

# Raznolikost izolata roda *Saprolegnia* u hrvatskim pastrvskim uzgajalištima

---

**Straga, Ana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2025**

*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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:863561>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-04-02**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, veljača 2025.

Ana Straga

**RAZNOLIKOST IZOLATA RODA**  
***Saprolegnia* U HRVATSKIM PASTRVSKIM**  
**UZGAJALIŠTIMA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ane Bielen te uz pomoć dr. sc. Dore Pavić.

## 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

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

RAZNOLIKOST IZOLATA RODA *Saprolegnia* U HRVATSKIM PASTRVSKIM UZGAJALIŠTIMA

Ana Straga, univ. bacc. ing. biotechn., 0058216144

### Sažetak:

U ovom je radu metodom tipizacije višestrukih lokusa (engl. *multilocus sequence typing*, MLST) po prvi put analizirana genotipska raznolikost izolata roda *Saprolegnia* (*S. parasitica*, *S. australis*, *S. delica* i *S. ferax*) iz hrvatskih pastrvskih uzgajališta. Nađena je velika raznolikost genotipova (engl. *diploid sequence type*, DST), od kojih je većina bila opisana prvi put i specifična za lokaciju s koje je izolirana. Između pojedinih DST-ova iste vrste utvrđena je statistički značajna razlika u brzini radijalnog rasta micelija. Neki genotipovi (npr. DST7 vrste *S. parasitica*) nađeni su isključivo na životinjskom domaćinu, a drugi isključivo u vodi (npr. DST21 vrste *S. parasitica*). Temeljem toga može se pretpostaviti da neki genotipovi imaju veću virulenciju i predstavljaju veći rizik za pojavu od saprolegnioze u akvakulturnim postrojenjima.

**Ključne riječi:** MLST, genotipizacija, DST, saprolegnioza, pastrva

**Rad sadrži:** 57 stranica, 28 slika, 13 tablica, 69 literaturnih navoda, 4 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Ana Bielen

**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Dora Pavić

### Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Lidija Šver (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Ana Bielen (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (član)
4. prof. dr. sc. Jurica Žučko (zamjenski član)

**Datum obrane:** 26. veljače 2025.

## 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

**Graduate university study programme:** Molecular Biotechnology

### DIVERSITY OF *Saprolegnia* ISOLATES IN CROATIAN TROUT FARMS

Ana Straga, univ. bacc. ing. biotechn., 0058216144

#### **Abstract:**

In this study, the genotype diversity of *Saprolegnia* isolates (*S. parasitica*, *S. australis*, *S. delica* and *S. ferax*) from Croatian trout farms was analysed for the first time. The results of multilocus sequence typing (MLST) revealed a large diversity of genotypes (diploid sequence types, DSTs), most of which were described for the first time and were specific to the site where they were isolated. Significant differences in the mycelium growth rate were observed between different DSTs of the same species. Some genotypes (e.g. *S. parasitica* DST7) were found exclusively on the animal host, while others were found exclusively in water (e.g. *S. parasitica* DST21). Based on the results, it can be hypothesized that some genotypes have a higher virulence and therefore represent a higher risk for the occurrence of saprolegniosis in aquaculture systems.

**Keywords:** MLST, genotype, DST, trout, saprolegniosis

**Thesis contains:** 57 pages, 28 figures, 13 tables, 69 references, 4 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Ana Bielen, PhD, Associate professor

**Technical support and assistance:** Dora Pavić, PhD, Scientific Assistant

#### **Reviewers:**

1. Lidija Šver, PhD, Full professor (president)
2. Ana Bielen, PhD, Associate professor (mentor)
3. Andreja Leboš Pavunc, PhD, Associate professor (member)
4. Jurica Žučko, PhD, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** February 26<sup>th</sup>, 2025

## Popis kratica

AFLP	Polimorfizam duljine amplificiranog fragmenta (engl. <i>amplified fragment length polymorphism</i> )
ALTS1	Gen koji kodira alanil-tRNA sintetazu
COX1	Gen koji kodira podjedinicu 1 citokrom c oksidaze
ddPCR	Kapljični digitalni PCR (engl. <i>droplet digital PCR</i> )
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DST	Diploidni tip sekvence (engl. <i>diploid sequence type</i> )
eDNA	Okolišna DNA (engl. <i>environmental DNA</i> )
GLUT	Gen lokus koji kodira glutaminazu
ITS	(engl. <i>internal transcribed spacer</i> )
LAMP	(engl. <i>loop-mediated isothermal amplification</i> )
MLM	(engl. <i>maximum likelihood method</i> )
MLST	Tipizacija višestrukih lokusa (engl. <i>multilocus sequence typing</i> )
MOTUs	Molekularne operative taksonomske jedinice (engl. <i>molecular operational taxonomic units</i> )
MST	(engl. <i>Minimum Spanning Tree</i> )
NA	Nespecifična amplifikacija
NAD1	Gen koji kodira podjedinicu 1 NADH dehidrogenaze
nrDNA	Jezgrina ribosomska DNA (engl. <i>nuclear ribosomal DNA</i> )
NRS	Nema rezultata sekvenciranja
pb	Parovi baza

PCR	Lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
RAPD	Nasumično amplificirana polimorfna DNA (engl. <i>random amplified polymorphic DNA</i> )
RAMP	Nasumično amplificiran mikrosatelitni polimorfizam (engl. <i>random amplified microsatellite polymorphism</i> )
rDNA	Ribosomska DNA (engl. <i>ribosomal DNA</i> )
<i>RPB2</i>	Gen koji kodira podjedinicu B RNA-polimeraze II
RZE	(engl. <i>repeated zoospore emergence</i> )
<i>SHMT</i>	Gen koji kodira serin-hidroksimetil transferazu
SNP	Polimorfizam jednog nukleotida (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i> )
<i>TUBB</i>	Gen koji kodira beta-tubulin
qPCR	Kvantitativni PCR (engl. <i>quantitative ili real-time PCR</i> )



# Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>3</b>
2.1. ROD <i>Saprolegnia</i> (Saprolegniales, Oomycota).....	3
2.2. MORFOLOGIJA I ŽIVOTNI CIKLUS .....	4
2.2.1 Nesporno razmnožavanje.....	5
2.2.2 Spolno razmnožavanje .....	6
2.3. PATOGENEZA I EKOLOŠKI UTJECAJ.....	6
2.4. METODE IDENTIFIKACIJE I GENOTIPIZACIJE VRSTA IZ RODA <i>Saprolegnia</i> .....	9
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>14</b>
3.1. OPIS IZOLATA RODA <i>Saprolegnia</i> .....	14
3.2. TIPIZACIJA VIŠESTRUKIH LOKUSA (engl. <i>multilocus sequence typing</i> , MLST) LANČANOM REAKCIJOM POLIMERAZOM.....	15
3.3. ELEKTROFOREZA U AGAROSNOM GELU.....	17
3.4. IZOLACIJA DNA IZ AGAROSNOG GELA .....	17
3.5. SEKVENCIRANJE I ANALIZA SEKVENCI.....	19
3.6. STATISTIČKA ANALIZA UTJECAJA DIPLOIDNOG TIPA SEKVENCE NA BRZINU RASTA MICELIJA .....	20
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>21</b>
4.1. MLST-SHEMA KAO ALAT ZA GENOTIPIZACIJU VRSTA IZ RODA <i>Saprolegnia</i> ...	21
4.2. RAZNOLIKOST IZOLATA VRSTE <i>Saprolegnia parasitica</i> .....	24
4.3. RAZNOLIKOST IZOLATA VRSTE <i>Saprolegnia australis</i> .....	34
4.4. RAZNOLIKOST IZOLATA VRSTE <i>Saprolegnia delica</i> .....	41
4.5. RAZNOLIKOST IZOLATA VRSTE <i>Saprolegnia ferax</i> .....	46
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>51</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>52</b>
<b>7. PRILOZI.....</b>	<b>58</b>

## 1. UVOD

Mikroorganizmi iz roda *Saprolegnia* predstavljaju velik problem u salmonidnoj akvakulturi i slatkovodnim ekosustavima (Lindholm-Lehto i Pylkkö, 2024; Lone i Manohar, 2018; van den Berg i sur., 2013; Bruno i sur., 2011). Uzrokuju bolest saprolegniozu kod širokog raspona domaćina, uglavnom riba u svim stadijima razvoja, od jaja do odrasle jedinke (Lindholm-Lehto i Pylkkö, 2024; Ferguson 2023; Elameen i sur., 2021; Pavić i sur., 2021; Bruno i sur., 2011). Zbog manjka učinkovitih mjera prevencije i tretmana, bolest uzrokuje masovne pomore riba i tako dovodi do velikih ekonomskih i ekoloških gubitaka (Lindholm-Lehto i Pylkkö, 2024; Lone i Manohar, 2018; van den Berg i sur., 2013; Bruno i sur., 2011).

Unatoč velikim štetama, epidemiološka istraživanja ovog roda su i dalje malobrojna. Dosad su različiti autori pokazali da postoji značajna razlika u virulenciji između različitih vrsta roda *Saprolegnia* (Songe i sur., 2016; Stueland i sur., 2005; Hussein i Hatai, 2002) no uočene su razlike i unutar same vrste (Engblom i sur., 2023; Hardy i sur., 2023; Elameen i sur., 2021). Osim razlika u virulenciji, uočena je i preferencija različitih *Saprolegnia* spp. prema određenoj vrsti domaćina ili njegovom razvojnem stadiju (ikra, mlađ, odrasle jedinke) te vodi kao staništu (Eszterbauer i sur., 2025; Shreves i sur., 2024; Matthews i sur., 2021; Tedesco i sur., 2021; Sarowar i sur., 2013; van den Berg i sur., 2013; Cao i sur., 2012), kao i razlike u brzini radijalnog rasta micelija (Bangyeekhun i sur., 2001). Ovi rezultati sugeriraju na postojanje specifičnih sojeva veće virulencije pa bi se u ribnjacima moglo uvesti njihovo ciljano praćenje i kontrola.

Razvoj brzih i reproducibilnih metoda identifikacije jedan je od glavnih preduvjeta za provođenje daljnjih istraživanja ovog roda (Pavić i sur., 2021; Sarowar i sur., 2019; Ravasi i sur., 2018). U posljednje je vrijeme razvijen veći broj molekularnih metoda za detekciju vrste *S. parasitica* koja je jedna od najopasnijih i najčešćih uzročnika epidemija saprolegnioze (Lindholm-Lehto i Pylkkö, 2024; Sarowar i sur., 2019; Lone i Manohar, 2018; Sandoval-Sierra i sur., 2014a; van den Berg i sur., 2013). Identifikacija se može provoditi direktno iz okolišnih uzoraka (npr. iz vode ili brisova kože) koristeći LAMP test (engl. *loop-mediated isothermal amplification*; Ghosh i sur., 2021) i multiplex PCR test (engl. *polymerase chain reaction*; Chanu i sur., 2022). Razvijeni su i qPCR test (engl. *quantitative ili real-time PCR*, kvantitativni PCR; Korkea-aho i sur., 2022; Rocchi i sur., 2017) i ddPCR test (engl. *droplet digital PCR*, kapljični digitalni PCR; Pavić i sur., 2022), koji omogućuju točnu kvantifikaciju patogena u uzorcima. Ovi testovi bazirani su na specifičnoj amplifikaciji ITS (engl. *internal transcribed spacer*) regije rDNA (engl. *ribosomal DNA*, ribosomska DNA) te omogućuju pouzdano praćenje patogena u okolišu i akvakulturi bez dugotrajnog uzgoja čistih kultura izolata.

Međutim, metode za razlikovanje genotipova unutar roda *Saprolegnia* puno su slabije razvijene. Metoda tipizacije višestrukih genskih lokusa (engl. *multilocus sequence typing*, MLST) nedavno je razvijena za vrstu *Saprolegnia parasitica* (Ravasi i sur., 2018), koja se najčešće povezuje s pojavom saprolegnioze u akvakulturi (Eszterbauer i sur., 2025; Engblom i sur., 2023; Mirmazloomi i sur., 2022; Elameen i sur., 2021; Pavić i sur., 2021). Metoda je, osim u Švicarskoj, nedavno primijenjena za istraživanje raznolikosti i rasprostranjenosti različitih genotipova ove vrste u Finskoj i u Mađarskoj (Engblom i sur., 2023; Erdei i sur., 2023.

U ovom istraživanju MLST-metoda primijenjena je za genotipizaciju 110 izolata vrsta *Saprolegnia parasitica*, *Saprolegnia australis*, *Saprolegnia delica* i *Saprolegnia ferax* porijeklom iz hrvatskih pastrvskih ribnjaka. Cilj istraživanja bio je ispitati raznolikost genotipova na ovom području te utvrditi postoji li povezanost određenog genotipa (DST, engl. *diploid sequence type*) s fenotipskim karakteristikama izolata (brzinom radijalnog rasta micelija) te lokacijom prikupljanja uzorka, kao i preferencijom životinjskog domaćina (i njegova razvojnog stadija) u odnosu na vodeni medij.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. ROD *Saprolegnia* (Saprolegniales, Oomycota)

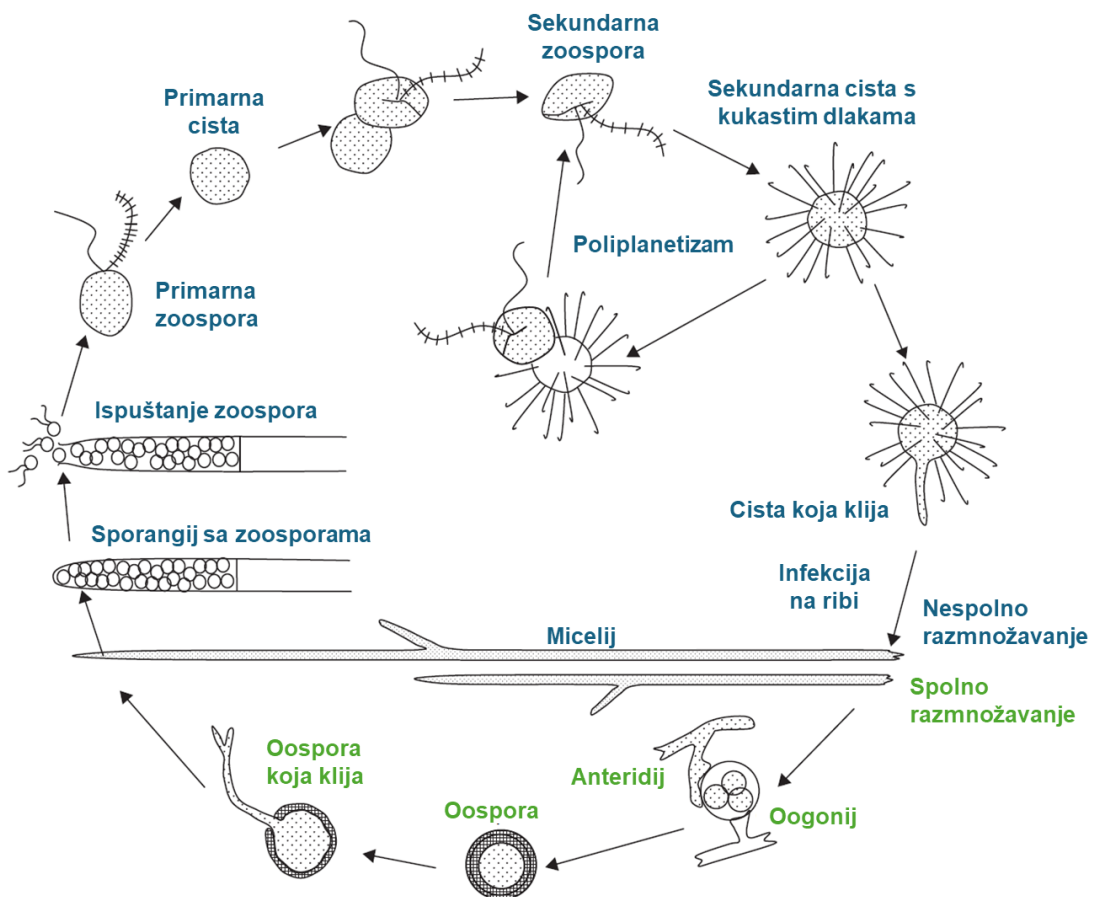
Vrste roda *Saprolegnia* pripadaju monofiletskom redu Saprolegniales u razredu Oomycota (Masigol i sur., 2023; Bruno i sur., 2011; van West, 2006). Ovaj razred je tradicionalno poznat pod nazivom „vodene plijesni“ (Lindholm-Lehto i Pytkkő, 2024; Masigol i sur., 2023; Lone i Manohar, 2018; Van den Berg i sur., 2013; Bruno i sur., 2011) i pripada skupini Stramenopila (Heterokonta) čije je zajedničko obilježje da neke faze životnog ciklusa (u ovom slučaju zoospore) posjeduju dva različita biča (Costa i Lopes, 2022; Beakes i sur., 2012). Vodene plijesni su ranije bile svrstane u carstvo gljiva (Fungi) zbog sličnosti ove dvije skupine u morfologiji (rast u obliku micelija) i ekologiji (saprotrofni ili parazitski način života) (Steciov i sur., 2014; van den Berg i sur., 2013; Beakes i sur., 2012; Bruno i sur., 2011). Razvojem molekularnih tehnika klasifikacija ovog razreda se značajno promijenila te se zna da su vodene plijesni srodnije smeđim algama i algama kremenjašicama nego gljivama pa su premiještene u supergrupu TSAR carstva protista (Protista, Chromista) (Masigol i sur., 2023; Costa i Lopes, 2022; Derelle i sur., 2016; Beakes i sur., 2012). TSAR je akronim naziva grupa koje čine ovu supergrupu (Telonemia, Stramenopila (Heterokonta), Alveolata i Rhizaria) (Burki i sur., 2020), a oomicete se nalaze unutar klade Stramenopila te njene podskupine Gyrista (Pseudofungi) (Derelle i sur., 2016; Steciow i sur., 2014).

No proučavanje i revizija sistematike vrsta roda *Saprolegnia* i dalje traju. Molekularna identifikacija temeljena na sekvenci DNA je trenutno najučinkovitija metoda za razjašnjenje filogenije vrsta ovog roda (Verebelyi i sur., 2024; Costa i Lopes, 2022), a kao marker za njihovu identifikaciju najčešće se koristi ITS regija nrDNA. Međutim, jedan od nedostataka je da GenBank baza podataka sadrži sekvence kojima su pogrešno dodijeljena imena vrsta (Costa i Lopes, 2022; Lone i Manohar, 2018; Sandoval-Sierra i sur., 2014a). Iz tog su razloga Sandoval-Sierra i sur. (2014a) revidirali unose *Saprolegnia* spp. u GenBank bazi podataka korištenjem molekularnih operativnih taksonomskih jedinica (MOTUs, engl. *molecular operational taxonomic units*) kao markera za identifikaciju vrsta. Njihova analiza obuhvatila je 961 sekvencu ITS regije nrDNA (500 iz GenBank baze, 461 iz čistih kultura), a rezultirala je određivanjem 29 MOTU-a, od kojih se 18 podudara s prethodno opisanim vrstama, a preostalih 11 potencijalno predstavlja nove vrste. Ovaj identifikacijski sustav predstavlja važan temelj za daljnju upotrebu ITS nrDNA kao regije za odgovarajuću identifikaciju *Saprolegnia* vrsta. A nove vrste, poput nedavno opisane vrste tako *Saprolegnia velencensis* (Verebelyi i sur., 2024), opisuju se i danas. *Saprolegnia parasitica* i *Saprolegnia diclina* koje uzrokuju velike gubitke u akvakulturi diljem svijeta su najpoznatije i najčešće vrste iz ovog roda

(Lindholm-Lehto i Pylkkö, 2024; Lone i Manohar, 2018; van den Berg i sur., 2013). Na području Hrvatske, u pastrvskim ribnjacima, su dosad zabilježene četiri vrste roda *Saprolegnia* (*S. australis*, *S. delica*, *S. ferax* i *S. parasitica*), a najzastupljenije su bile *S. parasitica* (53 uzorka) i *S. australis* (52 uzorka) (Pavić i sur., 2021).

## 2.2. MORFOLOGIJA I ŽIVOTNI CIKLUS

Vrste roda *Saprolegnia*, kao i druge vodene plijesni, imaju složen životni ciklus (slika 1). Karakterizira ga nesporno razmnožavanje putem sporangija i zoospora te spolno razmnožavanje pomoću oospora (Lone i Manohar, 2018; van den Berg i sur., 2013; Bruno i sur., 2011). Smatra se da je proizvodnja zoospora u nespornoj fazi životnog ciklusa roda *Saprolegnia* odgovorna za pronalazak novih domaćina, dok spolno razmnožavanje omogućava preživljavanje u nepovoljnim uvjetima (visoke temperature, nedovoljna vlažnost) (van den Berg i sur., 2013).



**Slika 1.** Shematski prikaz životnog ciklusa *Saprolegnia* spp. (prema Bruno i sur., 2011)

Patogeni pripadnici roda *Saprolegnia* na tijelu domaćina tvore bijelo-sivi mrežasti micelij koji se sastoji od hifa koje se granaju i šire po tijelu inficirane životinje. Hife su široke oko 10  $\mu\text{m}$  i aseptirane, a stijenka im je građena od celuloze obogaćene  $\beta$ -(1-3) i  $\beta$ -(1-6) glukanom. Za razliku od gljiva, u sastavu staničnih stijenki hifa nema hitina (Lindholm-Lehto i Pylkkö, 2024; van den Berg i sur., 2013).

### 2.2.1 Nespolno razmnožavanje

Nespolna faza razmnožavanja započinje nastankom zoospora u sporangiju. Sporangiji su strukture u obliku malog proširenja koje se formiraju na krajevima hifa. Od hife su odvojeni bazalnim septama, a unutar njih se nakuplja citoplazma i jezgre od kojih nastaju zoospore (Lindholm-Lehto i Pylkkö, 2024; van den Berg i sur., 2013). Formirane zoospore ispuštaju se u okoliš na poticaj specifičnih okidača. To može biti primjerice nedostatak hranjivih tvari ili nagli pad temperature (Lindholm-Lehto i Pylkkö, 2024; Lone i Manohar, 2018; van den Berg i sur., 2013). Vrh sporangija se razgrađuje i oslobađa jednostanične primarne zoospore koje imaju dva biča. One ne plivaju na velike udaljenosti nego već nakon par minuta prelaze u primarne ciste tako što odbace bičeve i formiraju staničnu stijenku. Ciste nakon nekog vremena pucaju i oslobađaju nove biflagelatne zoospore (sekundarne zoospore) (Lindholm-Lehto i Pylkkö, 2024; Lone i Manohar, 2018; van den Berg i sur., 2013; Bruno i sur., 2011). U mnogim infekcijskim studijama nije jasno koji se stadij aseksualnih spora koristi, primarne ili sekundarne, pa se često sve aseksualne spore jednostavno nazivaju zoosporama (Bruno i sur., 2011).

Kod nekih vrsta, kao što su *S. parasitica* i *S. diclina*, sekundarne zoospore mogu prolaziti uzastopne cikluse ponovnog nastanka cista i oslobađanja novih zoospora. Taj se proces naziva poliplanetizam ili RZE (engl. *repeated zoospore emergence*) i smatra se da je oblik prilagodbe parazitskom načinu života zato što omogućava nekoliko pokušaja za pronalazak i kolonizaciju pogodnog domaćina (Lone i Manohar, 2018; van den Berg i sur., 2013; Bruno i sur., 2011). Sekundarne zoospore pokazuju veliki taksijski odgovor na različite čimbenike (npr. pH, kemijski spojevi). Primjerice, za neke zoospore iz roda *Saprolegnia* je pokazano kako ih privlače nutrijenti koji se oslobađaju iz uginulih jaja pa plivaju u tom smjeru (van den Berg i sur., 2013).

Sekundarne zoospore smatraju se glavnim pokretnim stadijem u životnom ciklusu *Saprolegnia* spp. Ostaju aktivne kroz dulje vrijeme, sve dok ne pronađu prikladnog domaćina ili supstrat, a kada se to dogodi prelaze u sekundarnu cistu (Lone i Manohar, 2018; Bruno i sur., 2011). Morfologija dlaka na cistama ovisi o vrsti roda *Saprolegnia* jer se razlikuju u duljini, debljini, gustoći i obliku (van den Berg i sur., 2013; Bruno i sur., 2011). Tako su snopovi

kukastih dlaka duljine od preko 2  $\mu\text{m}$  na sekundarnim cistama pouzdani marker za identifikaciju vrste *S. parasitica*. Smatra se da kukice služe za prihvaćanje na domaćina i/ili za usporavanje sedimentacije same ciste (Bruno i sur., 2011). Sekundarne ciste kliju u hife koje se dalje šire tijelom domaćina.

