

Genetička analiza izolata oomiceta iz ribnjaka pastrve

Sačer, Martin

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:125522>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, ožujak, 2020.

Martin Sačer

1022/MB

**GENETIČKA ANALIZA IZOLATA
OOMICETA IZ RIBNJAKA
PASTRVE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc.dr.sc. Tomislava Vladušića i neposrednim vodstvom doc.dr.sc. Ane Bielen, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Dore Pavić, mag. oecol.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

GENETIČKA ANALIZA IZOLATA OOMICETA IZ RIBNJAKA PASTRVE

Martin Sačec, 1022/MB

Sažetak:

Oomiceti su patogeni mikroorganizmi koji uzrokuju bolesti koje uzrokuju milijunske gubitke u akvakulturi i agrokulturi. Budući su zastupljenost i biologija oomiceta u ribogojilištima Hrvatske uglavnom nepoznati, cilj ovog diplomskog rada bio je identificirati prisutne vrste oomiceta, izoliranih kao čista kultura iz uzoraka prikupljenih na ribogojilištu Belski dol, te ustanoviti njihove filogenetske odnose na temelju genetske analize ITS-regije 5,8S rRNA gena. Filogenetski odnosi rekonstruirani su pomoću metode Bayesianovog zaključivanja (BA, eng. *Bayesian analysis*) pomoću programa Mr. Bayes sa 100 000 iteracija. Molekularno-filogenetička analiza ustanovila je da od ukupno 48 izolata uzgojenih kao čiste kulture; dvadeset i pet pripadaju *Pythium sp.*, četrnaest vrsti *Saprolegnia parasitica*, pet izolata identificirano je kao *Saprolegnia ferax*, tri izolata spadaju u *Leptolegnia sp.*, dok samo jedan izolat spada u *Saprolegnia australis*. Upotreba PCR testova za detekciju patogenih oomiceta omogućila bi rano otkrivanje prisutnosti patogena i predviđanje “vrućih točaka” s povećanim rizikom izbijanja bolesti. Time bi se utjecalo na smanjenje ekonomskih gubitaka i potaknulo na poboljšanje uvjeta uzgoja.

Ključne riječi: oomiceti, izolacija, ITS regija, sekvenciranje, filogenetska analiza

Rad sadrži: 67 stranica, 28 slika, 5 tablica, 94 literaturnih navoda, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *doc.dr.sc. Tomislav Vladušić*

Pomoć pri izradi: *Dora Pavić, mag. oecol.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. *Reno Hrašćan*
2. doc. dr. sc. *Tomislav Vladušić*
3. doc. dr. sc. *Maja Dent*
4. izv. prof. dr. sc. *Jurica Žučko* (zamjena)

Datum obrane: 6. Ožujak.2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

GENETIC ANALYSIS OF OOMYCETE ISOLATES FROM TROUT PONDS

Martin Sačer, 1022/MB

Abstract:

Oomycetes are pathogenic microorganisms that cause diseases which can lead to millions of losses in aquaculture and agriculture. Considering that existing pathogen identification methods are based on the cultivation of isolates in growth-medium, a procedure that is time-consuming and often unsuccessful, the aim of this study was to identify the species of oomycetes isolated as pure cultures from samples collected at fish farm “Belski dol” and also to identify their phylogenetic relationship based on genetic analysis of the ITS region of the 5.8S rRNA gene. Phylogenetic relationship was reconstructed using the Bayesian analysis (BA) method using Mr. Bayes with 100,000 iterations. Molecular-phylogenetic analysis found twenty-five *Phytium sp.*, fourteen *Saprolegnia parasitica*, five *Saprolegnia ferax*, three isolates belong to *Leptolegnia sp.*, while only one belongs to *Saprolegnia australis*. The use of PCR assays for detection of pathogenic oomycetes would allow the early detection of pathogens and the prediction of “hot spots” with increased risk of disease outbreaks. This would have the effect of reducing economic losses and stimulating the improvement of farming conditions.

Keywords: *oomycetes, isolation, ITS region, sequencing, phylogenetic analysis*

Thesis contains: 67 pages, 28 figures, 5 tables, 94 references, 1 supplement

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *Tomislav Vladušić, PhD.*

Technical support and assistance: *Dora Pavić, MSc.*

Reviewers:

1. PhD. *Reno Hrašćan*, Associate professor
2. PhD. *Tomislav Vladušić*, Assistant professor
3. PhD. *Maja Dent*, Assistant professor
4. PhD. *Jurica Žučko*, Associate professor (substitute)

Thesis defended: 6. March. 2020.

Sadržaj	stranica
1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Glavne karakteristike oomiceta.....	2
2.2. Filogenija oomiceta.....	4
2.3. Životni ciklus.....	6
2.3.1. Nesporno razmnožavanje.....	7
2.3.2. Spolno razmnožavanje.....	9
2.4. Bolesti uzrokovane vrstama iz reda <i>Peronosporales</i>	13
2.5. Bolesti uzrokovane vrstama iz reda <i>Saprolegniales</i>	16
2.5.1. Bolesti koje uzrokuju vrste oomiceta iz roda <i>Saprolegnia</i> , <i>Achlya</i> , <i>Leptolegnia</i>	17
2.5.2. Bolesti koje uzrokuju vrste oomiceta iz roda <i>Aphanomyces</i>	19
2.6. Metode izolacije i uzgoja izolata oomiceta.....	21
2.7. Identifikacija oomicetnih vrsta.....	22
2.8. Lančana reakcija polimerazom.....	26
2.8.1. Hot Start PCR.....	27
2.8.2. Oligonukleotidne početnice za PCR.....	28
2.9. Primjena PCR metode u akvakulturi.....	29
2.10. Filogenetska analiza DNA slijedova.....	31
2.10.1. Ograničenja unutar filogenetske analize DNA slijedova.....	32
3. EKSPERIMENTALNI DIO	33
3.1. Izolacija i uzgoj oomiceta iz ribogojilišta Belski dol	33
3.2. Izolacija genomske DNA.....	37
3.3. Lančana reakcija polimerazom.....	38
3.4. Elektroforetsko razdvajanje fragmenata DNA.....	40
3.5. Pročišćavanje i sekvenciranje, te računalna analiza nukleotidnih sekvenci.....	41
4. REZULTATI I RASPRAVA	43
4.1. Izolacija i uzgoj čistih kultura uzoraka oomiceta izoliranih iz ribogojilišta Belski dol.....	43
4.2. Izolacija DNA i umnažanje ITS regije 5,8S rRNA gena.....	44
4.3. Pregled i uređivanje kromatograma sekvenciranih PCR produkata.....	44
4.4. Pretraživanje baze podataka, provjera autentičnosti te sravnjenje nukleotidnih slijedova.....	46
4.5. Filogenetska analiza sekvenci.....	46
5. ZAKLJUČAK	54
6.LITERATURA	54
7.PRILOZI	62

1.UVOD

Oomicete su mikroorganizmi koji su široko rasprostranjeni u različitim tipovima okoliša, uključujući čak pustinja i polarna područja. Ovisno o različitim tipovima staništa, domaćinskim organizmima te uvjetima rasta i razvoja, oomiceti su razvili saprofitski i parazitski način života. Jedan od najbitnijih ekosustava u kojem obitavaju ove vrste mikroorganizama su slatkovodna staništa. Najviše istraživanja napravilo se na patogenim vrstama koje žive u tlu, a malo je onih koja uključuju oomicete iz slatkovodnih okoliša, poznate i kao vodene plijesni (Bora i Choi, 2019; Songe, 2015; Van der Berg i sur., 2013)

Vodne plijesni uzrokuju velik broj bolesti u akvakulturi, što rezultira uginućem različitih vrsta divljih te uzgajanih riba i rakova. Oomicete koje spadaju u red *Saprolegniales*, posebno vrste iz roda *Saprolegnia*, *Aphanomyces* i *Achlya*, su glavni uzročnici saprolegnioze, bolesti koja zahvaća vrste riba važne u slatkovodnoj akvakulturi (poput pastrve i lososa), ali i niz divljih vrsta (poput grgeča i jesetre) te riblja jaja. S ekonomskog stajališta, vrste koje spadaju u red *Saprolegniales* jedni su od najvažnijih patogena u salmonidnoj akvakulturi, jer na godišnjoj razini uzrokuju milijunske gubitke. To su saprofitski mikroorganizmi koji se razmnožavaju na ribi koja je fizički ozljeđena, pod stresom ili zaražena drugim patogenima (Lone i Manohar, 2018; Hatai i Hoshiai, 1993). Vrste koje spadaju u ovu skupinu obično se smatraju uzročnicima sekundarnih infekcija koje su posljedica primarnih bakterijskih infekcija, loših uvjeta uzgoja, zaraze parazitima itd. Međutim, postoji nekoliko izvještaja i novih istraživanja o oomicetama kao primarnim uzročnicima infekcija riba i ribljih jaja (Pickering i Christie, 1980).

Oomicete su poznate po tome što su patogeni i za biljke. Najbolje proučene fitopatogene vrste oomiceta spadaju u red *Peronosporales*, najpoznatije spadaju u rodove *Phytophthora* i *Pythium* (Sarowar i sur., 2018). Najčešće ih se može izolirati iz tla, ali također su široko rasprostranjeni u slatkovodnim akvakulturama. Mnoge su *Pythium* vrste patogeni koji uzrokuju ekonomski važne bolesti, kao što su trulež korijenja te crna pjegavost stabiljke i listova. Do sada nije utvrđeno sudjeluju li fitopatogene vrste oomiceta roda *Pythium* u razvoju saprolegnioza, oomicetama uzrokovanih bolesti kod riba i rakova, ali je otkriveno postojanje samo jedne vrste koja uzrokuje bolesti u sisavaca i ptica, *Pythium insidiosum* (Bora Nam i Young Choi, 2019; Levesque, 2011).

Zbog svega navedenog nužno je pratiti pojavnost ovih patogena u akvakulturnim i agrokulturnim objektima. Međutim, brza i pouzdana identifikacija oomicetnih vrsta otežana je zbog

dugotrajnog i kompliciranog uzgoja u čistoj kulturi. Osim toga, neke vrste oomiceta su morfološki i mikroskopski vrlo međusobno slične (Songe, 2015; Markovskaja, 2006). Stoga se u tom slučaju vrsta ne može pouzdano identificirati na temelju morfoloških karakteristika nakon uzgoja, već je potrebno izolirati DNA (eng. *Deoxyribonucleic Acid*) željenog mikroorganizma, bilo iz taksonomski nepoznatog mikrobnog izolata, bilo iz uzorka bolesnog tkiva ribe ili primjerice iz uzorka vode u ribnjaku, provesti umnažanje oomicetnih genskih biljega s pomoću PCR, određivanje redoslijeda nukleotida takvog biljega i naknadnu filogenetsku analizu.

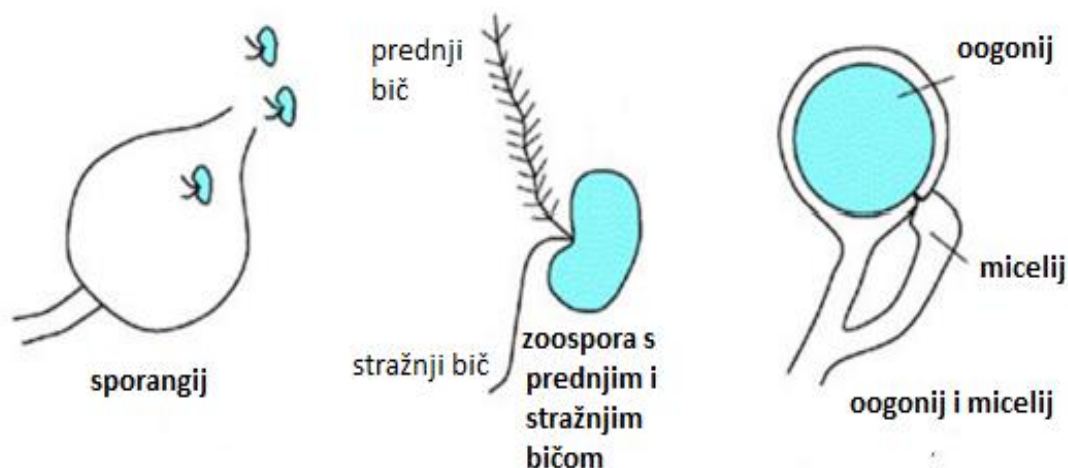
2. TEORIJSKI DIO

2.1. Glavne karakteristike oomiceta

Oomiceti su heterotrofni eukariotni mikroorganizmi vrlo slični mikroskopskim gljivama (plijesnima) koji žive u morima, slatkoj vodi te naseljavaju kopnena područja (Beakes i sur., 2012). Dugo vremena su se oomiceti svrstavali u carstvo gljiva zbog toga što imaju sličnu ulogu u ekosustavu, nutrijente iz hrane dobivaju apsorcijom, te rastu na specifičan način formirajući kolonije koje se sastoje od hifa umreženih u micelij (Songe, 2015). Biokemijske i strukturne karakteristike koje odvajaju oomicete od gljiva su: (1) glavna gradivna komponenta od koje je građena stanična stijenka stanica nije hitin, kao što je kod gljiva, nego smjesa različitih glukana ili celuloze; (2) vakuole stanica sadržavaju fosforilirane β -(1,3)-mikolaminarin glukane, koji se izlučuju iz vakuole te su osnovna gradivna komponenta stanične stijenke stanice i pričuvni polisaharid; (3) vegetativne stanice oomiceta sastoje se od hifa bez septi koje sadrže diploidne jezgre, dok kod gljiva nalazimo hife sa septama koje sadrže haploidne jezgre; (4) mitohondriji oomiceta su tubularnog oblika, a kod gljiva pločastog; (5) drugačiji biokemijski put sinteze aminokiseline lizin; (6) zoospore oomiceta sadrže dva tipa biča pomoću kojih se mogu kretati. Iako većina gljiva proizvodi nepokretne zoospore, neke gljive imaju pokretne zoospore, koje imaju samo jedan bič (Fawke i sur., 2015). U tablici 1 prikazan je sažetak glavnih morfoloških razlika između gljiva i oomiceta, a na slici 1 prikazane su strukture oomiceta bitne za reprodukciju.

Tablica 1. Prikaz glavnih morfoloških razlika između oomiceta i gljiva (Songe, 2015)

Karakteristike	Oomicete	Gljive
Vegetativne stanice hifa	diploidne	haploidne
Građa stanične stijenke	glukani ili celuloza	hitin
Tip biča kod zoospora	prednji i stražnji bič	uglavnom bez biča
Mitohondriji	tubularni oblik	pločastog oblika



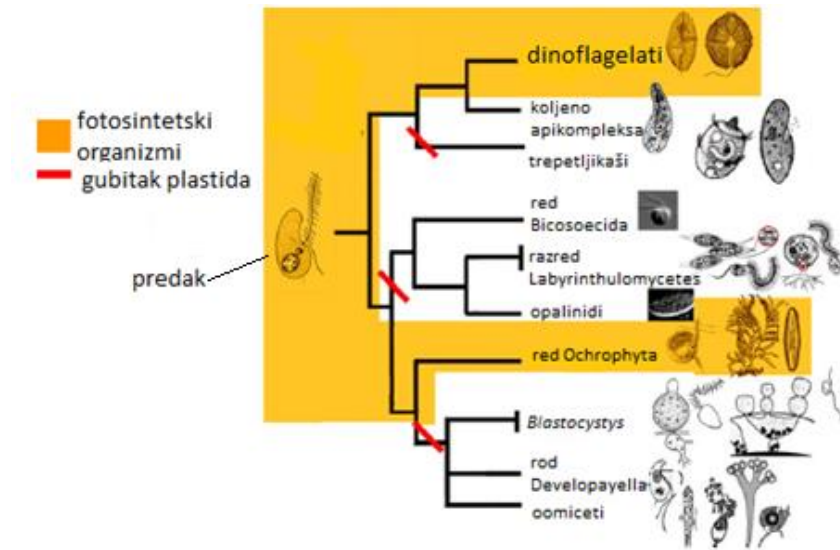
Slika 1. Strukture oomiceta uključene u njihovu reprodukciju (Songe, 2015)

Gljive i oomiceti, iako filogenetski međusobno vrlo udaljeni, su osmotrofni organizmi. To su organizmi koji luče enzime i druge sekretorne metabolite u okolinu pomoću kojih razgrađuju polimere kao što su: celuloza, lipidi, proteini i lignin u monomere koji se transportiraju u njihove stanice te im služe za rast i razvoj. Stoga, svojstva ekoloških niša koje nastanjuju oomiceti uveliko ovise o sekretornim produktima izlučenih od strane oomiceta. Zbog njihove osmotrofne prirode, patogeni oomiceti su u stanju prodrijeti kroz netaknute površine organizma domaćina, te prouzročiti infekcije koje imaju po njega fatalne posljedice. Otkriće koje je izazvalo veliko uzbuđenje među znanstvenicima jest da vrste iz rodova *Phytophthora* i *Hyaloperonospora* proizvode toksine uglavnom enzimske prirode, te uzrokuju inaktivaciju i/ili inhibiciju

obrambenog staničnog sustava domaćina (Tyler, 2007). Ti sekretorni proteini sadrže specifičan gradivni motiv RxLR koji se nalazi blizu N-terminalnog kraja peptidnog lanca te je taj dio peptidnog lanca jako očuvan. RxLR gradivni motiv peptidnog lanca, po slijedu aminokiselina i konzerviranosti, jako je sličan gradivnim motivima obligatnih parazita iz koljena *Apicomplexa* i parazita roda *Plasmodium* koji uzrokuju malariju (Bhattacharjee i sur., 2006). Također, slični sekretorni proteini pronađeni su kod oomiceta iz roda *Saprolegnia*, ali u manjoj koncentraciji nego kod *Phytophthora infestans* ili *Hyaloperonospora parasitica* (Grouffaud i sur., 2008).

2.2. Filogenija oomiceta

Na temelju gore navedenih karakteristika, koje ih razlikuju od gljiva, znanstvenici su odlučili svrstati oomicete u carstvo Chromista, no takva klasifikacija je kontroverzna jer neki autori smatraju kako carstvo Chromista nije monofiletska skupina. Klasificiraju se nadalje u infracarstvo heterokonta (Baldauf i sur., 2000). Infracarstvo heterokonta obuhvaća mnogobrojne organizme uključujući autotrofne alge u čijim se stanicama nalazi klorofil a ili c (npr. alge kremenjašice, smeđe alge, dijatomeje itd.) te brojne heterotrofne organizme. U skupinu heterotrofnih heterokonta spadaju: (1) flagelati kao što su: vrste iz reda *Bicosoecida*, fakultativni anaerobi koji parazitiraju u crijevima (npr. ljudski parazit *Blastocystis*), opalinidi itd.; (2) osmotrofni heterotrofi, organizmi koji su ujedno i najbližnji gljivama, te su glavni predstavnici ove skupine oomiceti. Zajednička karakteristika svih heterokonta je postojanje dva nejednolika biča (Beakes, 2012). Razvoj metoda sekvenciranja te analize genoma različitih organizama omogućio je dokaze o povezanosti heterokonta i alveolata, te postojanju njihovog zajedničkog pretka koji se hranio fotosintezom i imao dva biča za pokretanje (Lamour i sur., 2007). Analiza očuvanih gena potvrdila je da se gubitak plastida dogodio najmanje tri puta tijekom evolucije od zajedničkog pretka (Tsui i sur., 2006). Na slici 2 shematski je prikazano filogenetsko stablo organizama koji spadaju u infracarstvo heterokonta i infracarstvo alveolata (Cavalier-Smith i Chao, 2006).



