

Izolati vodenih plijesni (Oomycota) s kutikule slatkovodnih deseteronožnih rakova u Hrvatskoj

Petrokov, Luka

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:747244>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Luka Petrokov

**Izolati vodenih plijesni (Oomycota) s kutikule
slatkovodnih deseteronožnih rakova u
Hrvatskoj**

Diplomski rad

Zagreb, 2023.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Luka Petrokov

**Oomycete (Oomycota) isolates from the
cuticle of crayfish species in Croatia**

Master thesis

Zagreb, 2023.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ane Bielen te uz pomoć dr. sc. Dora Pavić pri izradi i na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta pod komentorstvom izv. prof. dr. sc. Sandre Hudina. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra ekologije i zaštite prirode.

ZAHVALE

Prvo bih, u nadi da ih nije cijeli proces pisanja ovog diplomskog rada koštao previše živaca, zahvalio svojoj mentorici Ani Bielen i Sandri Hudina na strpljivosti i predanosti u zadnjih godinu i pol dana (punih uspona i padova).

Od srca se zahvaljujem i svojoj asistentici Dori Pavić koja mi je najviše pomogla u izvedbi eksperimentalnog dijela ovog rada i što je danonoćno visila na Whatsapp-u tijekom svake elektroforeze i PCR-a. Hvala i profesorici Maguire, Pauli, Leoni i Catherini na pomoći na terenima i u trenucima mog odsustva. Raditi ovaj rad bilo je vrlo lako u ovako složnoj ekipi koja vrvi samo i isključivo pozitivom.

Najviše hvala sponzorima mog školovanja, mojoj obitelji. Hvala Barbara i Marko (i bratu Leu), nonićima Ederini i Franji te Franki i Ivici, teti Lindi. Hvala i Davidu i Vesni, Katji, Ivi i Tei. Vi ste mi bili uvijek najveća podrška te iako ste počeli sumnjati da će ovaj dan doći, ipak je svanuo.

Mojim Dušmanima: Aniti, Keki, Niki, Martini, Tinu, Filipu, Mariti, Ivanu (Beni), Andrei, Lani, Erni, u biti svima osim Mimiju - hvala vam što postojite i što ste mi zadnje godine studiranja ukrasili bezbrojnim smijehovima koji izazivaju upale trbušnih mišića. Bolju ekipu od vas ne bih mogao zamisliti.

Hvala mojoj ekipi iz Umaga: Iri, Frani i Davidu na konstantnim ruganjima što najduže studiram. Takve stvari daju motivaciju za uspješan završetak fakulteta. Hvala i Ariani što studira čak i duže od mene.

Hvala i bivšim cimerima Borni i Samuelu, prijateljima, bivšim ljubavima, kolegama (posebno Auu), Udruzi studenata biologije - BIUS i svim poznanicima. Svi ste vi bili dio mog putovanja i dali svoj obol meni kao osobi.

Na kraju krajeva, hvala i meni.

Lp,

LP.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Izolati vodenih plijesni (Oomycota) s kutikule slatkovodnih deseteronožnih rakova u Hrvatskoj