### 2.2.2 Spolno razmnožavanje

Spolno razmnožavanje vrsta roda *Saprolegnia* započinje stvaranjem specijaliziranih spolnih organa na vrhovima hifa, ženskog oogonija i muškog anteridija. Općenito, vrste iz porodice Saprolegniaceae koje se spolno razmnožavaju i izolirane su s ribljih domaćina su homotalične tj. sadrže i muške i ženske spolne strukture na jednom miceliju. Oplodnja započinje kada anteridij krene rasti prema oogoniju, nakon čega dolazi do stapanja ovih haploidnih struktura i nastanka oospora. Nastale oospore obavijene su debelom stijenkom, što im omogućuje preživljavanje u teškim uvjetima, poput ekstremnih temperatura ili nedostatka vlage. Razlikuju se u broju, veličini i obliku, te su zajedno s oblikom anteridija i oogonija jedna od osnova za identifikaciju i klasifikaciju vrsta (Lindholm-Lehto i Pykkö, 2024; Lone i Manohar, 2018; van den Berg i sur., 2013; Bruno i sur., 2011). Klijanje oospora se obično odvija nakon razdoblja mirovanja te tako nastaje sporangij, čiji se protoplast dijeli u nekoliko zoospora, dovršavajući reproduktivni ciklus otprilike tri mjeseca od oplodnje (Lindholm-Lehto i Pykkö, 2024; Bruno i sur., 2011).

U laboratorijskim uvjetima se spolno razmnožavanje može potaknuti sniženjem temperature ili rastom u mediju siromašnom nutrijentima (van den Berg i sur., 2013). Primjerice, neki izolati vrste *S. parasitica* nakon 4 – 6 tjedana na suboptimalnim temperaturama mogu krenuti u spolni reproduktivni ciklus (Bruno i sur., 2011). Međutim, obično je vrlo izazovno potaknuti spolno razmnožavanje *in vivo*, a *in vitro* ponekad i gotovo nemoguće. Iz tog razloga najčešće nije moguće identificirati vrste na temelju morfoloških karakteristika njihovih spolnih struktura (van den Berg i sur., 2013).

## 2.3. PATOGENEZA I EKOLOŠKI UTJECAJ

Vrste iz roda *Saprolegnia* su sveprisutne u slatkovodnim ekosustavima te uglavnom žive saprofitskim načinom života (Lindholm-Lehto i Pykkö, 2024; Lone i Manohar, 2018). Međutim, neke su vrste razvile parazitski način života te mogu biti patogene za rakove, ribe, vodozemce i vodene kukce kod kojih uzrokuju bolest saprolegniozu (Lindholm-Lehto i Pykkö, 2024; Costa i Lopes, 2022; Lone i Manohar, 2018; Krugner-Higby i sur., 2010). Saprolegnioza

stvara velike štete u prirodnim staništima i akvakulturi jer dovodi do značajnog smanjenja populacija ovih organizama (Lindholm-Lehto i Pylkkö, 2024; Lone i Manohar, 2018; van den Berg i sur., 2013; Bruno i sur., 2011). Od riba su najčešće zahvaćene salmonidne vrste poput akvakulturno značajnih lososa i pastrve (Ferguson 2023; Elameen i sur., 2021), ali i nesalmonidne vrste poput smuđa, jegulje i soma (Pavić i sur., 2021). U salmonidnoj akvakulturi u zemljama s umjerenom klimom (sjeverozapadna Europa, Čile, Japan, Kanada) uglavnom su zabilježene infekcije vrstama *S. parasitica* i *S. diclina* (Lone i Manohar, 2018; van den Berg i sur., 2013). Smatra se da su vrste roda *Saprolegnia* na globalnoj razini odgovorne za najmanje 10 % svih ekonomskih gubitaka za salmonidne vrste, a u nekim slučajevima gubici u akvakulturi mogu iznositi i do 50 % cjelogodišnjeg uzgoja (van den Berg i sur., 2013; Bruno i sur., 2011).

Parazitske vrste se uglavnom smatraju oportunističkim patogenima koji inficiraju domaćina u stresnim uvjetima, međutim, neka istraživanja pokazuju da određeni sojevi vrste *S. parasitica* mogu uzrokovati i primarne infekcije (Pavić i sur., 2021; Bruno i sur., 2011). Ove vodene plijesni mogu inficirati ribe u svim razvojnim fazama (Lindholm-Lehto i Pylkkö, 2024; Bruno i sur., 2011), iako istraživanja pokazuju preferenciju nekih vrsta prema određenom razvojnom stadiju domaćina. Tako je utvrđeno da *S. parasitica* primarno inficira odrasle ribe (Tedesco i sur., 2021), dok *S. ferax* i *S. diclina* uglavnom inficiraju njihova jaja (van den Berg i sur., 2013). Patogen primarno zahvaća epidermalno tkivo pa su inficirane ribe prekrivene bijelo-sivim micelijem kružnog oblika najčešće u području oko glave, škrge te leđne i repne peraje, od kud se infekcija širi u unutrašnjost tijela (Lindholm-Lehto i Pylkkö, 2024; Magray i sur., 2019; Bruno i sur., 2011). Najčešća mjesta penetracije hifa su već postojeće rane ili mjesta infekcije uzrokovana drugim patogenima i parazitima, dok su zdrave ribe pod relativno niskim rizikom od oboljenja saprolegniozom (Lone i Manohar, 2018; van den Berg i sur., 2013). Nakon što zaraze domaćina, vrste roda *Saprolegnia* prenose svoje efektorske proteine u stanice njegova tkiva što suprimira imunosni odgovor (Lindholm-Lehto i Pylkkö, 2024; Sarowar i sur., 2019). Kako infekcija napreduje zahvaća mišićni sloj, krvne žile i unutarnje organe te uništava epidermis i ostala zahvaćena tkiva zbog proteolitičke aktivnosti enzima iz hifa (Lindholm-Lehto i Pylkkö, 2024; Engblom i sur., 2023). Završni stadiji infekcije uključuju poremećenu osmoregulaciju (zbog razrjeđenja krvi kao posljedice rana na velikoj površini tijela), respiratorno zatajenje (zbog opsežne infekcije škrge) i u rjeđim slučajevima zatajenje unutrašnjih organa (Lindholm-Lehto i Pylkkö, 2024; Lone i Manohar, 2018; van den Berg i sur., 2013).

Na ikri se bolest očituje rastom micelija na površini i u unutrašnjosti što uglavnom uzrokuje odumiranje zaraženih jaja (Lindholm-Lehto i Pylkkö, 2024; Hardy i sur., 2023; Elameen i sur., 2021). Veličina jaja je važan čimbenik koji utječe na razvoj infekcije: manja jaja



se brže inficiraju (Lone i Manohar, 2018; van den Berg i sur., 2013). U uzgajalištima se najčešće događa da vrste iz roda *Saprolegnia* prvo inficiraju uginula jaja te se s njih onda prošire na okolna živa jaja (van den Berg i sur., 2013). Postoje i indikacije da različite vrste roda *Saprolegnia* koriste različite mehanizme za infekciju jaja. Primjerice, *S. diclina* uzrokuje razgradnju korionske membrane koja regulira osmozu embrija, dok *S. parasitica* može prodrijeti direktno kroz nju (Hardy i sur., 2023; Mirmazloomi i sur., 2022; Songe i sur., 2016).

Točni uzroci izbijanja epidemija saprolegnioze su i dalje nepoznati, no povezuju se s različitim stresorima kao što su loša kvaliteta vode, velika gustoća riba, temperaturne varijacije, pothranjenost, smanjena koncentracija otopljenog kisika, fizičke ozljede, bakterijske i gljivične infekcije te nepravovremeno uklanjanje uginule ribe i jaja iz ribnjaka (Lindholm-Lehto i Pylkkö, 2024; Ferguson, 2023; Bruno i sur., 2011). Bolest se najčešće javlja u zimskim mjesecima kada je temperatura vode niža zbog čega je imunost sustava riba oslabljen pa ovi oportunistički patogeni lakše inficiraju domaćina (Lindholm-Lehto i Pylkkö, 2024; Engblom i sur., 2023; Bruno i sur., 2011). U različitim *in vitro* istraživanjima analiziran je učinak fizikalno-kemijskih parametara vode na vijabilnost različitih faza životnog ciklusa vrsta roda *Saprolegnia*, uglavnom *S. parasitica*. Tako je uočeno da je pri temperaturama višim od 20 °C proizvodnja zoospora smanjena, a pH < 4 inhibira njihovo klijanje. Povećana koncentracija NaCl (> 1,75 %) inhibira rast patogena iz roda *Saprolegnia* (Lindholm-Lehto i Pylkkö, 2024), a povećana koncentracija Ca<sup>2+</sup> ga stimulira (pozitivno utječe na adheziju, nastanak i klijanje cista; Pavić i sur., 2022). Povišene razine organske tvari i dušikovih spojeva, poput amonijaka i nitrita, povezane su s povećanom osjetljivošću riba na infekcije, ali i s intenzitetom sporulacije vrste *S. parasitica* (Lindholm-Lehto i Pylkkö, 2024; Pavić i sur., 2022).

Do nedavno, najučinkovitije sredstvo za tretiranje saprolegnioze bilo je malahitno zelenilo. Međutim, njegova je uporaba u proizvodnji ribe namijenjene ljudskoj prehrani zabranjena 2002. godine diljem svijeta (Lindholm-Lehto i Pylkkö, 2024; van West, 2006) zbog toga što njegov reducirani oblik ima karcinogene, teratogene i mutagene učinke (Tedesco i sur., 2019). Alternativni preparati za suzbijanje saprolegnioze su formalin, vodikov peroksid, ozon, NaCl, borna kiselina, bakrov sulfat i drugi no njihova učinkovitost ne može se usporediti s malahitnim zelenilom. Osim toga, većina ovih spojeva također može predstavljati rizik za ljudsko zdravlje i okoliš ili biti skupa i nepraktična za upotrebu u akvakulturnim uvjetima (Lindholm-Lehto i Pylkkö, 2024; Tedesco i sur., 2019). Preventivne mjere koje se ponekad koriste za smanjenje pojavnosti saprolegnioze uključuju kontrolu glavnih čimbenika koji utječu na rast patogena iz roda *Saprolegnia* poput temperature, saliniteta, koncentracije Ca<sup>2+</sup> iona i kvalitete vode.

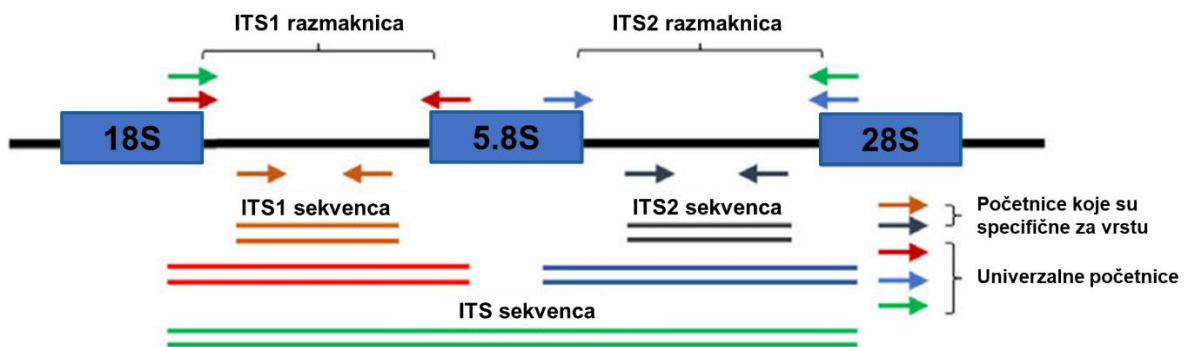
## 2.4. METODE IDENTIFIKACIJE I GENOTIPIZACIJE VRSTA IZ RODA *Saprolegnia*

S obzirom na gore opisane manjkavosti metoda liječenja i prevencije bolesti, važno je identificirati vrste i sojeve roda *Saprolegnia* uključene u izbijanje bolesti. Ranije su demonstrirane razlike u virulenciji i rasponu domaćina između različitih vrsta roda *Saprolegnia* (Songe i sur., 2016; Stueland i sur., 2005; Hussein i Hatai, 2002), no uočene su razlike i među različitim izolatima iste vrste (Hardy i sur., 2023; Elameen i sur., 2021; Matthews i sur., 2021; Thoen i sur., 2011). Stoga je identifikacija i detekcija visokovirulentnih vrsta i sojeva jedan od prvih koraka ka razvoju specifičnih mjera prevencije i kontrole kako bi se smanjila učestalost i težina epidemija te optimizirala održivost proizvodnje i zdravlje riba (Sarowar i sur., 2019; Ravasi i sur., 2018). Danas dostupne metode identifikacije vrsta i genotipova unutar roda *Saprolegnia* variraju od morfoloških do molekularnih te se mogu primijeniti na čistim kulturama, ali i na uzorcima DNA izoliranim iz domaćina ili iz okoliša (okolišna DNA, engl. *environmental DNA*; eDNA).

Tradicionalno se klasifikacija vrsta unutar roda *Saprolegnia* provodila na temelju morfoloških karakteristika čistih kultura izolata, kao što su struktura sporangija i način oslobađanja zoospora te karakteristike seksualnih reproduktivnih struktura. Međutim, morfološka identifikacija zahtijeva mnogo vremena i visoko obučene stručnjake te ima značajne nedostatke (Lone i Manohar, 2018; van den Berg i sur., 2013; Bruno i sur., 2011). Seksualne reproduktivne strukture često nije moguće uzgojiti u *in vitro* uvjetima (Shreves i sur., 2024; Erdei i sur., 2023; Masigol i sur., 2020; Lone i Manohar, 2018; van den Berg i sur., 2013), a ako se i uzgoje, njihova morfologija može biti varijabilna te se preklapati među vrstama (Masigol i sur., 2020; Sandoval-Sierra i Dieguez-Uribeondo, 2015). Stoga se danas uglavnom koriste molekularne metode identifikacije vodenih plijesni (Erdei i sur., 2021; Lone i Manohar, 2018; van den Berg i sur. 2013).

Najčešće korištena metoda identifikacije vrsta, koju primjenjuju mnogi autori (Eszterbauer i sur., 2025; Pires-Zottarelli i sur., 2024; Shreves i sur., 2024; Engblom i sur., 2023; Erdei i sur., 2023; Hardy i sur., 2023; Pavić i sur., 2021; Ravasi i sur., 2018), je lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) uz korištenje univerzalnih početnica koje amplifiraju ITS (engl. *internal transcribed spacer*) regiju rDNA (slika 2). Ova visoko očuvana regija duljine oko 700 pb (za *Saprolegnia* spp.) nalazi se između 18S i 28S rDNA i uključuje 5.8S rDNA sekvencu (slika 2). Nakon sekvenciranja izolat se može identificirati usporedbom dobivene sekvence sa sekvencama u javno dostupnim bazama podataka kao što je GenBank (Pires-Zottarelli i sur., 2024; Erdei i sur., 2023; Mirmazloomi i sur., 2022; Masigol i sur., 2020; Sarowar i sur., 2019; Sandoval-Sierra i sur., 2014a; van den Berg i sur., 2013). Međutim, poznato je da javne baze podataka sadrže pohranjene referentne

sekvence koje u sebi nose pogreške ili je im vrsta pogrešno identificirana što može dovesti do pogrešne klasifikacije uzoraka (Engblom i sur., 2023; Erdei i sur., 2023; Pavić i sur., 2021; Sandoval-Sierra i sur., 2014a).



**Slika 2.** Shematski prikaz ITS (engl. *internal transcribed spacer*) regije (prema Orhan, 2021)

Nedavno je više istraživačkih grupa razvilo visoko osjetljive i specifične molekularne metode koje omogućuju detekciju *S. parasitica* izravno iz okolišnih uzoraka, čime se može zaobići dugotrajan uzgoj čistih kultura izolata. Ove metode se također temelje na ITS sekvencama, ali se početnice dizajniraju tako da specifično umnažaju DNA ciljne vrste, odnosno vežu se na varijabilni dio ITS regije (slika 2). Na primjer, nedavno je razvijen LAMP (engl. *loop-mediated isothermal amplification*) test koji omogućuje vrlo osjetljivu i brzu detekciju vrsta iz roda *Saprolegnia* spp. na terenu (Ghosh i sur., 2021). Nedostatak ovog testa je što amplificira ITS fragment svih vrsta unutar roda *Saprolegnia*, iako su neke vrste, poput *S. parasitica*, mnogo štetnije od drugih (Sarowar i sur., 2019; Sandoval-Sierra i sur., 2014a; van den Berg i sur., 2013; Phillips i sur., 2008). Osim toga, nedavno je razvijen i multiplex PCR test za detekciju vrste *S. parasitica*, koji paralelno amplificira ITS regiju i gen hipotetičkog proteina koji sadrži visoko konzerviranu Puf (engl. *Pumilio-family*) RNA veznu domenu (Chanu i sur., 2022). Nova metoda pokazala je visoku specifičnost i osjetljivost (s granicom detekcije od 16 pg genomske DNA *S. parasitica*, no primjenjivost ovog protokola za detekciju patogena u okolišnim uzorcima (npr. uzorcima vode ili brisevima kože) tek treba testirati.

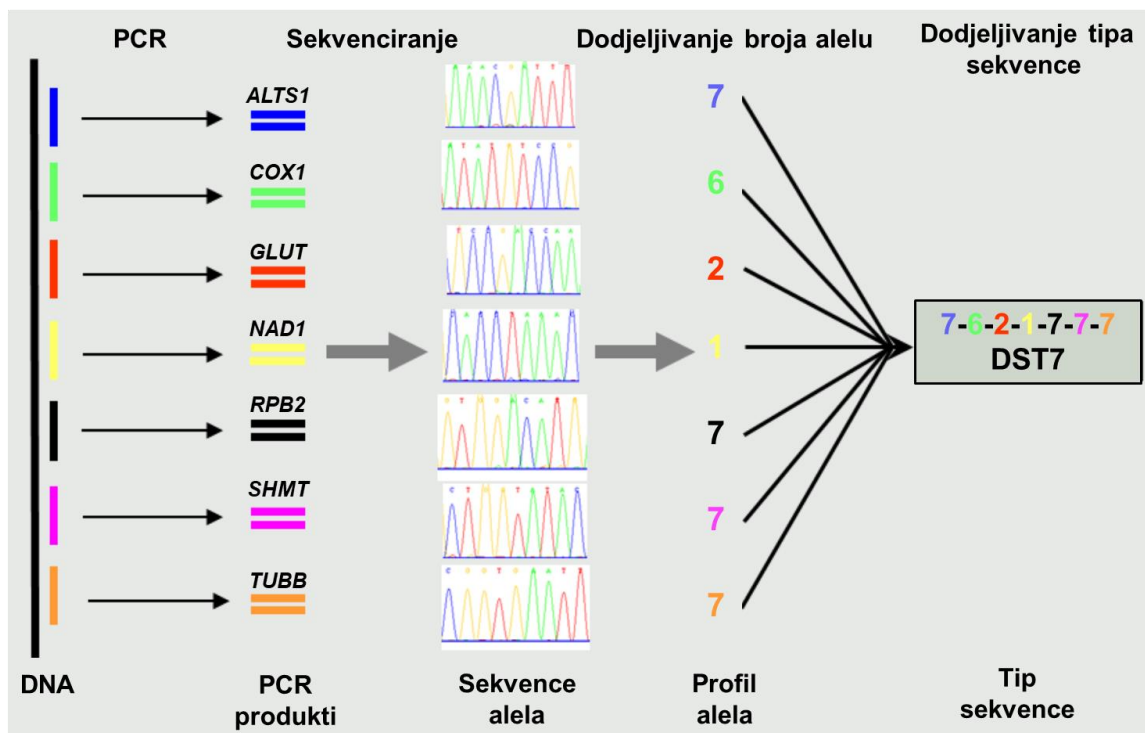
Nadalje, tehnike poput qPCR-a (engl. *quantitative* ili *real-time PCR*, kvantitativni PCR) i ddPCR-a (engl. *droplet digital PCR*, kapljični digitalni PCR) omogućuju točnu kvantifikaciju patogena (Pavić i sur., 2022; Rusch i sur., 2020; Davison i sur., 2017; Blaya i sur., 2016; Tuffs i Oidtmann, 2011). Rocchi i sur. (2017) su nedavno razvili visoko specifičan i osjetljiv qPCR test za detekciju vrste *S. parasitica* iz uzoraka vode i okoliša (Korkea-aho i sur., 2022), dok su Pavić i sur. (2022) razvili ddPCR test. Ovi praktični, brzi i pouzdani testovi olakšavaju nadzor

i praćenje patogena u okolišu i akvakulturi te na taj način doprinose smanjenju utjecaja saprolegnioze na riblje zajednice, no nedostatak im je da mogu precijeniti količine *S. parasitica* u okolišu jer test ne razlikuje da li je otkrivena DNA porijeklom iz vijabilnih zoospora ili fragmenata micelija.

Što se tiče karakterizacije i identifikacije genotipova vrsta iz roda *Saprolegnia*, do danas je tek nekoliko znanstvenih grupa pokušalo različitim metodama utvrditi postoje li genetske razlike na razini pojedine vrste roda *Saprolegnia*, uglavnom na vrsti *S. parasitica* koja uzrokuje najveće probleme u akvakulturi. Primjerice, Bangyeekhun i sur. (2001) su nasumičnom amplifikacijom polimorfne DNA (engl. *random amplified polymorphic DNA*, RAPD) među 19 izolata roda *Saprolegnia* iz države Mississippi uspjeli razlučiti tri genetski različite skupine od kojih neke perzistiraju na istom području već dulji niz godina. Naumann (2014) i de la Bastide i sur. (2018) koristili su degenerirane početnice za PCR koje sadrže kratke ponavljajuće sljedove za umnažanje mikrosatelitnih regija u DNA (engl. *random amplified microsatellite polymorphism*, RAMP). U svom istraživanju demonstrirali su da je genetska raznolikost izolata vrste *S. parasitica* iz uzgajališta u Britanskoj Kolumbiji (Kanada) vrlo mala, vjerojatno zbog česte razmjene ribe i jaja među mrijestilištima. Analiza polimorfizma duljine amplificiranog fragmenta (engl. *amplified fragment length polymorphism*, AFLP) korištena je za proučavanje genetske raznolikosti i odnosa vrsta roda *Saprolegnia* iz Kanade, Čilea, Japana, Norveške i Škotske (Elameen i sur., 2021). Izolati su grupirani na temelju broja vrpca amplificiranih svakim od šest setova početnica, što se podudaralo s grupiranjem prema patogenosti i sposobnosti produkcije oogonija sa i bez dugih kukastih dlaka, ali ne i s grupiranjem prema zemlji porijekla.

Prvu potpunu shemu za genotipizaciju izolata vrste *S. parasitica* razvili su Ravasi i suradnici (2018) koristeći metodu tipizacije višestrukih lokusa (engl. *multilocus sequence typing*, MLST). Ovom metodom uspoređuju se polimorfizmi jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) u pet do sedam visokoočuvanih genskih regija (održavateljski geni, engl. *housekeeping genes*). MLST-shema Ravasi i sur. (2018) koristi sedam održavateljskih gena: gen koji kodira za alanil-tRNA sintetazu (*ALTS1*), gen koji kodira za podjedinicu 1 citokrom c oksidaze (*COX1*), gen koji kodira za glutaminazu (*GLUT*), gen koji kodira za podjedinicu 1 NADH dehidrogenaze (*NAD1*), gen koji kodira za podjedinicu B RNA polimeraze II (*RPB2*), gen koji kodira za serin-hidroksimetil transferazu (*SHMT*) i gen koji kodira za beta-tubulin (*TUBB*). PCR-reakcijom amplificiraju se regije ovih gena duljine 480-650 pb kojima se zatim, sekvenciranjem po Sangeru, određuje točan redoslijed nukleotida. Dobivene sekvence iz iste regije se međusobno uspoređuju kako bi se identificirala polimorfna nukleotidna mjesta. Svakom jedinstvenom alelu dodjeljuje se broj, a kombinacije brojeva svih sedam gena čine diploidni tip sekvence (DST, engl. *diploid sequence type*) (slika 3). Ravasi i

sur. (2018) su ovom metodom uspjeli razlučiti 15 genotipova kod 77 izolata vrste *S. parasitica*. Izolati su prikupljeni s ribljeg domaćina (jezerska zlatovčica, atlantski losos, potočna zlatovčica, potočna pastrva, obična mrena, som, pijor, grgeč, lipljen, glavatica, štika, kalifornijska pastrva) na 22 lokacije u Švicarskoj, uključujući mrijestilišta, ribogojilišta, rijeke i jezera. Neki genotipovi, kao što je DST3, bili su rasprostranjeni diljem Švicarske (na 13 od 22 lokacije), dok su drugi (primjerice DST4, DST6 i DST13) nađeni samo u specifičnim riječnim slivovima ili lokacijama. DST3 je pronađen kod najvećeg broja epidemija saprolegnioze (16), dok su ostali pronađeni tek tijekom jednog do tri izbijanja bolesti. Analiza je također otkrila da neki genotipovi tvore klonalne komplekse (razlikuju se tek u jednom od sedam proučavanih lokusa) no nije bilo moguće odrediti genotip od kojeg su potekli. Osim toga, pokazano je da se dizajniranim parovima početnica mogu amplificirati i MLST geni drugih vrsta roda *Saprolegnia* (*S. australis*, *S. delica*, *S. diclina*, *S. ferax* i *S. litoralis*), uz određene iznimke, poput gena *ALTS1* kod vrsta *S. australis* i *S. litoralis*.