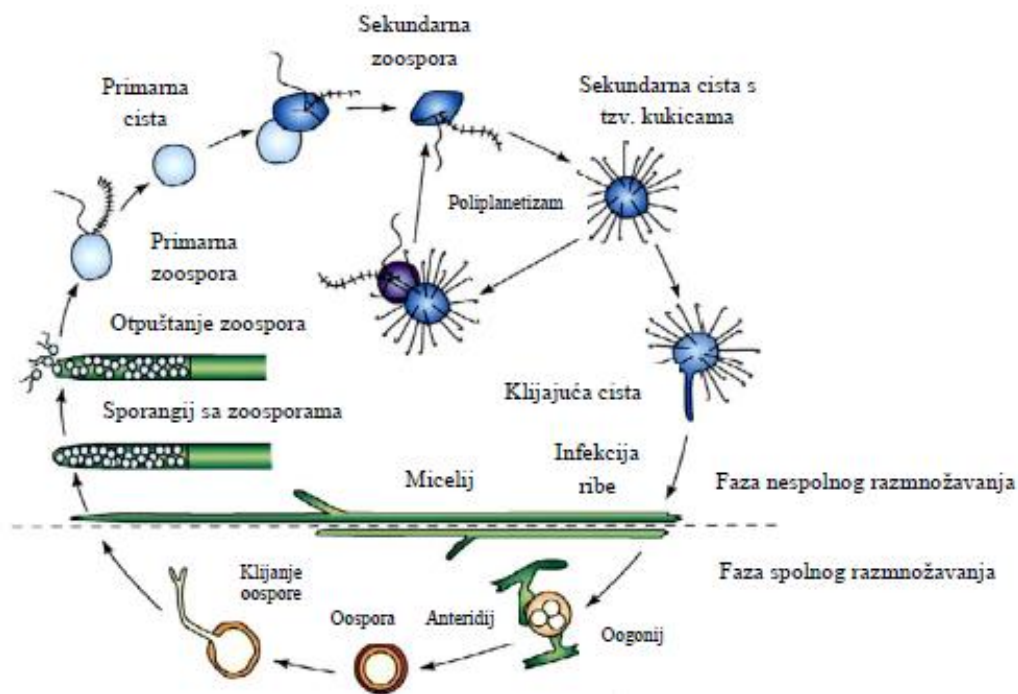
Slika 2. Filogenetsko stablo organizama koji spadaju u infracarstva heterokonta i alveolata (Cavalier-Smith i Chao, 2006)

Najčešće korištena podijela oomiceta, koja temelje vuče još od sredine devetnaestog stoljeća na temelju istraživanja Antona de Baryja te je dodatno nadopunjena novijim istraživanjima, dijeli oomicete na dvije glavne grupe. Jedna taksonomska grupa obuhvaća oomicete koji su saprotrofi te se oni jednim imenom nazivaju “vodene plijesni” (npr. redovi *Eurychasmales*, *Leptomitales*, *Saprolegniales* itd.), dok u drugu taksonomsku grupu pripadaju oomiceti koji su uglavnom biljni patogeni (npr. red *Rhipidiales*, *Pythiales*, *Peronosporales*, itd.) (Beakes i sur., 2012).

Najnovija genetička istraživanja raznih predstavnika oomiceta, koja se temelje na analizi gena koji kodiraju za SSU i LSU rDNA te mitohondrijske Cox2 proteine, otkrila su da postoji 15 redova oomiceta. Velika većina istraživanih vrsta pripadaju u jedan od dva velika reda – *Saprolegniales* ili *Peronosporales*. Ako se još uzmu u obzir staništa i organizmi domaćini koje napadaju oomiceti iz gore navedenih redova, može se zaključiti da su oomiceti ta dva reda pretežno paraziti i da većina njih živi u vodi (Hudspeth i sur., 2000).

2.3. Životni ciklus

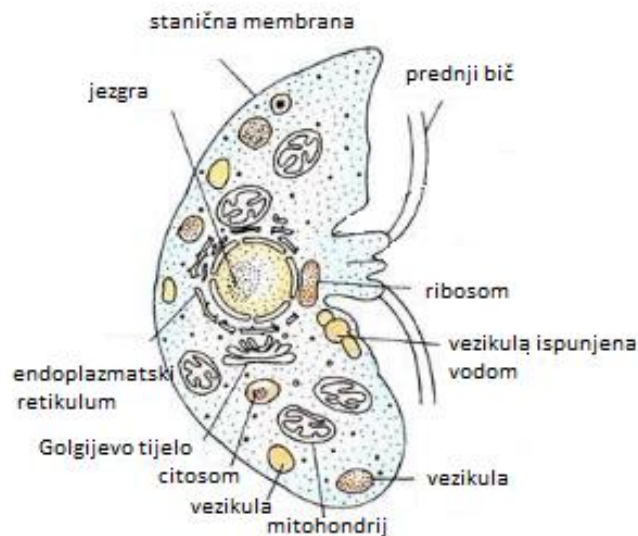
Većina znanstvenih istraživanja usmjerena je na patogene oomicete, koji izazivaju bolesti riba, ikre, algi i biljaka, kao što su vrste rodova iz reda *Saprolegniales* (npr. *Achlya*, *Saprolegnia*, *Aphanomyces*, *Leptolegnia*) i *Peronosporales* (npr. *Pythium*, *Phytophthora*) (Bora i Choi, 2019). Razlikujemo dvije faze životnog ciklusa oomiceta: vegetativnu fazu i reproduktivnu fazu. Pojava micelija na površini domadara karakteristika je patogenih vrsta oomiceta. Micelij se sastoji se od bijelih, razgranatih hifa koje penetriraju u tijelo domadara te se šire u svim smjerovima. Hife se ne sastoje od odvojenih stanica jer ne sadrže septe. Nakon određenog vremena provedenog u povoljnim okolišnim uvjetima, oomiceti uđu u reproduktivnu fazu životnog ciklusa. Ta faza životnog ciklusa vrsta iz rodova *Pythium*, *Leptolegnia*, *Achlya* i *Saprolegnia* uključuje nesporno razmnožavanje tvorbom sporangija i slobodno pokretnih zoospora te spolno razmnožavanje u koje su uključene oospore, koje su morfološki različite od zoospora (Sinha i Vashista, 2007; William i McInnis, 1987). Neki oomiceti ne posjeduju spolni način razmnožavanja, već se razmnožavaju isključivo nesporno. Ta pojava uočena je kod *Aphanomyces astaci*, uzročnika račje kuge (Huang i sur., 1994). Na slici 3 prikazana je shema životnog ciklusa na primjeru *Saprolegnia parasitica* (Vujović, 2019).



Slika 3. Životni ciklus na primjeru *Saprolegnia parasitica* (Vujović, 2019)

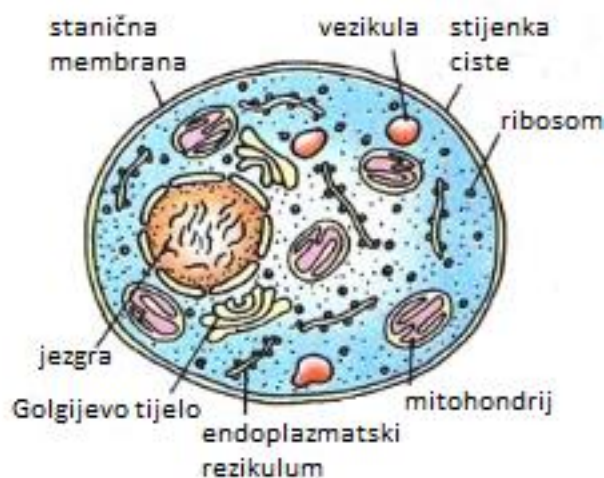
2.3.1. Nesporno razmnožavanje

Kod oomiceta su prisutna dva načina nespornog razmnožavanja: (1) fragmentacijom hifa; (2) pomoću zoospora. Fragmentacija hifa temelji se na pucanju hifa, u određenim uvjetima okoline, na više dijelova različitih veličina. Iz svakog odvojenog dijela daljnjom elongacijom i mitotičkim diobama razvije se micelij. Sporulacija se temelji na stvaranju zoospora koje nastaju u sporangijima. Sporangiji su posebne stanične strukture, ovalnog ili cilindričnog oblika, koje se formiraju na vrhovima hifa, te je uočeno da formiranju sporangija, tj. nespornom razmnožavanju sporulacijom, pogoduje nedostatak hrane, veliki pad temperature u okolini i visoka vlažnost. Ovakav način razmnožavanja smatra se odgovornim za razvoj bolesti kod životinja ili biljaka. Unutrašnjost sporangija je ispunjena citoplazmom u kojoj se nalazi puno jezgara (polinuklearna struktura). Unutrašnjost sporangija se u određenom trenutku razdijeli na više protoplasta, koji imaju svaki po dva biča na svojoj površini. Daljnjom diferencijacijom iz ovakvih struktura nastaju primarne zoospore. Kad sazriju do kraja, primarne se zoospore počinju gibati unutar sporangija pomoću bičeva, što dovodi do pucanja sporangija i otpuštanja primarnih zoospora u okolinu. Njihovo kretanje je potaknuto kemotaksijom s ciljem pronalaska adekvatnog domaćina. Kod većine je oomiceta građa zoospora vrlo slična (slika 4). Prednji bič sadrži dva reda trostrukih cjevastih struktura koje podsjećaju na dlačice (Sinha i Vashista, 2007).



Slika 4. Građa zoospore (Sinha i Vashista, 2007)

Postojanje dva biča jedno je od glavnih karakteristika svih vrsta oomiceta koje spadaju u infracarstvo heterokonta. Međutim, kod nekih oomiceta uočeno je nepostojanje dva reda trostrukih struktura u obliku dlačica kod prednjeg biča (npr. rod *Haptoglossa*), dok neke vrste iz roda *Myzocytiopsis* imaju samo nekoliko takvih struktura na prednjem biču. Budući da baš te strukture u obliku dlačica omogućuju prednji potisak biča, njihovo neimanje daje naslutiti da je vrsta u fazi tranzicije kad počinje proizvoditi aplanospore (nepokretne spore). Bazalno tijelo biča na sebe veže četiri mikrotubula te je to morfološka karakteristika koja vrijedi za sve dosad istražene oomicete. Ako su uvjeti u okolini nepogodni, spora se prestaje kretati te prijeđe u stanje mirovanja. Nedugo nakon mirovanja, iz spora nastaju ciste koje se još nazivaju citospore (slika 5). Kad uvjeti u okolini budu pogodni, iz cista germinacijom nastaju zoospore (Beakes i sur., 2012; Oidtmann i sur., 2006).



Slika 5. Građa ciste (Sinha i Vashista, 2007)

Proizvodnja dvije generacije zoospora karakteristična je za oomicete iz reda *Saprolegniales*. Primarne zoospore pokreću se pomoću dva biča, međutim one su aktivne samo nekoliko minuta nakon čega se pretvore u primarnu cistu. Germinacijom primarne ciste dolazi do tvorbe sekundarnih pokretnih zoospora koje se smatraju glavnim infektivnim stadijem oomiceta iz roda *Saprolegnia*, *Aphanomyces*, *Achlya* i *Leptolegnia*. Za razliku od primarnih zoospora, sekundarne zoospore mogu ostati pokretne i do nekoliko dana, nakon čega dolazi do tvorbe sekundarnih cista, tzv. citospora. Sekundarne ciste nekih vrsta rodova *Saprolegnia*, *Aphanomyces* i *Achlya* imaju sposobnost da iznova stvore zoospore ukoliko je stvaranje ciste inducirano nespecifičnim

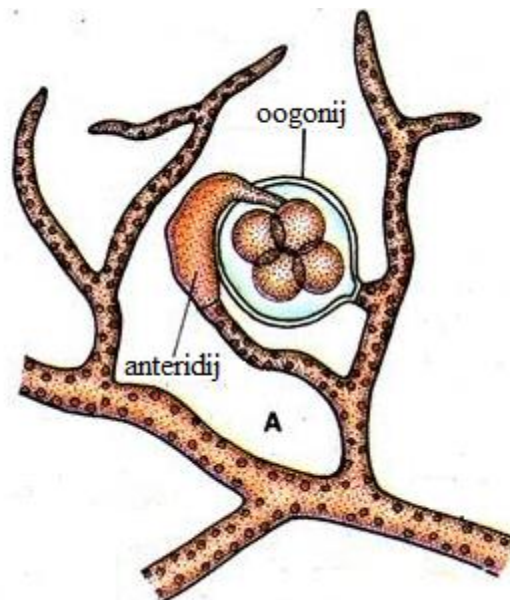
podražajem kao što je slučajna promjena pH okoline. Ta pojava naziva se poliplanetizam i može se ponavljati kroz nekoliko ciklusa, no u većini slučajeva dolazi do klijanja sekundarne ciste u novi micelij (Rezinciuc i sur., 2018; Earle i Hintz, 2014). Kod mnogih je vrsta uočeno postojanje različitih tzv. kukica, tj. struktura u obliku zavijenih dlačica na površini ciste, te se kukice razlikuju između vrsta koje pripadaju rodu *Saprolegnia*. Smatra se da je funkcija tih kukica omogućavanje cisti prihvaćanje na površinu domaćina i općenita je pretpostavka da je dužina kukica proporcionalna jačini vezanja ciste na površinu domaćina, odnosno da duže kukice znače čvršće vezanje i obrnuto (Songe, 2017).

Pomoću SEM mikroskopa uočeno je da zoospore svih oomiceta sadrže mnoštvo unutarstaničnih vezikula iz kojih se otpuštaju mnoge sekretorne molekule u staničnu okolinu. Ovisno o vrsti oomiceta, oslobođene molekule iz vezikula sudjeluju u omogućavanju zoospori adhezije na podlogu, tj. površinu stanica domaćina (npr. kod *P. cinnamomi* sekretorne molekule iz vezikule se vežu za aglutinin u soji), dok kod nekih oomiceta sekretorne molekule iz vezikula grade vanjski sloj primarne ciste (npr. kod mnogih vrsta iz roda *Saprolegnia*) (Beakes i sur., 2012). Genetičkom analizom gena *PcVsv1* iz *P. cinnamomi*, koji kodira za protein bitan za adheziju zoospore na stanicu domadara te se oslobađa iz unutarstaničnih vezikula, uočena je sličnost između slijeda nukleotida i očuvanosti određenih dijelova gena s genima parazitskih vrsta roda *Plasmodium* koji kodiraju adhezijske proteine bitne za vezanje parazita na staničnu membranu domadara. Ovo je značajan primjer povezanosti patogeneze između heterokonta i alveolata (Robold i Hardham 2005).

2.3.2. Spolno razmnožavanje

Za ovaj način razmnožavanja karakteristično je da pri određenim nepovoljnim uvjetima dolazi do stvaranja muških i ženskih spolnih struktura. Najčešći uvjeti koji usmjeravaju organizam na spolno razmnožavanje su: (1) nedostatak hrane (domadar je razgrađen); (2) niska vlaga. Tijekom spolne faze nastaju oospore koje mogu poslužiti kao učinkovita 'faza mirovanja' tijekom nepovoljnih uvjeta. Kao takve, oospore služe za preživljavanje fitopatogenim oomicetama koji se moraju nositi s ekstremnim uvjetima u tlu kao što su temperaturne oscilacije, iznimna vlaga i suša, trošenje supstrata i sl. Suprotno tome, kod animalnih parazita spolno razmnožavanje je vrlo rijetko (Diéguez-Uribeondo i sur., 2009). Strukture za spolno razmnožavanje stvaraju se na

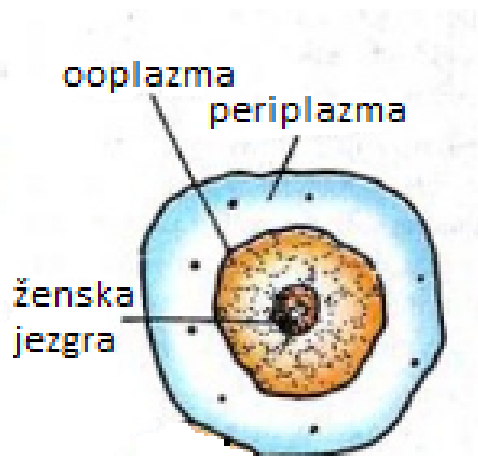
vrhovima somatskih hifa, koje se nalaze unutar tkiva mrtvog domadara. Muška spolna struktura naziva se anteridij (slika 6), a ženska je oogonij (slika 7 i slika 8), te se oni formiraju iz zasebnih vrhova hifa koji su međusobno blizu. Najčešće oogoniji nastaju iz većih i debljih vrhova hifa, dok anteridiji nastaju iz manjih susjednih vrhova. Većina patogenih vrsta iz rodova *Leptolegnia* i *Saprolegnia* koje pripadaju redu *Saprolegniales*, te roda *Phytium* (red *Peronosporales*) su homotalične. U anteridijima nastaju muške pokretne spolne stanice, a u oogonijima ženske nepokretne stanice. Anteridiji su cijevastog oblika, veličinom manji od oogonija, obavijeni tankom stijenkom, a unutrašnjost se sadrži više jezgara i malih vakuola. Pomoću septe odvaja se citoplazma anteridija od ostatka hife. U kasnijoj fazi razvoja, dolazi do vezanja anteridija na najbliži susjedni oogonij, te stvaranja fertilizacijske cijevi pomoću koje se ubace muške gamete u oogonij. Anteridiji se sastoje od diploidnih stanica koje se počinju dijeliti mejozom, te iz njih nastaju haploidne gamete. Gamete unutar anteridija obavijene su membranom i sadrže haploidnu jezgru u kojoj se nalazi genom (Sinha i Vashista, 2007).



Slika 6. Izgled anteridija i oogonija kod oomiceta roda *Saprolegnia* (Sinha i Vashista, 2007)

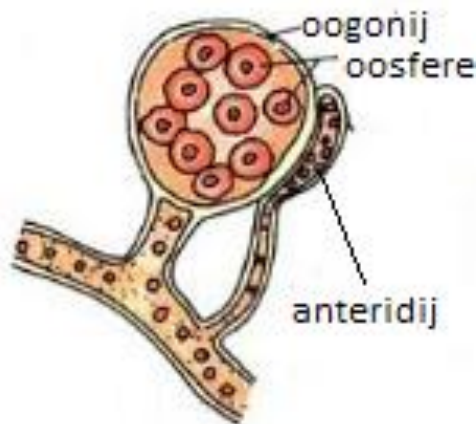
Oogoniji su okruglog oblika, veći od anteridija, obavijeni debelom stijenkom, a unutrašnjost sadrži: više jezgara, vakuola, raznih vezikula i septe. U kasnijim fazama razvoja, dolazi do reorganizacije unutrašnjosti citoplazme oogonija. Kod roda *Pythium* svi se organeli, vakuole i višak jezgri pomiču prema periferiji citoplazme, a prema središtu citoplazme migriraju vezikule i

samo jedna jezgra. Dolazi do formiranja dva sloja oogonija. Vanjski sloj (periplazma) nastaje kao rezultat propadanja i koalescencije citoplazmatskog sadržaja koji je migrirao prema periferiji citoplazme za vrijeme razvoja, a unutarnji sloj (ooplazma) se sastoji od jedne jezgre i rezervnih hranidbenih vezikula. Ooplazma ima funkciju jajne stanice (eng. *Ovum*) (Sinha i Vashista, 2007).



Slika 7. Izgled oogonija kod oomiceta roda *Phytium* (Sinha i Vashista, 2007)

Kod oomiceta koji pripadaju redu *Saprolegniales* u kasnijim fazama razvoja oogonija (Slika 7) ne dolazi do migriranja i preraspodjele staničnih organela i jezgri, nego se jezgre mitotički dijele te neke od njih propadaju. Oko preživjelih jezgri se nakuplja citoplazma te se formiraju oosfere, koje kasnijom oplodnjom postaju oospore (Sinha i Vashista, 2007).



Slika 8. Izgled oogonija kod oomiceta roda *Saprolegnia* (Sinha i Vashista, 2007)

Početak oplodnje karakterizira vezanje anteridija na oogonij, pri čemu dolazi do razgradnje vanjskih stijenka spolnih struktura na mjestima kontakta. Fertilizacijska cijev anteridija, kod vrsta iz roda *Phytium*, penetrira kroz vanjski sloj (periplazmu) te uranja u unutrašnji sloj (ooplazmu) oogonija. U unutarnji se sloj ubacuje samo jedna muška jezgra, pri čemu dolazi do fuzije muške i ženske jezgre. Nakon oplodnje dolazi do lučenja raznih molekula iz organela te vanjski sloj oogonija (periplazma) reorganizira. Kada se novi vanjski sloj u potpunosti formirao, dolazi do propadanja i nestajanja periplazme, a novonastala struktura se sad naziva oospora (zigota) (Sinha i Vashista, 2007).

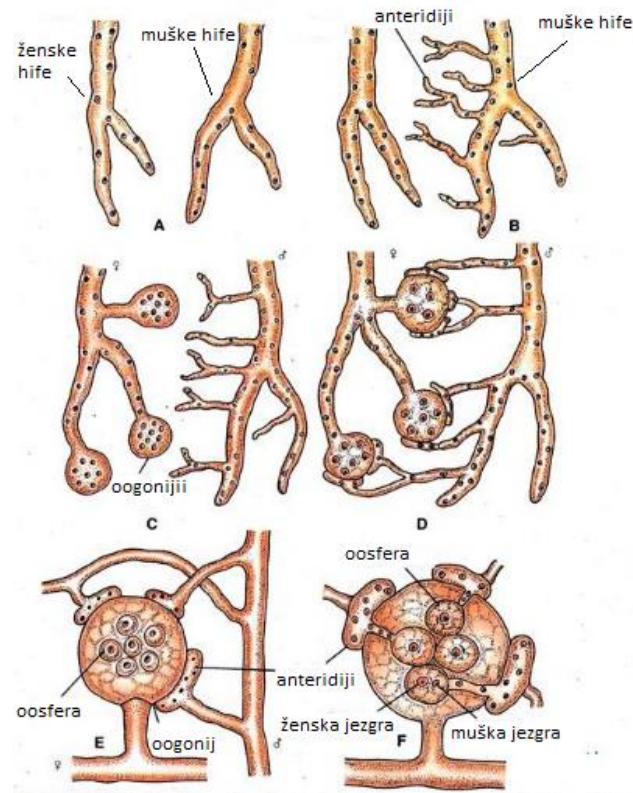
Kod vrsta iz reda *Saprolegniales* iz anteridija nastaje više fertilizacijskih cijevi, od kojih svaka ubacuje po jednu mušku jezgru u jednu oosferu. Pri tome dolazi do fuzije muške i ženske jezgre. Kao posljedica fertilizacije, dolazi do stvaranja debele vanjske stijenke na površini svake oosfere i nastaje struktura koja se naziva oospora (zigota) (Sinha i Vashista, 2007).

