i>S. australis</i>	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	8,09	MT555872
Z31	<i>S. australis</i>	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	5,57	MT555875
Z32	<i>S. australis</i>	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	11,00	MT555876
Z36	<i>S. australis</i>	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	5,29	MT555879
Z37	<i>S. australis</i>	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	5,96	MT555880

Prilog 1.B. Šifre izolata vrste *S. delica*, informacije o lokaciji i vremenu uzorkovanja, brzini rasta micelija i GenBank pristupni broj ITS-sekvence.

Šifra izolata	Vrsta	Lokacija	Datum	Vrsta domaćina	Stadij domaćina	Brzina rasta / cm <sup>2</sup> dan <sup>-1</sup>	GenBank pristupni broj
B9S	<i>S. delica</i>	Kostanjevac	prosinac 2018.	<i>Salmo trutta</i>	Odrasla riba	9,78	MT555943
BF5	<i>S. delica</i>	Solin	studeni 2018.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Ličinke	8,83	MT555867
VU26	<i>S. delica</i>	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	10,10	MT555938
Z51	<i>S. delica</i>	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	12,52	MT555918
Z52	<i>S. delica</i>	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	9,58	MT555919
Z54	<i>S. delica</i>	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	10,02	MT555921
Z55	<i>S. delica</i>	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	10,87	MT555923
Z56	<i>S. delica</i>	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	7,78	MT555924
Z64	<i>S. delica</i>	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	11,56	MT555928
Z84	<i>S. delica</i>	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	8,71	MT555971
Z92	<i>S. delica</i>	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	10,87	MT555973
Z94	<i>S. delica</i>	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	11,06	MT555975
VD11	<i>S. delica</i>	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	7,31	MT555970
VD12	<i>S. delica</i>	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	10,73	MT555952
VD23	<i>S. delica</i>	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	7,62	MT555947
VD24	<i>S. delica</i>	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	11,78	MT555948
VD25	<i>S. delica</i>	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	9,42	MT555949
VD32	<i>S. delica</i>	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	6,96	MT555922
VD39	<i>S. delica</i>	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	7,47	MT555958
Z14	<i>S. delica</i>	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	5,58	MT555884

Prilog 1.C. Šifre izolata vrste *S. ferax*, informacije o lokaciji i vremenu uzorkovanja, brzini rasta micelija i GenBank pristupni broj ITS-sekvence.

Šifra izolata	Vrsta	Lokacija	Datum	Vrsta domaćina	Stadij domaćina	Brzina rasta / cm <sup>2</sup> dan <sup>-1</sup>	GenBank pristupni broj
BF6	<i>S. ferax</i>	Solin	studeni 2018.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Odrasla riba	4,90	MT555868
VU47	<i>S. ferax</i>	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	10,29	MT555957
Z135	<i>S. ferax</i>	Radovan	siječanj 2019.	–	Voda	10,90	MT555911
BD110	<i>S. ferax</i>	Radovan	ožujak 2019.	–	Voda	8,43	MT555968
BD31	<i>S. ferax</i>	Radovan	ožujak 2019.	–	Voda	7,07	MT555963
BD37	<i>S. ferax</i>	Radovan	ožujak 2019.	–	Voda	6,32	MT555966
BD39	<i>S. ferax</i>	Radovan	ožujak 2019.	–	Voda	8,35	MT555967

Prilog 1 D. Šifre izolata vrste *S. parasitica*, informacije o lokaciji i vremenu uzorkovanja, dodijeljeni DST, brzini rasta micelija i GenBank pristupni broj ITS-sekvence.