**Slika 3.** Shematski prikaz MLST-sheme za vrstu *S. parasitica* (prema Ruppitsch, 2016)

MLST-shema je, osim u Švicarskoj, nedavno primijenjena za istraživanje raznolikosti i rasprostranjenosti različitih genotipova vrste *S. parasitica* u Finskoj (Engblom i sur., 2023), Mađarskoj (Erdei i sur., 2023; Hardy i sur., 2023) i Kanadi (Sarowar i sur., 2019). U finskim salmonidnim uzgajalištima je na temelju analize šest gena iz sheme utvrđeno da većina izolata potječe od jednog glavnog klona (čine klonalni kompleks) te je uočeno čak 13 jedinstvenih

tipova sekvenci (ST, engl. *sequence type*). Erdei i sur. (2023) su detektirali šest genotipova (A-F) kod 19 izolata iz mađarskih mrjestilišta uspoređujući sekvence gena *RPB2* i *SHMT*, dok su sekvence preostalih gena bile gotovo identične među izolatima. Druga istraživanja bazirala su se na primjeni samo jednog markera iz razvijene sheme za utvrđivanje intraspecifičnih raznolikosti. Tako su Hardy i sur. (2023) na temelju gena *RPB2* uspjeli razlučiti tri izolata vrste *S. parasitica* sa 100 % identičnim ITS DNA sekvencama, dok su Sarowar i sur. (2019) na temelju gena *COX1* detektirali četiri genotipa vrste *S. parasitica* i dva vrste *S. ferax* iz salmonidnih uzgajališta u Kanadi.

U ovom istraživanju, MLST-metoda Ravasi i sur. (2018) primijenjena je kako bi se po prvi put analizirala genotipska raznolikost izolata različitih vrsta roda *Saprolegnia* na području Hrvatske.

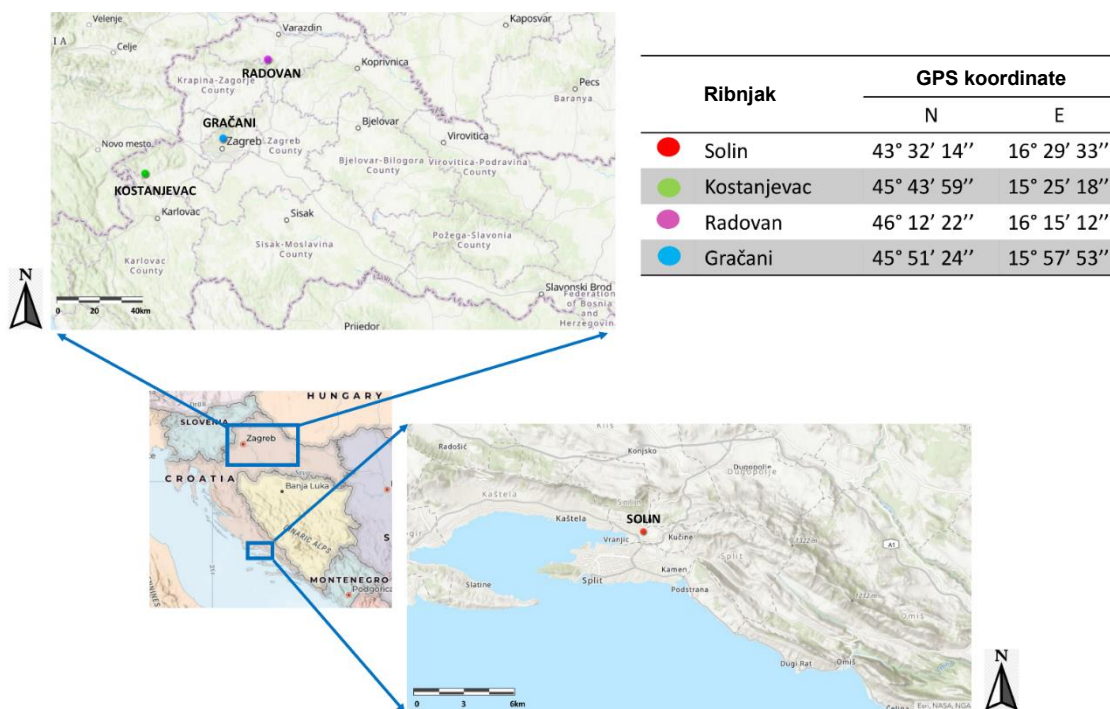
### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. OPIS IZOLATA RODA *Saprolegnia*

U ovom je radu genotipizirano 110 izolata roda *Saprolegnia* iz kolekcije izv. prof. dr. sc. Ane Bielen. Izolati su prikupljeni tijekom 2018. i 2019. godine na četiri ribogojilišta u Republici Hrvatskoj (slika 4) te identificirani do razine vrste sekvenciranjem ITS-regije, kako je detaljno opisano u radu Pavić i sur. (2021). Kolekcija vodenih plijesni je sadržavala:

- 38 izolata vrste *Saprolegnia parasitica*,
- 45 izolata vrste *Saprolegnia australis*,
- 20 izolata vrste *Saprolegnia delica*,
- i 7 izolata vrste *Saprolegnia ferax*.

U ribogojilištima Gračani, Radovan i Solin uzgaja se kalifornijska pastrva (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)), dok se u Kostanjevcu uzgaja potočna pastrva (*Salmo trutta* (Linneaus, 1758)) (Pavić i sur., 2021). Vodene plijesni su izolirane s domaćina (odrasle pastrve, ikra, ličinke) i iz vode u uzgajalištu te uzvodno i nizvodno od uzgajališta. U tablicama 1.A – 1.D u Prilogu navedene su šifre, vrste i razvojni stadiji domaćina te lokacije uzorkovanja za svaki analizirani izolat. Dodatne informacije o samom prikupljanju izolata, dobivanju i pohrani čistih kultura te postupku izolacije DNA opisane su u radu Pavić i sur. (2021). Pohranjena izolirana DNA iz tog istraživanja korištena je kao kalup za PCR-reakcije u ovom radu.



**Slika 4.** Karta Republike Hrvatske s prikazanim lokacijama ribnjaka na kojima je provedeno uzorkovanje vodenih plijesni (prema Pavić i sur., 2021)

### 3.2. TIPIZACIJA VIŠESTRUKIH LOKUSA (engl. *multilocus sequence typing, MLST*) LANČANOM REAKCIJOM POLIMERAZOM

Genotipska raznolikost izolata analizirana je metodom tipizacije višestrukih lokusa (engl. *multilocus sequence typing, MLST*) prema ranije razvijenoj shemi za vrstu *S. parasitica* (Ravasi i sur., 2018). Razvijena shema koristi sekvence sedam održavateljskih gena (engl. *housekeeping genes*) na temelju kojih se vrši genotipizacija, a ti geni su:

- *ALTS1* (gen koji kodira alanil-tRNA sintetazu),
- *COX1* (gen koji kodira podjedinicu 1 citokrom c oksidaze),
- *GLUT* (gen koji kodira glutaminazu),
- *NAD1* (gen koji kodira podjedinicu 1 NADH dehidrogenaze),
- *RPB2* (gen koji kodira podjedinicu B RNA polimeraze II),
- *SHMT* (gen koji kodira serin-hidroksimetil transferazu),
- i *TUBB* (gen koji kodira beta-tubulin).

Navedeni geni umnoženi su lančanom reakcijom polimerazom uz primjenu početnica i uvjeta definiranih u radu Ravasi i sur. (2018). U tablici 1 navedene su sekvence korištenih početnica te očekivane veličine amplikona za vrstu *S. parasitica*. Navedene su i sekvence koje označavaju početak i kraj svakog lokusa, kao i pripadajuće veličine lokusa. U tablici 2 naveden je sastav reakcijske smjese za PCR. U slučajevima kada amplifikacija nije bila uspješna (kada nije uočena vrpca na gelu ili je ona bila vrlo slabog intenziteta) koncentracija početnica u reakcijskoj smjesi povećana je s 0,2  $\mu\text{M}$  na 0,3  $\mu\text{M}$ , dok je volumen DNA kalupa povećan s 2  $\mu\text{L}$  na 4  $\mu\text{L}$ . Sve PCR-reakcije provedene su u uređaju Apha Cyler 1 (PCRmax, Ujedinjeno Kraljevstvo), a uvjeti su bili:

- početna denaturacija DNA 10 minuta pri 94 °C,
- 40 ciklusa amplifikacije:
  - denaturacija DNA 1 minutu pri 95 °C,
  - komplemetarno sparivanje početnica 1 minutu
    - pri 58 °C za gene *NAD1*, *RPB2* i *SHMT*,
    - pri 60 °C za gene *ALTS1*, *COX1* i *TUBB*,
    - pri 62 °C za gen *GLUT*,
  - sinteza DNA 1 minutu pri 72 °C,
- i završna sinteza DNA 7 minuta pri 72 °C.

Kao pozitivna kontrola korištena je DNA uzorka *Saprolegnia parasitica* CBS 233.65, a kao negativna kontrola destilirana voda.



**Tablica 1.** Sekvence oligonukleotidnih početnica korištenih za umnažanje fragmenata gena i karakteristike fragmenata za vrstu *S. parasitica* (prema Ravasi i sur., 2018)

Gen	Početnice F, uzvodna (engl. <i>forward</i> ) R, nizvodna (engl. <i>reverse</i> )	Veličina amplikona (pb)*	Početak (5') i kraj (3') lokusa**	Veličina lokusa (pb)***
<b>ALTS1</b>	F; CTA <sup>CTT</sup> CCAGCAGCATGAGC R; GACAAGGTTCCAGAGCTCC	552	AGGTCTTT, AGCGTCCT	515
<b>COX1</b>	F; AACCTGGAAATCAAATTTTTATGGG R; ATCACCTCCACCTGAAGGATCA	559	AAATCATC, ATACTTCA	508
<b>GLUT</b>	F; GGAGCGGCAGTCCATCAATC R; CGTCGACGGTGCACATGGAG	496	CATCAATC, CGCGTACG	445
<b>NAD1</b>	F; CCTAATGTTGTAGGTACTTTTTGG R; GAAACTAATTCAGCTTCAGCTT	523	GTAGGTAC, GATTTACC	491
<b>RPB2</b>	F; CGACCGCGATCACTATGG R; CGACACTTCGGCGTCAATGT	650	GATTTCCA, CATTGACG	505
<b>SHMT</b>	F; CAAGCCGCTCAAGGAGAC R; CGTGTCGTAGTCGATCAAGC	486	CCGGTCCT, CGGGCTTG	450
<b>TUBB</b>	F; CAACGCCACGCTCTCGG R; CCGAGACGCGCTTGAACAT	598	GAAAACGC, GCGATCCA	545

pb – parova baza

\* Veličina PCR-produkta umanjena za duljinu početnica

\*\* Sekvence koje se nalaze unutar amplikona, služe kod obrade rezultata sekvenciranja

\*\*\* Duljina sekvence DNA omeđene redoslijedima nukleotida početak (5') i kraj (3') lokusa

**Tablica 2.** Sastav reakcijske otopine za PCR

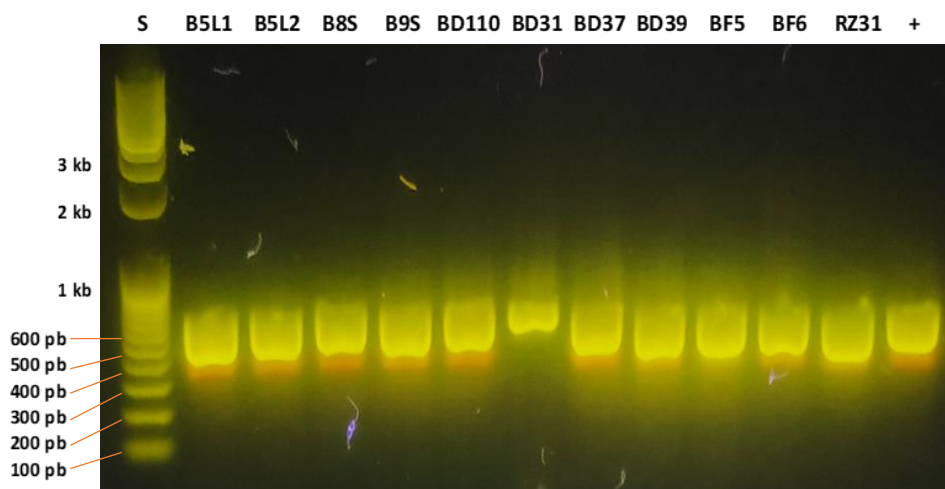
Komponenta reakcijske otopine za PCR	Volumen
DNA-kalup	2 – 4 $\mu$ L*
EmeraldAmp® PCR 2X Master Mix (TAKARA, Japan)	12,5 $\mu$ L
10 $\mu$ M uzvodna početnica (Metabion international AG, Njemačka)	0,5 – 0,75 $\mu$ L**
10 $\mu$ M nizvodna početnica (Metabion international AG, Njemačka)	0,5 – 0,75 $\mu$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

\* U slučaju kada amplifikacija nije bila uspješna korišten je volumen DNA-kalupa od 4  $\mu$ L

\*\* U slučaju kada amplifikacija nije bila uspješna korišten je volumen početnica od 0,75  $\mu$ L  
(konačna koncentracija početnica u reakcijskoj smjesi bila je 0,2 – 0,3  $\mu$ M)

### 3.3. ELEKTROFOREZA U AGAROZNOM GELU

Za provjeru uspješnosti amplifikacije fragmenata produkti lančane reakcije polimerazom vizualizirani su provedbom elektroforeze u 1 %-tnom agaroznom gelu. Gel je pripremljen otapanjem agaroze (Sigma-Aldrich, SAD) u TAE-puferu [40 mM TRIS (hidroksimetil) aminometan; 20 mM octena kiselina; 1 mM EDTA]. Smjesa je zagrijavana dok se sva agarozna nije otopila te joj je nakon hlađenja na otprilike 60 °C dodana boja GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain za vizualizaciju fragmenata DNA slijedeći upute proizvođača (Lonza, Švicarska). Potom je rastopljena agarozna izlivena u kalup za izlijevanje gela i postavljen je češalj za formiranje jažica. Nakon polimerizacije agaroze, u jažice gela nanosena su po 2 µL molekularnog standarda SimplyLoad™ Tandem DNA ladder (Lonza, Švicarska) i po 5 µL PCR-produkata. Elektroforeza se provodila u TAE-puferu pri naponu od 100 V tijekom 60 minuta u aparaturi Owl Easy Cast B1 Mini Gel Electrophoresis System (Thermo Fisher Scientific, SAD). Po završetku elektroforeze, fragmenti DNA su vizualizirani pod UV-svjetlom (UV transiluminator UVIpure, UVITEC Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo) i fotografirani. Na slici 5 prikazan je primjer uspješne amplifikacije fragmenata gena *TUBB*, veličine oko 600 pb.



**Slika 5.** Primjer rezultata amplifikacije gena *TUBB*

S = standard (SimplyLoad™ Tandem DNA ladder)

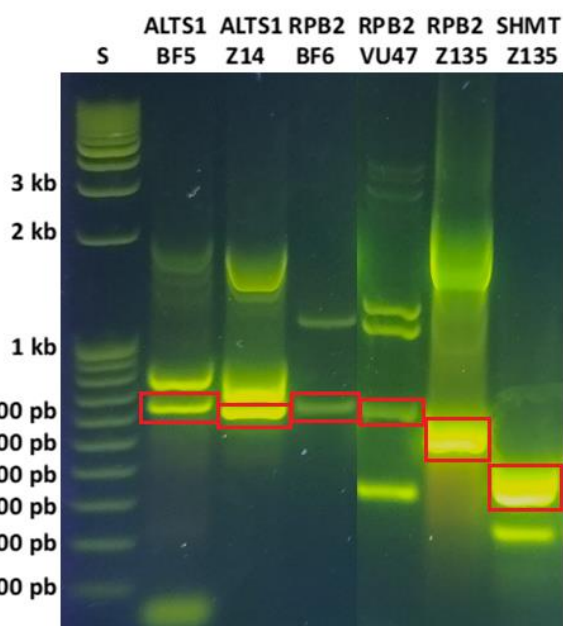
+ = pozitivna kontrola (*Saprolegnia parasitica* CBS 233.65)

### 3.4. IZOLACIJA DNA IZ AGAROZNOG GELA

Tijekom provjere uspješnosti amplifikacije elektroforezom, za neke uzorke je na gelu uočeno dvije i više vrpce, od kojih je samo jedna veličinom odgovarala očekivanoj (slika 6). Prisutnost više od jedne vrpce ukazuje na to da dolazi do nespecifične amplifikacije te takve uzorke nije moguće direktno sekvencirati metodom po Sangeru. Kako bi se ipak pokušale

dobiti sekvence željenih amplikona, provedena je izolacija onih vrpca iz gela čija je veličina odgovarala očekivanoj.

U jažice 1 %-tnog agaroznog gela nanesen je čitav volumen uzorka (20  $\mu$ L) te je provedena elektroforeza pri naponu od 60 V tijekom 2,5 sati. Nakon toga je kompletno NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey Nagel, Njemačka), prema protokolu proizvođača, provedena izolacija DNA iz agaroznog gela. Iz gela su izrezane vrpce DNA čije su veličine odgovarale očekivanoj veličini amplikona te su komadići gela prebačeni u kivete volumena 1,5 mL i izvagani. Za svakih 100 mg agaroznog gela u kivetu je dodano 200  $\mu$ L pufera NTI. Uzorci su inkubirani na 50 °C, uz povremeno vorteksiranje, dok se sva agarozna nije otopila (5 – 10 min). Zatim je provedeno vezanje DNA na membranu na način da je čitav volumen otopljenog uzorka dodan na stupac za pročišćavanje iz kompleta i centrifugiran 30 s pri 11,000 x g (centrifuga Tehtnica® Centric200R, Slovenija). Otopina koja je prošla kroz membranu je odbačena, a membrana je isprana sa 700  $\mu$ L pufera NT3 (centrifugiranje 30 s na 11,000 x g). Centrifugiranje je ponovljeno još jednom kako bi se uklonili ostaci pufera i membrana osušila. Kao zadnji korak provedena je elucija DNA s membrane dodatkom 30  $\mu$ L pufera NE (inkubacija na sobnoj temperaturi tijekom 5 min i centrifugiranje 1 min pri 11,000 x g). Dobiveni eluat poslan je na sekvenciranje.



**Slika 6.** Uzorci kod kojih su na gelu uočene dvije ili više elektroforetskih vrpca  
S = standard (SimplyLoad™ Tandem DNA ladder). Crvenom bojom su označene izrezane vrpce.

Za uzorke BF5 i Z14 gena *ALTS1* i uzorak Z135 gena *RPB2* i *SHMT* sekvence su uspješno dobivene i uključene u istraživanje. Za uzorke BF6 i VU47 gena *RPB2* sekvence nisu dobivene zbog nedovoljne količine izoliranih amplikona.

### 3.5. SEKVENCIRANJE I ANALIZA SEKVENCI

PCR-produkti poslani su u komercijalni servis Microsynth (Austrija) na pročišćavanje i sekvenciranje Sanger-metodom. Sekvenciranje je provedeno u oba smjera korištenjem početnica navedenih u tablici 1. Potrebno je napomenuti da je dio podataka sekvenciranja (geni *COX1*, *NAD1* i *SHMT* za vrstu *S. parasitica*) dobiven u sklopu ranijeg istraživanja u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama (Schwerer, 2021). Od autora su preuzete neobrađene sekvence te su uz ostale obrađene na način opisan u nastavku teksta.

Kromatogrami dobiveni sekvenciranjem uređeni su u programu GeneStudio (GeneStudio, Inc.). Uzvodne (engl. *forward*, F) i nizvodne (engl. *reverse*, R) sekvence su preklopljene, dijelovi s nižom kvalitetom uklonjeni te je preklopljena sekvenca (engl. *contig*) skraćena na duljinu navedenu u tablici 1 korištenjem početnih i završnih sekvenca lokusa. Dobivena konačna sekvenca lokusa za svaki gen svakog uzorka pohranjena je u fasta formatu za daljnju obradu.

Sve sekvence jednog gena, zajedno sa sekvencama referentnih alela, za uzorke iste vrste, višestruko su poravnate u programu MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11 (Tamura i sur., 2021). Referentne sekvence za sve genske lokuse dobivene su od autora rada Ravasi i sur. (2018). Za vrstu *S. parasitica* to uključuje: 13 alela gena *ALTS1*, 8 alela gena *COX1*, 10 alela gena *GLUT*, 7 alela gena *NAD1*, 13 alela gena *RPB2*, 14 alela gena *SHMT* i 13 alela gena *TUBB* te po jednu referentnu sekvencu za svaki gen kod preostale tri *Saprolegnia* vrste (*S. australis* CBS 302.56, *S. delica* S058, *S. ferax* CBS 305.37). Pomoću dobivenog višestrukog poravnanja je u programu BioEdit (Hall, 2011) izrađena matrica identiteta sekvenci (engl. *sequence identity matrix*). Na temelju ove matrice utvrđeno je koji uzorci imaju identične sekvence unutar pojedinog lokusa te da li one odgovaraju kojem od referentnih alela. Uzorku čija je sekvenca odgovarala nekom od referentnih alela dodijeljen je broj identičan onome kod Ravasi i sur. (2018), dok je novim alelima dodijeljen novi broj/šifra. Na ovaj način je za svaki izolat roda *Saprolegnia* dobivena njegova jedinstvena kombinacija alela koja zajedno definira diploidni tip sekvence (engl. *diploid sequence type*, DST). Kombinacijama alela koje prethodno nisu opisane u radu Ravasi i sur. (2018) dodijeljeni su novi DST brojevi.

Sekvence svih gena za koje su dobiveni rezultati konkatenirane su u programu BioEdit (Hall, 2011) abecednim redoslijedom: *ALTS1*, *COX1*, *GLUT*, *NAD1*, *RPB2*, *SHMT*, *TUBB*. Za vrstu *S. parasitica* i *S. australis* nije korišten gen *ALTS1*, a kod vrste *S. ferax* gen *RPB2* (objašnjenje u poglavlju 4. *Rezultati i rasprava*). Konkatenirane sekvence uzoraka iste vrste višestruko su poravnate (engl. *multiple sequence alignment*) u programu MEGA11 (Tamura i sur., 2021), što je bio temelj za filogentsku analizu koja je provedena u programu MEGA11

(Tamura i sur., 2021) metodom najveće vjerojatnosti (engl. *maximum likelihood*, ML) uz korištenje modela Kimura 2-parameter. Kao podrška grananju unutar stabla korištena je Bootstrap metoda s 1,000 ponavljanja, a duljina grana odgovara broju supstitucija po nukleotidnom mjestu. Nijedno mjesto nije odbačeno tijekom analize pa su tako za vrstu *S. parasitica* analizirane 2,944 baze, za vrstu *S. australis* 2,947 baza, za *S. delica* 3,458 baza i *S. ferax* 2,956 baza.

Za bolju vizualizaciju razlika među genotipovima dodatno je izrađeno MS-stablo (engl. *Minimum Spanning Tree*) svih DST-ova koristeći programski jezik Python. Sekvence svih DST-ova učitane su u Google Colab okruženje u fasta obliku koristeći Biopython knjižnicu. Za generiranje matrice udaljenosti između sekvenci (engl. *pairwise distance matrix*) korištena je metoda Hammingove udaljenosti (engl. *Hamming distance*), dok je za kreiranje grafa s čvorovima (engl. *nodes*) i udaljenostima (engl. *weights*) i izračunavanje MST-a korištena knjižnica NetworkX. Podaci za čvorove i rubove (engl. *edges*) izvezeni su u CSV formatu za daljnju upotrebu, a vizualizacija i uređivanje MST-a provedena je u programu Gephy (Bastian i sur., 2009).

### **3.6. STATISTIČKA ANALIZA UTJECAJA DIPLOIDNOG TIPRA SEKVENCE NA BRZINU RASTA MICELIJA**

Kako bi se utvrdio utjecaj genotipa (DST) na fenotip (brzina rasta micelija) provedena je statistička analiza u Google Colab okruženju koristeći programski jezik Python. Podaci o brzini rasta svakog pojedinog izolata preuzeti su iz ranijeg istraživanja (Schwerer, 2021). Podaci su prvo učitani iz Excel datoteke u DataFrame pomoću pandas knjižnice. Za testiranje postoji li statistički značajna razlika između srednjih vrijednosti različitih grupa podataka korištena je jednofaktorska analiza varijance (engl. *one-way ANOVA*). Rezultati su smatrani statistički značajnima ukoliko je  $p$ -vrijednost bila niža od 0,05. Nakon što je ANOVA test pokazao statističku značajnost primijenjen je Tukeyev HSD test za višestruke usporedbe. Ovaj test daje uvid u parove grupa koji pokazuju značajne razlike, uz pružanje intervala povjerenja za te razlike. Na kraju, pomoću knjižnice seaborn, rezultati su prikazani u obliku "boxplot" grafova koji prikazuju distribuciju brzine rasta za svaki genotip.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom je radu je MLST-metodom (Ravasi i sur. 2018) prvi put analizirana genotipska raznolikost izolata roda *Saprolegnia* iz hrvatskih pastrvskih uzgajališta. Utvrđeno je da na ovom području postoji velik broj genotipova roda *Saprolegnia* (DST-ovi), od kojih je većina uočena po prvi put i specifična za lokaciju s koje je izolirana. Između pojedinih DST-ova uočena je statistički značajna razlika u brzini radijalnog rasta micelija, a za neke DST-ove je uočena preferencija prema razvojnom stadiju domaćina ili vodenom staništu.

### 4.1. MLST-SHEMA KAO ALAT ZA GENOTIPIZACIJU VRSTA IZ RODA *Saprolegnia*

Provođenje MLST-analize na uzorcima četiri vrste roda *Saprolegnia* (*S. parasitica*, *S. australis*, *S. delica*, *S. ferax*) pokazalo je određene nedostatke, čak i za vrstu *S. parasitica* za koju je ova shema ranije razvijena (Ravasi i sur., 2018) i unatoč tome što se radi o srodnim vrstama iz porodice Saprolegniaceae (Sandoval-Sierra i sur., 2014a).