Luka Petrokov

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Istraživanja rasprostranjenosti i utjecaja vodenih plijesni na slatkovodne deseteronožne rakove većinom su fokusirana na patogena *Aphanomyces astaci*, dok su u Hrvatskoj i ostalim dijelovima Europe nedovoljno istražene druge vrste vodenih plijesni koje mogu nastanjivati kutikulu rakova, iako neke od njih također mogu imati negativan utjecaj na domaćina. Cilj ovog istraživanja bio je uzgojiti i taksonomski identificirati izolate vodenih plijesni s egzoskeleta pet različitih autohtonih i invazivnih vrsta rakova u Hrvatskoj. Vodene plijesni kultivirane su iz pereopoda i abdominalne kutikule položene na PG1 krutu hranjivu podlogu, uz precjepeljivanje hifa na nove podloge do dobivanja akseničnih kultura vodenih plijesni. Identifikacija izolata do razine vrste provedena je sekvenciranjem ITS (engl. *internal transcribed spacer*) regije uz naknadnu filogenijsku analizu. Utvrđene su četiri vrste vodenih plijesni izolirane s kutikule dviju vrsta rakova: izolati *Saprolegnia australis* i *Saprolegnia turfosa* s kutikule vrste *Pacifastacus leniusculus* te izolati *Aphanomyces astaci* i *Aphanomyces repetans* s kutikule vrsta *Astacus astacus* i *Pacifastacus leniusculus*. Neke od izoliranih vodenih plijesni su saprofiti (*S. turfosa*, *A. repetans*), dok su drugi oportunisti (*S. australis*) ili primarni patogeni (*A. astaci*, uzročnik račje kuge).

Ključne riječi: Oomycota, kutikula rakova, filogenija, Saprolegniales
(44 stranica, 14 slika, četiri tablice, 60 literaturnih navoda, jedan prilog, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Ana Bielen
Komentor: Izv. prof. dr. sc. Sandra Hudina

Ocjenitelji: Izv. prof. dr. sc. Sandra Hudina
Prof. dr. sc. Ivana Maguire
Izv. prof. dr. sc. Marin Ježić

Rad prihvaćen: 12.10.2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Oomycete (Oomycota) isolates from the cuticle of crayfish species in Croatia

Luka Petrokov

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Research on the distribution and effects of oomycetes on crayfish hosts is mostly focused on *Aphanomyces astaci*, the causative agent of the crayfish plague. In Croatia and other parts of Europe research on this topic is scarce, despite of the possibility of negative impacts on the host. The aim of this study was to cultivate and identify oomycete isolates from the exoskeleton of different native and invasive crayfish species present in Croatia. Oomycetes were cultivated from pereopods and abdominal cuticle inoculated on PG1 solid growth media, with hyphal transfers to new media until pure cultures were obtained. Identification of the isolates to species level was performed by sequencing of the internal transcribed spacer (ITS) region followed by phylogenetic analysis. We detected four oomycete species originating from two crayfish species: *Saprolegnia australis* and *Saprolegnia turfosa* isolates originating from *Pacifastacus leniusculus*, *Aphanomyces astaci* and *Aphanomyces repetans* isolates originating from both *Astacus astacus* and *Pacifastacus leniusculus*. Some of the detected species are saprophytic (*S. turfosa*, *A. repetans*), while others are opportunistic (*S. australis*) or primary pathogens (*A. astaci*, the causative agent of crayfish plague).

Keywords: Oomycota, crayfish cuticle, phylogeny, Saprolegniales
(44 pages, 14 figures, 4 tables, 60 references, 1 appendix, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Assoc. Prof. Ana Bielen, PhD
Co-mentor: Assoc. Prof. Sandra Hudina, PhD

Reviewers: Assoc. Prof. Sandra Hudina, PhD
Prof. Ivana Maguire, PhD
Asst. Prof. Marin Ježić, PhD

Thesis accepted: 12.10.2023.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Deseteronožni rakovi u Hrvatskoj	1
1.1.1. Zavičajne vrste rakova	2
1.1.2. Invazivne strane vrste rakova	3
1.2. Vodene plijesni	4
1.2.1. Životni ciklus vodenih plijesni	5
1.2.2. Vodene plijesni na slatkovodnim deseteronožnim rakovima	6
1.2.3. Račja kuga.....	8
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	9
3. MATERIJAL I METODE.....	10
3.1. Područje istraživanja i terensko prikupljanje rakova	10
3.2. Uzgoj akseničnih laboratorijskih kultura vodenih plijesni	14
3.2.1. Priprema krute hranjive podloge PG1 s antibioticima	14
3.2.2. Sekcija uginulih rakova/egzuvija	15
3.2.3. Polaganje dijelova račjeg egzoskeleta na hranjivu podlogu i uzgoj akseničnih kultura vodenih plijesni	16
3.3. Izolacija DNA	19
3.4. Lančana reakcija polimerazom	20
3.4.1. Umnažanje ITS regije izolata PCR-reakcijom	21
3.4.2. PCR-test za detekciju patogena <i>A. astaci</i>	22
3.5. Elektroforeza na agaroznom gelu	23
3.6. Izrada filogenijskog stabla i molekularna identifikacija izolata.....	24
4. REZULTATI	26
5. RASPRAVA	29
6. ZAKLJUČAK	32
7. LITERATURA	33