Većina vrsta roda *Achlya*, te neke vrste rodova *Leptolegnia*, *Saprolegnia* i *Phytium*, su heterotalične, tj. kod njih dolazi do stvaranja muških odnosno ženskih spolnih struktura na dva različita micelija. To znači da razlikujemo muške i ženske jedinke (Slika 9). Istraživanja su otkrila, da kod heterotaličnih vrsta u fazi spolnog razmnožavanja dolazi do lučenja različitih hormona u okolinu. Hormoni koje luče muške jedinke stimuliraju rast oogonija kod ženskih jedinki, a hormoni koje luče ženske jedinke stimuliraju rast anteridija kod muških jedinki (Sinha i Vashista, 2007).

Tablica 2. Prikaz hormona koje luče heterotalične vrste i njihova funkcija (Sinha i Vashista, 2007)

	Vrsta hormona	Funkcija hormona
hormon A	ženski hormon	inicira početak stvaranja anteridija kod muških jedinki
hormon B	muški hormon	inicira početak stvaranja oogonija kod ženskih jedinki

hormon C	ženski hormon	inicira rast anteridija muških jedinki prema oogonijama ženskih jedinki, te inicira spajanje anteridija i oogonija
hormon D	muški hormon	inicira diferencijaciju oosfera



Slika 9. Faze razvoja spolnih struktura i spolnog razmnožavanja kod heterotalične vrste *Achlya bisexualis*; A – muške i ženske somatske hife; B – hife ženskih jedinka luče hormon A koji inicira razvoj anteridija kod hifa muških jedinka; C – hife muških jedinka luče hormon B koji inicira razvoj oogonija kod hifa ženskih jedinka; D – oogoniji luče hormon C koji inicira rast anteridija prema oogonijima te njihovo spajanje; E – anteridiji luče hormon D koji inicira diferencijaciju oosfera; F – spajanje ženske i muške jezgre unutar oosfera (Sinha i Vashista, 2007)

2.4. Bolesti uzrokovane vrstama iz reda *Peronosporales*

Red *Peronosporales* podijeljen je u tri porodice, koje se na temelju morfoloških karakteristika dijele u 12 rodova i otprilike 325 vrsta. Naseljavaju različite tipove vodenih i kopnenih staništa, a mnoge vrste mogu živjeti kako na kopnu, tako i u vodi. Većina kopnenih vrsta su obligacijski paraziti koji uzrokuju ozbiljne bolesti u važnih gospodarskih biljaka (npr. vinova loza, duhan, luk, cikla, grašak, mnoge kupusovke itd.) te u algi. Ostale vrste su saprofiti, no otkriveno je da neke parazitne vrste mogu živjeti kao saprofiti nakon smrti domaćina (npr. vrste roda *Pythium*). Ekonomski najvažnije fitopatogene oomicete iz reda *Peronosporales* su vrste koje spadaju u rodove *Plasmopara*, *Phytophthora* i *Pythium*. Rod *Plasmopara* uključuje 20 vrsta koje su sve široko rasprostranjeni fitopatogeni, a najpoznatija i najvažnija s ekonomskog stajališta jest *Plasmopara viticola*. To je oomiceta koja napada vinograde vinove loze (*Vitis vinifera*), te uzrokuje bolest koja se naziva peronospora ili plamenjača. Patogene vrste iz roda *Phytophthora* većinom napadaju kritosjemenjače uzrokujući razne bolesti, pr. trulež plodova i palež listova voćaka i povrća, te se one smatraju važnim biotskim čimbenikom odgovornim za smrtnost stabala. Ekonomski najvažnija vrsta je *Phytophthora infestans*, uzročnik plamenjače krumpira, koja osim nadzemnog dijela biljke može zaraziti i gomolje te uzrokovati znatne gubitke kako tijekom vegetacije, tako i tijekom skladištenja (Sinha i Vashista, 2007). U ovom istraživanju identificirano je prisutstvo samo *Pythium* spp. na našim uzorcima, pa će u daljnjem tekstu detaljnije biti opisane najčešće bolesti uzrokovane vrstama iz roda *Pythium*.

Najviše vrste oomiceta iz reda *Peronosporales* spadaju u rod *Pythium*. Oni žive u vodi, ali vrlo lako se mogu prilagoditi na kopno, gdje su pretežito stanovnici tla u kojem se održavaju kao saprofiti na biljnim ostacima. Međutim, prelaskom na parazitski način života sposobni su napasti mnogo različitih vrsta biljaka uzrokujući siptome poput polijeganja nasada lisnatog povrća, trulež korijenova vrata mnogih biljaka poput papaje, đumbira, duhana, te uzrokuju trulež gomolja krumpira. Infekcija gomolja krumpira najčešće se odvija kroz ozljede nastale tijekom vađenja krumpira. Razvoju bolesti pogoduju temperature više od 25 °C i pri tome zaraženi gomolji instrunu u skladištu za nekoliko dana. Simptomi bolesti javljaju se ubrzo nakon skladištenja, međutim često nisu vidljivi na pokožici. Zaraženo tkivo u unutrašnjosti gomolja jasno je odvojeno od zdravog tkiva tamnijom linijom, vodenasto je, svijetlo žute do smeđe boje. Vodenasti eskudat oslobađa se prilikom oštećenja pokožice zaraženoga gomolja te se tako

infekcija širi na okolne gomolje. Vanjski simptomi mogu se pojaviti kao sivo do smeđe obojenje pokožice. Simptomi bolesti mogu se zamijeniti s fiziološkim oštećenjem gomolja kao što je “crno srce”, međutim razlika je u pojavi vodenastog eskudata u infekciji s *Pythium* spp. (Sever i Miličević, 2013).

Vrste roda *Pythium* parazitiraju biljke u zoni korijenova vrata i to vrlo brzo, pa u 24 sata može poleći čitav nasad. One napadaju mjesto pri kojem biljka izlazi iz tla, javlja se vodenast izgled, a zatim se na tim mjestima biljka prelama. Bolesne biljke poliježu te se na njima javlja bijeličasti micelij koji se širi i po površini tla/supstrata. Starije biljke slabije oboljevaju i na njima se mogu naći pjege na stabljici, zaostaju u rastu i javlja se venuće. Na slici 10 prikazano je korijenje koje truli kao posljedica infekcije s *Pythium* spp. (Cvjetković i sur., 2016).

Za spriječavanje razvitka bolesti sjeme se prije uzgoja tretira zaštitnim sredstvom na bazi bakrovog oksiklorida ili tiuram disulfida. Posljedica nanošenja zaštitnog sredstva je stvaranje vanjskog sloja na sjemenci. Kako su količina vlage u tlu, vlažnost zraka i pretjerano gomilanje sadnica glavni faktori širenja bolesti, potrebno se pridržavati navedenih sanitarnih mjera: (i) izbjegavanje guste sjetve; (ii) odgovarajuće izlaganje zraku i svjetlosti gređica za sadnju; (iii) održavanje optimalne količine vlage u zemlji za sadn; (iv) dezinfekcija zemlje za sadnju; (v) korištenje fungicida na osnovi metalaksila ili propamokarbata; (vi) korištenje izolata gljive *Trichoderma harzianum* (Cvjetković i sur., 2016; Sinha i Vashista, 2007)



Slika 10. Trulo korijenje duhana (*Nicotiana tabacum*) kao posljedica infekcije *Pythium* spp.

(Izvor: <https://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1233225>)

Bolesti koje uzrokuju oomycete iz roda *Pythium* sveprisutne su i često destruktivne za razne biljke koje se proizvode na poljima ili u vrtovima za potrebe domaćinstva ili u masovnoj proizvodnji koja se vrši u zaštićenim prostorima (staklenicima). U Kanadi i Nizozemskoj bolesti korijenja uzrokovane *Pythium* spp. velika su prijetnja poljoprivrednicima koji proizvode krizanteme, tulipane i ostalo ukrasno cvijeće za izvoz, pa pravovremena prevencija omogućava povećanje prihoda. Ovakve bolesti su potencijalna prijetnja u proizvodnji biljaka na izvanzemaljskim postrojenjima u budućim svemirskim misijama. Doista, znanstvenici su uspjeli izolirati *Pythium* spp. s biljaka uzgojenih u svemirskim laboratorijima u orbiti oko Zemlje. Pojava ovakvih bolesti na biljkama zabilježena je na svim kontinentima na Zemlji (Sutton i sur., 2006).

Zadnjih 20 godina najveće štete uzrokovane ovakvim bolestima zabilježene su u Africi. U Keniji i Ruandi mnogi su uzgajivači prestali uzgajati mahunarke u razdoblju od 1991. do 1993. godine

zbog najezde oomicetama uzrokovane bolesti, što je izazvalo masovnu glad ljudi pošto su u tim zemljama mahunarke glavni izvor hrane (Nzungize i sur., 2012). U Hrvatskoj su zabilježeni slučajevi propadanja velikog broja biljaka. Pagliarini (2005) opisuje jake napade šampinjonskih mušica na vrat korijena paprika u hidroponskom uzgoju u srednjoj Dalmaciji i navodi šampinjonske mušice kao moguće vektore oomiceta *Pythium* spp. U razdoblju od 2006. do 2008. na području srednje Dalmacije u hidroponskom uzgoju utvrđeni su na korijenu rajčice *Phytophthora parasitica* i *Pythium* spp. (Cvjetkovic i sur., 2006).

2.5. Bolesti uzrokovane vrstama iz reda *Saprolegniales*

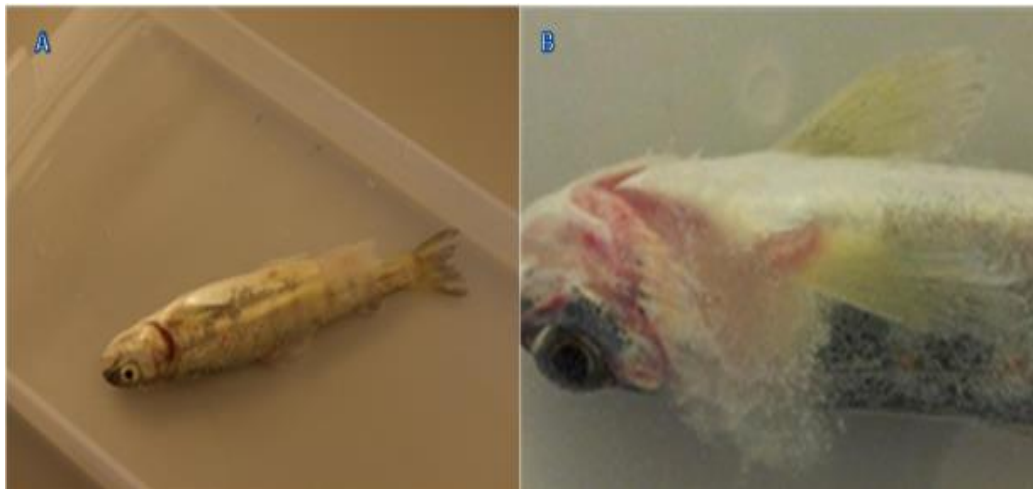
Oomiceti koji spadaju u red *Saprolegniales* preživljavaju kako na kopnu, tako i u vodi. Većinom su saprofitski mikroorganizmi, međutim neke su vrste patogeni biljaka i životinja pritom uzrokujući velik broj bolesti u prirodi, agrokulturi i akvakulturi (Sandoval-Sierra i sur., 2014). Najviše ih se može izolirati i identificirati u slatkovodnim vodama na proteinima bogatim supstratima kao što su riblja jaja, tijela mrtvih insekata, riba i drugih životinja (Sinha i Vashista, 2007).

2.5.1. Bolesti koje uzrokuju vrste oomiceta iz roda *Saprolegnia*, *Achlya*, *Leptolegnia*

Saprolegnioze su kronične do subakutne bolesti kože, škrge i ikre slatkovodnih riba prouzročene svuda prisutnim vodenim plijesnima iz roda *Saprolegnia*, *Achlya*, *Leptolegnia* (Densmore i Green, 2007). Česti domaćini koje oomiceti iz roda *Saprolegnia* napadaju su ribe koje iz porodice *Salmonidae*, kao što su: Atlantski losos (*Salmo salar*), kalifornijska pastrva (*Oncorhynchus mykiss*), potočna pastrva (*Salmo trutta*) te njihova jaja. Iako su saprolegnioze sekundarne infekcije, one nanose značajne štete te ih je potrebno spriječiti. Prijemljivosti riba za ove bolesti pogoduju vanjski čimbenici kao što je snižavanje temperature vode (temperaturni stres), mehaničke ozljede kože zbog nesavjesnog i nepažljivog rukovanja s ribom u intenzivnom uzgoju, loša kvaliteta vode zbog onečišćenja organskom tvari, prenaseljenost, transport, umjetno mriještenje. Također, u doba mrijesta se smanjuje imunološka otpornost riba uslijed utjecaja hormona. Vrste riba čija koža izlučuje više sluzi otpornije su prema infekciji. Pojavi bolesti pogoduju i greške u hranidbi, postojanje drugih nametničkih bolesti kože i škrge, niska razina

oplođenosti jaja i dr. U otvorenim vodama ove su bolesti češće nakon ozljeda tijekom prirodnog mriještenja, naročito kod potočne pastrve. Tijekom inkubiranja ikre u prirodi i u valionicama oomicete se prvo nasele i umnažaju na neoplođenim ili oštećenim jajima, te brzo šire na zdrava jaja čime mogu kompletno uništiti oplođenu ikru (Bruno i sur., 2010; Fijan, 2006).

Bolest koja zahvati kožu odraslih jediniki je lako uočljiva i prepoznatljiva. Oomicete se nasele i umnažaju na oštećenoj koži i škrgama. Infekcija može započeti na bilo kojem dijelu tijela. Zahvaćeno područje kože prekriveno je naslagom uzročnika koji izgleda poput vate sivo bijele boje (slika 11). Širenjem infekcije uzročnik može prekriti gotovo cijelo tijelo i riba ugine. Ikra zahvaćena saprolegniozom okružena je bijelim hifama (slika 12) i ugine. Sraštavanjem micelija nastaju bijeli grumeni nalik plijesni (Songe 2007; Fijan, 2006).



Slika 11. Atlantski losos zaražen sa *Saprolegnia parasitica* (Songe, 2007)



Slika 12. Ikra zaražena saprolegniozom (Songe, 2007)

Bolesti se sprječava provođenjem tehnoloških mjera dobre proizvođačke prakse u ribogojilištima, održavanjem visoke kvalitete vode, izbjegavanjem mehaničkog ozljeđivanja riba, naročito u uvjetima niskih temperatura kad je zaraštavanje rana usporeno, a umnažanje uzročnika bolesti ubrzano. Nekad je u valionicama za pastrvske ribe neoplođenu i oboljelu ikru trebalo odstranjivati ručno iz inkubatora, a ta je metoda i danas prihvatljiva ako je postotak oplodnje vrlo visok, kakvoća vode povoljna, te ako valionica koristi vodoravne ležnice s rijetkim smještanjem ikre. Pri inkubiranju ikre, primjenjivale su se kupke sa malahitnim zelenilom za sprječavanje saprolegnioza ikre te liječenje odraslih riba. Istodobno se razvijala i spoznaja o posljedicama masovnog korištenja kemijskih sredstava i fungicida na zdravlje živih organizama i nepovoljan utjecaj na okoliš, te se razvijaju nove alternativne metode u kontroli saprolegnioze s ciljem smanjivanja ekonomskih gubitaka u ribogojilištima. U 2002. godini odobren je lijek na bazi bronopola za liječenje saprolegnioza, pa ga valja koristiti (Fijan, 2006).

Bolesti koje prouzrokuju gljive i oomiceti teško je spriječiti i liječiti, posebno u ribogojilištima, te su one uz bakterijske bolesti druge po ekonomskoj važnosti za akvakulturu. Izbijanje kroničnih saprolegnioza u ribogojilištima počelo je tek nakon što se zabranila uporaba malahitnog zelenila (Torto-Alalibo i sur., 2005). Tijekom žestokih zima, neki su uzgajivači riba u SAD prijavili gubitke od 50% kod uzgoja soma s ekonomskim troškovima od oko 40 milijuna dolara, a kao glavni uzročnik se navode saprolegnioze. U Japanu, godišnji gubici od 50% u uzgoju coho lososa (*Oncorhynchus kisutch*), pripisuju se bolestima uzrokovanih oomicetom *S. parasitica* (Bruno i sur., 2010). Nadalje, smatra se da vrste iz roda *Saprolegnia* u Španjolskoj

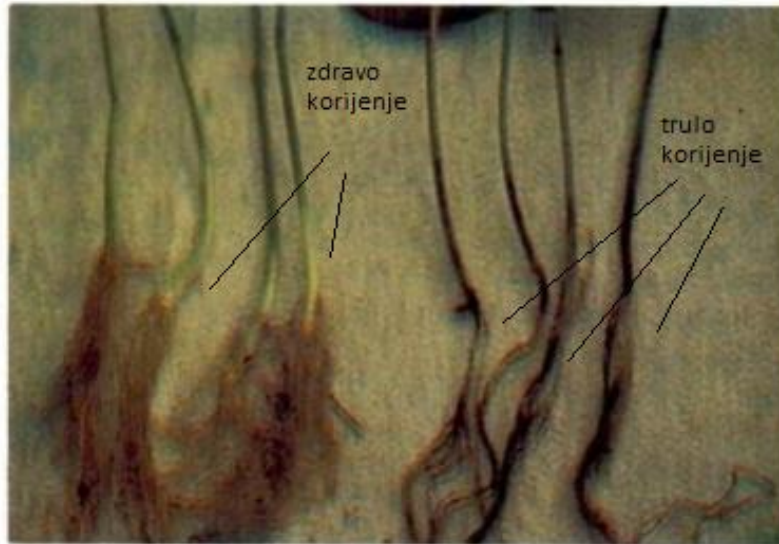
uzrokuju prosječno 10% ukupnih ekonomskih gubitaka u slatkovodnoj akvakulturi, a ponekad i do 50% ukupnih godišnjih gubitaka u uzgajalištima (Sandoval-Sierra i sur., 2014).

Prema podacima Europske udruge proizvođača u akvakulturi (FEAP) za 2019., ukupna proizvodnja šarana i pastrva u Republici Hrvatskoj tijekom posljednjih godina doživljava značajan pad u proizvodnji s 2,752 tona na 395 tona za pastrve i s 3,201 tona na 2,039 tona za obične šarane. Ovakvo stanje u proizvodnji posljedica je brojnih i raznovrsnih čimbenika. Među njima svakako treba istaknuti bolesti poput saprolegnioze (Fijan, 2006.).

2.5.2. Bolesti uzrokovane oomicetama iz roda *Aphanomyces*

Rod *Aphanomyces* čini 45 vrsta koje su većina paraziti te uzrokuju bolesti životinja (riba, kornjača ili rakova), dok je samo nekolicina vrsta patogena za biljke (Gaulin i sur., 2007).

Najistraživaniji biljni patogen je *A. euteiches* koji uzrokuje trulež korijena različitih vrsta mahunarki (slika 13). Mnogi simptomi truleža korijena su identični onima koje uzrokuju vrste iz roda *Phytium*. Početni simptomi bolesti se mogu vidjeti na korijenu koji dobiva vodenasti izgled te se na površini javljaju svijetlo žute lezije koje se šire na kortikalno tkivo, te se nakon nekog vremena javlja crno-smeđa trulež. Kod nekih se biljka mogu naći pjege na stabljici, one zaostaju u rastu i nakon nekog vremena dođe do venuća. Razvoj bolesti posljedica je germinacije zoospora ili oospora u vlažnim zemljištima pri temperaturama između 24 i 28 °C (Holub i sur., 1991). Najdjelotvorniji načini sprječavanja nastanka bolesti su: (1) sijanje kultivara koji su pokazali rezistentnost; (2) drenaža tla; (3) korištenje fungicida na bazi metalaksila; (4) korištenje herbicida koji u svom sastavu sadrže pendimetalin i trifluralin (Hughes i Grau., 2007).