Za vrstu *S. parasitica* je tijekom obrade rezultata sekvenciranja uočeno da neki kromatogrami gena *ALTS1* sadrže preklapajuće pikove, tj. da dolazi do nespecifične amplifikacije (NA) za pojedine uzorke. Kod provjere uspješnosti amplifikacije elektroforezom, za ove uzorke na gelu nije uočena prisutnost više vrpci, što pokazuje da su specifični i nespecifični amplificirani fragmenti vrlo sličnih veličina. Kako za te uzorke nije bilo moguće dobiti točne sekvence, ovaj gen je izostavljen kod provedbe filogenetske analize i u ostalim uzorcima *S. parasitica*. Kasnije, nakon provedene filogenetske analize, je utvrđeno da uzorci kod kojih je uočena ova nespecifična amplifikacija pripadaju vrlo srodnim DST-ovima (DST18, DST20 i DST22). Riječ je o novoopisanim DST-ovima koji nisu bili uključeni u kolekciju Ravasi i sur. (2018) prilikom razvoja MLST-sheme. Problemi prilikom amplifikacije i sekvenciranja ovog gena uočeni su i ranije kod genotipizacije nekih izolata vrste *S. parasitica* iz Mađarske (Erdei i sur., 2023) i Finske (Engblom i sur., 2023) te je i u tim istraživanjima gen *ALTS1* isključen iz analize. Sve ovo upućuje na zaključak da bi postupak amplifikacije ovog lokusa trebalo prilagoditi ili ga isključiti iz MLST-protokola, s obzirom da je varijabilnost *ALTS1* sekvence vrste *S. parasitica* očito značajno veća nego što je bilo utvrđeno među švicarskim izolatima kada je shema razvijena.

Kod uzoraka vrsta *S. delica* i *S. ferax* također je uočeno da dolazi do nespecifične amplifikacije u lokusima *ALTS1*, *RPB2* i *SHMT*. U ovom slučaju su nespecifične vrpce uočene već tijekom provjere uspješnosti amplifikacije na gelu (slika 6) pa je proveden postupak izolacije DNA iz gela čime su uspješno dobivene genske sekvence za neke od izolata. Kod gena *ALTS1* za uzorke BF5 i Z14 vrste *S. delica* se kasnijom analizom utvrdilo da čine zaseban genotip (DST3). Za uzorak Z135 (*S. ferax*) uspješno su dobivene sekvence oba gena (*RPB2* i *SHMT*) te je analizom utvrđeno da on pripada istom DST-u kao i drugi uzorci kod kojih nije bilo problema s amplifikacijom (DST2). Može se pretpostaviti da su je u ovom slučaju nespecifična amplifikacija bila uzrokovana problemima tehničke prirode, a nije bila posljedica stvarne genetske razlike među uzorcima. Primjerice, kvaliteta DNA je kod ovog uzorka mogla biti suboptimalna, a degradirana ili kontaminirana DNA može uzrokovati poteškoće u amplifikaciji. Za preostala dva uzorka vrste *S. ferax* sekvence gena *RPB2* nisu dobivene no i bez njih analiza pokazuje da pripadaju vrlo srodnom DST-ovima (DST4 i DST5). S obzirom na to da je nespecifična amplifikacija zabilježena na relativno malom broju uzoraka, potrebno je proširiti istraživanje kako bi se metoda dodatno optimizirala i prilagodila za ovakve slučajeve.

Osim spomenute nespecifične amplifikacije, prilikom obrade rezultata sekvenciranja *ne-parasitica* vrsta uočene su i promjene u duljinama pojedinih lokusa te početnim i završnim sekvencama lokusa (tablice 3, 4 i 5). Lokus *ALTS1* je kod vrste *S. delica* kraći za sedam nukleotida, a kod vrste *S. ferax* za četiri, u odnosu na vrstu *S. parasitica*. Uz to, u završnim sekvencama ovog lokusa uočene su transverzije citozina u gvanin te heterozigotno S mjesto umjesto citozina. Ova zapažanja dodatno naglašavaju varijabilnost lokusa *ALTS1*. Nadalje, lokus *GLUT* je bio za tri nukleotida duži kod vrsta *S. australis* i *S. delica*. U lokusu *RPB2* istih vrsta zabilježeni su aleli kod kojih je u početnim sekvencama uočeno po jedno heterozigotno Y mjesto umjesto timina. U završnim sekvencama lokusa *SHMT* i *TUBB* svih *ne-parasitica* vrsta također su uočena heterozigotna S mjesta umjesto gvanina, ali i transverzija tog istog gvanina u citozin.

S obzirom da je MLST-shema razvijena za vrstu *S. parasitica* i prije ovog istraživanja nije bila testirana na većem broju uzoraka drugih vrsta roda *Saprolegnia* ovakvi rezultati nisu neobični i upućuju da metodu treba dalje razvijati i prilagođavati raznolikosti genotipova.

**Tablica 3.** Promjene u početnim i konačnim sekvencama gena te duljinama lokusa za vrstu *Saprolegnia australis*

GEN	DULJINA LOKUSA (pb)	POČETNA SEKVENCA LOKUSA (5')	ZAVRŠNA SEKVENCA LOKUSA (3')
<b>GLUT</b>	<b>448</b>	CATCAATC	CGCGTACG
<b>RPB2</b>	505	GATTTCCA GAYTTCCA	CATTGACG
<b>SHMT</b>	450	CCGGTCCT	CCGGCTTG CSGGCTTG
<b>TUBB</b>	545	GAAAACGC	GCCATCCA GCSATCCA

pb – parova baza

Crvena boja označava promjene u odnosu na shemu razvijenu za vrstu *S. parasitica* (tablica 1).

**Tablica 4.** Promjene u početnim i konačnim sekvencama gena te duljinama lokusa za vrstu *Saprolegnia delica*

GEN	DULJINA LOKUSA (pb)	POČETNA SEKVENCA LOKUSA (5')	ZAVRŠNA SEKVENCA LOKUSA (3')
<b>ALTS1</b>	<b>508</b>	AGGTCTTT	AGCGTGCT
<b>GLUT</b>	<b>448</b>	CATCAATC	CGCGTACG
<b>RPB2</b>	505	GATTTCCA GAYTTCCA	CATTGACG
<b>SHMT</b>	450	CCGGTCCT	CSGGCTTG
<b>TUBB</b>	545	GAAAACGC	GCCATCCA GCSATCCA

pb – parova baza

Crvena boja označava promjene u odnosu na shemu razvijenu za vrstu *S. parasitica* (tablica 1).

**Tablica 5.** Promjene u početnim i konačnim sekvencama gena te duljinama lokusa za vrstu *Saprolegnia ferax*

GEN	DULJINA LOKUSA (pb)	POČETNA SEKVENCA LOKUSA (5')	ZAVRŠNA SEKVENCA LOKUSA (3')
<b>ALTS1</b>	<b>511</b>	AGGTCTTT	AGCGTGCT AGSGTGCT
<b>GLUT</b>	445	CATCAATC	CGCGTACG CGCGYACG
<b>SHMT</b>	450	CCGGTCCT	CGGGCTTG CSGGCTTG
<b>TUBB</b>	545	GAAAACGC	GCGATCCA GCSATCCA

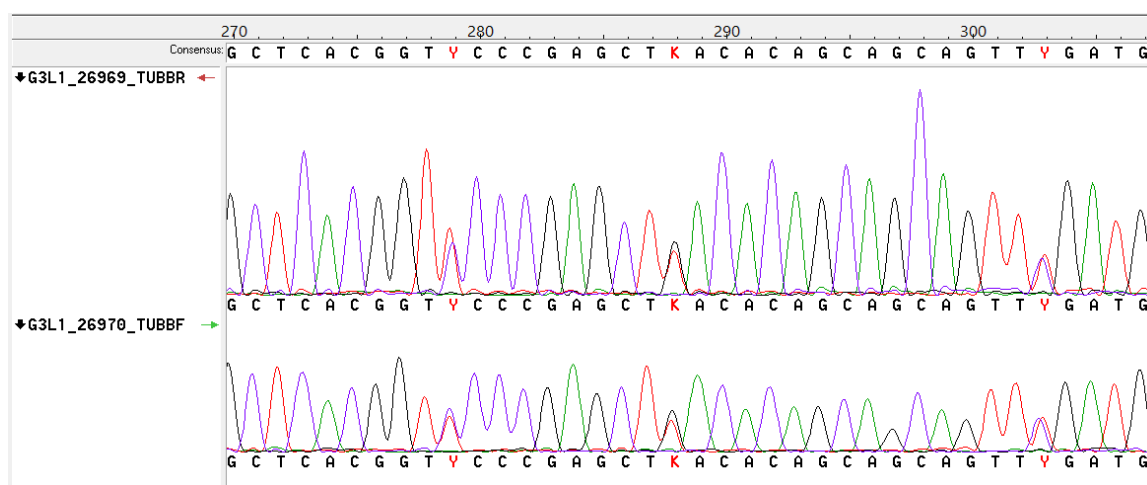
pb – parova baza

Crvena boja označava promjene u odnosu na shemu razvijenu za vrstu *S. parasitica* (tablica 1).



## 4.2. RAZNOLIKOST IZOLATA VRSTE *Saprolegnia parasitica*

U ovom istraživanju heterozigotni rezultati sekvenciranja uočeni su kod pet od sedam proučavanih lokusa (*ALTS1*, *GLUT*, *RPB2*, *SHMT* i *TUBB*), u skladu s ranije objavljenim rezultatima Ravasi i sur. (2018). Heterozigotna mjesta definirana su prisutnošću dva istovjetna pika u kromatogramima uzvodne i nizvodne sekvence (Ravasi i sur., 2018) kao što je to prikazano na slici 7. Time je potvrđena je diploidnost genoma za vrstu *S. parasitica* (Jiang i sur., 2013).



**Slika 7.** Primjer preklopljenog uzvodnog i nizvodnog kromatograma gena *TUBB* izolata G3L1 (*S. parasitica*)

Na 279. i 303. paru nukleotida vidljivo je heterozigotno C/T mjesto označeno kao Y prema IUPAC nomenklaturi, dok je na 288. paru nukleotida vidljivo G/T heterozigotno mjesto označeno kao K prema IUPAC nomenklaturi.

U tablici 6 prikazani su podaci o karakteristikama svih lokusa za vrstu *S. parasitica*. U uzorcima iz ovog istraživanja, u različitim lokusima uočeno je između četiri (*NAD1*) i sedam (*RPB2*) alela, od čega su u svakom lokusu, osim lokusa *NAD1*, uočena 1 do 4 nova alela (u odnosu na istraživanje Ravasi i sur., 2018) (slika 8). U odnosu na rezultate istraživanja Ravasi i sur. (2018), u ovom je istraživanju detektiran manji broj SNP-ova u svim alelima, što je vjerojatno posljedica razlike u broju izolata vrste *S. parasitica*: 77 kod Ravasi i sur. (2018), 38 u ovom istraživanju. Kada se analiziraju objedinjeni podaci o analiziranim lokusima kod izolata vrste *S. parasitica* iz Švicarske i Hrvatske, broj dosad opisanih alela varira od 7 (*NAD1*) do 14 (*SHMT*), a broj polimorfizama jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) od 15 (*NAD1*) do 49 (*ALTS1*). Iz omjera broja alela i SNP-ova vidljivo je da je lokus *ALTS1* najmanje diskriminatoran (0,29 alela/SNP), dok je lokus *SHMT* najviše diskriminatoran (0,69 alela/SNP).

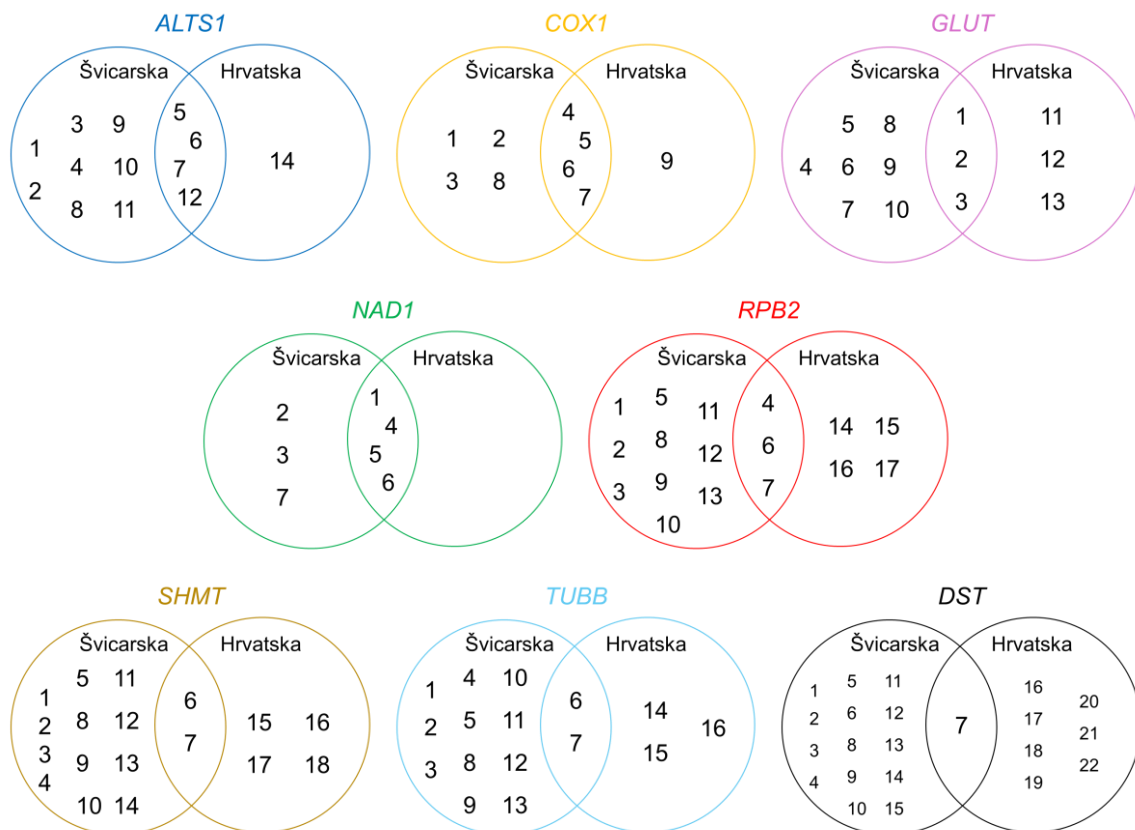
**Tablica 6.** Karakteristike lokusa za vrstu *Saprolegnia parasitica*

<i>Saprolegnia parasitica</i>		<i>ALTS1</i>	<i>COX1</i>	<i>GLUT</i>	<i>NAD1</i>	<i>RPB2</i>	<i>SHMT</i>	<i>TUBB</i>
<b>Hrvatska</b>	Broj alela u uzorcima iz ovog istraživanja	5	5	6	4	7	6	5
	Broj SNP u alelima iz ovog istraživanja	27	15	12	14	24	14	19
	Broj alela/broj SNP	0,19	0,33	0,50	0,29	0,29	0,43	0,26
	Broj novih alela*	1	1	3	0	4	4	3
<b>Švicarska (Ravasi i sur., 2018)</b>	Broj alela	13	8	10	7	13	14	13
<b>Ukupno</b>	Ukupan broj dosad opisanih alela**	14	9	13	7	17	18	16
	Ukupan broj SNP u dosad opisanim alelima**	49	23	23	15	31	26	30
	Ukupan broj alela/ukupan broj SNP	0,29	0,39	0,57	0,47	0,55	0,69	0,53

SNP – polimorfizam jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*)

\* U odnosu na istraživanje Ravasi i sur. (2018)

\*\* U ovom istraživanju i istraživanju Ravasi i sur. (2018)



**Slika 8.** Prikaz alela i DST-ova specifičnih za pojedinu zemlju za vrstu *Saprolegnia parasitica*

Temeljem kombinacija alela za 38 izolata vrste *S. parasitica* iz hrvatskih pastrvskih ribnjaka razlučeno je sedam različitih DST-ova: jedan od njih, DST7, je ranije detektiran u Švicarskoj (Ravasi i sur., 2018) dok su ostali (DST16 – 22) opisani po prvi put (tablica 7, slika 8). Najveći broj uzoraka (11) pripadao je genotipu DST19, a slijedi ga DST7 sa sedam uzoraka. Po pet uzoraka pripadalo je genotipovima DST17, 18 i 21, dva uzorka genotipu DST20, a po jedan DST-ovima 16 i 22. DST koji sadrži najviše novih alela (njih pet od šest) je DST20. DST18 i 22 sadrže po četiri nova alela, dok ostali novoopisani genotipovi (DST16, 17, 19 i 21) imaju po dva nova alela (tablica 7).

Srodstveni odnosi i sličnosti/razlike među DST-ovima dodatno su istraženi primjenom filogenetske analize (slika 9) i konstruiranjem MS-stabla (slika 10), u koje su uključeni svi do sada opisani DST-ovi vrste *S. parasitica* (DST1 – 22). Rezultati su pokazali da se DST10 najviše razlikuje od svih ostalih DST-ova. U njega spada izolat *S. parasitica* CBS 869.72 porijeklom sa štuke *Esox lucius* iz Nizozemske (Ravasi i sur., 2018). Geografska udaljenost lokacije sakupljanja ovog izolata od većine ostalih izolata iz Švicarske i Hrvatske može objasniti njegov izdvojen položaj u filogenetskom stablu. Ostale DST-ove je filogenetska analiza grupirala u dvije velike skupine, od kojih obje sadrže više manjih grupa (slika 9). Prva grupa sadrži DST-ove 1, 2, 5, 7, 12, 13 i 19, a druga DST-ove 3, 4, 6, 8, 9, 11, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21 i 22.

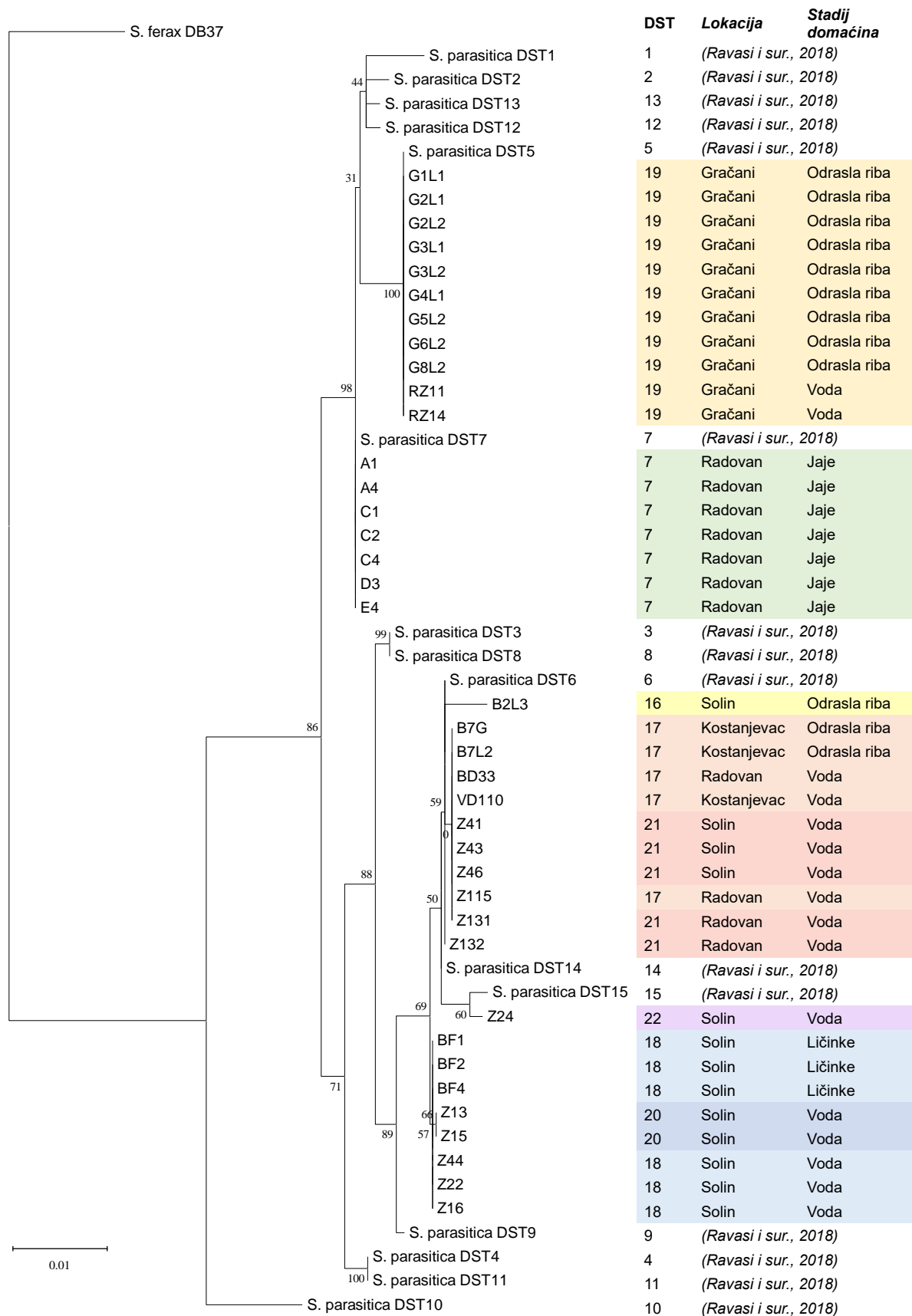
Neki analizirani DST-ovi međusobno su vrlo srodni i nalaze se na istim granama u filogenetskom stablu. To su primjerice DST-ovi 4 i 11 te 3 i 8. Oni su opisani u istraživanju Ravasi i sur. (2018) te je uočeno da tvore klonalne komplekse (CC-1 i CC-2). Genotipovi DST4 i DST11 međusobno razlikuju u tek jednom nukleotidnom mjestu (jedan SNP u lokusu *GLUT*), a genotipovi DST3 i 8 za pet SNP-ova (u lokusu *SHMT*) (slika 10). Kako su u ovom istraživanju definirani novi genotipovi, uočeno je da neki od njih također tvore klonalne komplekse s prethodno definiranim genotipovima iz istraživanja Ravasi i sur. (2018). To su DST-ovi 5 i 19\* te 6, 17\* i 21\* (\* = novi DST u odnosu na istraživanje Ravasi i sur., 2018). DST 5 i 19\* razlikuju se za sedam SNP-ova (jedan u lokusu *RPB2*, dva u lokusu *SHMT* i četiri u lokusu *TUBB*) dok je među DST-ovima 6, 17\* i 21\* čak 18 SNP-ova razlike (dva u lokusima *GLUT* i *SHMT* te 14 u lokusu *RPB2*) (slika 10). Zajedničko obilježje ovih klonalnih grupa je da su im svi SNP-ovi kombinacija pojedinačnog nukleotida i njegove heterozigotne varijante (npr. T/Y) zbog čega na filogenetskom stablu djeluju kao potpuno identični.