8. PRILOZI	42
-------------------------	-----------

POPIS KRATICA

AA - riječni rak, *Astacus astacus*

AK - abdominalna kutikula

BE - *buffer elution*

BW - *buffer wash*

DNA - deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina

F - uzvodna početnica (engl. *forward*)

ITS - *internal transcribed spacer*

M - svlak (engl. *molt*)

PCR - lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

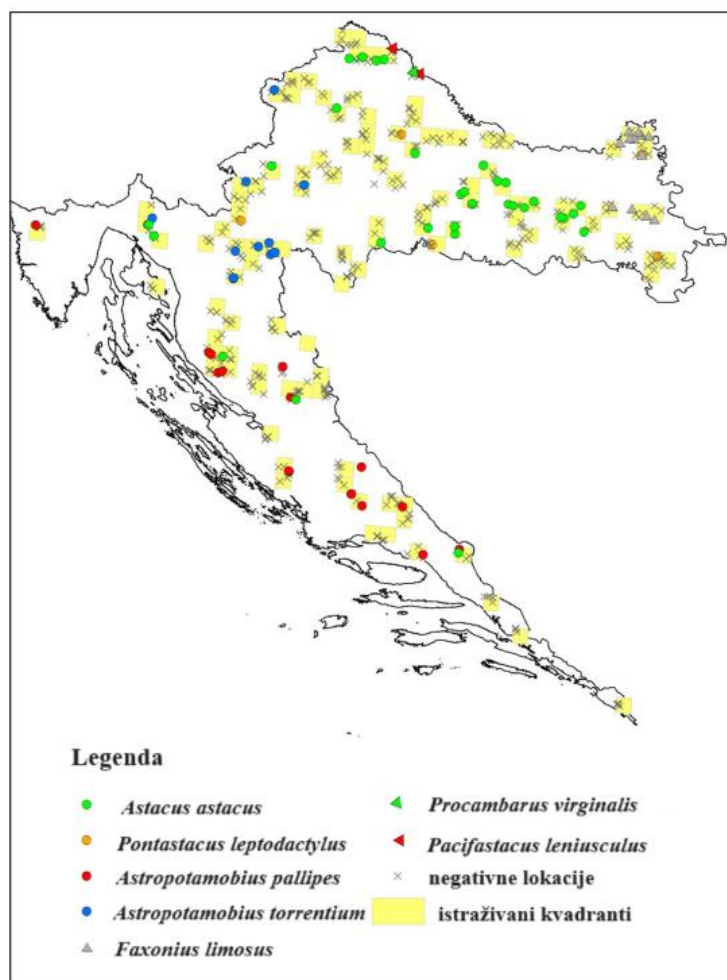
PL - signalni rak, *Pacifastacus leniusculus*

R - nizvodna početnica (engl. *reverse*)

1. UVOD

1.1. Deseteronožni rakovi u Hrvatskoj

Slatkovodni deseteronožni rakovi čine važnu sastavnicu slatkovodnih ekosustava iz razloga što su poveznica različitih trofičkih razina tih ekosustava. U Hrvatskoj je trenutno prisutno sedam vrsta slatkovodnih deseteronožnih rakova, od čega su četiri vrste zavičajne i prirodno rasprostranjene, a tri su stranog porijekla i invazivne su vrste na području Hrvatske (Slika 1; Maguire i sur. 2018).