Slika 13. Trulež korijenja uzrokovano *A. euteiches* na grahu (Holub i sur., 1991)

Rod *Aphanomyces* obuhvaća neke od najštetnijih životinjskih parazita. Među najopasnijim animalnim patogenima su vrsta *A. astaci* koja uzrokuje račju kugu i uvrštena je u sto najinvazivnijih vrsta, te *A. invadans* odgovorna za neke od najgorih zaraza u slatkovodnim i estuarijskim ribljim populacijama uzrokujući epizootski ulcerativni sindrom (Huang i Söderhäll, 1994). Vrsta *A. astaci* je obligatni animalni parazit koji napada ribe, rakove i školjke te ima zabilježenu samo nespolnu fazu. Najvažniji trenutak nespolnog ciklusa je proizvodnja sekundarnih zoospora koje imaju ulogu u prenošenju zaraze. Najveću podložnost zarazi pokazale su europske autohtone vrste riječnih rakova kao što su *Astacus astacus* i *A. pallipes*, a najmanju podložnost obolijevanju uslijed kontakta s patogenim zoosporama pokazuju sjevernoameričke vrste rakova (Oidtmann i sur., 2004). Mehanizam obrane sjevernoameričkih rakova se temelji na konstitutivnoj sintezi proenzima profenoloksidaze (proPO) koji se aktivira u ranim fazama zaraze, te nastaje feniloksidaza. To je enzim koji sudjeluje u sintezi slojeva melanina koji imaju inhibirajući učinak na *A. astaci* (Söderhäll i Cerenius, 1998). Širenje račje kuge je posljedica antropogenih čimbenika, a bolest se širi i kontaktom između rakova, kontaminiranom vodom i putem životinja koje se hrane ili su bile u kontaktu s zaraženom jedinkom. Razvoj i stopa širenja infekcije ovisi o različitim faktorima, a najviše o temperaturi. U rasponu temperature vode od 4 do 16 °C uočeno je najbrže širenje zaraze. Jednom kad dođe do pojave bolesti ona se ne može spontano izliječiti. Stoga je potrebno izbjeći širenje, a za to je potrebno: (1) spriječiti premještanje potencijalno zaraženih živih ili mrtvih rakova, kontaminirane vode ili opreme koja

može prenjeti patogen na mjesta bez infestacije; (2) izbjegavati premještanje riba s mjesta infestacije s *A. astaci* jer to predstavlja visok rizik od širenja infekcije; (3) provesti procjenu rizika i sigurnosti u objektima za uzgoj rakova i drugih organizama (Oidtmann i sur., 2004).

2.6. Metode izolacije i uzgoja izolata oomiceta

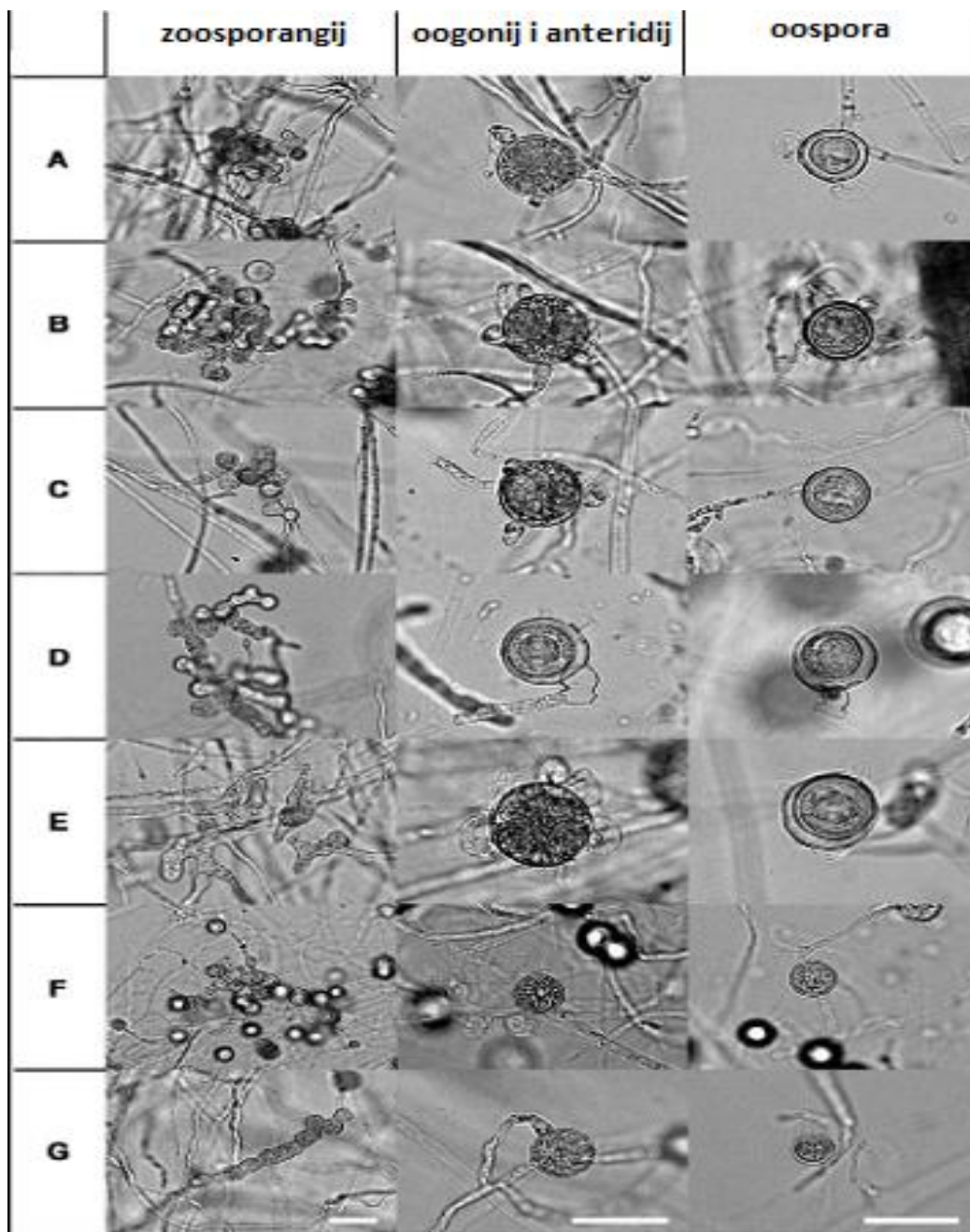
Jedna od težih zadaća, tijekom istraživanja oomiceta, znanstvenicima predstavlja izolacija organizama i dobivanje čistih kultura. Mnogo oomiceta koje su životinjski patogeni izazivaju infekcije koje zahvaćaju dermis pa je stoga moguće u isto vrijeme iz lezija izolirati različite vrste. Ako uzimamo uzorke sa lezija, prisutne mogu biti mnoge saprofitske vrste i njihov rast na hranjivoj podlozi može biti brz uzrokujući teško prepoznavanje primarnih patogena, tj. vrste od interesa. Početni korak u izolaciji je uzimanje malog dijela zaraženog tkiva (otprilike 5 mm³) te se preporučuje uzimanje dubokog tkiva ispod površine dermisa, jer se na taj način smanjuje mogućnost kontaminacije s bakterijama i raznim oportunistima. Sva uzeta tkiva iz kojih se vrši izolacija, prije nego što se stave na hranjivu podlogu, zahtijevaju predtretman pomoću kojeg se uklanjaju sekundarni patogeni. Neke metode predtretmana su: (1) sterilizacija površine tkiva uranjanjem u etanol; (2) izlaganje ionizirajućem zračenju; (3) pranje površine tkiva pomoću sterilne vode. Da bi dobili čistu kulturu, potrebno je provesti izolaciju iz jedne spore ili vrhova hifa od inicijalne kulture. Nadalje, dobiveni izolati čiste kulture trebali bi se podvrgnuti eksperimentu u kojem bi se dokazalo njihov patogeni učinak na zdravom tkivu domaćina koje je služilo za izolaciju. U praksi se, međutim, taj postupak provjere izolacije čiste kulture rijetko koristi. Danas se koriste različiti mediji za izolaciju i rast kultura oomiceta i gljiva sa zaraženih ribljih ili biljnih tkiva te se u njihov sastav gotovo uvijek dodaju antibiotici kako bi se spriječila kontaminacija bakterijama. Međutim, postoje oomiceti koji su osjetljivi na antibiotike, npr. *Aphanomyces astaci* ili *A. invadans*. Penicilin i streptomycin su najčešće korišteni antibiotici u hranjivim podlogama za izolaciju i rast oomiceta te se dodaju u koncentraciji od 150 – 1000 IU ml⁻¹, odnosno 250 – 1000 mg ml⁻¹, a u manjoj mjeri se još koriste i drugi antimikrobni agensi kao što su: karbenicilin, kloramfenikol, neomicin, gentamicin i dr. Ploče s agarom inokuliraju se dijelovima zaraženog tkiva, te se one najčešće inkubiraju pri temperaturama između 10 i 20 °C. Tijekom inkubacije, ploče se promatraju u određenim vremenskim intervalima kako bi se pratio rast hifa. Dio hifa se izreže iz hranjive podloge, te se prebaci u novu hranjivu podlogu s agarom

kako bi se izolirala čista kultura oomiceta (Bruno i sur., 2012). Alderman (1982) za što manju kontaminaciju kulture bakterijama u svojem radu predlaže da se koriste hranjivi mediji s niskom koncentracijom glavnih sastojaka potrebnih za rast u koje se dodaju antibiotici i mali volumen svježje ili morske vode, kako bi se stvorio sloj vode iznad agara. Kod uzgoja morskih vrsta u medij se dodaje još i sol, najčešće u koncentraciji od 3% ili se koristi sterilna morska voda (Hatai i sur., 2000). Najmodernija alternativna metoda se temelji na inkubaciji zaraženog tkiva, uzorka tla ili vode sa sjemenkama konoplje. Da bi se dobile čiste culture, nastale kolonije oomiceta na sjemenkama se prebace u sterilnu vodu ili svježju hranjivu podlogu. Ova je metoda najbolja za izolaciju i uzgoj oomiceta iz roda *Saprolegnia* (Bruno i sur., 2012).

2.7. Identifikacija oomicetnih vrsta

Tradicionalne metode identifikacije vrsta unutar rodova oomiceta uveliko se oslanjaju na morfološke i sporulacijske karakteristike koje se javljaju za vrijeme nespolnog i/ili spolnog razmnožavanja (slika 14) (Schroder i sur., 2013).

Metode identifikacije se temelje na određivanju načina otpuštanja zoospora iz sporangija, obliku sporangija i morfološkim razlikama između oospora, anteridija i oogonija u veličini, obliku i broju spora. Budući da su te morfološke karakteristike jako varijabilne unutar vrste ili jako slične kod različitih vrsta, te postoje dokazi da kod nekih sojeva spontano dolazi do gubitka mogućnosti spolnog razmnožavanja ili često nije moguće inicirati spolno razmnožavanje u *in vitro* uvjetima, znanstvenici sve više zaobilaze tradicionalan način identifikacije, te se okreću korištenju modernijih metoda (Bruno i sur., 2012).

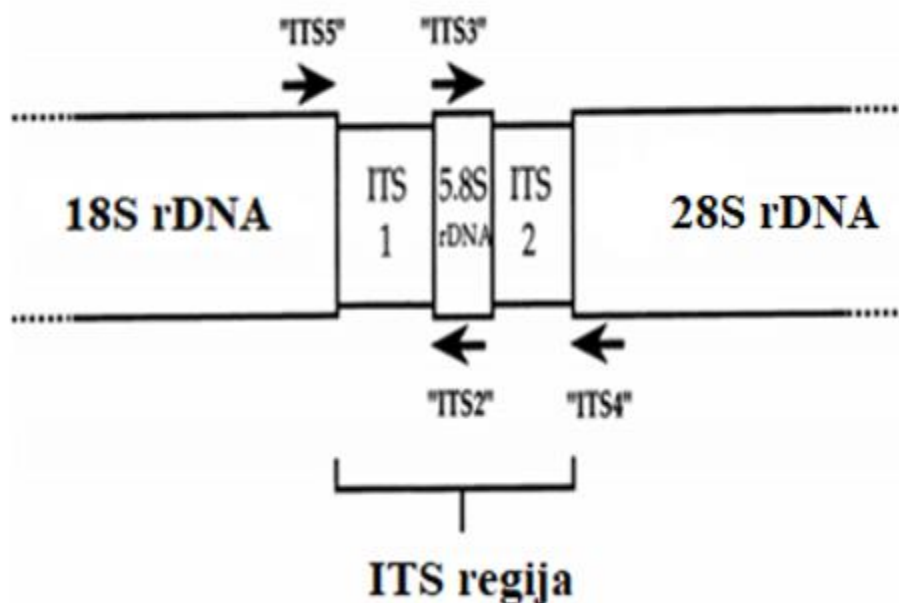


Slika 14. Prikaz morfoloških razlika između nekoliko vrsta unutar roda *Phytium*. Prikazani su zoosporangiji, anteridiji i oogoniji te oospore. Oznake se odnose na: *P. graminicola* (A), *P. arrhenomanes* (B, C), *P. aphanidermatum* (D), *P. myriotylum* (E), *P. torulosum* (F) i *P. vanterpoolii* (G) (Kageyama i sur., 2003)

Sposobnost određivanja slijeda nukleotida u genomskoj DNA revolucionirala je većinu područja suvremenih biomedicinskih istraživanja te se ostvario velik napredak u razumijevanju genetike mikroorganizama patogenih za ribe, školjke i rakove. DNA i RNA molekule koriste se za klasifikaciju i identifikaciju mikroorganizama već dugi niz godina (Altinok i Kurt, 2003). Geni koji kodiraju za rRNA pronađeni su u svim eukariotskim i prokariotskim mikroorganizmima te je za njih znano da su kroz evoluciju nakupili mali broj mutacija i relativno su očuvani u odnosu na druge gene. Ta pretpostavka pruža molekularnu osnovu za većinu filogenetičkih istraživanja koja se temelje na sekvenciranju dijelova gena za rRNA. Nekodirajuće regije, koje razdvajaju kodirajuće rRNA gene, nakupljaju mutacije s većom učestalošću nego rRNA geni, pa se one koriste za taksonomsko određivanje mikroorganizama unutar rodova i vrsta. Organizacija rRNA genskog kompleksa kod gljiva i oomiceta uključuje: kodirajuće očuvane 18S rRNA, 5,8S rRNA, 28S rRNA gene i ITS (eng. *Internal Transcribed Spacer*) regiju (Iwen i sur., 2002). ITS regija se nalazi između gena za 18S i 28S rRNA. U ovu regiju su također uključene i razmaknice ITS-1 i ITS-2 (slika 15). Zbog nakupljanja mutacija kroz evoluciju, ITS-1 i ITS-2 razmaknice pokazuju raznolikost u slijedu nukleotida među glavnim eukariotskim skupinama mikroorganizama, pa čak i unutar vrsta iste skupine. ITS regija je dio transkripcijske jedinice nrDNA, ali se razmaknice kao dio transkripta izrezuju za vrijeme post-translacijskih modifikacija prije transporta u citoplazmu. Analizom *in vivo* mutacija u kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*) utvrđeno je da delecija dijela ITS-1 razmaknice može inhibirati proizvodnju male i velike podjedinice ribosoma, što utječe na sintezu proteina u stanici (Musters i sur. 1990), dok određene delecije i točkaste mutacije na ITS-2 razmaknici sprečavaju ili inhibiraju pravilnu sintezu 5,8S i 28S rRNA molekula te se uspostavilo da ITS-2 razmaknica ima ulogu u staničnom osiguranju da se samo funkcionalne rRNA molekule ugrade u sastav ribosoma. Iako su ITS regije nekodirajuće, one se ne smatraju intronima, nego pseudointronima zbog njihove uloge u ekspresiji gena i proizvodnji proteina u stanici (Iwen i sur., 2002).

Kao što je već rečeno, ITS (ITS-1, 5,8 S i ITS-2) je jako često korištena regija DNA za filogenetička i klasifikacijska istraživanja zbog varijabilnosti na nižim taksonomskih razinama. Najbitnije karakteristike ITS lokusa u filogenetičkim analizama su: biparentalno nasljeđivanje, univerzalnost početnica (White i sur., 1990), jednostavnost umnožavanja (postojanje stotine ITS regija unutar jezgrinog genoma), intergenska uniformnost (posljedica usklađene evolucije) i intergenomska varijabilnost (Baldwin i sur., 1995). Iako se identifikacija na temelju određivanja

slijeda nukleotida ITS regije i usporedbe s bazom podataka pokazala kao dobra i robusna metoda za identifikaciju oomiceta, ona se ponekad pokazala i dosta problematičnom za filogenetičke analize jer je utvrđeno kako je u bazama podataka prisutan velik broj pogrešno klasificiranih nukleotidnih slijedova što može dovesti do daljnjih grešaka. ITS slijedovi mogu dosta varirati unutar soja zbog polimorfizama koji se javljaju unutar visoko ponovljenih regija. Ujedno je dokazano da pojava polimorfizama unutar ITS regija kod različitih vrsta uzrokuje smetnje i loše vrhove očitavanja na elektroferogramu prilikom Sanger sekvenciranja (Schroeder i sur., 2013). U svrhu navedenog danas se koriste i mnogo brže evoluirajuće regije DNA, poput regije koja kodira za podjedinicu 1 citokrom c oksidaze (cox1) i regije za podjedinicu 2 citokrom c oksidaze (cox2) (Beakes i sur., 2012).



Slika 15. Prikaz ITS regije. “ITS5” i “ITS4” te “ITS3” i “ITS2” su PCR početnice za umnožavanje različitih dijelova ITS regije (Denona, 2011)

Postoje različite molekularne tehnike koje se koriste ITS regijama primarno za identifikaciju velikog broja različitih mikroorganizama, ali i za druga istraživanja. Neke od metoda su: analiza nasumično umnožene polimorfne DNA, RAPD (eng. *Random Amplified Polymorphic DNA*) u kombinaciji s lančanom reakcijom polimeraze, PCR (eng. *Polymerase Chain Reaction*), analiza polimorfizama u duljini restrikcijskih fragmenata, RFLP (eng. *Restriction Fragment Length Polymorphism*), restrikcijska analiza rDNA genskog kompleksa, fluorescencijska hibridizacija *in*

situ, FISH (eng. *Fluorescence In Situ Hybridization*), masena spektrometrija i sekvenciranje ITS regije što je metoda koja se koristila u ovom diplomskom radu, a temelji se na umnožavanju ITS regije iz izolirane DNA i određivanju njenog slijeda nukleotida itd. Identifikacijski postupak određenih organizama temelji se prvenstveno na dva koraka: (1) određivanje slijeda nukleotida specifičnih regija koje su djelovi rDNA genskog kompleksa; (2) uspoređivanje dobivenog slijeda nukleotida s poznatim slijedovima u nukleotidnim bazama podataka (Iwen i sur., 2002.). Prilikom ovakvog načina identifikacije vrlo je važno: (i) e-vrijednost, koja se dobiva nakon BLAST analize, označava podudarnost analiziranog slijeda sa referentnim slijedom iz baze podataka bazirano na homologiji i duljini slijedova nukleotida; (ii) koristiti se referentnim slijedovima čija je ispravnost potvrđena (Schroeder, 2013; Bruno i sur., 2012).