Tablica 7. Rezultati genotipizacije za 38 izolata vrste *Saprolegnia parasitica*

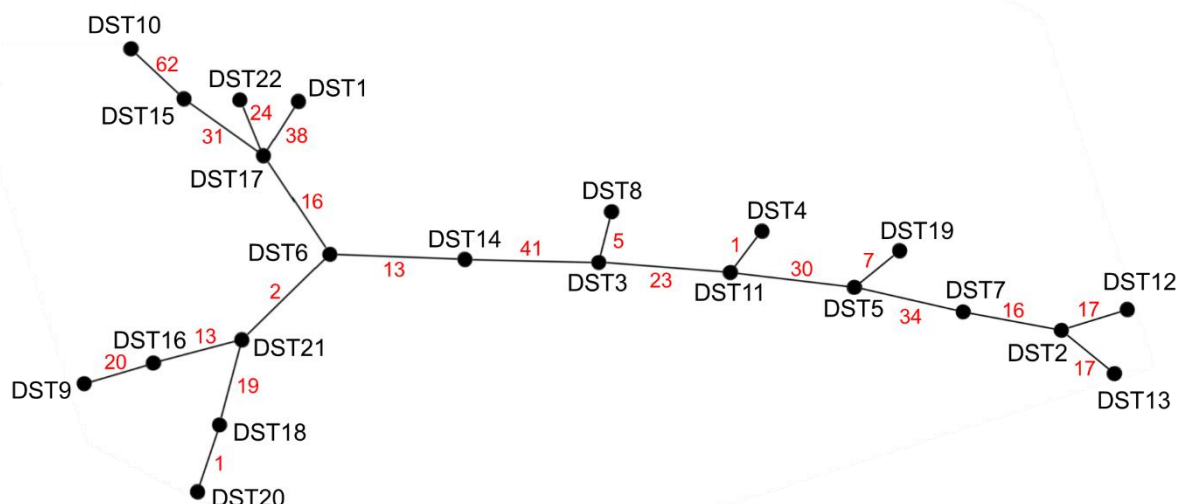
ID	ALTS1	COX1	GLUT	NAD1	RPB2	SHMT	TUBB	DST
A1	7	6	2	1	7	7	7	7
A4	7	6	2	1	7	7	7	7
C1	7	6	2	1	7	7	7	7
C2	7	6	2	1	7	7	7	7
C4	7	6	2	1	7	7	7	7
D3	7	6	2	1	7	7	7	7
E4	7	6	2	1	7	7	7	7
B2L3	12	5	11*	5	14*	6	6	16*
B7G	6	5	1	5	15*	15*	6	17*
B7L2	6	5	1	5	15*	15*	6	17*
BD33	6	5	1	5	15*	15*	6	17*
VD110	6	5	1	5	15*	15*	6	17*
Z115	6	5	1	5	15*	15*	6	17*
BF1	NA	7	12*	6	16*	16*	14*	18*
BF2	NA	7	12*	6	16*	16*	14*	18*
BF4	NA	7	12*	6	16*	16*	14*	18*
Z16	NA	7	12*	6	16*	16*	14*	18*
Z22	NA	7	12*	6	16*	16*	14*	18*
Z44	NA	7	12*	6	16*	16*	14*	18*
G1L1	5	4	3	4	4	17*	15*	19*
G2L1	5	4	3	4	4	17*	15*	19*
G2L2	5	4	3	4	4	17*	15*	19*
G3L1	5	4	3	4	4	17*	15*	19*
G3L2	5	4	3	4	4	17*	15*	19*
G4L1	5	4	3	4	4	17*	15*	19*
G5L2	5	4	3	4	4	17*	15*	19*
G6L2	5	4	3	4	4	17*	15*	19*
G8L2	5	4	3	4	4	17*	15*	19*
RZ11	5	4	3	4	4	17*	15*	19*
RZ14	5	4	3	4	4	17*	15*	19*
Z13	NA	9*	12*	6	16*	16*	14*	20*
Z15	NA	9*	12*	6	16*	16*	14*	20*
Z41	14*	5	11*	5	6	6	6	21*
Z43	14*	5	11*	5	6	6	6	21*
Z46	14*	5	11*	5	6	6	6	21*
Z131	14*	5	11*	5	6	6	6	21*
Z132	14*	5	11*	5	6	6	6	21*
Z24	NA	5	13*	6	17*	18*	16*	22*

\* = Novi alel/DST u odnosu na istraživanje Ravasi i sur. (2018)

NA = nespecifična amplifikacija



**Slika 9.** Filogenetsko stablo vrste *Saprolegnia parasitica* konstruirano metodom najveće vjerojatnosti (engl. *maximum likelihood method*, MLM) Pored čvorova su prikazane podrške grananjima u obliku bootstrap vrijednosti. Duljina grana sukladna je broju supstitucijskih promjena (mjerna crta označava 0,01 supstitucija).

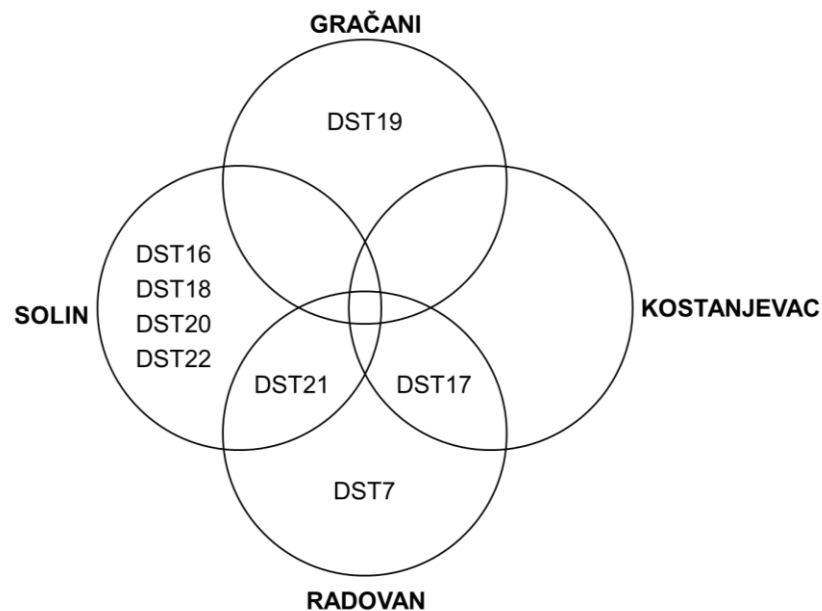


**Slika 10.** MST (engl. *Minimum Spanning Tree*) prikaz DST-ova vrste *Saprolegnia parasitica*. Čvorovi predstavljaju DST-ove, a brojevi na granama broj SNP-ova između dva DST-a.

Analizirana je i geografska rasprostranjenost genotipova unutar Hrvatske (slika 11) kao i izvor različitih genotipova (s jaja, ličinke, odrasle ribe ili iz vode, slika 12). Uočeno je da je većina genotipova specifična za lokaciju iz koje je izolirana. Primjerice, genotip DST7 detektiran je samo u Radovanu, a DST19 samo u Gračanima (slika 11). Najveći broj specifičnih genotipova nađen je u ribogojilištu Solin (DST 16, 18, 20 i 22) koje se nalazi u sklopu Jadranskog sliva (nasuprot ribogojilištima Gračani, Kostanjevac i Radovan u sklopu Crnomorskog sliva). Jedino je DST21 nađen u ribogojilištima iz oba sliva (Solin i Radovan), no ne može se isključiti da je na distribuciju DST21 utjecala ljudska aktivnost kao što je trgovina jajima ili ribom među uzgajalištima. Naime, ribogojilište u Solinu na svojim Web stranicama ([www.trotta.com.hr](http://www.trotta.com.hr)) navodi da dio mlade ribe prodaje drugim uzgajalištima, pa postoji mogućnost da je DST21 tako prenesen iz Solina u Radovan.

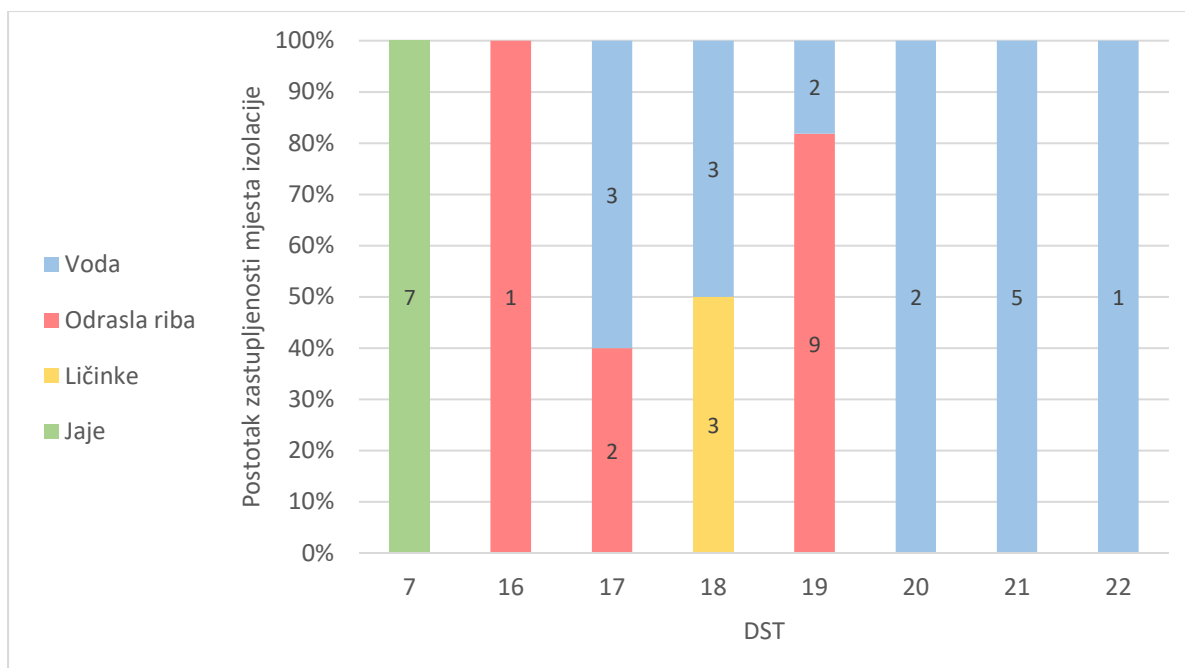
U skladu s ovim rezultatima i u drugim sličnim publikacijama su genotipovi vrste *S. parasitica* bili najvećim dijelom prisutni samo u određenom geografskom području (Shreves i sur., 2024; Ravasi i sur., 2018). Iznimka je genotip DST7 koji je pronađen u ribogojilištu Radovan na ikri kalifornijske pastrve (Pavić i sur., 2021). Za ovaj genotip je u ranijem istraživanju Ravasi i sur. (2018) utvrđeno da je relativno široko rasprostranjen u različitim slivovima u Švicarskoj: i južno i sjeverno od Alpa u tri riječna sliva (Ticino, Rhone i Rajna), i u uzgajalištima i u prirodnom okolišu. Činjenica da je ovo jedini genotip *S. parasitica* nađen i u Hrvatskoj i u Švicarskoj upućuje na mogućnost da ovaj genotip posjeduje određene adaptivne prednosti u odnosu na druge genotipove koji mu omogućuju preživljavanje i širenje u različitim ekološkim uvjetima. Te prednosti mogu uključivati veću otpornost na okolišne stresore, fleksibilnost u prilagodbi različitim temperaturama ili kemijskim sastavima vode, ili pak

sposobnost kolonizacije različitih domaćina, uključujući i uzgojne populacije riba. Osim toga, njegova široka rasprostranjenost mogla bi biti rezultat antropogenih faktora, poput prijenosa među uzgajalištima putem trgovine ikrom ili opremom.



**Slika 11.** Geografska rasprostranjenost genotipova vrste *Saprolegnia parasitica* u hrvatskim pastrvskim ribnjacima

Osim izraženog utjecaja lokacije, uočen je i utjecaj tipa uzorka na genotip. Neki su genotipovi izolirani samo iz vode (DST20, 21 i 22), dok su drugi bili pretežno izolirani s jaja (npr. DST7) ili ribe (npr. DST16 i 19) (slika 12). U ranijim je istraživanjima opetovano pokazano da se vrsta *S. parasitica* češće izolira sa životinja nego iz vode uzgajališta (Eszterbauer i sur., 2025; Shreves i sur., 2024; Pavić i sur., 2021; Tedesco i sur., 2021), ali ovakve usporedbe nisu ranije rađene među genotipovima. Poznato je da je vrsta *S. parasitica* oportunistički patogen koji može prelaziti iz saprofitskog u parazitski način života (Hardy i sur., 2023; Pavić i sur., 2021; Sarowar i sur., 2019; Ravasi i sur., 2018; van den Berg i sur., 2013). Stoga se može pretpostaviti da neki genotipovi (češće prisutni na razvojnim stadijima ribe) imaju veću virulenciju, a drugi, koji su češće detektirani u vodi, manju i pretežito žive saprofitskim načinom života. U skladu s tim, ranije je pokazano da različiti izolati vrste *S. parasitica* (koji su pokazivali identične ITS DNA sekvence, ali razlike u *RPB2* genu) mogu imati značajno različitu virulenciju prema jajima pastrve (Hardy i sur., 2023).

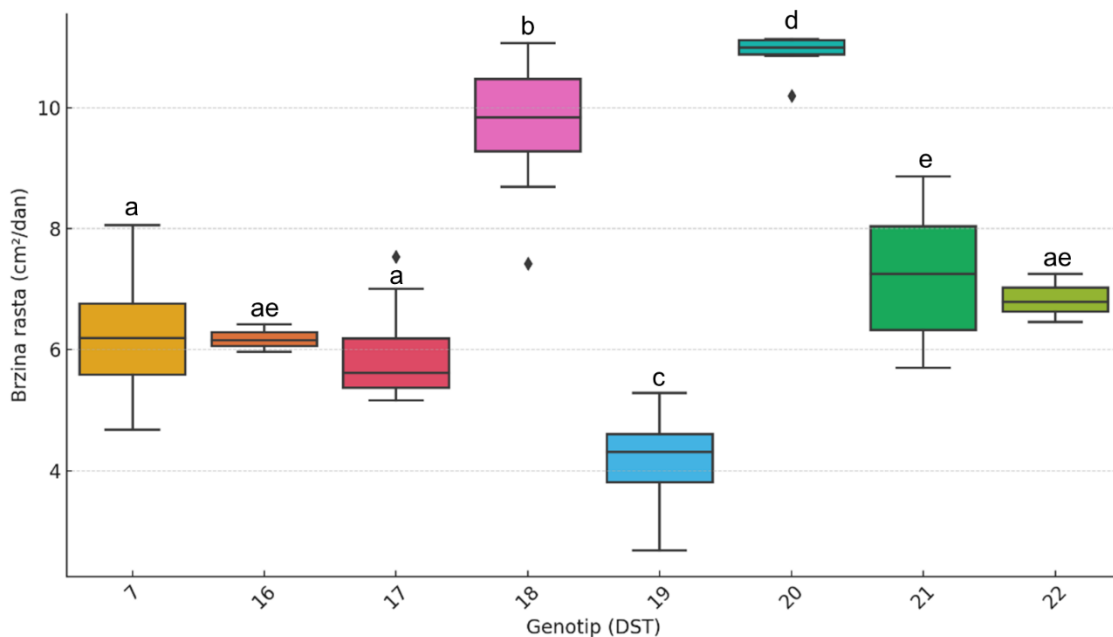


**Slika 12.** Zastupljenost mjesta izolacije za različite DST-ove vrste *Saprolegnia parasitica*. Brojevi u stupićima označavaju broj izolata za svako od mjesta izolacije.

Brzina rasta micelija mogla bi biti jedan od indikatora virulencije genotipova vrste *S. parasitica* pod pretpostavkom da brži rast micelija može (i) omogućiti patogenu da brže kolonizira tkiva domaćina, (ii) lakše nadjača obrambene mehanizme domaćina i/ili kompetitivne okolišne mikroorganizme, i (iii) brže uzrokuje oštećenja tkiva domaćina odnosno simptome bolesti. Stoga je u ovom radu analiziran utjecaj genotipa na brzinu rasta micelija. Rezultati ANOVA testa pokazali su da među analiziranim DST-ovima postoji statistički značajna razlika u brzini rasta ( $F = 115.97$ ,  $p = 1.90 \cdot 10^{-46}$ ) (slika 13). Ovo je u skladu s ranijim istraživanjima u kojima je demonstrirano da postoje značajne razlike u brzini radijalnog rasta micelija među izolatima roda *Saprolegnia* (Bangyeekhun i sur., 2001) te među genotipovima vodene plijesni *Aphanomyces astaci* koja uzrokuje račju kugu (Francesconi i sur., 2024). U ovom radu, DST19 je imao najmanju brzinu rasta od oko  $4 \text{ cm}^2/\text{dan}$ , koja je bila statistički značajno manja od brzine rasta svih ostalih izolata (Tukeyev HSD test,  $p_{adj} = 0$ ). Najbrži rast micelija je utvrđen za genotipove DST18 (oko  $10 \text{ cm}^2/\text{dan}$ ) i DST20 (oko  $11 \text{ cm}^2/\text{dan}$ ), što je statistički značajno više od brzine rasta svih ostalih izolata (Tukeyev HSD test,  $p_{adj} = 0$ ). DST-ovi 7, 16 i 17 imali su sličnu brzinu radijalnog rasta micelija koja je iznosila oko  $6 \text{ cm}^2/\text{dan}$  (Tukeyev HSD test,  $p_{adj} > 0,05$ ). Brzina rasta micelija za DST21 i DST22 je također bila vrlo slična (Tukeyev HSD test,  $p_{adj} > 0,05$ ) i u prosjeku iznosila  $7 \text{ cm}^2/\text{dan}$ .



Opisano grupiranje izolata temeljeno na fenotipskoj karakteristici brzine radijalnog rasta micelija (slika 13) nije se podudaralo s njihovim filogenetskim grupiranjima (slike 9 i 10). Primjerice, DST-ovi 7, 16 i 17, odnosno 21 i 22, pokazali su slične brzine rasta micelija unatoč tome što genotipski sadrže velik broj međusobnih razlika (SNP) te su na filogenetskom stablu prilično udaljeni. S druge strane, DST18 i 20 se međusobno razlikuju tek u jednom nukleotidnom mjestu, no statistički značajno se razlikuju u brzini rasta (Tukeyev HSD test,  $p_{adj} = 0,041$ ). Ovakvi rezultati su u skladu s ranijim istraživanjem Bangyeekhuna i suradnika (2001) koji također nisu uočili korelaciju genotipa (temeljem RAPD-PCR metode) i fenotipa (brzina radijalnog rasta micelija) među izolatima roda *Saprolegnia*. Ovo ukazuje na mogućnost da je brzina rasta određena genima koji podliježu bržim evolucijskim promjenama u usporedbi s održavateljskim genima (engl. *housekeeping genes*), što sugerira da ovaj fenotip može odražavati specifične selekcijske pritiske, a ne nužno filogenetske odnose. Treba dodatno naglasiti da brže rastući sojevi patogena ne moraju nužno biti virulentniji, a *in vivo* infekcijski pokusi su jedini način za demonstriranje razlika u virulenciji. Primjerice, kod srodnog patogena rakova *A. astaci* nije utvrđena korelacija brzine rasta micelija i virulencije (Francesconi i sur., 2024), a kod fitopatogene gljive *Magnaporthe oryzae* je utvrđeno da odnos između brzine rasta i virulencije nije linearan (Lindsay i sur., 2023). Pri relativno niskim brzinama rasta, povećanje brzine bilo je pozitivno korelirano s virulencijom, no samo do određene točke, nakon čega se virulencija smanjivala s daljnjim povećanjem brzine rasta.



**Slika 13.** Prikaz ovisnosti brzine rasta (cm<sup>2</sup>/dan) o genotipu za vrstu *Saprolegnia parasitica*. Razlike među skupinama prikazane su slovima. Skupine koje dijele isto slovo nisu statistički različite ( $p > 0,05$ ), dok skupine s različitim slovima pokazuju značajne razlike ( $p < 0,05$ ).

Zaključno, u ovom je radu demonstrirana značajna genotipska i fenotipska varijabilnost među izolatima patogena *S. parasitica* iz hrvatskih pastrvskih ribnjaka. Može se postaviti hipoteza da različiti genotipovi imaju različite preferencije prema razvojnim stadijima domaćina i da pokazuju razlike u virulenciji. To može otežati procjenu rizika od saprolegnioze u uzgajalištima, budući da detekcija patogena na razini vrste ne mora nužno odražavati stvarni rizik od razvoja bolesti (Sharves i sur., 2024). Stoga se u nastavku istraživanja trebaju provesti *in vivo* pokusi infekcije domaćina kako bi se utvrdile potencijalne razlike u virulenciji i identificirali specifični visokovirulentni genotipovi u uzgajalištima. Dobiveni podaci služili bi kao temelj za daljnji razvoj strategija za ciljano upravljanje i kontrolu saprolegnioze u uzgajalištima te razvoj mjera prevencije i tretiranja, čime bi se smanjili gubici u proizvodnji i unaprijedilo zdravlje riba.

### 4.3. RAZNOLIKOST IZOLATA VRSTE *Saprolegnia australis*

Karakteristike analiziranih lokusa za vrstu *S. australis* prikazane su u tablici 8. S obzirom da su od autora Ravasi i sur. (2018) preuzeti podaci o samo jednom genotipu ove vrste (DST1 – *S. australis* CBS 302.56), za svaki gen je postojao tek jedan ranije opisani alel. Ovim istraživanjem je za svaki lokus opisano od dva do pet novih alela, pri tome najviše (pet) u lokusu *GLUT*. Kao i kod vrste *S. parasitica*, za lokuse *GLUT*, *RPB2*, *SHMT* i *TUBB* dobiveni su heterozigotni rezultati sekvenciranja. Za uzorke *S. australis* iz ovog istraživanja i ranijeg istraživanja Ravasi i sur. (2018) broj polimorfizama jednog nukleotida (SNP) kretao se od dva (*NAD1*) do 18 (*RPB2*) po lokusu. Iz omjera broja alela i broja SNP-ova vidljivo je da je lokus *NAD1* najviše diskriminatoran (1,5 alel/SNP), dok su lokusi *COX1* i *RPB2* oko deset puta manje diskriminatorni (0,21 i 0,17 alel/SNP).

**Tablica 8.** Karakteristike lokusa za vrstu *Saprolegnia australis*

<i>Saprolegnia australis</i>		<i>COX1</i>	<i>GLUT</i>	<i>NAD1</i>	<i>RPB2</i>	<i>SHMT</i>	<i>TUBB</i>
<b>Hrvatska</b>	Broj alela u uzorcima iz ovog istraživanja	2	5	3	2	3	4
	Broj SNP u alelima iz ovog istraživanja	13	16	2	18	7	8
	Broj alela/broj SNP	0,15	0,31	1,50	0,11	0,43	0,50
	Broj novih alela*	2	5	2	2	2	3
<b>Ravasi i sur., 2018</b>	Broj alela	1	1	1	1	1	1
<b>Ukupno</b>	Ukupan broj dosad opisanih alela**	3	6	3	3	3	4
	Ukupan broj SNP u dosad opisanim alelima**	14	16	2	18	7	8
	Ukupan broj alela/ukupan broj SNP	0,21	0,38	1,50	0,17	0,43	0,50

SNP – polimorfizam jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*)

\* U odnosu na istraživanje Ravasi i sur. (2018)

\*\* U ovom istraživanju i istraživanju Ravasi i sur. (2018)

Dobivene kombinacije alela za 45 izolata vrste *S. australis* iz hrvatskih pastrvskih ribnjaka razlučile su pet novih DST-ova (DST2 – DST6, tablica 9) čime je znatno proširen uvid u raznolikost ove vrste u odnosu na postojeće istraživanje Ravasi i sur. (2018). Najveći broj izolata (71 %) pripadao je genotipu DST2. Genotipovi DST3 i 6 sadrže svih šest novih alela, DST5 pet novih alela, a DST-ovi 2 i 4 po četiri nova alela.