Slika 1. Rasprostranjenost zavičajnih i invazivnih vrsta slatkovodnih deseteronožnih rakova u Hrvatskoj. Istraživani kvadranti su površine 10 x 10 km. Zavičajne vrste označene su krugovima, a invazivne vrste trokutima (preuzeto iz: Maguire i suradnici 2018).

1.1.1. Zavičajne vrste rakova

Riječni rak, *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758), zavičajna je i najrasprostranjenija vrsta slatkovodnih deseteronožnih rakova u Hrvatskoj te je zabilježen u svim biogeografskim regijama na području RH: kontinentalnoj, alpinskoj i mediteranskoj (Slika 1). Prirodno je rasprostranjen u manjim rijekama i potocima crnomorskog sliva, a zbog svoje ekonomske vrijednosti antropogenim mu je djelovanjem proširena rasprostranjenost na stajaćice i vodotoke jadranskoga sliva. Broj populacija ove vrste je posljednjih desetak godina u alarmantnom padu, odnosno čak je 55 % populacija na mjestima prirodne rasprostranjenosti nestalo, većinom zbog kompeticije s invazivnim vrstama i bolesti račje kuge te antropogenog pritiska na staništa (Lovrenčić i sur. 2022).

Potočni rak, *Austropotamobius torrentium* (Schränk, 1803), zavičajna je vrsta rasprostranjena u manjim rijekama i potocima većih nadmorskih visina. Vrsta je šire rasprostranjena u potocima crnomorskog sliva, uz nekoliko iznimaka u rasprostranjenosti u potocima koji pripadaju jadranskom slivu (Slika 1; Maguire i sur. 2006). U istraživanju Maguire i suradnika (2011) zabilježen je pad od 17 % u broju ranije poznatih populacija u Hrvatskoj.

Bjelonogi rak, *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858), zavičajna je vrsta rasprostranjena isključivo u rijekama jadranskog sliva (Maguire i sur. 2011), kao što je prikazano na Slici 1. Zabilježen je alarmantni pad od 68 % u brojnosti populacija ove vrste s obzirom na ranije poznate populacije u Hrvatskoj (Maguire i sur. 2011).

Uskoškari rak, *Pontastacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823), zavičajna je vrsta koja u Hrvatskoj nastanjuje nizinske rijeke crnomorskog sliva. Zbog kompeticije sa stranim invazivnim vrstama rakova njegove populacije su potisnute iz svojeg prirodnog areala, no kao naš najveći zavičajni deseteronožni rak počinje pokazivati invazivni karakter prilikom osvajanja novih staništa pri čemu potiskuje populacije riječnog raka u istima (Maguire i sur. 2018). Njegovom širenju potpomaže i djelomična otpornost na zarazu patogenom *Aphanomyces astaci* Schikora, 1906 (Kokko i sur. 2012, Maguire i sur. 2018).

Populacije zavičajnih vrsta slatkovodnih rakova u Hrvatskoj, s iznimkom uskoškarog raka, zbog ljudskog su djelovanja u posljednjih stotinjak godina u drastičnom opadanju. Antropogeni

pritisci i prijetnje poput fragmentacije staništa, zagađenja voda, urbanizacije i klimatskih promjena negativno utječu na populacije zavičajnih vrsta, no kompeticija s invazivnim vrstama slatkovodnih rakova i širenje patogena *A. astaci* *Aphanomyces astaci* Schikora, 1906 glavni su faktori smanjenja brojnosti i nestajanja populacija zavičajnih rakova na područjima njihove prirodne rasprostranjenosti (Maguire i sur. 2011). Iz navedenih su razloga na Crvenom popisu rakova (Crustacea) slatkih i boćatih voda Hrvatske (Gottstein i sur. 2011), a riječni, potočni i bjelonogi rak proglašeni strogo zaštićenim prema Pravilniku o strogo zaštićenim vrstama (NN 144/2013), a nalaze se i na IUCN-ovom (*International Union for Conservation of Nature*) Crvenom popisu ugroženih vrsta (IUCN 2023).