2.8. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom, PCR je tehnika koja se temelji na otkrivanju i umnožavanju specifičnih DNA odnosno RNA slijedova. Ova tehnika primjenu nalazi u forenzici, populacijskoj genetici, evolucijskoj biologiji, bioinženjerstvu, pa i u akvakulturi, gdje se pomoću PCR metode može dijagnosticirati niz virusnih, bakterijskih i parazitarnih bolesti riba, školjaka i rakova. Glavne prednosti ove tehnike su visoka osjetljivost i stroga specifičnost, kratko vrijeme za analizu i dobivanje rezultata te repetabilnost (Strunjak-Perović i Topić Popović, 1999). PCR metoda se temelji na umnožavanju jednog ili više slijedova nukleotida koji su specifični za određeni soj, vrstu, rod ili porodicu patogenog organizma (bakterija, virus, oomiceta itd.) (Innis i sur., 1988). Ukratko, slijed nukleotida koji želimo umnožiti određuje se s pomoću početnica tzv. "primera". Početnice su DNA fragmenti sastavljeni od oko 20 nukleotida čiji je redoslijed specifičan i komplementaran određenom slijedu nukleotida DNA ciljnog organizma, uzročnika bolesti. PCR je ciklički postupak (slika 16) koji započinje denaturacijom nukleinskih kiselina ispitivanog uzorka zbog djelovanja topline pri temperaturi od 94 do 97 °C. Zatim se smjesa ohladi kako bi se početnice mogle vezati za sebi komplementarne slijedove, te ponovo zagrije kako bi se željeni slijed nukleotida enzimski umnožio. Ta zadnja faza, faza umnožavanja ili amplifikacije, katalizirana je enzimom DNA polimerazom. Ponavljanjem ciklusa zagrijavanja i hlađenja, umnaža se željeni slijed nukleotida. Broj ciklusa, dužina primjene i vrijednosti temperature pojedinih koraka te njihovo trajanje tijekom procesa određuju se ovisno o: veličini slijeda koji se umnaža, količini i sastavu DNA kalupa, sastavu reakcijske smjese i DNA

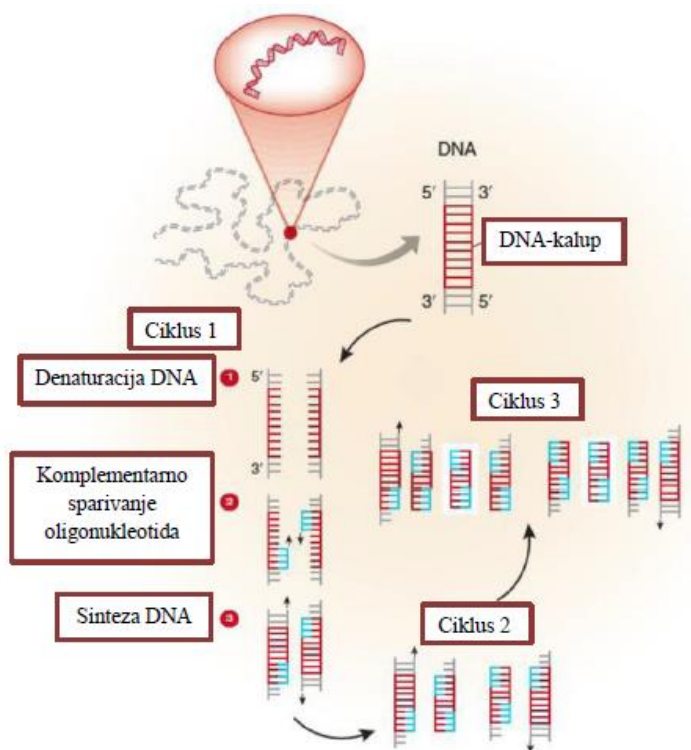
polimerazi koja se koristi. Postoje različite vrste prilagodbe PCR metode, npr. nested PCR, hot start PCR, PCR uz reverznu transkripciju, kvantitativni PCR, multiplex PCR itd. (S. Rajalakshmi, 2017). Od tih prilagodbi, u ovom radu koristilo se Hot Start PCR metodom. Nakon umnožavanja potrebno je analizirati PCR produkte, a najčešća metoda analize je elektroforeza na gelu. Elektroforeza se primjenjuje za odvajanje DNA segmenata umnoženih s pomoću PCR ili izoliranih iz staničnog materijala veličine od 100 pb do 25 000 pb. Tijekom elektroforeze dolazi do odvajanja ioniziranih molekula prolaskom kroz gel u električnom polju. Budući da je DNA negativno nabijena, molekule putuju od negativno električno nabijene katode prema pozitivno nabijenoj anodi različitom brzinom, ovisno o svojoj veličini, obliku, naboju i svojstvima gela. Na pokretljivost DNA molekula još utječu i sastav pufera za elektroforezu, prisutnost interkalirajućih boja te jakost i smjer električnog polja. Na taj se način u gelu, iz reakcijske smjese koja se sastoji od umnoženog ciljanog slijeda i DNA kalupa, čija je koncentracija višestruko manja, izdvoji traženi umnoženi slijed nukleotida od DNA kalupa (rijetko se vidi u gelu) u obliku različitih vrpca. Slijedi vizualiziranje vrpca, a najčešći način vizualizacije je pomoću interkalirajućih boja koje fluoresciraju pod UV svjetlom, a može se koristiti i npr. bojanje srebrom ili hibridizacija s označenom probom, te na kraju usporedba rezultata prema standardima. DNA standardi su specifični DNA segmenti točno određene veličine, koji se koriste za određivanje veličine dobivenih vrpca u gelu (Strunjak-Perović i Topić Popović, 1999; Innis i sur., 1988)

2.8.1. Hot Start PCR

To je PCR metoda koja se koristi za smanjenje mogućnosti nastajanja nespecifičnih produkata umnažanja. Kao početni korak u procesu koristi se korak početnog zagrijavanja na 94 do 98 °C, što ili aktivira posebno prilagođenu DNA polimerazu inaktivnu do početnog zagrijavanja ili se DNA polimeraza dodaje nakon tog početnog koraka. Ovakav PCR se koristi zbog mogućnosti nespecifičnog sparivanja početnica pri nižim temperaturama, bilo međusobno ili s DNA kalupom koji ne nosi ciljni slijed kojeg želimo umnožiti. Budući da su takvi kompleksi također supstrati za DNA polimerazu, oni se nakon amplifikacije također pojavljuju kao produkti, ali to su neželjeni produkti reakcije čija pojava smanjuje prinos ili otežava vizualizaciju i izolaciju ciljnog PCR produkta (Paul i sur., 2010).

2.8.2. Oligonukleotidne početnice za PCR

Za uspješnu amplifikaciju određenog slijeda nukleotida metodom lančane reakcije polimerazom potrebno je prethodno odabrati početnice koje se dizajniraju prema slijedovima koji omeđuju traženi slijed DNA. Početnice su kratki oligonukleotidni fragmenti koji omogućuju DNA polimerazi da započne sintezu novog lanca. Duljine su između 18 i 25 pb s udjelom G i C nukleotida 45 – 55 %. Uz svaku početnicu navedena je njezina T_m – vrijednost (eng. *melting temperature*). To je temperatura pri kojoj je 50 % početnice vezano uz komplementarni lanac DNA kalupa, dok je drugih 50 % u jednolančanom obliku. Na T_m vrijednost utječu: (i) dužina oligonukleotida – što je oligonukleotid duži, to mu je T_m vrijednost viša; (ii) udio GC parova baza – što je veći udio GC parova to je T_m vrijednost oligonukleotida viša. Predviđanje T_m vrijednosti je bitno radi određivanja optimalne temperature sparivanja početnica s DNA kalupom T_a (eng. *annealing temperature*). Temperatura sparivanja treba iznositi između 50 i 65 °C te biti manja za 5 °C od vrijednosti T_m (Dieffenbach i sur., 1993).



Slika 16. Shematski prikaz PCR reakcije (Vujović, 2019)

2.9. Primjena PCR metode u akvakulturi

U akvakulturi, metoda lančane reakcije polimerazom korisno je sredstvo za dijagnosticiranje i kontrolu različitih bolesti. Ona omogućuje brzu, široko raspostranjenu i osjetljivu detekciju virusa, bakterija i drugih patogenih mikroorganizama. Analize se mogu primjeniti na uzorcima krvi, fecesa, zaraženih dijelova tijela oboljelih životinja i drugim tipovima bioloških uzoraka (L. de la Pena, 2002).

U odnosu na klasične relativno dugotrajne mikrobiološke tehnike dijagnosticiranja bakterijskih bolesti, koje uključuju izolaciju i uzgoj na hranjivoj podlozi te identifikaciju biokemijskim testovima ili mikroskopom, PCR predstavlja bržu i osjetljiviju alternativu (Strunjak-Perović i Topić Popović, 1999). Budući da se ovom metodom mogu otkriti vrste bakterija koje se teško izoliraju i uzgajaju, Leon i sur. (1994) razvili su test koji se temelji na lančanoj reakciji umnažanja polimerazom nukleotidnog slijeda dugog 149 parova baza specifičnog za teško uzgojivu bakteriju *Renibacterium salmoninarum* uzročnika bolesti bubrega kod lososa u uzorcima tkiva zaraženih bakterijom (Bruno i sur., 2012). Umnažanjem jednog dijela očuvanog 16S rRNA nukleotidneog slijeda bakterija, duljine 924 parova baza, te restrikcijom dobivenih fragmenata pomoću enzima BamI i ApaI, Talaat i sur., (2004) su uspjeli razviti metodu za dijagnosticiranje mikobakterija *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium fortuitum* i *Mycobacterium chelonae* koje su patogeni za određene vrste riba (Karunasagar i sur., 2016). *Mycobacterium sp.* smatraju se jednim od najsmrtonosnijih mikroorganizama jer uzrokuju masovna uginuća riba u uzgajalištima diljem svijeta. Akutne mikobakterioze uzrokuju stvaranje granuloma u različitim organima, što uzrokuje smrt riba unutar nekih 16 dana, dok kronične infekcije uzrokuju smrt u vremenu od 4 do 8 tjedana (Hashish i sur., 2018). Umnažanjem gena za 16S rRNA, najkorištenijeg genskog biljega za identifikaciju bakterija, pomoću PCR i usporedbom dobivenih rezultata sa slijedovima tog gena u srodnih vrsta, znanstvenici su uspjeli razviti PCR test sa specifičnim oligonukleotidima kreiranim na temelju razlika u slijedu nukleotida 16S rRNA gena u odnosu na druge bliske vrste za identifikaciju *Yersenia ruckeri* i *Flavobacterium columnare*. Bakterija *Y. ruckeri* uzročnik je jersinioze karakterizirane jakim krvarenjem usne šupljine. Patogen *F. columnare* uzrokuje lezije na površini riba, eroziju peraja i nekrozu škrga. Ove bakterije uzrokuju bolesti kod slatkovodnih riba, a jedinke najpodložnije obolijevanju su

kalifornijske pastrve. Osim za spomenute bakterije, danas postoje PCR protokoli za identifikaciju gotovo svih značajnijih bakterijskih patogena u akvakulturi, te su oni postali glavni način identifikacije tih patogena zbog brzine i visoke osjetljivosti (Karunasagar i sur., 2016; Darwish i sur., 2004).

Postoji velik broj istraživanja u kojima se znanstvenici koriste PCR testom za detekciju virusa koji uzrokuju bolesti te uginuća riba u divljini i u uzgajalištima. Bruchof i sur., 1995. u svojem su istraživanju uspješni pomoću RT-PCR (eng. *Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*) testa dijagnosticirati RNA virus hemoragičke septikemije (VHSV) i virus infektivne hematopoetske nekroze (IHNV), te uspostaviti genetičku vezu između uzročnika virusne hemoragičke septikemije izoliranog iz zaraženih riba koje obitavaju u slobodnim europskim vodama i virusa koji bolest uzrokuje na uzgajalištima. Virus infektivne hematopoetske nekroze uzrokuje akutne zaraze mladih i odraslih jedinki različitih vrsta salmonidnih riba, a virus infektivne hemoragičke septikemije uzrokuje kronične, akutne i subkliničke zaraze najčešće mladih jedinki više od 60 različitih vrsta morskih i slatkovodnih riba, a posebno veliku prijetnju predstavlja u uzgajalištima salmonidnih vrsta. Oba virusa spadaju u porodicu *Rhabdoviridae* (rod *Novirhabdovirus*). Znanstvenici su se koristili posebno dizajniranim početnicama pomoću kojih su umnožili virusni gen koji kodira za specifični protein kapside - glikoprotein G (Karunasagar i sur., 2016; Strunjak-Perović i Topić Popović, 1999; Miller i sur., 1998).

Kao kod bakterijskih i virusnih bolesti, tako se PCR testovi s jednakom učinkovitosti primjenjuju u parazitologiji. Pomoću njih moguće je otkriti uzročnika vrtičavosti kod salmonida, *Myxobolus cerebralis*, u svakoj fazi. Todd i sur. (1997) uspješni su otkriti genetičku vezu između morskih uši (lat. *Lepeophtherus salmonis*) izoliranih iz divljih i uzgajanih salmonida (Bruno i sur., 2012; Andree i sur., 1998).

Jedina oomiceta za čiji su detekciju do sada razvijeni PCR testovi je patogen slatkovodnih rakova *Aphanomyces astaci* koji uzrokuje račju kugu. Princip detekcije temelji se na umnožavanju, pomoću specifično dizajniranih početnica, ITS regije gena za 5,8 rRNA vrste *A. astaci* ili dijelova gena koji kodiraju za hitinaze CHI2 i CHI3 (Hochwimmer i sur., 2009; Oidtmann i sur., 2006).

2.10. Filogenetska analiza DNA slijedova

Rezultati filogenetskih analiza pojedinih gena ili određenih DNA regija nekih organizama obično se izražavaju filogenetskim stablima s ciljem rekonstrukcije srodnosti i određivanja vremena koje je prošlo od trenutka kada su organizmi dijelili zajedničkog pretka. Svako stablo sastoji se od: (i) unutrašnjih i vanjskih grana; (ii) unutrašnjih i vanjskih čvorova. Unutrašnje grane ukazuju na evolucijsku udaljenost između dva pretka neke vrste, dok vanjske grane pokazuju koliko su evolucijski udaljeni ispitivane vrste s pretkom, te međusobno. Grane mogu biti različitih duljina ovisno o evolucijskoj udaljenosti, što se odnosi na vremenske i genske promjene koje su se dogodile među njima. Unutrašnji čvorovi stoga predstavljaju hipotetske zajedničke pretke od taksona koji se proučavaju, a vanjski čvorovi predstavljaju proučavane taksone, najčešće vrste. Za sve vrste koje imaju jednog zajedničkog pretka govorimo da pripadaju jednom grozdu ili jednoj skupini (eng. cluster), tj. tvore monofiletsku skupinu. Da bi dobili filogenetsko stablo, potrebno je najprije slijedove DNA baza od interesa, koji se koriste kao filogenetski biljezi, obraditi i analizirati pomoću računalnih programa (Lemey i sur., 2009).

Najprije se istražuju baze podataka radi dobijanja homolognih referentnih slijedova DNA baza koji su ranije uneseni u bazu podataka, te se uspoređuju slijedovi od interesa s referentnim slijedovima u GenBank® bazi podataka na internetskoj stranici NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) pomoću alata BLAST® (eng. *Basic Local Alignment Search Tool*). BLAST analiza uspoređuje sličnosti među primarnom strukturom slijedova te rezultate daje kao postotak sličnosti. Analizom tih podataka može se utvrditi postojanje homologije među slijedovima. BLAST analiza također može uspoređivati željene slijedove s onima u GenBank® bazi podataka pa se zato i koristi kao alat za njeno pretraživanje. U BLAST analizi korišteni su algoritmi megablast, discontinuous megablast i blastn koji se razlikuju po osjetljivosti na sličnosti među analiziranim slijedovima (Pearson, 2014).

Nakon BLAST analize, analizirani slijedovi se zajedno s homolognim referentnim slijedovima sravnjuju s pomoću računalnih programa kao što su ClustaX (Higgins i sur., 2016), MUSCLE (Edgar, 2004), DIALIGN (Amarendran, 2008), MAAFT (Katoh i Standley, 2013) itd. Cilj sravnjenja je određivanje regija sličnosti između homolognih slijedova koje se pojavljuju u različitom redosljedu ili orijentaciji, te su one u sličnom funkcionalnom, strukturnom ili

evolucijskom odnosu. Među slijedovima mora postojati određena sličnost da bi uopće moglo doći do sravnjenja, jer ako je homologija među sekvencama ispod 30 % sravnjenje nije pouzdano (Thompson i sur., 1997). Prije samog sravnjenja potrebno je maknuti početak (tu su se vezali primeri) i kraj slijedova (tu obično dolazi do opadanja procesivnosti polimeraze), a to se najčešće radi u programima BioEdit (Hall, 2013) ili GeneStudio™ (GeneStudio Inc., GA, USA) (Hall, 2013). Tijekom analize sravnjenih slijedova često se otkriju različiti problemi: signali na mjestu ponavljajućih nukleotida daju umjesto definiranih vrhova široki plato ili vrlo dugačku padinu, postojanje nejasnih apsorpcijskih vrhova za pojedini nukleotid u oba lanca, nemogućnost točnog određivanja nukleotida na određenom mjestu, što je čest slučaj na početku i na kraju slijeda. Ovaj problem se najjednostavnije rješava tako da se ta regija ukloni iz daljnje analize. Podatci o sličnosti koje dobijemo sravnjenjem slijedova temelj su za izradu filogenetskih stabala odabirom željene metode (Daugelaite i sur., 2013).

Za konstrukciju filogenetskog stabla najčešće se koriste četiri metode: Bayesian metoda, metoda najveće vjerojatnosti, metoda najveće štedljivosti, metoda susjednog sparivanja (Lovrenčić, 2015). U ovom radu koristila se Bayesian metoda, pa će o njoj dalje biti nešto više riječi. Bayesian metoda se temelji na spoznaji o podacima i njihovoj distribuciji (eng. posterior probabilities) i vjerojatnostima koje se procijenjuju na osnovi modela koji se naziva prethodno očekivanje (eng. prior expectation). Bayesian analiza provodi se upotrebom Markov Chain Monte Carlo (MCMC) metode, koje se baziraju na nizu neovisnih potraga za skupinom najboljih stabala, s mogućnošću povremenih izmjena informacija među potragama za najboljom grupom stabala. Tako se stvara naknadna distribucija (eng. posterior distribution) (Mau i sur., 1999).

2.10.1. Ograničenja unutar filogenetičke analize DNA slijedova

Najčešće korištene metode u filogenetici dobre su samo za rješavanje interspecifičnih evolucijskih odnosa koji su hijerarhijski, što znači da iz jedne ancestralne vrste nastaju dvije nove vrste. Problem nastaje kada se pokušava pomoću tradicionalnih metoda objasniti intraspecifične evolucijske odnose koji nisu hijerarhijski jer su rezultat spolnog razmnožavanja, malog broja relativno nedavnih mutacija i čestih rekombinacija. Navedene metode zakazuju jer ne uzimaju u obzir: (i) nizak stupanj različitosti, tj. mali broj značajki za filogenetsku analizu; (ii) pojavu politomije; (iii) prisutnost retikulacije; (iv) velik broj populacija i više predstavnika za

svaku populaciju. Za bolje rješavanje intraspecifičnih evolucijskih odnosa predlaže se rekonstrukcija filogenetske mreže (Posada i Crandall, 2001). Također, nedavno otkriće horizontalnog prijenosa gena između organizama stvara značajnu komplikaciju, što znači da različiti geni unutar istog organizma mogu imati različito porijeklo (Philippe i sur., 2011).

Konstrukcija filogenetskog stabla komplicirani je proces u kojemu su točnost i pouzdanost izuzetno važni. Problemi koji smanjuju efikasnost metoda su atrakcija dalekih ogranaka, genska zasićenost te problem kod izbora uzoraka za istraživanje, pa stoga niti jedna metoda neće dati točno stablo već najbolje moguće na osnovu unesenih podataka i u skladu sa svojim ograničenjima. Preporuka je da se koriste najmanje dvije metode za bilo kakvu filogenetsku analizu kako bi se provjerila dosljednost dobivenih rezultata (Philippe i sur., 2011).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Izolacija i uzgoj oomiceta iz ribogojilišta Belski dol

Molekularno-filogenetske analize provedene su na uzorcima oomiceta sakupljenima iz ribogojilišta Belski dol (GPS koordinate: 46.206310, 16.253076), 2019. godine (slike 17 i 18). Jedan tip uzoraka predstavljaju komadi tkiva, lezija na koži (simptom saprolegnioze na površini kože zaražene ribe) te škrge uzeti od zaraženih pastrva koje su imale vidljive znakove saprolegnioze na koži. Uzorkovanje oomiceta s riba je provedeno sterilnim priborom pomoću kojeg je izrezan komad škrge i kože na kojoj se vide lezije. Tkivo je zatim kratko uronjeno u etanol te isprano sterilnom destiliranom vodom i postavljeno na hranjivu podlogu GY+Ox+P. Drugi tip uzorkovanja proveden je sakupljanjem inficiranih sjemenki konoplje starih 14 dana koje su vidljivo bile obrasle micelijem. U vodu je postavljeno deset zamki za oomicete sa sjemenkama konoplje (slika 19).



Slika 17. Karta s označenim ribogojilištem na kojem je provedeno uzorkovanje (GPS kordinate: 46.206310, 16.253076)



Slika 18. Pregled lokaliteta na kojem je vršeno uzorkovanje. Autor fotografije: Ana Bielen



Slika 19. Primjer zamki za oomicete sa sjemenkama konoplje. Autor fotografije: Martin Sačer

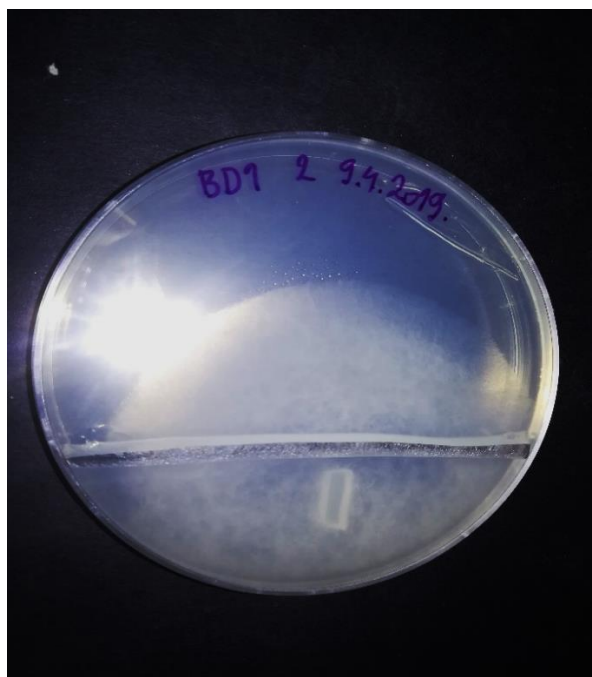
Za izradu zamki, sjemenke konoplje su prokuhane dvije minute u kipućoj destiliranoj vodi nakon čega su procijeđene i prerezane na polovice skalpelom. U zamke napravljene od žičane mreže stavi se deset polovica sjemenki, te se zamke zatvore i dodatno osiguraju povezivanjem žicom. Zatim se pripremljene zamke stave u staklenke i steriliziraju autoklaviranjem tijekom 20 minuta pri temperaturi od 121 °C i tlaku od 1,2 bara. Na terenu, pet zamki je uronjeno u vodu koja ulazi u ribnjak te pet u vodu koja izlazi iz ribnjaka, potopljene su pomoću utega i vezane plastičnim koncem za objekt na obali. Nakon 13 dana, zamke su izvađene, stavljene u sterilne staklenke, prelivene vodom u koju su bile uronjene na terenu te transportirane u laboratorij.