**Tablica 9.** Rezultati genotipizacije za 45 izolata vrste *Saprolegnia australis*

ID	COX1	GLUT	NAD1	RPB2	SHMT	TUBB	DST
B5L1	2*	2*	1	2*	2*	1	2*
B5L2	2*	2*	1	2*	2*	1	2*
B8S	2*	2*	1	2*	2*	1	2*
RZ31	2*	2*	1	2*	2*	1	2*
RZ32	2*	2*	1	2*	2*	1	2*
RZ33	2*	2*	1	2*	2*	1	2*
RZ34	2*	2*	1	2*	2*	1	2*
RZ44	2*	2*	1	2*	2*	1	2*
RZ45	2*	2*	1	2*	2*	1	2*
VD14	2*	2*	1	2*	2*	1	2*
VD15	2*	2*	1	2*	2*	1	2*
VD16	2*	2*	1	2*	2*	1	2*
VD210	2*	2*	1	2*	2*	1	2*
VD22	2*	2*	1	2*	2*	1	2*
VD310	2*	2*	1	2*	2*	1	2*
VD33	2*	2*	1	2*	2*	1	2*
VD34	2*	2*	1	2*	2*	1	2*
VD35	2*	2*	1	2*	2*	1	2*
VD36	2*	2*	1	2*	2*	1	2*
VD37	2*	2*	1	2*	2*	1	2*
VD38	2*	2*	1	2*	2*	1	2*
VU210	2*	2*	1	2*	2*	1	2*
Z53	2*	2*	1	2*	2*	1	2*
Z62	2*	2*	1	2*	2*	1	2*
Z63	2*	2*	1	2*	2*	1	2*
Z71	2*	2*	1	2*	2*	1	2*
Z72	2*	2*	1	2*	2*	1	2*
Z73	2*	2*	1	2*	2*	1	2*

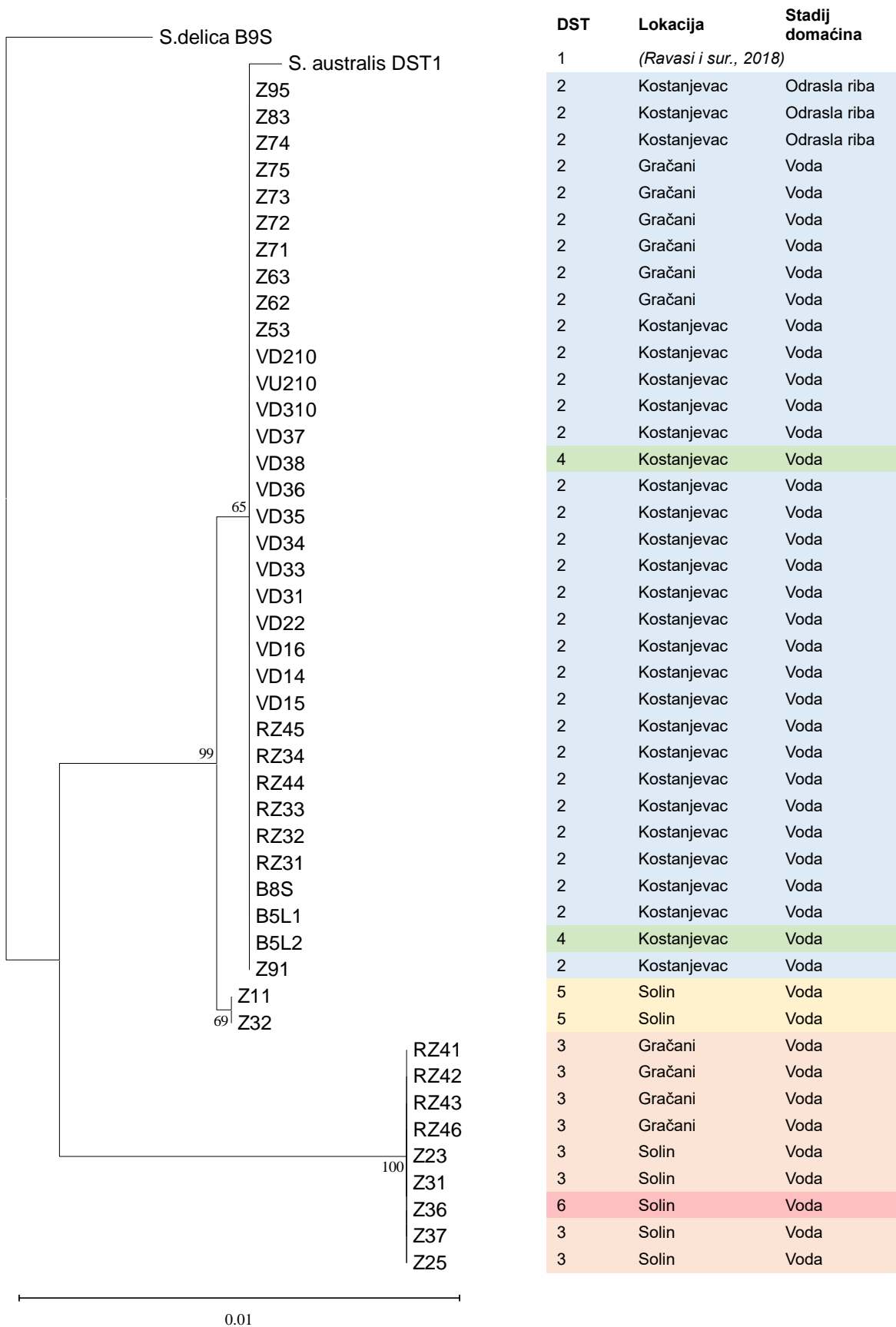
\* = Novi alel/DST u odnosu na istraživanje Ravasi i sur. (2018)

**Tablica 9.** Rezultati genotipizacije za 45 izolata vrste *Saprolegnia australis* - nastavak

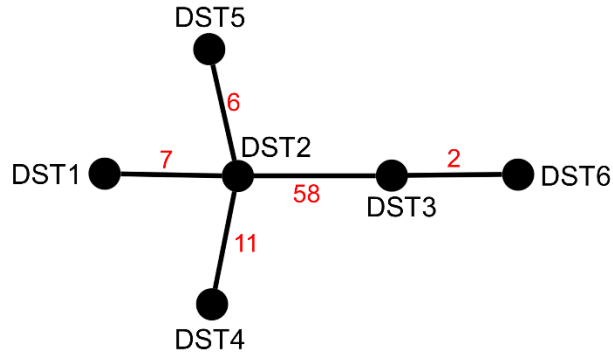
ID	COX1	GLUT	NAD1	RPB2	SHMT	TUBB	DST
Z74	2*	2*	1	2*	2*	1	2*
Z75	2*	2*	1	2*	2*	1	2*
Z83	2*	2*	1	2*	2*	1	2*
Z95	2*	2*	1	2*	2*	1	2*
RZ41	3*	3*	2*	3*	3*	2*	3*
RZ42	3*	3*	2*	3*	3*	2*	3*
RZ43	3*	3*	2*	3*	3*	2*	3*
RZ46	3*	3*	2*	3*	3*	2*	3*
Z23	3*	3*	2*	3*	3*	2*	3*
Z25	3*	3*	2*	3*	3*	2*	3*
Z36	3*	3*	2*	3*	3*	2*	3*
Z37	3*	3*	2*	3*	3*	2*	3*
VD31	2*	4*	1	2*	2*	1	4*
Z91	2*	4*	1	2*	2*	1	4*
Z11	2*	5*	3*	2*	1	3*	5*
Z32	2*	5*	3*	2*	1	3*	5*
Z31	3*	6*	2*	3*	3*	4*	6*

\* = Novi alel/DST u odnosu na istraživanje Ravasi i sur. (2018)

Srodstveni odnosi i sličnosti/razlike među DST-ovima vrste *S. australis* analizirani su konstruiranjem filogenetskog (slika 14) i MS-stabla (slika 15). Tako je utvrđeno da se dobiveni genotipovi mogu podijeliti u dvije velike skupine od kojih prva sadrži DST1, 2, 4 i 5, a drugu čine međusobno vrlo slični DST3 i DST6. Unutar prve skupine razlučene su tri podskupine: (i) DST1, (ii) DST2 i DST4, te (iii) DST5. Genotipovi DST 2 i 4 te 3 i 6 čine klonalne komplekse. DST2 i DST4 se međusobno razlikuju u 11 SNP-ova (svi u lokusu *GLUT*), a DST 3 i 6 u dva: jedan u lokusu *GLUT*, a drugi u lokusu *TUBB* (slika 15).

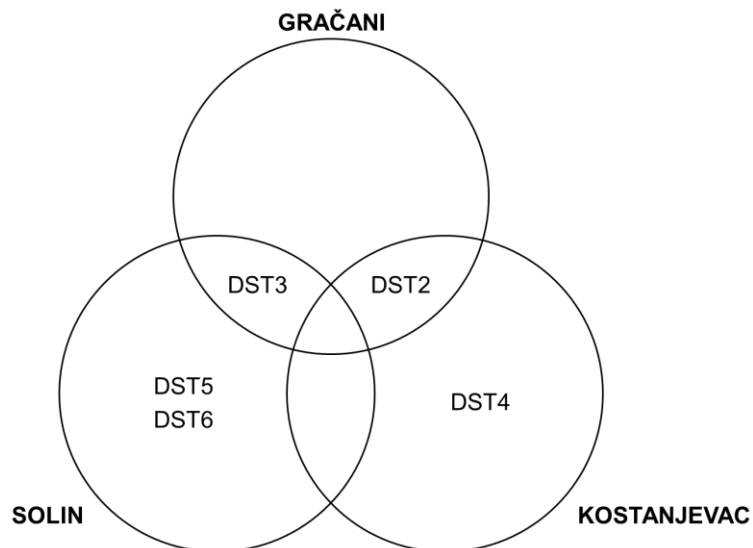


**Slika 14.** Filogenetsko stablo vrste *Saprolegnia australis* konstruirano metodom najveće vjerojatnosti (engl. *maximum likelihood method*, MLM) Pored čvorova su prikazane podrške grananjima u obliku bootstrap vrijednosti. Duljina grana sukladna je broju supstitucijskih promjena (mjerna crta označava 0,01 supstitucija).



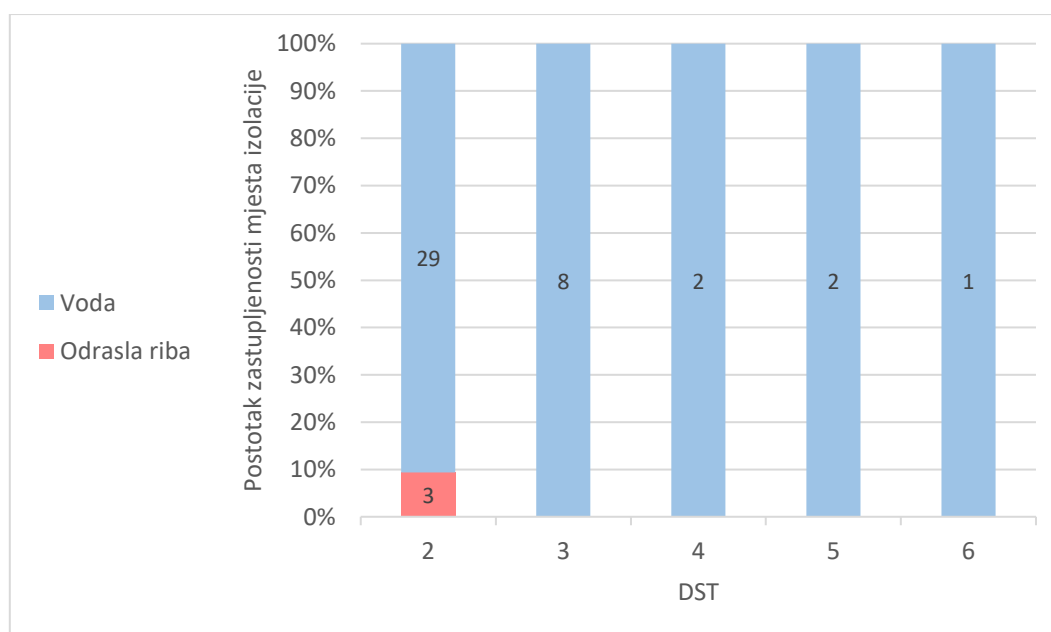
**Slika 15.** MST (engl. *Minimum Spanning Tree*) prikaz DST-ova vrste *Saprolegnia australis*. Čvorovi predstavljaju DST-ove, a brojevi na granama broj SNP-ova između dva DST-a.

Analizom geografske rasprostranjenosti za genotipove vrste *S. australis* (slika 16) utvrđeno je da su izolati genotipa DST5 i DST6 pronađeni samo u Solinu, dok je genotip DST4 nađen samo u ribogojilištu Kostanjevac. Genotipovi DST2 i DST3 imali su nešto širu rasprostranjenost: DST2 je zabilježen u Gračanima i Kostanjevcu, a DST3 u Gračanima i Solinu. U ribogojilištu Radovan nije detektiran nijedan uzorak vrste *S. australis* (Pavić i sur., 2021). Osim DST3, nije uočeno preklapanje genotipova između jadranskog i crnomorskog sliva.



**Slika 16.** Geografska rasprostranjenost genotipova vrste *Saprolegnia australis* u hrvatskim pastrvskim ribnjacima

Iako su u svim ribogojilištima uzeti uzorci vodenih plijesni iz vode i s pastrva (Pavić i sur., 2021), gotovo su svi izolati vrste *S. australis*, neovisno o genotipu, izolirani iz vode (slika 17). Iznimka su tri uzorka genotipa DST2 koji su nađeni na odrasloj ribi u ribogojilištu Kostanjevac. U odnosu na vrstu *S. parasitica*, za koju su razna istraživanja, uključujući i ovo, potvrdila da preferira životinjskog domaćina, vrsta *S. australis* je češće nađena u vodi. To je uočeno na ribogojilištima u Mađarskoj (Eszterbauer i sur., 2025) te u talijanskim i hrvatskim uzgajalištima pastrva (Pavić i sur., 2021; Tedesco i sur., 2021). Nasuprot tome, u uzgajalištima atlantskog lososa u Škotskoj izoliran je veći broj uzoraka ove vrste s riba (Shreves i sur., 2024; Tedesco i sur., 2021). Obje vrste (*S. parasitica* i *S. australis*) imaju relativno visok generalistički indeks (Gozlan i sur., 2014) odnosno poznato je da mogu kolonizirati različite domaćine i ekološke niše. Međutim, rezultati ovog rada i drugih istraživanja upućuju na to da vrsta *S. australis* ne preferira pastrvu kao domaćina, odnosno da je njezina virulencija prema pastrvi manja nego kod vrste *S. parasitica*. Veći broj izolata ove vrste pronađen je na atlantskom lososu pa postoji mogućnost da se ova vrsta bolje prilagodila toj vrsti domaćina. Trebalo bi provesti *in vivo* infekcijske pokuse kako bi se testirala ova hipoteza.

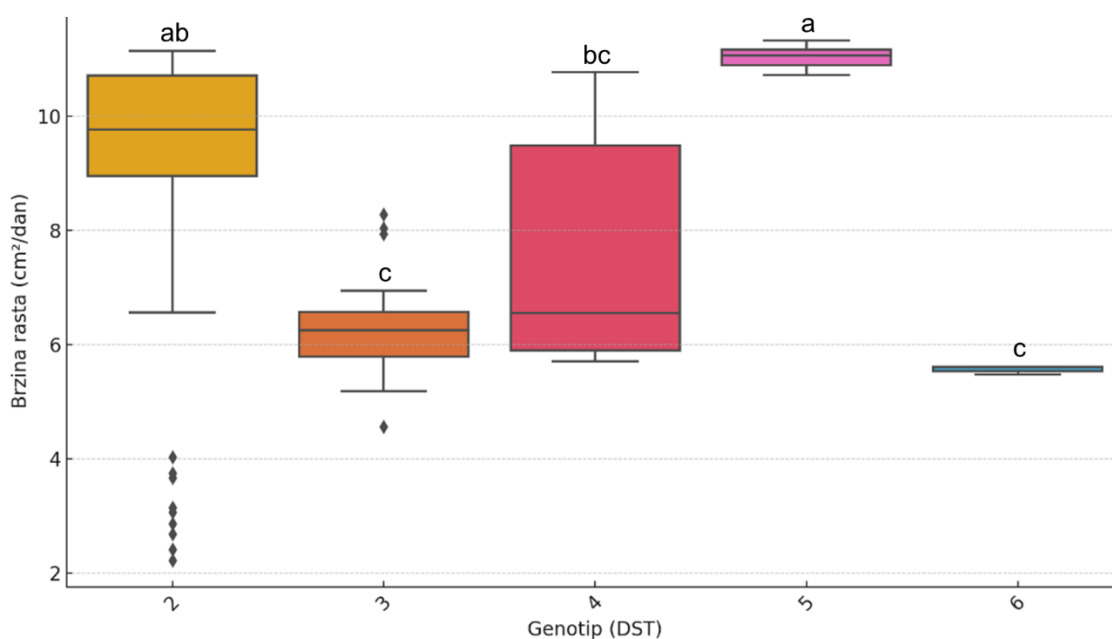


**Slika 17.** Zastupljenost mjesta izolacije za različite DST-ove vrste *Saprolegnia australis*. Brojevi u stupićima označavaju broj izolata za svako od mjesta izolacije.

U ovom je radu ANOVA testom po prvi puta pokazano da različiti DST-ovi vrste *S. australis* pokazuju statistički značajnu razliku u brzini rasta micelija ( $F = 12.42$ ,  $p = 1.41 \cdot 10^{-8}$ ) (slika 18). Za genotip DST5 zabilježena je najveća prosječna brzina rasta od oko 11 cm<sup>2</sup>/dan, što je statistički značajno više od brzine rasta svih ostalih genotipova (Tukeyev HSD test,  $p_{adj} < 0,05$ ) osim genotipa DST2. Genotip DST2 bio je slijedeći s prosječnom brzinom rasta od 9,2



cm<sup>2</sup>/dan koja je veća od svih preostalih prosječnih brzina rasta izolata. Međutim, za genotipove DST4 i DST5 ta razlika nije bila statistički značajna (Tukeyev HSD test,  $p_{adj} > 0,05$ ), vjerojatno zbog toga što je ovaj genotip sadržavao izolate sa širokim rasponom brzina rasta, uključujući i velik broj uzoraka sa značajno sporijim rastom micelija (2 – 4 cm<sup>2</sup>/dan). Slično genotipu DST2, i genotip DST4 je uključivao vrlo širok raspon brzina rasta među izolatima (interkvartilni raspon 6 – 9,5 cm<sup>2</sup>/dan). Takva varijabilnost može biti pokazatelj da unutar ovih genotipova postoje podskupine koje se razlikuju po genetskim ili epigenetskim značajkama, ali nisu utvrđene u okviru provedene MLST-analize. Ova pretpostavka bi se mogla testirati dodatnim istraživanjima, poput sekvenciranja genoma i fenotipskih analiza za dodatnu karakterizaciju razlikovnih obilježja. Kod DST3 prosječna brzina rasta iznosila je oko 6 cm<sup>2</sup>/dan, a najmanja brzina rasta zabilježena je za DST6 – oko 5,5 cm<sup>2</sup>/dan. Između genotipova DST 3 i 6 nije utvrđena statistički značajna razlika u brzini rasta micelija (Tukeyev HSD test,  $p_{adj} > 0,05$ ), što se slaže s činjenicom da su genetski vrlo slični (slike 14 i 15).



**Slika 18.** Prikaz ovisnosti brzine rasta (cm<sup>2</sup>/dan) o genotipu za vrstu *Saprolegnia australis*. Razlike među skupinama prikazane su slovima. Skupine koje dijele isto slovo nisu statistički različite ( $p > 0,05$ ), dok skupine s različitim slovima pokazuju značajne razlike ( $p < 0,05$ ).

Zaključno, u ovom radu je po prvi put karakterizirana genotipska raznolikost vrste *S. australis* te je pokazano je da su detektirani genotipovi uglavnom specifični za određene geografske lokacije. Fenotipske analize brzine rasta micelija ukazale su na heterogenost unutar određenih genotipova, poput najzastupljenijeg genotipa DST2. Ovo upućuje na potrebu daljnjeg razlučivanja u podgrupe, što zahtijeva dodatna istraživanja.

#### 4.4. RAZNOLIKOST IZOLATA VRSTE *Saprolegnia delica*

Karakteristike analiziranih lokusa za 20 analiziranih izolata vrste *S. delica* prikazane su u tablici 10. Kao i za vrstu *S. australis*, od autora Ravasi i sur. (2018) su prethodno dobiveni podaci o samo jednom genotipu (DST1 – *S. delica* S058) dok su u ovom istraživanju detektirana dva nova genotipa: DST2 i DST3. Genotip DST3 čine svi novo detektirani aleli, dok DST2 sadrži dva od sedam novih alela (tablica 11). Većina izolata (90 %) pripadala je genotipu DST2, a samo dva genotipu DST3.

Za razliku od vrste *S. parasitica*, heterozigotni rezultati sekvenciranja nisu uočeni u lokusu *ALTS1*, dok su lokusi *GLUT*, *RPB2*, *SHMT* i *TUBB* i ovdje bili heterozigotni. Svaki od analiziranih lokusa (tablica 10) sadržavao je po dva alela sa 6 (*NAD1*) do 26 (*RPB2*) polimorfizama jednog nukleotida (SNP). Geni *RPB2* (0,08), *ALTS1* (0,11) i *COX1* (0,13) imali su niže omjere broja alela prema broju SNP-ova, što ukazuje na njihovu ograničenu sposobnost razlikovanja genotipova. Taj omjer je bio značajno veći kod gena poput *NAD1* (0,33) i *TUBB* (0,33).

**Tablica 10.** Karakteristike lokusa za vrstu *Saprolegnia delica*

<i>Saprolegnia delica</i>		<i>ALTS1</i>	<i>COX1</i>	<i>GLUT</i>	<i>NAD1</i>	<i>RPB2</i>	<i>SHMT</i>	<i>TUBB</i>
<b>Hrvatska</b>	Broj alela u uzorcima iz ovog istraživanja	2	2	2	2	2	2	2
	Broj SNP u alelima iz ovog istraživanja	19	15	5	6	26	10	9
	Broj alela/broj SNP	0,11	0,13	0,40	0,33	0,08	0,20	0,22
	Broj novih alela*	1	1	2	1	1	1	2
<b>Ravasi i sur., 2018</b>	Broj alela	1	1	1	1	1	1	1
<b>Ukupno</b>	Ukupan broj dosad opisanih alela**	2	2	3	2	2	2	3
	Ukupan broj SNP u dosad opisanim alelima**	19	15	14	6	26	10	9
	Ukupan broj alela/ukupan broj SNP	0,11	0,13	0,21	0,33	0,08	0,20	0,33

SNP – polimorfizam jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*)

\* U odnosu na istraživanje Ravasi i sur. (2018)

\*\* U ovom istraživanju i istraživanju Ravasi i sur. (2018)

**Tablica 11.** Rezultati genotipizacije za 20 izolata vrste *Saprolegnia delica*

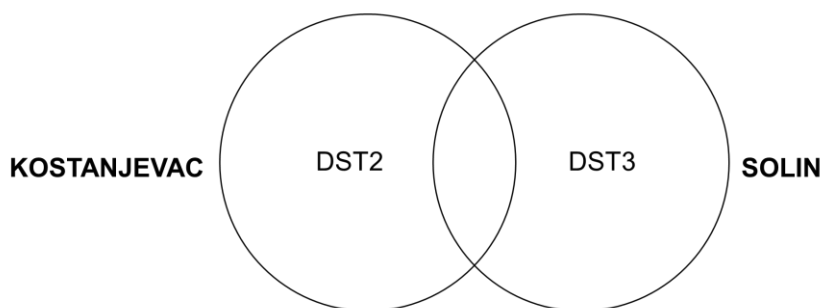
ID	ALTS1	COX1	GLUT	NAD1	RPB2	SHMT	TUBB	DST
<b>B9S</b>	1	1	2*	1	1	1	2*	<b>2*</b>
<b>VD11</b>	1	1	2*	1	1	1	2*	<b>2*</b>
<b>VD12</b>	1	1	2*	1	1	1	2*	<b>2*</b>
<b>VD23</b>	1	1	2*	1	1	1	2*	<b>2*</b>
<b>VD24</b>	1	1	2*	1	1	1	2*	<b>2*</b>
<b>VD25</b>	1	1	2*	1	1	1	2*	<b>2*</b>
<b>VD32</b>	1	1	2*	1	1	1	2*	<b>2*</b>
<b>VD39</b>	1	1	2*	1	1	1	2*	<b>2*</b>
<b>VU26</b>	1	1	2*	1	1	1	2*	<b>2*</b>
<b>Z51</b>	1	1	2*	1	1	1	2*	<b>2*</b>
<b>Z52</b>	1	1	2*	1	1	1	2*	<b>2*</b>
<b>Z54</b>	1	1	2*	1	1	1	2*	<b>2*</b>
<b>Z55</b>	1	1	2*	1	1	1	2*	<b>2*</b>
<b>Z56</b>	1	1	2*	1	1	1	2*	<b>2*</b>
<b>Z64</b>	1	1	2*	1	1	1	2*	<b>2*</b>
<b>Z84</b>	1	1	2*	1	1	1	2*	<b>2*</b>
<b>Z92</b>	1	1	2*	1	1	1	2*	<b>2*</b>
<b>Z94</b>	1	1	2*	1	1	1	2*	<b>2*</b>
<b>BF5</b>	2*	2*	3*	2*	2*	2*	3*	<b>3*</b>
<b>Z14</b>	2*	2*	3*	2*	2*	2*	3*	<b>3*</b>

\* = Novi alel/DST u odnosu na istraživanje Ravasi i sur. (2018)

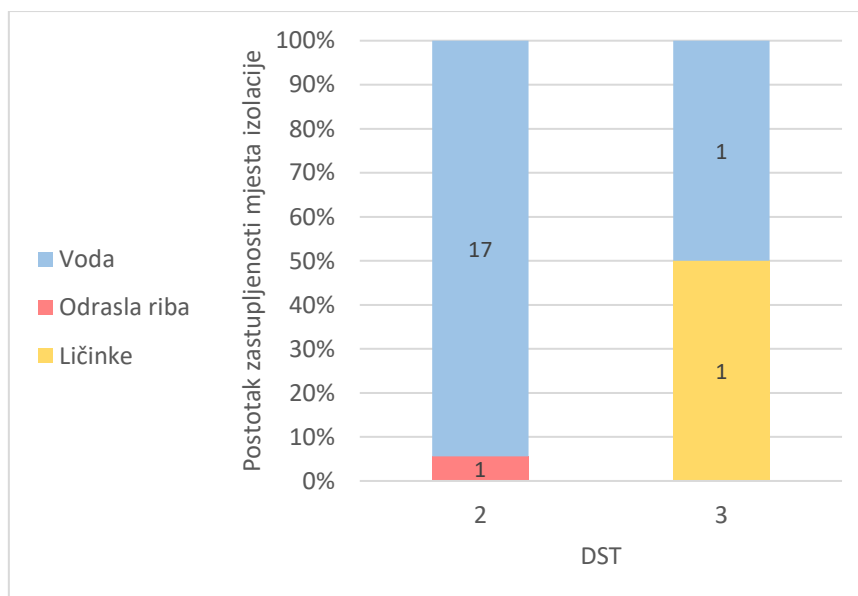
Filogenetska analiza podijelila je genotipove u dvije dobro podržane skupine (slika 19): (i) genotipovi DST1 i DST2; te (ii) genotip DST3. Srodni genotipovi DST1 i 2 na filogenetskom stablu nisu razlučeni zbog nerazlikovanja homozigotnog nukleotida od njegova heterozigotnog homologa na istoj poziciji u nukleotidnoj sekvenci. Između njih postoji čak 12 takvih polimorfizama (SNP): 11 u lokusu *GLUT* i jedan u lokusu *TUBB* (slika 20).



Oba genotipa detektirana u istraživanju bila su specifična za jednu lokaciju: DST2 za Kostanjevac, a DST3 za Solin (slika 21). Pri tome je jedan od izolata genotipa DST3 pronađen na ličinkama, a drugi u vodi (slika 22). S druge strane, gotovo svi izolati genotipa DST2 potječu iz vode (17/18, 94 %). Samo jedan izolat dobiven je s jedinke odrasle ribe. Može se zaključiti da ova vrsta, kao i njoj najrodnija *S. australis* (Sandoval-Sierra i sur., 2014a), uglavnom obitava u vodenom staništu. Ovu činjenicu potvrđuje i istraživanje Tedesco i sur. (2021) gdje je također najveći broj izolata vrste *S. delica* dobiven iz vode, a manji broj sa jedinki riba. Unatoč tome, infekcijskim pokusima je pokazano da *S. delica* može biti patogena prema salmonidima, i to prema jajima kalifornijske pastrve *O. mykiss* (Magray i sur., 2021), kao i prema jajima atlantskog lososa *Salmo salar* (Sarowar i sur., 2013).