1.1.2. Invazivne strane vrste rakova

Bodljobrادي rak, *Faxonius limosus* (Rafinesque, 1817), prva je zabilježena invazivna vrsta rakova u Hrvatskoj, a porijeklom je iz Sjeverne Amerike. Invazivnost mu je pospješena visokim fekunditetom, ranim spolnim sazrijevanjem i značajnom agresivnošću, čime istiskuje zavičajne vrste. Osim spomenutog, djeluje i kao vektor širenja patogena *A. astaci*, zbog čega se uspješno širi europskim slatkovodnim sustavima (Todorov i sur. 2020). Prvi je put zabilježen 2003. godine u Parku prirode Kopački rit (Maguire i Klobučar 2003), gdje se pojavio kao posljedica prirodnog širenja kroz rijeku Dunav iz Mađarske (Maguire i sur. 2011), dok je kasnije zabilježeno daljnje širenje kroz rijeke Dunav i Dravu (Maguire i sur. 2018).

Signalni rak, *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852), najraširenija je invazivna vrsta na europskom kontinentu, porijeklom iz Sjeverne Amerike, s biološkim karakteristikama sličnim bodljobrađom raku (Dragičević i sur. 2020a). Proširio se nizvodno tokom rijeke Mure kroz Austriju i Sloveniju te je u Hrvatskoj prvi puta zabilježen 2008. godine u rijeci Muri, a kasnije mu je areal proširen u tok rijeke Drave (Maguire i sur. 2018). Osim toga, ilegalno je introducirana u rijeku Koranu, odakle se počeo širiti uzvodno i nizvodno čime prijeti ulasku u pritoke i utoke Korane, a samim time i istiskivanju populacija triju od četiri zavičajne vrste u Hrvatskoj (*A. astacus*, *A. torrentium* i *P. leptodactylus*) koje su distribuirane u slivu Korane (Hudina i sur. 2017).

Mramorni rak, *Procambarus virginalis* Lyko, 2017, jedina je vrsta slatkovodnih deseteronožnih rakova koja se razmnožava isključivo apomiktičnom partenogenezom, odnosno

nove se jedinke razvijaju iz neoplođenih jajašaca. Razmnožavanje partenogenezom zaslužno je za visoki fekunditet ove vrste, što doprinosi njenoj invazivnosti. Nakon što dospije u novo stanište, u optimalnim uvjetima jedna je propagula dovoljna za uspostavljanje čitave nove populacije (Dobrović i sur. 2021). U Hrvatskoj porijeklo ove vrste nije poznato, a prvi je puta zabilježena 2014. u umjetnom jezeru Šoderica koje se napaja Dravom (Samardžić i sur. 2014), a trenutno je to i jedina zabilježena lokacija ovog raka u državi (Dobrović i sur. 2021).

1.2. Vodene plijesni

Vodne plijesni (Oomycota) mikroorganizmi su svrstani u grupu Stramenopiles, zajedno s algama kremenjašicama i smeđim algama (Derevnina i sur. 2016). Zbog filamentoznog rasta i saprofitskog ili parazitskog načina života bile su smatrane gljivama te se iz tog razloga i danas neslužbeno nazivaju „organizmi nalik gljivama” (engl. *fungus-like organisms*). Međutim, za razliku od gljiva, hife im nisu septirane (tzv. cenocitne hife) te je i molekularnim istraživanjima utvrđeno da vodene plijesni nisu srodne gljivama (Buaya i Thines 2020).

Prema načinu života vodene plijesni mogu biti saprofiti ili (primarni ili sekundarni) patogeni širokog raspona domaćina, uglavnom biljaka i životinja (Phillips i sur. 2008). Kao takve, mogu uzrokovati značajne štete u poljoprivredi, uključujući akvakulturu, ali i u prirodnim ekosustavima (West i Beakes 2014).