Po povratku u laboratorij su uzorci (inficirane polovice sjemenki konoplje) izvađeni iz zamki te nasađeni na krutu hranjivu podlogu GY+OX+P.

Za pripremu hranjive podloge GY+OX+P potrebno je u jednoj litri destilirane vode suspendirati 12 g agara (Biolife, Italija), 5 g glukoze (Biolife, Italija) i 1 g kvašćevog ekstrakta (Biolife, Italija). Nakon sterilizacije u autoklavu tijekom 20 minuta pri temperaturi od 121 °C i tlaku od 1,2 bara, podloga se ohladi do temperature od približno 60 °C, te joj se doda 20 ml otopine antibiotika koja sadrži oksoloničnu kiselinu i penicilin. 20 mL otopine antibiotika priprema se tako da se pomiješa 8 mL destilirane vode, 10 mL etanola (Alkaloid, Sjeverna Makedonija), 2 mL 0,1M 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). Prije

dodavanja u podlogu, otopina antibiotika se sterilizira provlačenjem kroz filter promjera pora 0,4 μm (LLG, Njemačka). Antibiotici se u hranjivu podlogu dodaju kako bi se inhibirao rast bakterija, dok su oomicete otporne na penicilin i oksoloničnu kiselinu.

Prije nego što smo nacjepili uzorke na hranjivu podlogu, svaki se uzorak (inficirana polovica sjemenki konoplje, komadić kože s lezijom ili komadić škrge) umoči u etanol te ispere sterilnom Pasteurovom pipetom tri puta s otprilike 2 mL sterilne destilirane vode. Tako tretirani uzorci stave se na krute hranjive podloge te inkubiraju u termokabinetu (Eppendorf, Njemačka) pri temperaturi od 18 °C. Kako bi se oomicetni izolati pročistili od drugih organizama, korištene su ploče s procjepom preko kojeg micelij može rasti, a bakterije i drugi organizmi ne mogu. Prije nego se uzorci stave na hranjive podloge, pomoću sterilnog skalpela se duž Petrijeve zdjelice izreže dio agara da se napravi procjep koji odijeljuje približno trećinu medija u Petrijevoj zdjelici od ostatka hranjive podloge. Uzorak se nasadi na manji, odijeljeni dio podloge te inkubira u termokabinetu. Zatim se svaka dva dana izrezuje komadić agara s naraslim micelijem koji je prošao procjep, te se presađuje na novu hranjivu podlogu s procjepom, dok se ne dobije čista kultura oomiceta. Na slici 20 prikazana je ploča s procjepom s nasadenim micelijem i micelij kako prerasta procjep te se širi dalje u podlogu.



Slika 20. Ploča s procjepom i micelijem. Autor fotografije: Martin Sačer

Za pohranu izolata, najprije se bočice volumena 50 mL napune destiliranom vodom do pola njihovog volumena, te se u svaku bočicu stavi po dvije sjemenke konoplje. Bočice sa sjemenkama zatvore se plastičnim poklopcem, steriliziraju u autoklavu i ohlade, te se čuvaju u hladnjaku na 4 °C do nasađivanja. Nasađivanje oomicetne kulture za pohranu vrši se s dva komada čvrste podloge s čistom kulturom koji se stave u bočice, zatvore poklopcem te se poklopci bočica pokriju parafilmom. Ovako pripremljeni izolati čistih kultura čuvaju su pri temperaturi od 18 °C.

3.2. Izolacija genomske DNA

Da bi se izolirala genomska DNA, oomicete je potrebno uzgojiti u tekućoj hranjivoj podlozi PG1 (Unestam, 1965). Iz GY+OX+P hranjive podloge miceliji se prenesu u jažice plastične pločice s 12 jažica koja se potom inkubira u termokabinetu (Eppendorf, Njemačka) dva dana pri temperaturi od 18 °C.

Nakon uzgoja, micelij koji je narastao u jažici odvoji se od ostatka krute hranjive podloge, prebaci u plastičnu kivetu od 1,5 mL, te se sadržaj kivete centrifugira pri 10 000 g tijekom 15 minuta. Nakon centrifugiranja supernatant se odbaci, a dobiveni talog micelija koristi se za izolaciju DNA.

Za izdvajanje genomske DNA iz stanica mikroorganizama korišten je komplet za izolaciju NucleoSpin® Microbial DNA (Macherey Nagel, Njemačka). Najprije se doda 100 µL BE-pufera u plastičnu kivetu s talogom micelija, te se sadržaj kivete resuspendira. Talog micelija se zatim prebaci u plastičnu epruveticu sa staklenim zrcima tipa B (NucleoSpin® Bead Tube Type B) u koju se potom doda 40 µL MG-pufera i 10 µL otopine proteinaze K. Da bi razbili stijenke i membrane stanica micelija, dobijena smjesa se vorteksira (Corning, SAD) tijekom 20 minuta pri frekvenciji od 30 Hz. Nakon vorteksiranja, sadržaj epruvetice centrifugira se pri 11 000 g tijekom 30 sekundi. U epruveticu s uzorkom doda se zatim 600 µL MG-pufera, vorteksira tijekom 5 sekundi te potom centrifugira pri 11 000 g tijekom 30 sekundi. Kolona za vezanje DNA postavi se čistu plastičnu kivetu od 1,5 mL (NucleoSpin® Tissue Column) te se na kolonu nanese supernatant dobijen centrifugiranjem. Nakon ponovnog centrifugiranja pri prethodnim uvjetima, kolona za izolaciju DNA ispere se s 500 µL BW pufera i ponovno centrifugira pri istim

uvjetima. Zatim se u kolonu doda 500 μ L B5 pufera, te se ponovno centrifugira dva puta pri istim uvjetima, te se filtrat ukloni. Na kraju, provede se elucija DNA s kolone. Kolona se prebaci u čistu plastičnu kivetu volumena 1,5 mL, na kolonicu se nanese 100 μ L BE-pufera za eluciju, te se kolona centrifugira pri 11 000 g tijekom 5 minuta. Nakon centrifugiranja, skupi se eluat koji sadrži DNA, te se kolona još jednom ispere eluatom kako bi se dobila maksimalna količina genomske DNA.

3.3. Lančana reakcija polimerazom

Molekularno-filogenetski odnosi oomiceta izoliranih iz uzoraka određeni su temeljem analize fragmenata jednog genskog biljega – ITS regije. Pri tome se fragmenti najprije umnože lančanom reakcijom polimerazom. Oligonukleotidne početnice korištene u ovom radu prikazane su u tablici 3. Sastav PCR reakcijske smjese naveden je u Tablici 4, a uvjeti PCR reakcije navedeni su u tablici 5. Uređaj korišten za izvođenje PCR je Alpha Cyclor 1 (PCRmax, Ujedinjeno Kraljevstvo) (slika 21).

Tablica 3. Korištene početnice za PCR umnažanje oomicetnih ITS regija

Oznaka početnice	Nukleotidni slijed 5' → 3'	T _m [°C]	Dužina oligonukleotida(pb)	Literatura
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	63	22	White i sur., 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	58	20	White i sur., 1990



Slika 21. PCR uređaj korišten u ovom radu: Alpha Cycler 1 (izvor: labcompare)

Tablica 4. Sastav reakcijske smjese za PCR

Komponente reakcijske smjese za PCR	Volumen (μL)	Konačna koncentracija komponente u reakcijskoj smjesi
EmeraldAmp [®] PCR 2X Master Mix (TAKARA, Japan)	25	1X
DNA kalup	1	$\leq 0,2 \text{ ng}/\mu\text{L}$
10 μM ITS5	1	0,2 μM
10 μM ITS5	1	0,2 μM
dH ₂ O	22	/
ukupni volumen	50	/

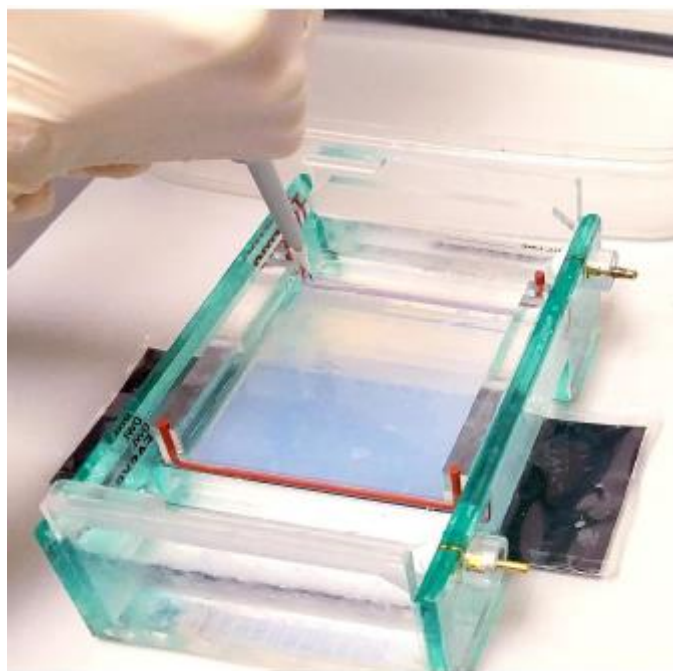
Kao negativna kontrola korištena je reakcijska smjesa koja nije sadržavala DNA kalup, a služila je kao kontrola potencijalne kontaminacije kemikalija i pribora. Također, koristila se i pozitivna kontrola koja je umjesto DNA kalupa sadržavala GBS reagens (Thermo Scientific™ AcroMetrix™ GBS Positive Control). Služila je ispitivanje prisutnosti inhibitora u uzorku i učinkovitosti PCR reakcije.

Tablica 5. Uvjeti PCR reakcije

Korak reakcije	Temperatura/Trajanje
početna denaturacija DNA	98 °C / 5 min
denaturacija DNA	98 °C / 30 s
sparivanje početnica	56 °C / 30 s
produljivanje lanaca DNA	72 °C / 1 min
završno produljivanje lanca DNA	72 °C / 10 min

3.4. Elektroforetsko razdvajanje fragmenata DNA

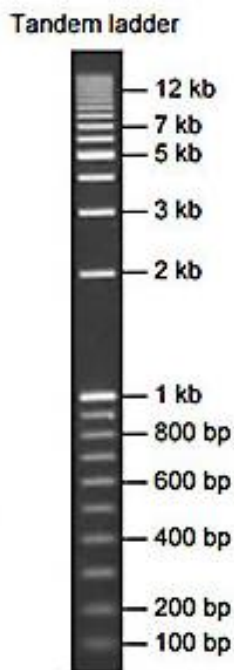
Uspješnost izolacije DNA iz uzoraka stanica micelija te uspješnost PCR reakcija provjeravani su gel elektroforezom u agaroznom gelu (slika 22.). Za potrebe ovog rada korišten je gel agaroze pripremljen otapanjem 0,8 g (za provjeru izolacije DNA), odnosno 1,6 g (za vizualizaciju PCR produkata) agaroze (Sigma-Aldrich, SAD) u 80 mL 1X TAE puferu (40 mM tris(hidroksimetil)aminometan; 20 mM octena kiselina; 1 mM etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA)). U ohlađenu otopinu agaroze dodano je 2 μ L boje GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain (Lonza, Švicarska) za vizualizaciju fragmenata DNA pod UV svjetlom.



Slika 22. Elektroforeza u agaroznom gelu – nanošenje uzorka u jažice gela. Autor fotografije:

Tamara Vujović

Na gel se nanosilo 5 µl pojedinog uzorka. Elektroforeza se provodila u 1X TBE puferu pri 100 V u trajanju od 45 minuta u aparaturi Owl Easy Cast B1 Mini Gel Electrophoresis System (Thermo Fisher Scientific, SAD). Nakon provedene elektroforeze, fragmenti DNA u gelu su promatrani na UV transiluminatoru (UV transiluminator UVIpure, UVITEC Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo) i fotografirani, te im je veličina određena pomoću molekularnog standarda SimplyLoad™ Tandem DNA ladder (Lonza Rockland, Inc.) (slika 23).



Slika 23. Molekularni standard SimplyLoad™ Tandem DNA ladder (Lonza Rockland, Inc.)

3.5. Pročišćavanje i sekvenciranje, te računalna analiza nukleotidnih sekvenci

PCR produkti poslani su na pročišćavanje i sekvenciranje u komercijalni servis Microsynth GmbH (Beč, Austrija). Sekvenciralo ih se upotrebom Sanger metode sekvenciranja, a početnice koje su korištene bile su iste kao i za amplifikaciju ITS regije (ITS4 i ITS5). Na sekvenciranje je ukupno poslano 100 PCR produkata.

Nakon određivanja slijeda nukleotida PCR produkata, njihovi su kromatogrami uređeni u programu GeneStudio™ (GeneStudio Inc., GA, USA) i spremljeni u .fasta formatu. Sve sekvence čiji kromatogrami nisu bili ispravni (loše očitani signali, preklapanje signala dviju baza ili neočitavanje nekih baza) izostavljene su iz daljnje analize. Dobivenim umnoženim i sekvenciranim slijedovima provjerena je autentičnost na stranicama NCBI pomoću alata

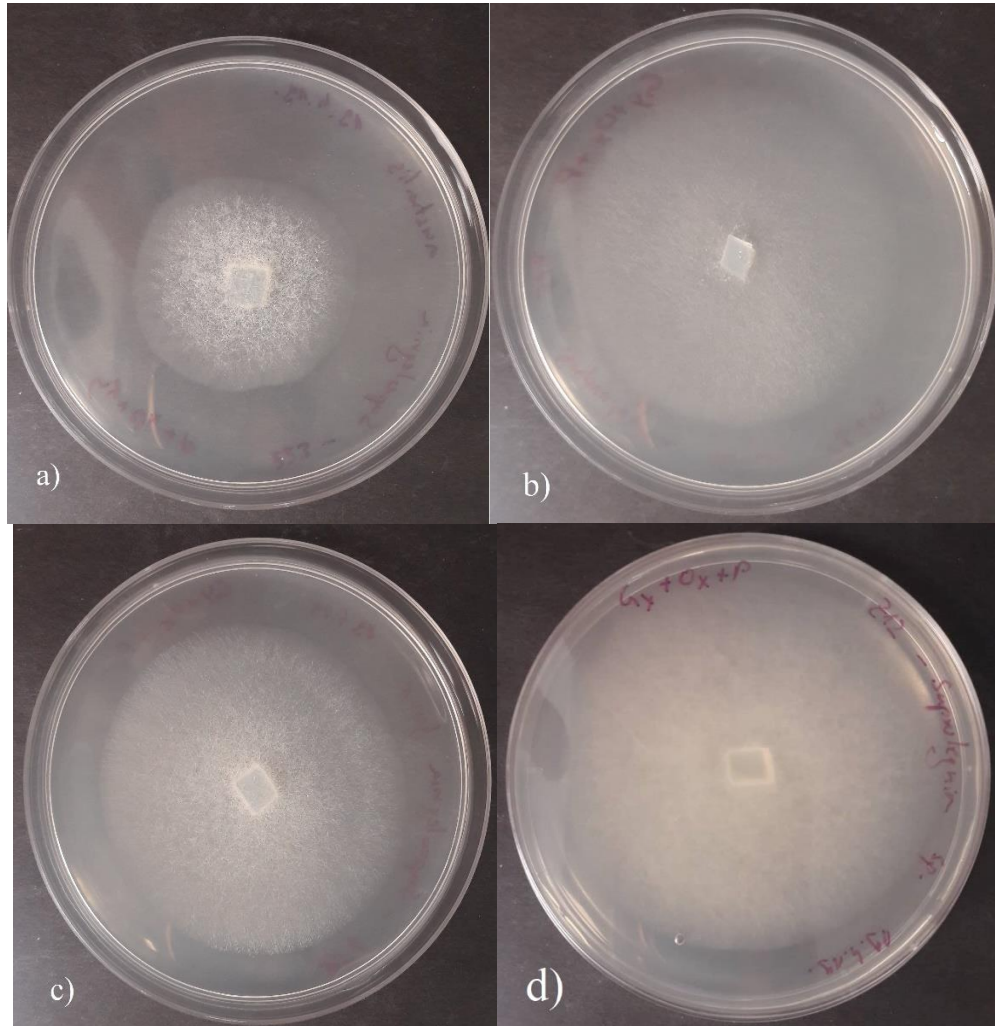
BLAST® (NCBI, USA, https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch), koji uspoređuje dobivene slijedove sa slijedovima srodnih organizama (tzv. referentni slijedovi) dostupnim u bazi podataka NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Za provjeru autentičnosti prethodno umnoženih i sekvenciranih slijedova pomoću alata BLAST® koristio se algoritam blastn (Altschul i sur., 1990).

Uz pomoć programa MAFFT ver. 7.450 (Berkeley Software Distribution, USA, <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) (Kato i Standley, 2013) napravljeno je višestruko sravnjenje nukleotidnih slijedova (eng. *multiple sequence alignment*) te je dodatno uređivanje sravnjenih sekvenci izvršeno u programima Bioedit 7.2.4. (Ibis Therapeutics, USA) (Hall, 2011) i SeaView ver. 5.0 (Pôle Rhône-Alpes de Bioinformatique Site Doua, Francuska) (Gouy i sur., 2010). Uređivanje sravnjenih sekvenci uključivalo je uklanjanje loše očitanih početaka i krajeva varijabilnih duljina kako bi u daljnjoj analizi ostale samo filogenetski informativne regije. Filogenetska analiza provedena je metodom Bayesianovog zaključivanja s pomoću Mr. Bayes ver. 3.2 (NBIS, Švedska) (Ronquist i Huelsenbeck, 2003) programa sa 100 000 iteracija, a dobiveno filogenetsko stablo uređeno je s pomoću programa iTOL ver. 5.5 (EMBL, Njemačka, <https://itol.embl.de/itol.cgi>) (Letunic i Bork, 2016).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Izolacija i uzgoj čistih kultura uzoraka oomiceta izoliranih iz ribogjilišta Belski dol

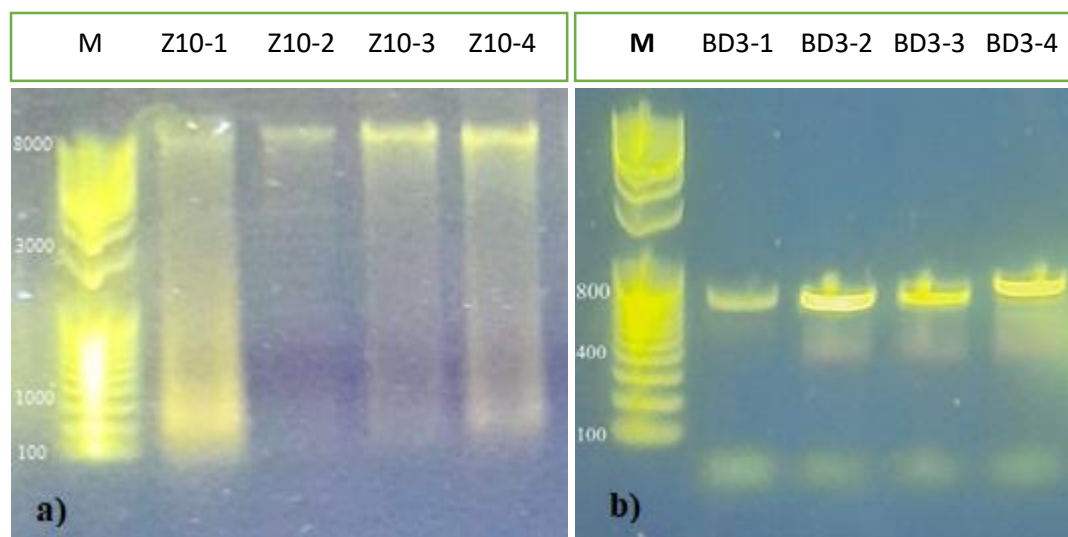
Uzorkovanjem, uzgojem u hranjivoj podlozi te višestrukim precjepljivanjem i pročišćavanjem sakupljeno je 100 izolata oomiceta iz ribogjilišta Belski dol – 94 sa zamki i 6 s bolesne ribe (slika 24).