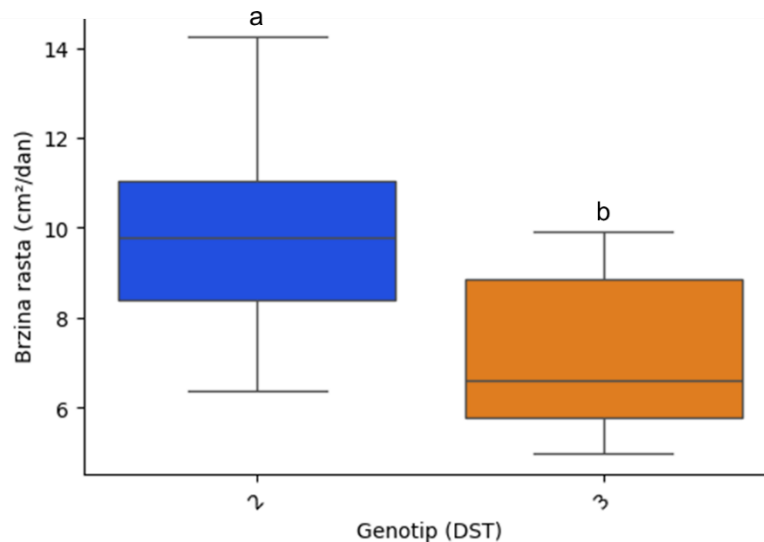


**Slika 21.** Geografska rasprostranjenost genotipova vrste *Saprolegnia delica* u hrvatskim pastrvskim ribnjacima



**Slika 22.** Zastupljenost mjesta izolacije za različite DST-ove vrste *Saprolegnia delica* Brojevi u stupićima označavaju broj izolata za svako od mjesta izolacije.

Analizom utjecaja genotipa na brzinu rasta micelija utvrđeno je da među genotipovima DST2 i DST3 postoji statistički značajna razlika u brzini rasta ( $F = 8,67$ ,  $p = 0,005$ ) (slika 23). Za genotip DST2 vrste *S. delica* zabilježen je najveći raspon brzina rasta među svim analiziranim genotipovima: od 6,5 do 14 cm<sup>2</sup>/dan, s prosječnom brzinom rasta od gotovo 10 cm<sup>2</sup>/dan. I kod genotipa DST3 zabilježen je širok raspon brzina rasta (5 – 10 cm<sup>2</sup>/dan) s prosječnom brzinom od 7,2 cm<sup>2</sup>/dan.



**Slika 23.** Prikaz ovisnosti brzine rasta (cm<sup>2</sup>/dan) o genotipu za vrstu *Saprolegnia delica*. Razlike među skupinama prikazane su slovima. Skupine koje dijele isto slovo nisu statistički različite ( $p > 0,05$ ), dok skupine s različitim slovima pokazuju značajne razlike ( $p < 0,05$ ).

Zaključno, rezultati ukazuju na postojanje geografski lokaliziranih i fenotipski specifičnih genotipova vrste *S. delica*. U ovom radu i drugim istraživanjima (Tedesco i sur., 2021) *S. delica* je uglavnom nađena u vodenom staništu, što ukazuje na saprofitski način života. Međutim, ranije je pokazano da u određenim okolnostima ova vrsta može postati patogena za riblje domaćine (Magray i sur., 2021; Sandoval-Sierra i sur., 2014b; Sarowar i sur., 2013), što upućuje na potrebu za dodatnim istraživanjima i identifikacijom genotipova više virulencije.

#### 4.5. RAZNOLIKOST IZOLATA VRSTE *Saprolegnia ferax*

Podaci o analiziranim lokusima za vrstu *S. ferax* prikazani su u tablici 12. I kod ove vrste je u ranijem istraživanju opisan samo jedan genotip (DST1 – *S. ferax* CBS 305.37; Ravasi i sur., 2018) pa je za svaki od gena u MLST-shemi (osim *RPB2*) bio od ranije poznat samo po jedan alel. Diploidni rezultati sekvenciranja uočeni su kod istih gena kao i kod vrste *S. parasitica* – geni *COX1* i *NAD1* bili su homozigotni, a ostali heterozigotni. Gledajući objedinjeno uzorke iz istraživanja Ravasi i suradnika (2018) i iz ovog rada, do sada su za vrstu *S. ferax* poznata između jedan (*RPB2*) i četiri (*SHMT*) alela po lokusu. Za velik broj lokusa detektiran je mali broj polimorfizama jednog nukleotida (SNP) po lokusu (*RPB2*: 0, *ALTS1*: 1, *GLUT1*: 4 i *NAD1*: 3), kao i niski omjeri broja alela prema broju SNP-ova, što ukazuje da su aleli tih gena međusobno vrlo slični i niske diskriminatorne moći, čak i među izolatima iz Hrvatske i Švicarske. Veća raznolikost uočena je u lokusima *TUBB* i *SHMT* koji su sadržavali 10 odnosno 20 SNP po lokusu.

**Tablica 12.** Karakteristike lokusa za vrstu *Saprolegnia ferax*

<i>Saprolegnia ferax</i>		<i>ALTS1</i>	<i>COX1</i>	<i>GLUT</i>	<i>NAD1</i>	<i>RPB2</i>	<i>SHMT</i>	<i>TUBB</i>
<b>Hrvatska</b>	Broj alela u uzorcima iz ovog istraživanja	2	2	2	2	1	3	2
	Broj SNP u alelima iz ovog istraživanja	1	2	1	1	0	17	9
	Broj alela/broj SNP	2	1	2	2	-	0,18	0,22
	Broj novih alela*	1	2	2	2	1	3	2
<b>Ravasi i sur., 2018</b>	Broj alela	1	1	1	1	0	1	1
<b>Ukupno</b>	Ukupan broj dosad opisanih alela**	2	3	3	3	1	4	3
	Ukupan broj SNP u dosad opisanim alelima**	1	7	4	3	0	20	10
	Ukupan broj alela/ukupan broj SNP	2	0,43	0,75	1	-	0,20	0,30

SNP – polimorfizam jednog nukleotida (*engl. single nucleotide polymorphism*)

\* U odnosu na istraživanje Ravasi i sur. (2018)

\*\* U ovom istraživanju i istraživanju Ravasi i sur. (2018)

Analizom šest alela, sedam uzoraka vrste *S. ferax* iz hrvatskih pastrvskih ribnjaka podijeljeno je na četiri DST-a (DST2 – DST5) (tablica 13). Nijedan od njih nije detektiran ranije te su svi aleli (osim jednoga u lokusu *ALTS1*) opisani po prvi put. Detektirano je najviše izolata genotipa DST2 (4/7, 57 %), dok je u kolekciji bio samo po jedan izolat ostalih genotipova.

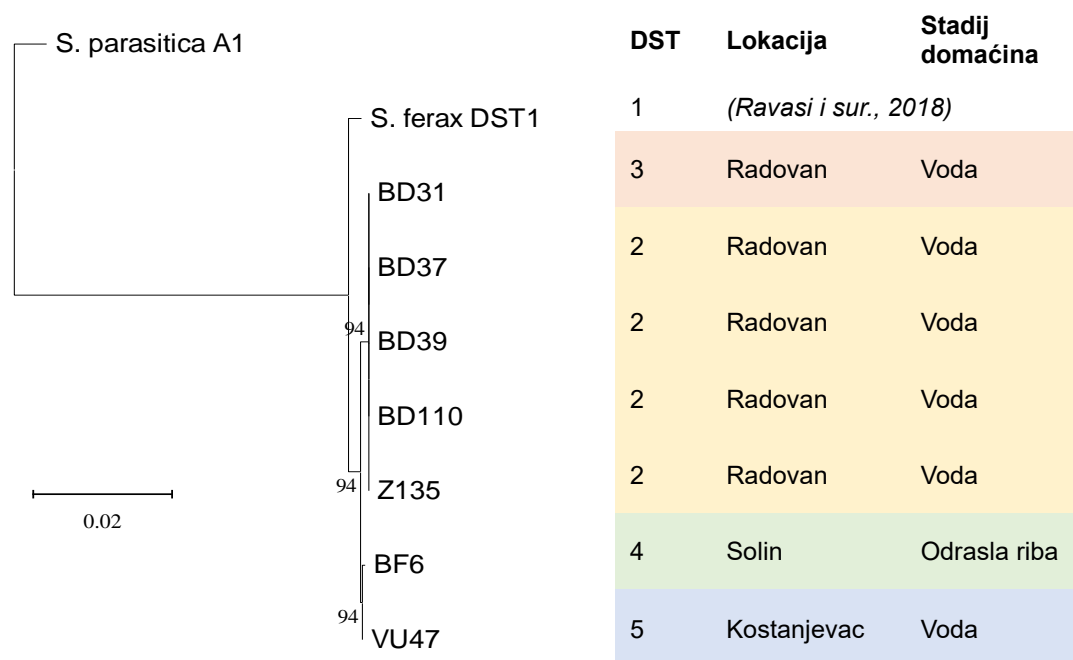
**Tablica 13.** Rezultati genotipizacije za sedam izolata vrste *Saprolegnia ferax*

ID	ALTS1	COX1	GLUT	NAD1	RPB2	SHMT	TUBB	DST
BD110	1	2*	2*	2*	1*	2*	2*	2*
BD37	1	2*	2*	2*	1*	2*	2*	2*
BD39	1	2*	2*	2*	1*	2*	2*	2*
Z135	1	2*	2*	2*	1*	2*	2*	2*
BD31	2*	2*	2*	2*	1*	2*	2*	3*
BF6	1	3*	2*	3*	NRS	3*	3*	4*
VU47	1	3*	3*	3*	NRS	4*	3*	5*

\* = Novi alel/DST u odnosu na istraživanje Ravasi i sur. (2018)

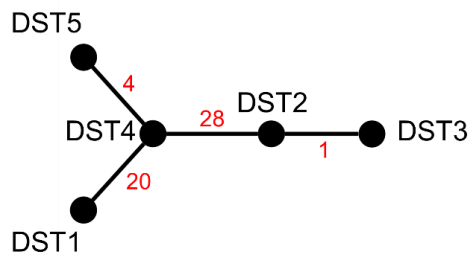
NRS = nema rezultata sekvenciranja (uzorci sa više vrpce na gelu)

Na filogenetskom stablu genotipova vrste *S. ferax* (slika 24) vidi se kako se ranije detektiran DST1 značajno razlikuje od genotipova iz Hrvatske. Oni su pak podijeljeni u dvije dobro podržane grupe. Jednu čine DST2 i DST3, a drugu DST4 i DST5. DST 2 i 3 se razlikuju samo u jednom SNP u lokusu *ALTS1* i tvore klonalni kompleks (slika 25). Genotipovi 4 i 5 se razlikuju u samo četiri SNP te su također genetski vrlo slični.



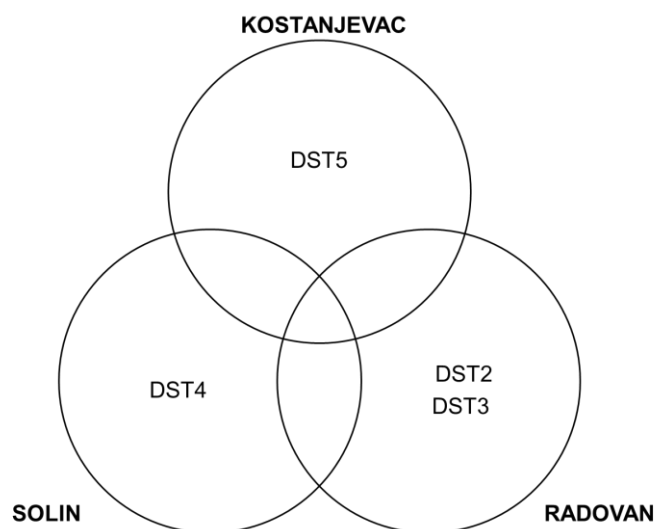
**Slika 24.** Filogenetsko stablo vrste *Saprolegnia delica* konstruirano metodom najveće vjerojatnosti (engl. *maximum likelihood method*, MLM) Pored čvorova su prikazane podrške grananjima u obliku bootstrap vrijednosti. Duljina grana sukladna je broju supstitucijskih promjena (mjerna crta označava 0,02 supstitucija).



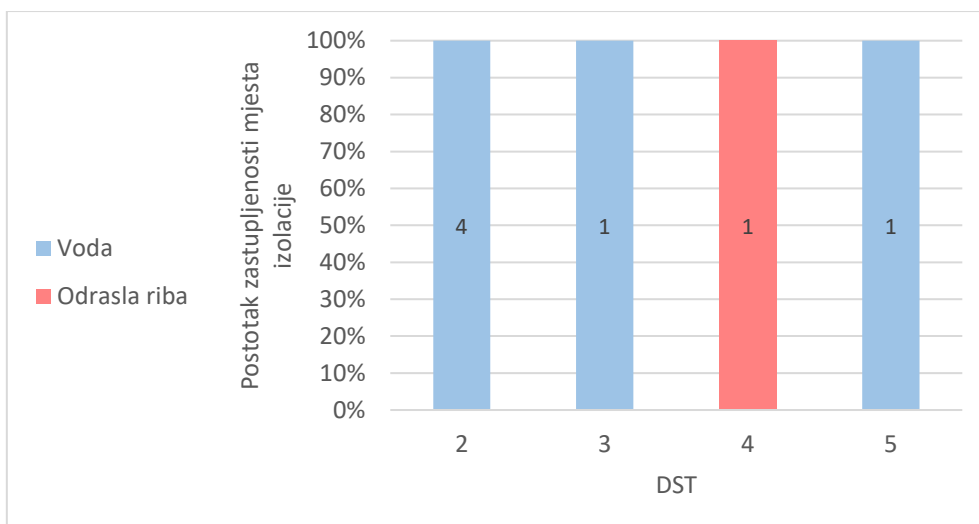


**Slika 25.** MST (engl. *Minimum Spanning Tree*) prikaz DST-ova vrste *Saprolegnia ferax*. Čvorovi predstavljaju DST-ove, a brojevi na granama broj SNP-ova između dva DST-a.

Analiza rasprostranjenosti genotipova (slika 26) i mjesta izolacije (slika 27) pokazala je da su svi bili specifični za lokaciju na kojoj su izolirani te da su uglavnom izolirani iz vode. Genotipovi DST 2 i 3 nađeni su u Radovanu, DST4 u Solinu, a DST5 u Kostanjevcu. Izolat BF6 genotipa DST4 jedini nije izoliran iz vode već s jedinke odrasle ribe. U nekoliko ranijih istraživanja za vrstu *S. ferax* utvrđeno je da može biti patogena, primjerice prema ličinkama vodozemaca (Sarowar i sur., 2013; Kiesecker i sur., 2001) i jajima žutog soma *Peleobagrus fulvidraco* (Cao i sur., 2012). Ipak, u većini istraživanja, kao i u ovom radu, izolati ove vrste nađeni su u puno većem broju u vodi nego na životinjama (Eszterbauer i sur., 2025; Tedesco i sur., 2021). Međutim, u škotskim uzgajalištima atlantskog lososa Shreves i sur. (2024) zabilježili su značajno veći broj uzoraka (70 %) na jedinkama lososa u odnosu na vodu. Prema ovim podacima, kao i kod vrste *S. australis*, postoji mogućnost da *S. ferax* preferira lososa kao domaćina u odnosu na pastrvu, no ovu bi pretpostavku trebalo ispitati *in vivo* infekcijskim pokusima.

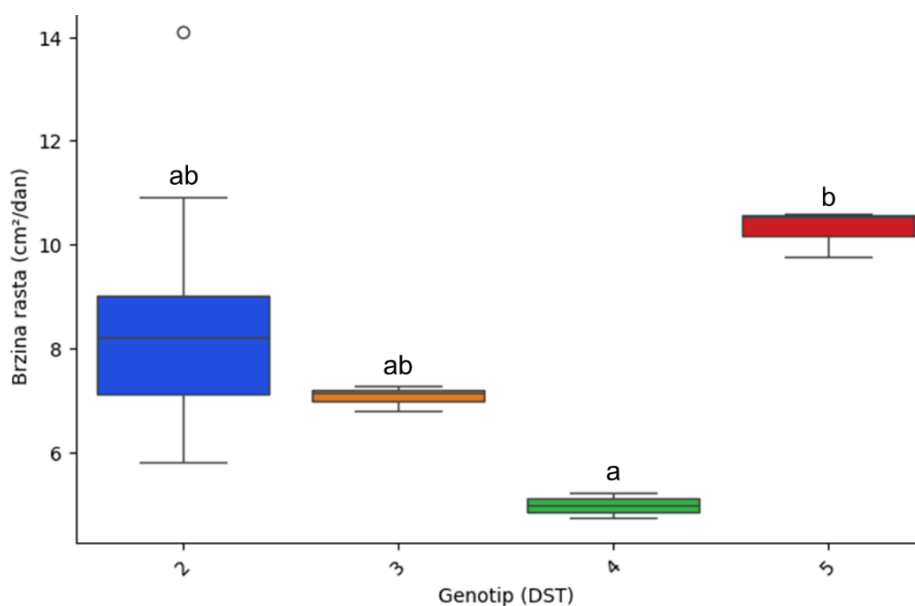


**Slika 26.** Geografska rasprostranjenost genotipova vrste *Saprolegnia ferax* u hrvatskim pastrvskim ribnjacima



**Slika 27.** Zastupljenost mjesta izolacije za različite DST-ove vrste *Saprolegnia ferax*. Brojevi u stupićima označavaju broj izolata za svako od mjesta izolacije.

Na kraju, i za vrstu *S. ferax* utvrđena je određena povezanost genotipa s fenotipom. ANOVA testom je utvrđena statistički značajna razlika u brzini rasta između različitih genotipova, ali je  $p$ -vrijednost bila relativno visoka ( $F = 3,40$ ,  $p = 0,044$ ), vjerojatno zbog malog broja izolata. Tukey post hoc analizom je utvrđeno da se jedino genotipovi DST4 i DST5 međusobno značajno statistički razlikuju (Tukey HSD test,  $p_{adj} = 0,04$ ), dok među ostalima nije utvrđena statistički značajna razlika (Tukey HSD test,  $p_{adj} > 0,05$ ). DST4 je imao najmanju prosječnu brzinu rasta od oko  $5 \text{ cm}^2/\text{dan}$ , a DST5 najveću od preko  $10 \text{ cm}^2/\text{dan}$  (slika 28). Na slici 28 vidljivo je da genotip DST2, kome pripada najviše izolata, obuhvaća vrlo širok raspon brzina rasta – od gotovo  $6$  pa do  $11 \text{ cm}^2/\text{dan}$ .



**Slika 28.** Prikaz ovisnosti brzine rasta ( $\text{cm}^2/\text{dan}$ ) o genotipu za vrstu *Saprolegnia ferax*. Razlike među skupinama prikazane su slovima. Skupine koje dijele isto slovo nisu statistički različite ( $p > 0,05$ ), dok skupine s različitim slovima pokazuju značajne razlike ( $p < 0,05$ ).

Zaključno, rezultati ovog rada demonstriraju postojanje geografski lokaliziranih i fenotipski specifičnih genotipova vrste *S. ferax*, koji vjerojatno nemaju izraženu patogenost prema pastrvi kao domaćinu. Ipak, u ranijim je istraživanjima pokazano da uzgajališta pastrva mogu biti izvor patogena koji se šire nizvodno u prirodni okoliš (Thorstad and Finstad, 2018; Andreou i sur., 2012; Johansen i sur., 2011; Wallace i sur., 2008; Raynard i sur., 2001), uključujući vrste iz roda *Saprolegnia* (Pavić i sur. 2021; Tedesco i sur., 2021). Može se pretpostaviti da ako povećana količina vrste *S. ferax* dospije iz ribnjaka u prirodne ekosustave to može predstavljati prijetnju za druge vodene organizme, poput vodozemaca (Sarowar i sur., 2013; Kiesecker i sur., 2001). Ovo naglašava važnost daljnjeg istraživanja ekologije ove vrste i njezinog utjecaja na bioraznolikost u vodenim ekosustavima te implementacije strožih biosigurnosnih mjera u akvakulturnim postrojenjima.

## 5. ZAKLJUČCI

U ovom je radu istražena genotipska raznolikost izolata četiri vrste roda *Saprolegnia* iz hrvatskih pastrvskih ribnjaka. Analizirana je povezanost pojedinih genotipova s lokacijom uzorkovanja, mjestom izolacije (voda ili životinjski domaćin) te brzinom radijalnog rasta micelija. Na temelju dobivenih rezultata doneseni su sljedeći zaključci:

1. U hrvatskim ribnjacima postoji velika genotipska raznolikost roda *Saprolegnia*.  
Detektirano je:
  - 8 DST-ova vrste *S. parasitica*,
  - 5 DST-ova vrste *S. australis*,
  - 2 DST-a vrste *S. delica*,
  - i 4 DST-a vrste *S. ferax*.
2. Većina detektiranih alela i genotipova (DST) opisana je po prvi put.
3. Većina genotipova pojedine vrste roda *Saprolegnia* je specifična za lokaciju uzgajališta s koje je izolirana.
4. Određene vrste i genotipovi roda *Saprolegnia* izolirani su pretežito s odraslih jedinki riba (npr. DST19 vrste *S. parasitica*) ili ikre (npr. DST7 vrste *S. parasitica*), dok su drugi uglavnom izolirani uz vode (npr. DST2 vrsta *S. australis* i *S. delica*).
5. DST-ovi unutar pojedine vrste roda *Saprolegnia* međusobno se statistički značajno razlikuju u brzini radijalnog rasta micelija, što ukazuje na fenotipske specifičnosti pojedinih genotipova.
6. S obzirom na veliku genotipsku raznolikost, potrebno je modificirati MLST-metodu genotipizacije za pojedine lokuse (ponajprije za lokus *ALTS1*) kako bi se provodila uspješnija genotipizacija vrsta.