Vrste terestričkih vodenih plijesni koje uzrokuju bolesti biljaka, uglavnom iz rodova *Phytophthora* i *Pythium*, vrlo su dobro istražene (Derevnina i sur. 2016). Primjerice, vrsta *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary patogen je krumpira, a 1840-ih je uzrokovala Veliku irsku glad. Vrste istog roda zaslužne su i za bolesti truleži plodova kakaovca, iznenadne smrti hrasta i mnoge druge (Derevnina i sur. 2016).

Dok su utjecaj i raznolikost vodenih plijesni povezanih s biljnim organizmima iz ekonomskih razloga relativno dobro istražene, o akvatičkim vodenim plijesnima koje uzrokuju bolesti životinja (većinom iz reda Saprolegniales) mnogo se manje zna. Niz vrsta iz roda *Saprolegnia* (uključujući vrste *S. parasitica* Coker 1923, *S. australis* R. F. Elliott i dr.) izazivaju bolest saprolegniozu koja je jedan od vodećih uzroka masovnih pomora slatkovodnih riba u akvakulturi (West i Beakes

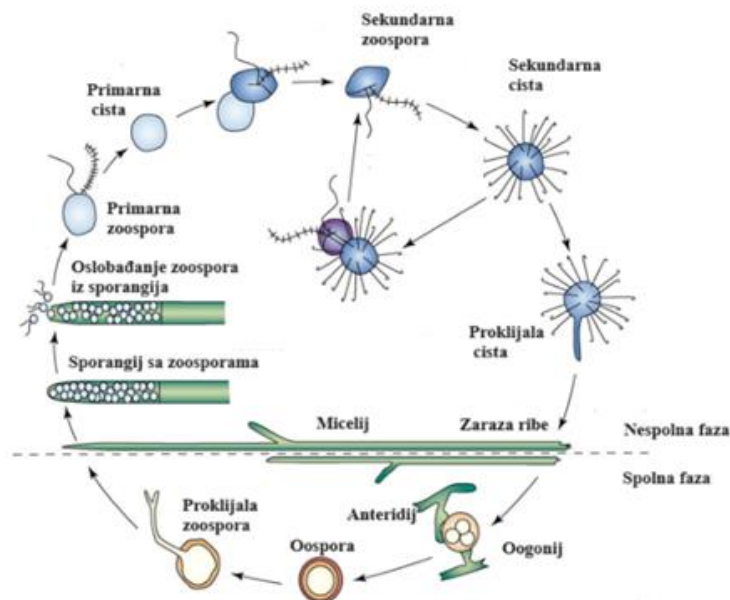
2014). Invazivna vrsta *A. astaci* uzrokuje masovnu smrtnost i nestajanje čitavih populacija slatkovodnih deseteronožnih rakova (opisano u odjeljku 1.2.2.). Pojedine vrste roda *Aphanomyces* djeluju u slatkovodnim ekosustavima kao saprofiti, poput *Aphanomyces fennicus* sp. novum (Viljamaa-Dirks i Heinikainen 2019). Na kraju, postoje vrste iz roda *Aphanomyces* koje uglavnom žive saprofitskim načinom života, no u određenim uvjetima mogu djelovati i kao oportunistički patogeni, primjerice *Aphanomyces laevis* de Bary 1860 te *Aphanomyces stellatus* de Bary 1860 (Diéguez-Uribeondo i sur. 2009).

1.2.1. Životni ciklus vodenih plijesni

Životni ciklus vodenih plijesni obilježen je izmjenom generacija, koja je na Slici 2 prikazana na primjeru patogene vrste *Saprolegnia parasitica*.

Prilikom spolnog razmnožavanja, iz cenocitnih hifa ($2n$) razvijaju se muški (anteridij, $2n$) i ženski generativni organi (oogonij, $2n$). Ovi organi mejozom produciraju spolne stanice (n) koje fuzioniraju preko fertilizacijske cjevčice, a oplodena zigota ($2n$) se naziva oospora te ona klija u novi diploidni micelij (Phillips i sur. 2008).