Slika 24. Prikaz uzgoja čistih kultura oomiceta iz roda *Saprolegnia* i *Leptolegnia* izoliranih iz sakupljenih uzoraka: **a)** *S. diclina* (oznaka: Z12-6); **b)** *S. australis* (oznaka: BU4-6); **c)** *Leptolegnia* sp. (oznaka: Z11-2) i **d)** *Saprolegnia ferax*. (oznaka: BD1-10)

4.2. Izolacija DNA i umnažanje ITS-regije 5,8S rRNA gena

Rezultati elektroforetske provjere kvalitete izolacije ukupne stanične DNA svih 100 čistih kultura izolata pomoću NucleoSpin® Microbial DNA (Macherey Nagel, Njemačka) izolacijskog kompleta pokazali su da je izolirana visoko polimerna genomska DNA, tek s manjom razinom degradacije i dodatnih nečistoća (slika 25a). Također, rezultati elektroforeze na agaroznom gelu potvrdili su da su PCR produkti jezgrene ITS regije 5,8S rRNA gena pogodni za sekvenciranje (slika 25b).

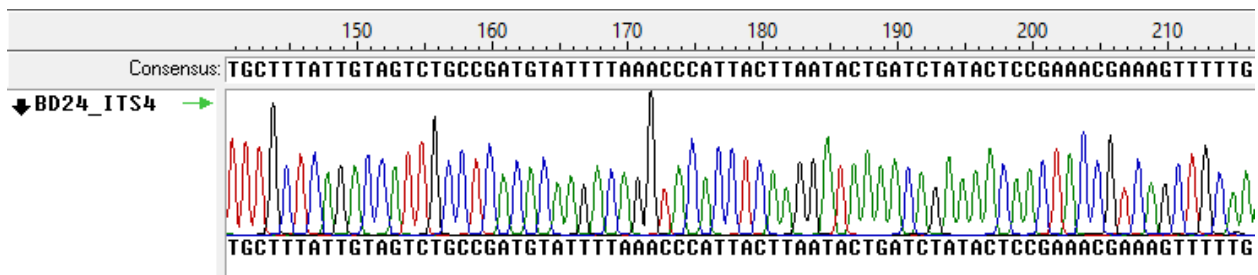


Slika 25. a) Izolirana genomska DNA nekoliko izolata korištenih u ovom radu; b) primjeri PCR-produkata amplificirane ITS regije 5,8S rRNA gena nekoliko izolata korištenih u ovom radu. M: molekularni standard SimplyLoad™ Tandem DNA ladder (Lonza, Švicarska)

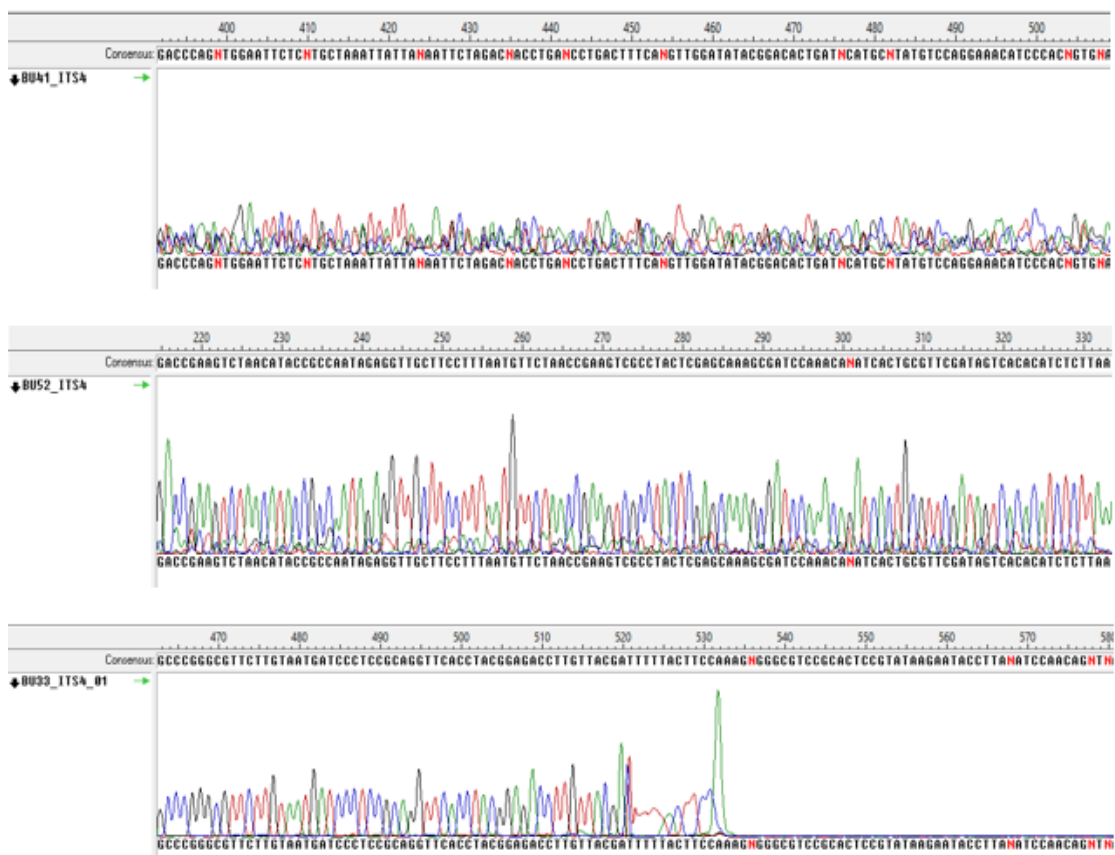
4.3. Pregled i uređivanje kromatograma sekvenciranih PCR produkata

Rezultati sekvenciranja dobiveni su u .abi i .txt formatu. Za učitavanje i korigiranje u programu GeneStudio™ (GeneStudio Inc., GA, USA) koristio se samo .abi format. Nakon pregledavanja rezultata sekvenciranja, utvrđeno je kako je samo 51 PCR produkt dovoljno pročišćen da rezultira pravilnim kromatogramom, te su uzeti na daljnju analizu. Također, pomoću programa GeneStudio™ (GeneStudio, Inc., GA, USA) slijedovima s pravilnim kromatogramima uklonjeni su loše očitani krajevi nukleotidnog slijeda. Tako dobiveni slijedovi spremljeni su kao FASTA

dokument. Na slici 26 prikazan je primjer pravilnog kromatograma u program GeneStudio™ (GeneStudio, Inc., GA, USA) za ITS regiju izolata BD2-4, a na slici 27 prikazan je primjer loših kromatograma za izolate BU4-1, BU5-2 i BU3-3.



Slika 26. Primjer pravilnog kromatograma u programu GeneStudio™ (GeneStudio, Inc., GA, USA) na kojem je prikazan slijed nukleotida ITS regije izolata BD2-4 (*Pythium sp.*)



Slika 27. Primjeri loših kromatograma u programu GeneStudio™ (GeneStudio, Inc., GA, USA) za izolate BU4-1, BU5-2, BU3-3

4.4. Pretraživanje baze podataka, provjera autentičnosti te sravnjenje nukleotidnih slijedova

Svim slijedovima oomicetnih ITS regija gena za 5.8 rRNA koji su korišteni u ovom radu provjerena je autentičnost te su identificirani pomoću BLAST alata u GenBank® bazi podataka na stranicama NCBI, te je preuzeto 50 homolognih sekvenci referentnih organizama koje su uključivale vrste rodova *Saprolegnia*, *Pythium*, *Leptolegnia*, *Achlya* te vanjsku grupu *Aphanomyces astaci*. Referentni slijedovi preuzeti su putem tzv. pristupnih brojeva (eng. *Accession Number* – Acc. No.).

Nakon sravnjenja slijedova u programu MAAFT, (Berkeley Software Distribution, USA, <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) (Kato i Standley, 2013), provjerene su supstitucije, delecije i/ili insercije baza (Prilog 1.). Nakon višestrukog sravnjivanja točnost sravnjivanja još je jednom provjerena uz pomoć programa Bioedit 7.2.4. (Ibis Therapeutics, USA) (Hall, 2013) i SeaView ver. 5.0 (Pôle Rhône-Alpes de Bioinformatique Site Doua, Francuska) (Gouy i sur., 2002), te su se sravnjenim slijedovima uspješno uklonili loše očitani varijabilni dijelovi na oba kraja. Obradeni slijedovi korišteni su u filogenetskoj analizi.

Od ukupno 51 izolata, tri nisu bili oomicetnog podrijetla. Od preostalih 48 izolata, dvadeset i pet je pripadalo *Pythium sp.* (KF889748.1): BD2-4, BD2-3, BD4-1, BD3-6, BU5-6, B4, Z12-4, BD1-7, Z10-3, Z12-1, BD3-4, Z12-5, BD4-4, Z10-1, Z12-2, Z12-3, Z10-4, BU3-2, BU5-3, BU5-4, Z11-7, BU3-4, BU3-5, BU1-2, BU1-3; tri izolata vrsti *Leptolegnia sp.* (KM061649.1): B11-L3, BD2-5, Z11-2; jedan izolat vrsti *S. australis* (KF717960.1): BU4-6; pet izolata vrsti *S. ferax* (KF717959.1): BD3-7, BD3-2, BD3-1, BD3-9, BD1-10) i četrnaest vrsti *S. parasitica* (KF717847.1): A1, B1, B3, C4, B2, E4, A4, D3, C1, Z11-5, BD3-3, D4, C3, C2.

4.5. Filogenetska analiza sekvenci

Filogenetska analiza ukupno 48 izolata uz pomoć programa Mr. Bayes ver. 3.2 (NBIS, Švedska) (Ronquist i Huelsenbeck, 2003) uz 100 000 iteracija rezultirala je filogenetskim stablom koje je jasno prikazalo *A. astaci* kao vanjska taksonomska jedinica, te je dobijeno filogenetsko stablo uređeno s pomoću programa iTOL ver. 5.5 (EMBL, Njemačka, <https://itol.embl.de/itol.cgi>) (Letunic i Bork, 2016) za grafički prikaz (slika 28). Međutim, rodovi *Achlya* i *Leptolegnia* grupirani su zajedno s rodom *Saprolegnia*.



Slika 28. Filogenetsko stablo načinjeno na temelju ITS regije gena koji kodira za 5.8S rRNA različitih vrsta roda *Saprolegnia*, *Leptolegnia* i *Pythium*, te vrsta *Achlya caroliniana* i *Aphanomyces astaci* (označeno GenBank® pristupnim brojem), uz izolate iz ribogojilišta Belski dol

Oomikoze riba uzrokuju oomiceti, mikroorganizmi morfološki slični gljivama, znani i kao vodene plijesni. Ti su organizmi sposobni zaraziti različite domačine od algi, biljaka, člankonožaca do kralježnjaka (Phillips i sur., 2008). U akvakulturi i agrokulturi oomiceti su poznati po tome što uzrokuju ozbiljne ekonomske gubitke širom svijeta, a također nanose i velike štete u svim vrstama ekosustava. Donedavno se detekcija oomicetnih bolesti koje se javljaju u akvakulturi i agrokulturi temeljila se na morfološkim metodama identifikacije. Međutim, većina se patogenih oomiceta i gljiva ne može razlikovati na razini vrste korištenjem samo morfoloških metoda identifikacije, zbog toga što imaju vrlo slične karakteristike i često ne uspijevaju proizvesti spolne karakteristike u *in vitro* uvjetima (ili se to može dogoditi ali tek nakon dužeg vremena uzgoja) (van West, 2006). Na primjer u ovom radu se nije uspjelo identificirati prisustvo *Aphanomyces invadas*, jednog od najčešćih uzročnika oomikoza u ribnjacima, bilo s uzoraka prikupljeni sa zamki, bilo sa uzoraka tkiva ribe, vjerojatno zbog nepovoljnih uvjeta uzgoja u laboratoriju. Slično je zabilježeno u radu Lilley i sur., (2001). Dodatno, prisustvo različitih vrsta bakterija na zamkama, bolesnim ribama ili u vodi potencijalno utječe na klijanje i prihvaćanje zoospora. Koristeći se metodama koje omogućuju detekciju niske koncentracije DNA u uzorcima mogli bi se prevladati ovakvi problemi, stoga je kombinacija modernih i tradicionalnih metoda najbolji način proučavanja patogenih oomiceta. (Sarowar i sur., 2013). 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 (Maguire i sur., 2016). Međutim, za ostale vrste oomiceta takvi testovi još nisu razvijeni, unatoč tome što se radi o patogenim mikroorganizmima koji uzrokuju velike štete u akvakulturi i agrokulturi. Razlog tome je najvjerojatnije taj što taksonomija većina oomiceta još nije do kraja riješena te u bazama podataka postoji velik broj nukleotidnih slijedova koji su pogrešni (Sandoval-Sierra i sur., 2014).

Napredak u razvoju molekularne biologije pomogao je u taksonomiji i dijagnostici oomicetnih bolesti. ITS regija gena za 5,8 rRNA pokazuje visoku mutacijsku stopu pa se koristi za detekciju i razlikovanje nekih srodnih vrsta oomiceta, te u ostalim filogenetičkim i taksonomskim istraživanjima (Sandoval-Sierra i sur., 2014). U ovom istraživanju, analiza ITS regije oomiceta omogućila je rezoluciju do razine vrste kojom se prikazuje bioraznolikost oomiceta u uzorkovanom području.

Četrdeset i sedam izolata kojima je pomoću Hot Start PCR metode umnožena ITS regija gena za 5,8 rRNA nisu pokazali pravilne kromatograme nakon sekvenciranja, pa su stoga izuzeti iz daljnje analize. Na Slici 27. mogu se vidjeti primjeri loših kromatograma, koji su najvjerojatnije posljedica lošeg pročišćavanja reakcijske smjese prije i nakon procesa sekvenciranja; (ii) kontaminacije stranom DNA ili solima tijekom pripreme reakcijske smjese za PCR; te manje vjerojatno (iii) dodatka obje ITS4 i ITS5 početnice tijekom sekvenciranja, umjesto samo ITS4; (iv) nedovoljne koncentracije početnica prilikom pripreme reakcijske smjese za PCR. Kontaminacija stranom DNA moguće upućuje i na moguću prisutnost više vrsta oomiceta u naizgled pročišćenim izolatima, posebice stoga što je upravo većina uzoraka tkiva ribe dala kompleksan kromatogram. U tom je slučaju nužno koristiti i morfološki pregled izolata za pravilnu identifikaciju vrste.

Ostalim izolatima, koji su pokazivali pravilne kromatograme nakon sekvenciranja, provjerena je autentičnost te je uspoređena homologija sekvencirane ITS regije 5,8S rRNA gena s referentnim slijedovima iz baze podataka. Tri izolata nisu identificirani kao oomicete, pa su oni izostavljeni iz daljnje filogenetičke analize. Jedna od glavnih ograničenja NCBI baze podataka je mali broj pohranjenih oomicetnih referentnih slijedova. Dodatnu nesigurnost u rezultate istraživanja unosi činjenica da u bazi podataka postoji više od 45 % pogrešno identificiranih vrsta oomiceta (Sandoval-Sierra i sur., 2014). Stoga, ovakva situacija otežava pravilnu identifikaciju oomicetnih vrsta i otežava razumijevanje stvarnog opsega oomicetnih vrsta koji izazivaju bolesti u akvakulturi i agrokulturi.

Većina izolata dobivenih u ovom istraživanju identificirani su kao vrste koje spadaju u rod *Pythium*. Uglavnom, *Pythium* spp. poznati su kao saprofiti ili biljni patogeni. U mnogim su istraživanjima znanstvenici uspjeli izolirati i identificirati oomicete roda *Pythium* s bolesnih riba zaraženih saprolegniozom, ali još nije utvrđeno jesu li oni primarni patogeni za ribe (Sarowar i sur., 2016). Štoviše, Czczuga (1996) je izolirao velik broj *Pythium* spp. koji su sporadično rasli na ikri slatkovodnih riba zajedno s oomicetama rodova *Saprolegnia* i *Achlya*. Zaključio je da vrste roda *Pythium* značajno pridonose razvoju saprolegnioze i ostalih oomikoza, što može dovesti do masovnog rasta patogenih oomiceta te oštetiti veliki broj inkubiranih ribljih jaja. Pored toga, osim kod riba vrste roda *Pythium* izolirane su i iz brojnih uzoraka rakova (Czczuga, 2002b). Većina radova su identificirali *Pythium* sp. kod riba sa ribogojilišta koja su bila okružena

šumom (Czeczuga i sur 2002a; 20002b; Czeczuga 1996), pa bi se iz toga vrlo lako moglo zaključiti da su *Pythium* vrste u šumama ili na poljima jedan od puteva svog širenja pronašle u vodi koja utječe u ribnjake, te su stoga detektirani na uzgajanim vrstama riba (Sarowar i sur., 2016). Slično je uočeno i na našem mjestu uzorkovanja koje je okruženo šumom i poljima na kojima se uzgaja povrće. Stoga, može biti da je pronalazak *Pythium* spp. u našim uzorcima iz vode koja ulazi u, te izlazi iz ribnjaka, rezultat širenja zoospora koje potječu iz vrsta *Pythium* sa okolnih usjeva ili su te vrste bile isprane zbog kiše preko polja do uzorkovane vode.

Svih 25 izolata *Pythium* spp. (red *Peronosporales*), temeljem rezultata filogenetskog istraživanja u ovom radu, najbliže je vrstama *Pythium coloratum*, *Pythium flavoense*, *Pythium lutarium*, *Pythium dissocotum* koje na temelju slijeda ITS regije 5,8 rDNA gena sve spadaju u monofiletsku podgrupu B2 (Levesque & Cock, 2004). U ovu podgrupu spadaju vrste za koje je karakteristično: (i) sporangij vlaknastog oblika, koji se po veličini i strukturi ne razlikuje od hifa; (ii) oogoniji manji od 30 mikrometra; (iii) umjerena stopa rasta (10–20 mm d⁻¹). Kod predstavnika podgrupe B2 duljina nukleotidnog slijeda ITS regije ne razlikuje se za više od 1 pb, također, morfološki im se ne razlikuju spolne strukture te ih je moguće izolirati iz tla, algi, biljaka roda *Pinus* i nekih dvosupnica (Levesque & Cock, 2004).

Ostalih 23 izolata spadaju u vrste oomiceta koje spadaju u red *Saprolegniales*, koje se smatraju ekološki najznačajnijim patogenim oomicetama riba (Fry i Grunwald, 2010). Većina ih je izolirana iz zamki sa sjemenkama konoplje, te se na temelju filogenetske analize uspostavilo da se radi o vrstama iz roda *Saprolegnia*, koje se može svrstati u pet glavnih monofiletskih grupa (Dieguez-Uribeondo, 2007). Međutim, identifikacija vrsta je teška i nepouzdana. Četrnaest izolata identificirano je kao *S. parasitica*. Ova vrsta oomiceta bitan je primarni patogen riba i ribljih jaja, te je uglavnom saprofit i glavni su predstavnik monofiletske grupe 1 (Dieguez-Uribeondo, 2007) u koju spadaju organizmi za koje je karakteristično: (i) izduženi oblik oogonija sa centričnim ili subcentričnim oosporama; (ii) sekundarne ciste sadrže puno struktura koje nalikuju na dlačice; (iii) homologne i međusobno jako slične ITS regije kod svih predstavnika unutar grupe; (iv) iste morfološke karakteristike. Pet izolata identificirano je kao *S. ferax* koji je predstavnik monofiletske grupe 2, koja je evolucijski relativno daleko u odnosu na grupu 1 (Dieguez-Uribeondo, 2007). Međutim, u ovom je istraživanju monofiletska grupa 2 evolucijski usko povezana s grupom 1. Monofiletsku grupu 2 čine uglavnom saprofitske vrste, koje se na

temelju morfoloških karakteristika međusobno jako razlikuju (Sarowar i sur., 2016). Stvarne odnose između vrsta unutar grupe 2 te vezu između grupe 2 i drugih grupa potrebno je još proučavati, pogotovo da se utvrdi da li je to isključivo saprofitna grupa ili nije. Vrsta *S. ferax* jedna je od najčešće pogrešno identificiranih taksona te ju se u mnogim istraživanjima odredi kao npr. *Protoachlya polysporus*, *Saprolegnia anomala*, *S. bulbosa*, *S. diclina*, *S. lapponica*, *S. litoralis*, *S. longicaulis*, *S. megasperma*, *S. mixta*, *S. nuchiae*, *S. oliviae*, *S. parasitica*, *S. terrestris* i *S. unispora*. U ovom istraživanju identificiran je jedan izolat kao vrsta *S. australis* koja spada u monofiletsku grupu 4 (Dieguez-Uribeondo, 2007). Vrsta *S. australis* često se, zbog jako sličnih morfoloških karakteristika, pogrešno odredi kao *S. delica* (monofiletska grupa 3), pa se te vrste u nekim istraživanjima smatraju kao dio jednog kompleksa (Johnson i sur., 2002). U ovom su istraživanju uspješno evolucijski razdvojene ove dvije vrste, no potrebno je provesti daljnja filogenetska istraživanja kako bi se bolje razjasnio taksonomski status i filogenetski odnos među trenutno opisanim vrstama.