Šifra izolata	Vrsta	Lokacija	Datum	Vrsta domaćina	Stadij domaćina	DST	Brzina rasta / cm <sup>2</sup> dan <sup>-1</sup>	GenBank pristupni broj
G1L1	<i>S. parasitica</i>	Gračani	prosinac 2018.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Odrasla riba	5	3,58	MT555978
G2L1	<i>S. parasitica</i>	Gračani	prosinac 2018.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Odrasla riba	5	4,44	MT555979
G2L2	<i>S. parasitica</i>	Gračani	prosinac 2018.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Odrasla riba	5	4,33	MT555980
G3L1	<i>S. parasitica</i>	Gračani	prosinac 2018.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Odrasla riba	5	4,53	MT555981
G3L2	<i>S. parasitica</i>	Gračani	prosinac 2018.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Odrasla riba	5	4,15	MT555982
G4L1	<i>S. parasitica</i>	Gračani	prosinac 2018.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Odrasla riba	5	4,56	MT555983
G5L2	<i>S. parasitica</i>	Gračani	prosinac 2018.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Odrasla riba	5	3,59	MT555985
G6L2	<i>S. parasitica</i>	Gračani	prosinac 2018.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Odrasla riba	5	4,57	MT555987
G8L2	<i>S. parasitica</i>	Gračani	prosinac 2018.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Odrasla riba	5	4,39	MT555989
B7L2	<i>S. parasitica</i>	Kostanjevac	prosinac 2018.	<i>Salmo trutta</i>	Odrasla riba	6	5,59	MT555935
B7G	<i>S. parasitica</i>	Kostanjevac	prosinac 2018.	<i>Salmo trutta</i>	Odrasla riba	6	5,26	MT555942
A1	<i>S. parasitica</i>	Radovan	siječanj 2019.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Jaje	7	5,88	MT555894
A4	<i>S. parasitica</i>	Radovan	siječanj 2019.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Jaje	7	7,54	MT555895
C1	<i>S. parasitica</i>	Radovan	siječanj 2019.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Jaje	7	5,06	MT555899
C2	<i>S. parasitica</i>	Radovan	siječanj 2019.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Jaje	7	6,48	MT555900
C4	<i>S. parasitica</i>	Radovan	siječanj 2019.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Jaje	7	5,68	MT555902
D3	<i>S. parasitica</i>	Radovan	siječanj 2019.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Jaje	7	6,01	MT555903
E4	<i>S. parasitica</i>	Radovan	siječanj 2019.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Jaje	7	6,77	MT555969
BF1	<i>S. parasitica</i>	Solin	studen 2018.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Ličinke	9	10,51	MT555864
BF2	<i>S. parasitica</i>	Solin	studen 2018.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Ličinke	9	9,64	MT555865
BF4	<i>S. parasitica</i>	Solin	studen 2018.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Ličinke	9	9,39	MT555866
B2L3	<i>S. parasitica</i>	Solin	studen 2018.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Odrasla riba	6	6,18	MT555939
RZ11	<i>S. parasitica</i>	Gračani	prosinac 2019.	–	Voda	5	4,42	MT555991
RZ14	<i>S. parasitica</i>	Gračani	prosinac 2019.	–	Voda	5	4,13	MT555992
VD110	<i>S. parasitica</i>	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	6	6,13	MT555956
Z115	<i>S. parasitica</i>	Radovan	siječanj 2019.	–	Voda	6	7,17	MT555977
Z131	<i>S. parasitica</i>	Radovan	siječanj 2019.	–	Voda	6	8,69	MT555908
Z132	<i>S. parasitica</i>	Radovan	siječanj 2019.	–	Voda	6	7,89	MT555909
BD33	<i>S. parasitica</i>	Radovan	ožujak 2019.	–	Voda	6	5,48	MT555965
Z13	<i>S. parasitica</i>	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	9	10,66	MT555883
Z15	<i>S. parasitica</i>	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	14/15	11,11	MT555885
Z16	<i>S. parasitica</i>	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	9	10,33	MT555886
Z22	<i>S. parasitica</i>	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	9	10,03	MT555869
Z24	<i>S. parasitica</i>	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	14/15	6,84	MT555871
Z41	<i>S. parasitica</i>	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	6	6,44	MT555887
Z43	<i>S. parasitica</i>	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	6	5,85	MT555889
Z44	<i>S. parasitica</i>	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	9	8,53	MT555890
Z46	<i>S. parasitica</i>	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	6	7,12	MT555892