U slučaju manjka hranjivih tvari (kod patogenih vrsta najčešće je domaćin pred ugibanjem ili je netom uginuo), dolazi do nespolnog razmnožavanja. Na cenocitnim hifama ($2n$) razvija se zoosporangij ($2n$) u kojem se mitozom stvaraju zoospore ($2n$). Pucanjem vrška zoosporangija oslobađaju se primarne zoospore (sadrže bičeve, $2n$) iz kojih nastanu primarne ciste ($2n$). One oslobađaju sekundarne zoospore ($2n$) koje se kemotaksijom približavaju okolišu s dovoljno hranjivih tvari te se potom pretvaraju u sekundarnu cistu ($2n$) koja klijanjem razvija cenocitni micelij ($2n$) (Söderhäll i Cerenius 1999; Phillips i sur. 2008).



Slika 2. Prikaz izmjene generacija u vodenih plijesni na primjeru vrste *S. parasitica* (preuzeto i prilagođeno iz: Phillips i suradnici 2008).

1.2.2. Vodene plijesni na slatkovodnim deseteronožnim rakovima

Raznolikost vodenih plijesni povezanih sa slatkovodnim deseteronožnim rakovima slabo je istražena (Kozubikova-Balcarova i sur. 2013; Dragičević i sur. 2020). Općenito, istraživanja raznolikosti vodenih plijesni na kutikuli rakova malobrojna su na europskoj i svjetskoj razini te su vrste većinom izolirane slučajno, najčešće prilikom pokušaja izolacije patogena *A. astaci*. Dostupna literatura uglavnom je fokusirana na bolest račju kugu i njezinog uzročnika *A. astaci* (detaljnije u poglavlju 1.2.3.), iako i druge vrste vodenih plijesni, poput *Saprolegnia australis*, mogu uzrokovati bolesti kod deseteronožnih rakova (Krugner-Higby i sur. 2010).

Vrste roda *Saprolegnia*, *Saprolegnia parasitica* i *Saprolegnia australis* dobro su poznati patogeni slatkovodnih riba i čine velike štete u akvatičkom uzgoju riba (Diéguez-Uribeondo i sur. 1994; Krugner-Higby i sur. 2010). Njihov utjecaj na rakove slabo je istražen, ali je u laboratorijskim uvjetima pokazano da mogu uzrokovati smrtonosnu bolest ukoliko je kutikula raka

oštećena, odnosno rak ranjen (Söderhäll i sur. 1991; Diéguez-Uribeondo i sur. 1994; Krugner-Higby i sur. 2010). U Turskoj je iz kutikule uskoškarog raka uspješno izolirana *Saprolegnia parasitica*, za koju je pokazano da može izazvati smrtonosnu bolest u prethodno ozlijeđenih rakova (Söderhäll i sur. 1991; Diéguez-Uribeondo i sur. 1994; Dragičević i sur. 2020b). U istraživanju Kozubikova-Balcarova i suradnika (2013) s kutikule rakova izolirane su i utvrđene vrste *Saprolegnia hypogyna* (Pringsheim) de Bary i *Saprolegnia ferax* (Gruith.) Kütz 1843, ali njihova patogenost još nije ispitivana.

U istraživanju Kozubikova-Balcarova i suradnika (2013) po prvi su puta s kutikule rakova izolirane vrste reda Peronosporales (vrste *Phytophthora inundata* Brasier, Sánch. Hern. & S.A. Kirk 2003 i *Phytophthora humicola* W. H. Ko & Ann) te Pythiales (*Pythium* sp. i *Phytopythium* sp.), u koje se uglavnom svrstavaju biljni patogeni.