Tri izolata oomiceta, jedan izoliran s uzoraka zaražene ribe, dva izolirani sa zamki postavljenih u vodi koja izlazi iz ribnjaka, identificirani su kao *Leptolegnia sp.* Oni su filogenetski usko povezani s vrstama *S. megasperma* i *S. turfosa*. Iako neka filogenetska istraživanja rod *Leptolegnia* odvajaju u zasebnu porodicu *Leptolegniaceae* odvojenu od porodice *Saprolegniaceae*, ovo filogenetsko istraživanje pokazuje da izolat, identificiran kao *Leptolegnia sp.*, vjerojatnije spada u porodicu *Saprolegniaceae*, nego *Leptolegniaceae*, a to isto su predložili u svojem istraživanju Sarowar i sur., (2001). Iako se iz zaražene ribe uspjelo izolirati i identificirati samo *Leptolegnia sp.*, to ne znači da ostali patogeni oomiceti koji uzrokuju saprolegniozu ne napadaju ribe u ribnjaku Belski dol. Mogući razlozi zašto se ostali uzročnici saprolegnioze nisu jasnije identificirali na zaraženoj ribi su: (i) u ribnjaku se koriste kemijska sredstva protiv oomikoza na koju su *Leptolegnia sp.* otporne, dok drugi uzročnici oomikoza nisu; (ii) imunološki sustav riba je još dovoljno jak da onemogući rast svim uzročnicima oomikoza, osim *Leptolegnia sp.*; (iii) za vrijeme uzgoja oomiceta na hranjivoj podlozi, početna količina *Leptolegnia sp.* je bila puno veća nego količina drugih oomiceta, pa su one prevladale druge oomicete; (iv) moguće da na zaraženoj ribi uopće nema uzročnika oomikoza koji se mogu detektirati PCR testom korištenim u ovom radu, već su se spore *Leptolegnia sp.*, koje se nalaze u vodi ribnjaka, u trenutku uzorkovanja sasvim slučajno kontaminirale uzorak. Smatram da bih se uzorci s lezija i škrge riba trebali ponovo analizirati, te bi se pomoću mikroskopa trebalo razlučiti

da li je doista samo *Leptolegnia sp.* prisutna u tim izolatima ili se također vide morfološke strukture drugih oomiceta. Budući da rezultati ovog istraživanja pokazuju da su oomicetni patogeni riba iz roda *Saprolegnia* i *Leptolegnia* prisutni u vodi iz ribnjaka, te u vodi koja izlazi iz ribnjaka, moguće je zaključiti o lošem upravljanju ribnjakom Belski dol. Trebalo bi dodatno ispitati: (i) prati li se u ribnjaku redovito zdravstveno stanje uzgajane ribe te uvjeti uzgoja, kao što su pH i temperatura vode; (ii) postoje li sustavi za filtraciju i dezinfekciju vode u ribnjaku, te vode koja ulazi i izlazi iz ribnjaka; (iii) čisti li se mulj i isušuje ribnjak nakon svakog intervala uzgoja ili infekcije; (iv) koriste li se kemijska antifungalna i/ili antibakterijska sredstva u ribnjaku.

Budući da je u ovom radu demonstrirana mogućnost primjene PCR testa za detekciju oomiceta na uzorcima genomske DNA izolirane iz čistih kultura izolata, potrebno je daljnjim istraživanjima ispitati uspješnost ove metode i na drugim vrstama uzoraka, primjerice uzoraka okolišne DNA (eng. *environmental DNA* – eDNA) iz vode, kao na primjeru detekcija biljnih oomicetnih patogena iz roda *Phytophthora* upotrebom eDNA iz tla (Català i sur., 2015). Daljnjem razrješenju filogenetskih odnosa pomoglo bi dizajniranje para početnica koje bi rezultirale dužim fragmentom ITS slijeda te korištenje dodatnih jezgrinih i/ili mitohondrijskih biljega koji evoluiraju sličnom ili većom brzinom. Tako su Keeratijarut i sur., (2015) razvili qPCR metodu za detekciju vrste *P. insidiosum* kod koje se za identifikaciju koriste specifični dijelovi gena koji kodira za ekso-1,3- β -38 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). Također, dobivene rezultate molekularno-filogenetskih analiza potrebno je povezati s analizom morfoloških značajki oomiceta i provjeriti mogu li se genski izolirane grupe povezati s eventualnim razlikama u morfologiji i anatomiji.

5. ZAKLJUČAK

1. Opisana PCR metoda identifikacije uzgojenih čistih kultura oomiceta pokazala se pouzdanom i učinkovitom za određivanje vrste oomiceta na molekularnoj razini, te bi se ona u budućnosti mogla koristiti za detekciju i praćenje patogenih oomiceta u ribnjacima.
2. U budućim istraživanjima trebalo bi proširiti analize na veći broj lokaliteta te analizirati veći broj jedinki po lokalitetu da bi se što točnije utvrdila rasprostranjenost vrsta oomiceta u Hrvatskoj.
3. Daljnjim istraživanjima potrebno je potvrditi primjenjivost ove metode identifikacije na različitim vrstama uzoraka, primjerice 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. Poželjno je također u buduću analizu uključiti i druge molekularne biljege te kreirati početnice, koji bi omogućili bolje rezriješavanje evolucijskih odnosa, te dobivene rezultate molekularno-filogenetičkih analiza povezati s analizom morfoloških značajki.

6. LITERATURA

1. Altinok I. i Kurt I. (2003) Molecular Diagnosis of Fish Diseases: a Review. *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* **3**, 131-138.
2. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
3. Baldauf S.L., Roger A.J., Wenk-Seifert I., Doolittle W.F. (2000) A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science* **290**, 972-977.
4. Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., Porter, J.M., Wojciechowski, M.F., Campbell, C.S. (1995) The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **82**, 247- 277.
5. Beakes G.W., Glockling S.L., Sekimoto S. (2012) The evolutionary phylogeny of the oomycete “fungi”. *Protoplasma* **249**, 3-19.
6. Bhattacharjee S., Hiller L.N., Liolios K., Win J., Kanneganti T.D., Young C., Kamoun S., Haldar K. (2006) The Malarial Host-Targeting Signal Is Conserved in the Irish Potato Famine Pathogen. *Plos. Pathog.* **2**, e50.

7. Bruno D. i P. Woo (2010) Fish Diseases and Disorders. Viral, Bacterial and Fungal Infections, 2. izd., CABI, Wallington, str. 669-720.
8. Cavalier-Smith T., Chao E.E.Y (2006) Phylogeny and megasystematics of phagotrophic heterokonts (Kingdom Chromista). *J. Mol. Evol.* **62**, 388-420.
9. 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**, e0119311.
10. Cvjetković B., Sever Z., Fabek S. (2016) Bolesti korijena u hidroponskom uzgoju i osvrt na parasite *Thielaviopsis basicola* (Berk. & Broome) Ferraris i *Pythium sp.* *Glasiło biljne zaštite* **16**, 548-556.
11. Daugelaite J., O' Driscoll A., Sleator R.D. (2013) An overview of Multiple Sequence Alignment and Cloud Computing in Bioinformatics. *ISRN Biomath.* **6**, 1-14.
12. 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*. *Mol. Cell. Probe.* **18**, 421-427.
13. De la Peña, L. D. (2002) Polymerase chain reaction (PCR) in disease diagnosis. *Seafdec Asian Aquacult.* **24**, 12-32.
14. Densmore C.L. i Green D.E. (2007) Diseases of Amphibians. *Ilar J.* **48**, 235-254.
15. Denona A. (2011) Utvrđivanje srodstvenih odnosa unutar tribusa *Alysseae* (*Brassicaceae*) analizom sekvenci ITS (diplomski rad), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Hrvatska.
16. Dieffenbach C. W., Lowe T. M. J., Dveksler G. S. (1993) General concepts for PCR primer design. *Genome Res.* **3**, 30-37.
17. Diéguez–Uribeondo J., Garcia M.A., Cerenius L., Kozubiková E., Bellesteros I., Windels C., Weiland C., Kator H., Söderhäll K., Martin M.P. (2009) Phylogenetic relationships among plant and animal parasites, and saprotrophs in *Aphanomyces* (Oomycetes). *Fungal Genet. Biol.* **46**, 365-376.
18. Diéguez–Uribeondo J., Fregeneda-Grandes J.M., Cerenius L., Perez-Iniesta E., Aller-Gancedo J.M., Telleria M.T., Martin M.P. (2007) Re-evolution of the enigmatic species complex *Saprolegnia diclina*-*Saprolegnia parasitica* based on morphological, physiological and molecular data. *Fungal Genet. Rep.* **44**, 585-601.

19. Earle G., Hintz W. (2014) New Approaches for Controlling *Saprolegnia parasitica*, the Causal Agent of a Devastating Fish Disease. *Trop. Life Sci. Res.* **25**, 101-109.
20. Fawke S., Doumane M., Schornack S. (2015) Oomycete interactions with plants: infection strategies and resistance principles. *Microbiol. Mol. Biol. R.* **79**, 263 – 280.
21. Fijan N. (2006): *Zaštita zdravlja riba*, 2. izd., Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Zagreb, str. 294-296.
22. Fry W.E., Grünwald N.J. (2010) Introduction to Oomycetes. *Plant Health Instr.*; <<https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/PathogenGroups/Pages/IntroOomycetes.aspx>> Pristupljeno 25. travnja 2019.
23. Gaulin E., Jacquet C., Dumas B., (2007) Root rot disease of legumes caused by *Aphanomyces euteiches*. *Mol. Plant Pathol.* **8**, 539-548.
24. Gouy M., Guindon S. i Gascuel O. (2010) SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* **27**, 221-224.
25. Grouffaud S., van West P., Avrova A.O., Birch P.R.J., Whisson S.C. (2008) Plasmodium falciparum and Hyaloperonospora parasitica effector translocation motifs are functional in Phytophthora infestans. *Microbiology* **154**, 3743-3751.
26. Hall T. (2011) BioEdit: An important software for molecular biology. *Gerf Bull. Biosci.* **2**, 60-61.
27. Hashish E., Merwad A., Elgaml S., Amer A., Kamal H., Elsadek A., Marei A., Sitohy M. (2018) Mycobacterium marinum infection in fish and man: epidemiology, pathophysiology and management; a review. *Vet. Quart.* **38**, 35-46.
28. Hatai K., Hoshiai G. (1993) Characteristics of Two *Saprolegnia* Species Isolated from Coho Salmon with Saprolegniosis. *J. Aquat.* **5**, 115-118.
29. Hatai K., Roza D., Nakayama T. (2000) Identification of lower fungi isolated from larvae of mangrove crab, *Scylla serrate*, in Indonesia. *Mycoscience* **41**, 565-572.
30. 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 Microbiol.* **9**, 180-184.

31. Huang T., Cerenius L., Söderhäll K. (1994) Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. *Aquaculture* **126**, 1-9.
32. Hogues T.J. i Grau C.R. (2013) Aphanomyces root rot or common root rot of legumes. *Plant Health Instr.* **4**, 33-36.
33. Holub E.B., Grau C.R., Parke J.L. (1991) Evaluation of the forma specialis concept in *Aphanomyces euteiches*. *Mycol. Res.* **95**, 147-157.
34. Hudspeth D.S.S, Nadler S.A, Hudspeth M.E.S (2000) A cox II molecular phylogeny of the Peronosporomycetes. *Mycologia* **92**, 674-684.
35. 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. *P. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 9436-9440.
36. Ivić D., Cvjetković B., Miličević T. (2006) Dynamics and intensity of apple disease development during its storage. *Poljoprivreda* **12**, 36-41.
37. Iwen P.C., Hinrichs S.H., Rupp M.E. (2002) Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Med. Mycol. J.* **40**, 87-109.
38. Johnson Jr. T. W., Seymour R. L., Padgett D. E. (2002) Biology and Systematics of the Saprolegniaceae, 1. izd., University of North Carolina, Wilmington, str. 1028.
39. Katoh K. i Standley D.M. (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 772-780.
40. Kageyama K., Suzuki M., Priyatmojo A., Oto Y., Ishiguro K., Suga H.A.T., Fukui H. (2003) Characterization and identification of asexual strains of *Pythium* associated with root rot of rose in Japan. *J. Phytopathol.* **151**, 485–491.
41. Karunasagar I, Karunasagar I, Raghunath P. (2016) Editorial: Ecology, Virulence, and Detection of Pathogenic and Pandemic *Vibrio parahaemolyticus*. *Front. Microbiol.* **16**, 155-156.
42. Lamour K.H., Win J., Kamoun S. (2007) Oomycete genomics: new insights and future directions. *FEMS Microbiol. Lett.* **274**, 1-8.
43. Lemey P., Rambaut A., Drummond A., Suchard M. (2009) Bayesian Phylogeography Finds Its Roots. *PloS Comput. Biol.* **5**, e1000520.

44. 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 Res. Spec. Publ.* **44**, 242-245.
45. Lévesque C. A. (2011) Fifty years of oomycetes - from consolidation to evolutionary and genomic exploration. *Fungal Divers.* **50**, 35-40.
46. Lone S.A. i Manohar S. (2018) *Saprolegnia parasitica*, A Lethal Oomycete Pathogen: Demands to be Controlled. *J. Infect. Mol. Biol.* **6**, 36-44.
47. Lovrenčić L. (2015) Molekularno-filogenetička i filogeografska analiza populacija vrste *Holandriana holandrii* (C. Pfeiffer, 1828) (Mollusca: Gastropoda) u Hrvatskoj (diplomski rad), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Hrvatska
48. Maguire I., Jelic M., Klobučar G.I., Grandjean F. (2016) Prevalence of the pathogen *Aphanomyces astaci* in freshwater crayfish populations in Croatia. *Dis. Aquat. Organ.* **118**, 45-53.
49. Mau B., Newton M., Larget B. (1999) Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. *Biometrics* **55**, 1-12.
50. Markovskaja S. (2006) Saprolegniaceae (Peronosporomycetes) in Lithuania. II. The genus *Saprolegnia*. *Bot. Lith.* **12**, 97-112.
51. Miller T. A., Rapp J., Wastlhuber 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. *Dis. Aquat. Organ.* **34**, 13-20.
52. Musters, W., Boon, K., Sande, C.A.F.M. van der, Heerikhuizen, H. van i Planta, R.J. (1990) Functional analysis of transcribed spacers of yeast ribosomal DNA. *EMBO J.* **9**, 3989-3996.
53. Nam B. i Choi Y. (2019) *Phytophthora* and *Pythium* Species (Oomycota) Isolated from Freshwater Environments of Korea. *Mycobiology* **47**, 261-272.
54. Nzugize J., Lyumugabe F., Busogoro J.P., Baudoin J.P. (2012) *Pythium* root rot of common bean: Biology and control methods. A review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **16**, 405-413.

55. Oidtmann B., Schaefer N., Cerenius L., Söderhäll K., Hoffmann R.W. (2004) Detection of genomic DNA of the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* (Oomycete) in clinical samples by PCR. *Vet. Microbiol.* **100**, 269-282.
56. Oidtmann B., Geiger S., Steinbauer P., Culas A., Hoffmann R. W. (2006) Detection of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish by polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Organ.* **72**, 53-64.
57. Paul N., Shum J., Le T. (2010) Hot Start PCR. *Methods Mol. Biol.* **630**, 301-318.
58. Phillips A.J., Anderson V.L., Robertson E.J., Secombes E.J., van West P. *Trends Microbiol.* **16**, 9-13.
59. Pearson W.R. (2014) An Introduction to Sequence Similarity (“Homology”) Searching. *Curr. Protoc. Bioinformatics* **42**, 33-49.
60. Philippe H., Brinkmann H., Lavrov D.V., Littlewood D.T.J., Manuel M., Baurain D. (2011) Resolving Difficult Phylogenetic Questions: Why More Sequences Are Not Enough. *PLoS Biol.* **9**, e1000602.
61. Pickering A.D., Christie P. (1980) Sexual differences in the incidence and severity of ectoparasitic infestation of the brown trout, *Salmo trutta*. *J. Fish Biol.* **16**, 669-683.
62. Posada D., Crandall K.A. (2001) Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations. *Proc Natl Acad Sci Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **98**, 13757-13762.
63. Rajalakshmi S. (2017) Different types of PCR techniques and its applications. *Int. J. Pharm., Chem. Biol. Sci.* **7**, 287-292.
64. 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**, e0190361.
65. Robold A, Hardham A.R. (2005) During attachment *Phytophthora* spores secrete proteins containing thrombospondin type 1 repeats. *Curr. Genet.* **47**, 307-315.
66. Ronquist F. i Huelsenbeck J.P. (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**, 1572–1574.
67. Sandoval-Sierra J.V., Martin M.P., Diéguez-Uribeondo J. (2014) Species identification in the genus *Saprolegnia* (Oomycetes): defining DNA-based molecular operational taxonomic units. *Fungal Biol.* **118**, 559-578.

68. Sarowar M.N., van den Berg A.H., McLaggan D., Young M.R., van West P. (2013) Saprolegnia strains isolated from river insects and amphipods are broad spectrum pathogens. *Fungal Biol.* **117**, 752-763.
69. 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. *Aquacult. Fish. Manage.* **4**, 105-113.
70. Schroeder K.L., Martin F.N., de Cock A.W.A.M., Lévesque C.A., Spies C.F.J., Okubara P.A., Paulitz T.C. (2013) Molecular Detection and Quantification of Pythium Species: Evolving Taxonomy, New Tools, and Challenges. *Plant Dis.* **97**, 4-20.
71. Sever Z., Miličević T. (2013) Bolesti uskladištenih gomolja krumpira. *Glasiilo biljne zaštite* **13**, 361-367.
72. Sinha A.K., Vashista B.R. (2007) Botany for degree students, S. Chand & Company Pvt. Ltd., New Delhi, str. 124-250
73. Sutton, J.C., Sopher, C.R., Owen-Going, T.N., Liu, W., Grodzinski, B., Hall, J.C., Benchimol, R.L. (2006) Etiology and epidemiology of Pythium root rot in hydroponic crops: current knowledge and perspectives. *Summa Phytopathol.* **32**, 307-321.
74. Söderhäll K., Cerenius L. (1998) Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 23-28.
75. 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.
76. Strunjak-Perović I., Topić Popović N. (1999) PCR kao dijagnostička metoda u akvakulturi. *Ribarstvo* **57**, 181-188.
77. Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res. Spec. Publ.* **25**, 4876-4882.
78. Torto-Alalibo T., Tian M., Gajendran K., Waugh W.E., van West P., Kamoun S. (2005) Expressed sequence tags from the oomycete fish pathogen *Saprolegnia parasitica* reveal putative virulence factors. *BMC Microbiol.* **2**, 45-46.
79. Tyler B.M. (2007) *Phytophthora sojae*: root rot pathogen of soybean and model oomycete. *Mol. Plant Pathol.* **8**, 1-8.

80. Tsui C.K.M, Marshall W., Yokoyama R., Honda D., Lippmeier J.C., Craven K.D., Berbee M.L. (2006) *Labryinthulomyces* phylogeny and its implications for the evolutionary loss of chloroplasts and gain of ectoplasmic gliding. *Mol. Phylogenet. Evol.* **50**, 129-140.
81. Van den Berg A.H., McLaggan D., Diéguez-Uribeondo J., Van West P. (2013) The impact of the water moulds *Saprolegnia diclina* and *Saprolegnia parasitica* on natural ecosystems and the aquaculture industry. *Fungal Biol. Rev.* **27**, 32-42.
82. Van West P., (2006) *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: New challenges for an old problem. *Mycologist* **20**, 99-104
83. Vujović T. (2019) Razvoj PCR-testa za detekciju patogena *Saprolegnia parasitica*, uzročnika saprolegnioze (znanstveni rad za natječaj Rektorova nagrada u akademskoj godini 2018/2019), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Hrvatska.
84. White, T.J., Bruns, T., Lee S. i Taylor J. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 1. izd., Academic Press, Inc., San Diego, str. 315-322.
85. Zattau W., McInnis T. (1987) Life cycle and mode of infection of *Leptolegnia chapmanii* (Oomycetes) parasitizing *Aedes aegypti*. *J. Invertebr. Pathol.* **50**, 134-145.

7. PRILOZI

Prilog 1. Čitavo višestruko sravnjenje slijedova nukleotida oomicetnih ITS regija gena za 5.8 rRNA od uzoraka oomiceta, koji su korišteni u ovom radu, te referentnih organizama.