## 6. LITERATURA

1. Andreou D, Arkush KD, Guégan JF, Gozlan RE (2012) Introduced pathogens and native freshwater biodiversity: a case study of *Sphaerothecum destruens*. *PLoS One* **7**(5), e36998. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036998>
2. Bangyeekhun E, Quiniou SM, Bly JE, Cerenius L (2001) Characterisation of *Saprolegnia* sp. isolates from channel catfish. *Dis Aquat Organ* **45**(1), 53-59. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738946>
3. Bastian M, Heymann S, Jacomy M (2009) Gephi: an open source software for exploring and manipulating networks. International AAAI Conference on Weblogs and Social Media. <https://doi.org/10.1609/icwsm.v3i1.13937>
4. Beakes GW, Glockling SL, Sekimoto S (2012) The evolutionary phylogeny of the oomycete “fungi”. *Protoplasma* **249**(1), 3-19. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0269-2>
5. Blaya J, Lloret E, Santísima-Trinidad AB, Ros M, Pascual JA (2016) Molecular methods (digital PCR and real-time PCR) for the quantification of low copy DNA of *Phytophthora nicotianae* in environmental samples. *Pest Manag Sci* **72**(4), 747-753. <https://doi.org/10.1002/ps.4048>
6. Bruno DW, West PV, Beakes GW (2011) *Saprolegnia* and other oomycetes. U: Woo PTK, Bruno DW (ured.) Fish diseases and disorders. Volume 3: viral, bacterial and fungal infections. 2. izdanje [online], Cabi, Wallingford UK, str. 669-720. <https://doi.org/10.1079/9781845935542.0669>
7. Burki F, Roger AJ, Brown MW, Simpson AG (2020) The new tree of eukaryotes. *Trends Ecol Evol* **35**(1), 43-55. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.08.008>
8. Cao H, Zheng W, Xu J, Ou R, He S, Yang X (2012) Identification of an isolate of *Saprolegnia ferax* as the causal agent of saprolegniosis of Yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) eggs. *Vet Res Commun* **36**, 239-244. <https://doi.org/10.1007/s11259-012-9536-8>
9. Chanu KV, Thakuria D, Pant V, Bisht S, Tandel RS (2022) Development of multiplex PCR assay for species-specific detection and identification of *Saprolegnia parasitica*. *Biotechnol Rep* **35**, e00758. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00758>
10. Costa S, Lopes I (2022) Saprolegniosis in amphibians: An integrated overview of a fluffy killer disease. *J Fungi* **8**(5), 537. <https://doi.org/10.3390/jof8050537>
11. Davison PI, Copp GH, Creach V, Vilizzi L, Britton JR (2017) Application of environmental DNA analysis to inform invasive fish eradication operations. *Sci Nat* **104**, 1-7. <https://doi.org/10.1007/s00114-017-1453-9>
12. de la Bastide PY, Naumann C, Hintz WE (2018) Assessment of intra-specific variability in *Saprolegnia parasitica* populations of aquaculture facilities in British Columbia, Canada. *Dis Aquat Organ* **128**(3), 235-248. <https://doi.org/10.3354/dao03224>
13. Derelle R, López-García P, Timpano H, Moreira D (2016) A phylogenomic framework to study the diversity and evolution of *Stramenopiles* (=Heterokonts). *Mol Bio Evol* **33**(11), 2890-2898. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw168>
14. Elameen A, Stueland S, Kristensen R, Fristad RF, Vrålstad T, Skaar I (2021) Genetic analyses of *Saprolegnia* strains isolated from salmonid fish of different geographic

- origin document the connection between pathogenicity and molecular diversity. *J Fungi* **7**(9), 713. <https://doi.org/10.3390/jof7090713>
15. Engblom C, Landor L, Sjöqvist C, Korkea-aho T, Viljamaa-Dirks S, Paulin L i sur. (2023) Identification and genetic characterization of *Saprolegnia parasitica*, isolated from farmed and wild fish in Finland. *J Fish Dis* **46**(8), 849-860. <https://doi.org/10.1111/jfd.13795>
  16. Erdei N, Hardy T, Verebélyi V, Weiperth A, Baska F, Eszterbauer E (2023) New insights into the morphological diversity of *Saprolegnia parasitica* (Oomycota) strains under in vitro culture conditions. *J Fungi* **9**(10), 982. <https://doi.org/10.3390/jof9100982>
  17. Eszterbauer E, Erdei N, Hardy T, Kovács A, Verebélyi V, Hoitsy G (2025) Distribution and environmental preferences of *Saprolegnia* and *Leptolegnia* (Oomycota) species in fish hatcheries in Hungary. *Aquaculture* **596**, 741737. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.741737>
  18. Ferguson H (2023, 21. studeni) Saprolegnia Infection in Fish – Gross Pathology and Histopathology - *Fish Patology*. <https://fishhistopathology.com/?p=2714>. Pristupljeno 6. siječnja 2025.
  19. Francesconi C, Boštjančić LL, Bonassin L, Schardt L, Rutz C, Makkonen J i sur. (2024) High variation of virulence in *Aphanomyces astaci* strains lacks association with pathogenic traits and mtDNA haplogroups. *J Invertebr Pathol* **206**, 108153. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2024.108153>
  20. Ghosh S, Straus DL, Good C, Phuntumart V (2021) Development and comparison of loop-mediated isothermal amplification with quantitative PCR for the specific detection of *Saprolegnia* spp. *Plos One* **16**(12), e0250808. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250808>
  21. Gozlan RE, Marshall WL, Lilje O, Jessop CN, Gleason FH, Andreou D (2014) Current ecological understanding of fungal-like pathogens of fish: what lies beneath?. *Front Microbiol* **5**, 62. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00062>
  22. Hall T (2011) BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bull Biosci* **2**(1), 60-61.
  23. Hardy T, Erdei N, Sipos D, Verebélyi V, Eszterbauer E (2023) Experimental exposure of rainbow trout eggs to water mould, *Saprolegnia parasitica* (Oomycota): intraspecific differences in pathogenicity. *Acta Vet Hung* **71**(2), 101-111. <https://doi.org/10.1556/004.2023.00931>
  24. Hussein MM, Hatai K (2002) Pathogenicity of *Saprolegnia* species associated with outbreaks of salmonid saprolegniosis in Japan. *Fish Sci* **68**, 1067–1072. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2002.00533.x>
  25. Jiang RH, de Bruijn I, Haas BJ, Belmonte R, Löbach L, Christie J i sur. (2013) Distinctive expansion of potential virulence genes in the genome of the oomycete fish pathogen *Saprolegnia parasitica*. *PLoS Genet* **9**(6), e1003272. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003272>
  26. Johansen LH, Jensen I, Mikkelsen H, Bjørn PA, Jansen PA, Bergh Ø (2011) Disease interaction and pathogens exchange between wild and farmed fish populations with special reference to Norway. *Aquaculture* **315**(3-4), 167-186. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.02.014>

27. Kiesecker JM, Blaustein AR, Miller CL (2001) Transfer of a pathogen from fish to amphibians. *Conserv Biol* **15**(4), 1064-1070.  
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2001.0150041064.x>
28. Korkea-aho T, Wiklund T, Engblom C, Vainikka A, Viljamaa-Dirks S (2022) Detection and quantification of the oomycete *Saprolegnia parasitica* in aquaculture environments. *Microorganisms* **10**(11), 2186.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10112186>
29. Krugner-Higby L, Haak D, Johnson PT, Shields JD, Jones III WM, Reece KS i sur. (2010) Ulcerative disease outbreak in crayfish *Orconectes propinquus* linked to *Saprolegnia australis* in Big Muskellunge Lake, Wisconsin. *Dis Aquat Organ* **91**(1), 57-66. <https://doi.org/10.3354/dao02237>
30. Lindholm-Lehto PC, Pylkkö P (2024) Saprolegniosis in aquaculture and how to control it?. *Aquaculture, Fish and Fisheries* **4**(4), e2200. <https://doi.org/10.1002/aff2.200>
31. Lindsay RJ, Holder PJ, Talbot NJ, Gudelj I (2023) Metabolic efficiency reshapes the seminal relationship between pathogen growth rate and virulence. *Ecol Lett* **26**(6), 896-907. <https://doi.org/10.1111/ele.14218>
32. Lone SA, Manohar S (2018) *Saprolegnia parasitica*, a lethal oomycete pathogen: demands to be controlled. *J Inf Mol Biol* **6**(2), 36-44.  
<https://doi.org/10.17582/journal.jimb/2018/6.2.36.44>
33. Magray A R, Lone SA, Ganai BA, Ahmad F, Hafeez S (2021) The first detection and *in vivo* pathogenicity characterization of *Saprolegnia delica* from Kashmir Himalayas. *Aquaculture* **542**, 736876. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736876>
34. Magray AR, Lone SA, Ganai BA, Ahmad F, Dar GJ, Dar JS, Rehman S (2019) Comprehensive, classical and molecular characterization methods of *Saprolegnia* (Oomycota; Stramnipila), an important fungal pathogen of fish. *Fungal Biol Rev* **33**(3-4), 166-179. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2018.12.001>
35. Masigol H, Khodaparast SA, Mostowfizadeh-Ghalanfarsa R, Rojas-Jimenez K, Woodhouse JN, Neubauer D i sur. (2020) Taxonomical and functional diversity of *Saprolegniales* in Anzali lagoon, Iran. *Aquat Ecol* **54**, 323-336.  
<https://doi.org/10.1007/s10452-019-09745-w>
36. Masigol H, van West P, Taheri SR, Fregeneda-Grandes JM, Pârvulesc, L, McLaggan D i sur. (2023) Advancements, deficiencies, and future necessities of studying Saprolegniales: A semi-quantitative review of 1073 published papers. *Fungal Biol Rev* **46**, 100319. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2023.100319>
37. Matthews E, Ellison A, Cable J (2021) *Saprolegnia parasitica* zoospore activity and host survival indicates isolate variation in host preference. *Fungal Biol - UK* **125**(4), 260-268. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.11.002>
38. Mirmazloomi S, Ghiasi M, Shirangi SA, Lashgari SN, Khosravi AR (2022) Morphological and molecular characterization of two species of *Saprolegnia* isolated from a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hatchery in Iran. *Int Aquat Res* **14**(3).  
<https://doi.org/10.22034/IAR.2022.1959159.1282>
39. Naumann C (2014) Use of random amplified microsatellites (RAMS) to discern genotypes of *Saprolegnia parasitica* isolates on the west coast of British Columbia. MSc thesis, University of Victoria.
40. Orhan N (2021) St. John's wort (*Hypericum perforatum*) laboratory guidance document. Austin, TX: ABCAHP-NCNPR Botanical Adulterants Prevention Program.



41. Pavić D, Grbin D, Hudina S, Zmrzljak UP, Miljanović A, Košir R i sur. (2022) Tracing the oomycete pathogen *Saprolegnia parasitica* in aquaculture and the environment. *Sci Rep* **12**, 16646. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16553-0>
42. Pavić D, Miljanović A, Grbin D, Šver L, Vladušić T, Galuppi R i sur. (2021) Identification and molecular characterization of oomycete isolates from trout farms in Croatia, and their upstream and downstream water environments. *Aquaculture* **540**, 736652. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736652>
43. Phillips AJ, Anderson VL, Robertson EJ, Secombes CJ, van West P (2008) New insights into animal pathogenic oomycetes. *Trends Microbiol* **16**(1), 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.10.013>
44. Pires-Zottarelli CLA, de Oliveira da Paixão SC, Marano AV, Prado J, James TY, Jerônimo GH i sur. (2024) Morphological and phylogenetic analyses of *Saprolegniales* (*Oomycota*) reveal taxonomic and nomenclatural novelties. *Mycol Prog* **23**(1), 24. <https://doi.org/10.1007/s11557-024-01963-3>
45. Ravasi D, De Respinis S, Wahli T (2018) Multilocus sequence typing reveals clonality in *Saprolegnia parasitica* outbreaks. *J Fish Dis* **41**(11), 1653-1665. <https://doi.org/10.1111/jfd.12869>
46. Raynard RS, Murray AG, Gregory A (2001) Infectious salmon anaemia virus in wild fish from Scotland. *Dis Aquat Organ* **46**(2), 93-100. <https://doi.org/10.3354/dao046093>
47. Rocchi S, Tisserant M, Valot B, Laboissière A, Frossard V, Reboux G (2017) Quantification of *Saprolegnia parasitica* in river water using real-time quantitative PCR: from massive fish mortality to tap drinking water. *Int J Environ Heal R* **27**(1), 1-10. <https://doi.org/10.1080/09603123.2016.1246653>
48. Ruppitsch W (2016) Molecular typing of bacteria for epidemiological surveillance and outbreak investigation/Molekulare Typisierung von Bakterien für die epidemiologische Überwachung und Ausbruchsabklärung. Die Bodenkultur. *Journal of Land Management, Food and Environment* **67**(4), 199-224. <https://doi.org/10.1515/boku-2016-0017>
49. Rusch J, Mojžišová M, Strand D, Svobodová J, Vrålstad T, Petrusek A (2020) Simultaneous detection of native and invasive crayfish and *Aphanomyces astaci* from environmental DNA samples in a wide range of habitats in Central Europe. *NeoBiota* **58**, 1-32. <https://doi.org/10.3897/neobiota.58.49358>
50. Sandoval-Sierra JV i Dieguez-Uribeondo J (2015) A comprehensive protocol for improving the description of *Saprolegniales* (*Oomycota*): two practical examples (*Saprolegnia aenigmatica* sp. nov. and *Saprolegnia racemosa* sp. nov.). *PloS One* **10**(7), e0132999. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132999>
51. Sandoval-Sierra JV, Latif-Eugenin F, Martín MP, Zaror L, Dieguez-Uribeondo J (2014b) *Saprolegnia* species affecting the salmonid aquaculture in Chile and their associations with fish developmental stage. *Aquaculture* **434**, 462-469. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.005>
52. Sandoval-Sierra JV, Martín MP, Dieguez-Uribeondo J (2014a) Species identification in the genus *Saprolegnia* (*Oomycetes*): defining DNA-based molecular operational taxonomic units. *Fungal Biol - UK* **118**(7), 559-578. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.10.005>
53. Sarowar MN, Cusack R, Duston J (2019) *Saprolegnia* molecular phylogeny among farmed teleosts in Nova Scotia, Canada. *J Fish Dis* **42**(12), 1745-1760. <https://doi.org/10.1111/jfd.13090>



54. Sarowar MN, Van Den Berg AH, McLaggan D, Young MR, Van West P (2013) *Saprolegnia* strains isolated from river insects and amphipods are broad spectrum pathogens. *Fung Biol – UK* **117**(11-12), 752-763. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.09.002>
55. Schwerer M (2021) Fenotipska i genotipska varijabilnost izolata roda *Saprolegnia* iz hrvatskih pastrvskih ribnjaka (diplomski rad), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
56. Shreves KV, Saraiva M, Ruba T, Miller C, Scott EM, McLaggan D i sur. (2024) Specific Phylotypes of *Saprolegnia parasitica* Associated with Atlantic Salmon Freshwater Aquaculture. *J Fungi* **10**(1), 57. <https://doi.org/10.3390/jof10010057>
57. Songe MM, Willems A, Wiik-Nielsen J, Thoen E, Evensen O, van West P i sur. (2016) *Saprolegnia diclina* IIIA and *S. parasitica* employ different infection strategies when colonizing eggs of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis* **39**, 343–352. <https://doi.org/10.1111/jfd.12368>
58. Steciow MM, Lara E, Paul C, Pillonel A, Belbahri L (2014) Multiple barcode assessment within the *Saprolegnia-Achlya* clade (*Saprolegniales*, *Oomycota*, *Straminipila*) brings order in a neglected group of pathogens. *IMA fungus* **5**, 439-448. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2014.05.02.08>
59. Stueland S, Hatai K, Skaar I (2005) Morphological and physiological characteristics of *Saprolegnia* spp. strains pathogenic to Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis* **28**, 445–453. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2005.00635.x>
60. Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Mol Biol Evol* **38**, 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
61. Tedesco P, Fioravanti ML, Galuppi R (2019) In vitro activity of chemicals and commercial products against *Saprolegnia parasitica* and *Saprolegnia delica* strains. *J Fish Dis* **42**(2), 237-248. <https://doi.org/10.1111/jfd.12923>
62. Tedesco P, Saraiva M, Sandoval-Sierra JV, Fioravanti ML, Morandi B, Dieguez-Uribeondo J (2021) Evaluation of potential transfer of the pathogen *Saprolegnia parasitica* between farmed salmonids and wild fish. *Pathogens* **10**(8), 926. <https://doi.org/10.3390/pathogens10080926>
63. Thoen E, Evensen Ø, Skaar I (2011) Pathogenicity of *Saprolegnia* spp. to Atlantic salmon, *Salmo salar* L., eggs. *J Fish Dis* **34**(8), 601-608. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01273.x>
64. Thorstad EB, Finstad B (2018) Impacts of salmon lice emanating from salmon farms on wild Atlantic salmon and sea trout. *NINA Rep* **1449**, 1–22.
65. Tuffs S, Oidtmann BA (2011) comparative study of molecular diagnostic methods designed to detect the crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*. *Vet Microbiol* **153**, 343–353. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.06.012>
66. van den Berg AH, 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**(2), 33-42. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2013.05.001>
67. Van West P (2006) *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem. *Mycologist* **20**(3), 99-104. <https://doi.org/10.1016/j.mycol.2006.06.004>

68. Verebelyi V, Erdei N, Hardy T, Eszterbauer E (2024) Description of *Saprolegnia velencensis* sp. n. (Oomycota), a novel water mold species from Lake Velence, Hungary. *PLoS One* **19**(3), e0298814. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0298814>
69. Wallace IS, Gregory A, Murray AG, Munro ES, Raynard RS (2008) Distribution of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in wild marine fish from Scottish waters with respect to clinically infected aquaculture sites producing Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis* **31**(3), 177-186. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00886.x>

## 7. PRILOZI

**Tablica 1.A** Opis izolata vrste *Saprolegnia parasitica*

Šifra izolata	DST	Lokacija uzorkovanja	Datum uzorkovanja	Vrsta domaćina	Stadij domaćina	Brzina rasta micelija [cm <sup>2</sup> /dan]	GenBank pristupni broj ITS-sekvence
<b>A1</b>	7	Radovan	siječanj 2019.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Jaje	5,88	MT555894
<b>A4</b>	7	Radovan	siječanj 2019.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Jaje	7,54	MT555895
<b>C1</b>	7	Radovan	siječanj 2019.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Jaje	5,06	MT555899
<b>C2</b>	7	Radovan	siječanj 2019.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Jaje	6,48	MT555900
<b>C4</b>	7	Radovan	siječanj 2019.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Jaje	5,68	MT555902
<b>D3</b>	7	Radovan	siječanj 2019.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Jaje	6,01	MT555903
<b>E4</b>	7	Radovan	siječanj 2019.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Jaje	6,77	MT555969
<b>B2L3</b>	16	Solin	studeni 2018.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Odrasla riba	6,18	MT555939
<b>B7G</b>	17	Kostanjevac	prosinac 2018.	<i>Salmo trutta</i>	Odrasla riba	5,26	MT555942
<b>B7L2</b>	17	Kostanjevac	prosinac 2018.	<i>Salmo trutta</i>	Odrasla riba	5,59	MT555935
<b>BD33</b>	17	Radovan	ožujak 2019.	–	Voda	5,48	MT555965
<b>VD110</b>	17	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	6,13	MT555956
<b>Z115</b>	17	Radovan	siječanj 2019.	–	Voda	7,17	MT555977
<b>BF1</b>	18	Solin	studeni 2018.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Ličinke	10,51	MT555864
<b>BF2</b>	18	Solin	studeni 2018.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Ličinke	9,64	MT555865
<b>BF4</b>	18	Solin	studeni 2018.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Ličinke	9,39	MT555866
<b>Z16</b>	18	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	10,33	MT555886

**Tablica 1.A** Opis izolata vrste *Saprolegnia parasitica* - nastavak

Šifra izolata	DST	Lokacija uzorkovanja	Datum uzorkovanja	Vrsta domaćina	Stadij domaćina	Brzina rasta micelija [cm <sup>2</sup> /dan]	GenBank pristupni broj ITS-sekvence
<b>Z22</b>	18	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	10,03	MT555869
<b>Z44</b>	18	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	8,53	MT555890
<b>G1L1</b>	19	Gračani	prosinac 2018.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Odrasla riba	3,58	MT555978
<b>G2L1</b>	19	Gračani	prosinac 2018.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Odrasla riba	4,44	MT555979
<b>G2L2</b>	19	Gračani	prosinac 2018.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Odrasla riba	4,33	MT555980
<b>G3L1</b>	19	Gračani	prosinac 2018.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Odrasla riba	4,53	MT555981
<b>G3L2</b>	19	Gračani	prosinac 2018.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Odrasla riba	4,15	MT555982
<b>G4L1</b>	19	Gračani	prosinac 2018.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Odrasla riba	4,56	MT555983
<b>G5L2</b>	19	Gračani	prosinac 2018.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Odrasla riba	3,59	MT555985
<b>G6L2</b>	19	Gračani	prosinac 2018.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Odrasla riba	4,57	MT555987
<b>G8L2</b>	19	Gračani	prosinac 2018.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Odrasla riba	4,39	MT555989
<b>RZ11</b>	19	Gračani	prosinac 2019.	–	Voda	4,42	MT555991
<b>RZ14</b>	19	Gračani	prosinac 2019.	–	Voda	4,13	MT555992
<b>Z13</b>	20	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	10,66	MT555883
<b>Z15</b>	20	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	11,11	MT555885
<b>Z131</b>	21	Radovan	siječanj 2019.	–	Voda	8,69	MT555908
<b>Z132</b>	21	Radovan	siječanj 2019.	–	Voda	7,89	MT555909
<b>Z41</b>	21	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	6,44	MT555887
<b>Z43</b>	21	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	5,85	MT555889
<b>Z46</b>	21	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	7,12	MT555892
<b>Z24</b>	22	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	6,84	MT555871

**Tablica 1.B** Opis izolata vrste *Saprolegnia australis*

Šifra izolata	DST	Lokacija uzorkovanja	Datum uzorkovanja	Vrsta domaćina	Stadij domaćina	Brzina rasta micelija [cm <sup>2</sup> /dan]	GenBank pristupni broj ITS-sekvence
<b>B5L1</b>	2	Kostanjevac	prosinac 2018.	<i>Salmo trutta</i>	Odrasla riba	10,80	MT555940
<b>B5L2</b>	2	Kostanjevac	prosinac 2018.	<i>Salmo trutta</i>	Odrasla riba	7,00	MT555941
<b>B8S</b>	2	Kostanjevac	prosinac 2018.	<i>Salmo trutta</i>	Odrasla riba	10,15	MT555937
<b>RZ31</b>	2	Gračani	prosinac 2019.	–	Voda	8,71	MT555993
<b>RZ32</b>	2	Gračani	prosinac 2019.	–	Voda	10,37	MT555994
<b>RZ33</b>	2	Gračani	prosinac 2019.	–	Voda	3,33	MT555995
<b>RZ34</b>	2	Gračani	prosinac 2019.	–	Voda	8,94	MT555996
<b>RZ44</b>	2	Gračani	prosinac 2019.	–	Voda	2,77	MT556002
<b>RZ45</b>	2	Gračani	prosinac 2019.	–	Voda	9,41	MT556003
<b>VD14</b>	2	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	10,41	MT555953
<b>VD15</b>	2	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	10,35	MT555954
<b>VD16</b>	2	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	9,54	MT555955
<b>VD210</b>	2	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	3,20	MT555951
<b>VD22</b>	2	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	10,16	MT555946
<b>VD310</b>	2	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	10,89	MT555959
<b>VD33</b>	2	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	10,30	MT555912
<b>VD34</b>	2	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	8,57	MT555913
<b>VD35</b>	2	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	9,59	MT555914
<b>VD36</b>	2	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	9,23	MT555915
<b>VD37</b>	2	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	8,77	MT555916

**Tablica 1.B** Opis izolata vrste *Saprolegnia australis* - nastavak

Šifra izolata	DST	Lokacija uzorkovanja	Datum uzorkovanja	Vrsta domaćina	Stadij domaćina	Brzina rasta micelija [cm <sup>2</sup> /dan]	GenBank pristupni broj ITS-sekvence
<b>VD38</b>	2	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	9,93	MT555917
<b>VU210</b>	2	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	10,75	MT555960
<b>Z53</b>	2	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	9,89	MT555920
<b>Z62</b>	2	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	10,84	MT555925
<b>Z63</b>	2	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	10,87	MT555926
<b>Z71</b>	2	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	8,62	MT555930
<b>Z72</b>	2	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	9,91	MT555931
<b>Z73</b>	2	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	10,85	MT555932
<b>Z74</b>	2	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	10,82	MT555933
<b>Z75</b>	2	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	10,77	MT555934
<b>Z83</b>	2	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	9,41	MT555945
<b>Z95</b>	2	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	10,92	MT555976
<b>RZ41</b>	3	Gračani	prosinac 2019.	–	Voda	6,26	MT555999
<b>RZ42</b>	3	Gračani	prosinac 2019.	–	Voda	6,03	MT556000
<b>RZ43</b>	3	Gračani	prosinac 2019.	–	Voda	5,30	MT556001
<b>RZ46</b>	3	Gračani	prosinac 2019.	–	Voda	6,41	MT556004
<b>Z23</b>	3	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	6,81	MT555870
<b>Z25</b>	3	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	8,09	MT555872
<b>Z36</b>	3	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	5,29	MT555879
<b>Z37</b>	3	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	5,96	MT555880

**Tablica 1.B** Opis izolata vrste *Saprolegnia australis* - nastavak

Šifra izolata	DST	Lokacija	Datum	Vrsta domaćina	Stadij domaćina	Brzina rasta [cm2/dan]	GenBank pristupni broj
<b>VD31</b>	4	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	9,36	MT555906
<b>Z91</b>	4	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	5,90	MT555972
<b>Z11</b>	5	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	11,08	MT555881
<b>Z32</b>	5	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	11,00	MT555876
<b>Z31</b>	6	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	5,57	MT555875

**Tablica 1.C** Opis izolata vrste *Saprolegnia delica*

Šifra izolata	DST	Lokacija uzorkovanja	Datum uzorkovanja	Vrsta domaćina	Stadij domaćina	Brzina rasta micelija [cm <sup>2</sup> /dan]	GenBank pristupni broj ITS-sekvence
<b>B9S</b>	2	Kostanjevac	prosinac 2018.	<i>Salmo trutta</i>	Odrasla riba	9,78	MT555943
<b>VD11</b>	2	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	7,31	MT555970
<b>VD12</b>	2	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	10,73	MT555952
<b>VD23</b>	2	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	7,62	MT555947
<b>VD24</b>	2	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	11,78	MT555948
<b>VD25</b>	2	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	9,42	MT555949
<b>VD32</b>	2	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	6,96	MT555922
<b>VD39</b>	2	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	7,47	MT555958
<b>VU26</b>	2	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	10,10	MT555938
<b>Z51</b>	2	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	12,52	MT555918
<b>Z52</b>	2	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	9,58	MT555919
<b>Z54</b>	2	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	10,02	MT555921
<b>Z55</b>	2	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	10,87	MT555923
<b>Z56</b>	2	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	7,78	MT555924
<b>Z64</b>	2	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	11,56	MT555928
<b>Z84</b>	2	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	8,71	MT555971
<b>Z92</b>	2	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	10,87	MT555973
<b>Z94</b>	2	Kostanjevac	prosinac 2018.	–	Voda	11,06	MT555975
<b>BF5</b>	3	Solin	studeni 2018.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Ličinke	8,83	MT555867
<b>Z14</b>	3	Solin	prosinac 2018.	–	Voda	5,58	MT555884



**Tablica 1.D** Opis izolata vrste *Saprolegnia ferax*

Šifra izolata	DST	Lokacija uzorkovanja	Datum uzorkovanja	Vrsta domaćina	Stadij domaćina	Brzina rasta micelija [cm <sup>2</sup> /dan]	GenBank pristupni broj ITS-sekvence
<b>BD110</b>	2	Radovan	ožujak 2019.	–	Voda	8,43	MT555968
<b>BD37</b>	2	Radovan	ožujak 2019.	–	Voda	6,32	MT555966
<b>BD39</b>	2	Radovan	ožujak 2019.	–	Voda	8,35	MT555967
<b>Z135</b>	2	Radovan	siječanj 2019.	–	Voda	10,90	MT555911
<b>BD31</b>	3	Radovan	ožujak 2019.	–	Voda	7,07	MT555963
<b>BF6</b>	4	Solin	studeni 2018.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Odrasla riba	4,90	MT555868
<b>VU47</b>	5	Kostanjevac	ožujak 2019.	–	Voda	10,29	MT555957

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Ana Straga, izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Ana Straga

Vlastoručni potpis