Što se tiče roda *Aphanomyces*, osim patogena *A. astaci* (poglavlje 1.2.3.), na kutikuli rakova mogu biti prisutne i druge vrste poput *A. laevis* te *Aphanomyces repetans* Royo, saprotrofne vodene plijesni koje u odgovarajućim uvjetima staništa mogu biti oportunistički patogeni (Cammà i sur. 2007; Royo i sur. 2004; Kozubikova-Balcarova i sur. 2013). Smith (1940) je izolirao dva soja vrste *A. laevis* iz većeg broja mladih uginulih rakova vrste *Procambarus clarkii* (Girard, 1852), dotada nepoznate kao patogena na životinjama. Prilikom istraživanja uginulih jedinki bjelonogog raka u Španjolskoj s kutikule rakova izoliran je *Aphanomyces frigidophylus* Kitanch. & Hatai (Ballesteros i sur. 2006). Saprofitska vrsta vodene plijesni, vrlo srodna vrsti *A. astaci*, a koja je također opisana nakon izolacije s kutikule rakova, je *A. fennicus* (Viljamaa-Dirks i Heinikainen 2019). Vrsta vodene plijesni, *A. repetans* opisana je nakon izolacije s kutikule rakova vrsta *P. leniusculus* i *P. clarkii* (Royo i sur. 2004), te s kutikule vrste *A. pallipes* (Cammà i sur. 2010).

1.2.3. Račja kuga

Prije više od 150 godina je u Europu zajedno s invazivnim sjevernoameričkim vrstama rakova introducirana bolest račja kuga koju uzrokuje patogen *A. astaci* (Svoboda i sur. 2016). Od tada, ovaj se patogen proširio čitavim europskim kontinentom te uzrokovao smanjenja populacija zavičajnih rakova, zbog čega je uvršten u ISSG-ov (*Invasive Species Specialist Group*) popis 100

najgorih invazivnih vrsta na svijetu (Lowe i sur. 2000). Zavičajne vrste rakova vrlo su podložne zarazi i nakon kontakta s patogenom najčešće razviju smrtonosnu bolest. Nasuprot tome, invazivne sjevernoameričke vrste rakova razvile su otpornost zahvaljujući dugotrajnoj koevoluciji s patogenom na sjevernoameričkom kontinentu te stoga djeluju kao vektori prijenosa bolesti račje kuge u europskim slatkovodnim sustavima (Jussila i sur. 2021).

Zaraza rakova nastupa kada zoospora patogena pronađe adekvatnog raka domaćina, pri čemu ona prelazi u oblik ciste koja počinje klijati unutar tkiva raka (Slika 2). Područja na organizmu raka koja su podložna zarazi najčešće su ona gdje je kutikula mekša, poput zglobova i ventralne abdominalne kutikule (Unesteim i Weiss 1970). Neki od simptoma bolesti su dnevna aktivnost zaraženog raka (umjesto uobičajene noćne), nekontrolirano kretanje i tamne (melanizirane) pjege na kutikuli, dok su simptomi kasnijih stadija bolesti gubitak udova, manjak aktivnosti te smrt (Unesteim i Weiss 1970).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Istraživanja rasprostranjenosti i utjecaja vodenih plijesni na slatkovodne desetonožne rakove većinom su fokusirana na patogena *A. astaci*, dok su u Hrvatskoj i ostalim dijelovima Europe nedovoljno istražene druge vrste vodenih plijesni koje mogu nastanjivati kutikulu rakova. Stoga su ciljevi ovog diplomskog rada:

- po prvi puta uzgojiti aksenične kulture vodenih plijesni s egzoskeleta različitih vrsta zavičajnih i invazivnih vrsta rakova u Hrvatskoj,
- sekvenciranjem i filogenijskom analizom ITS (engl. *internal transcribed spacer*) regije utvrditi vrste sakupljenih izolata.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Područje istraživanja i terensko prikupljanje rakova

Uzorkovanje jedinki provedeno je na sedam različitih stajaćica i tekućica na području Republike Hrvatske (Tablica 1). Jedinke rakova ulovljene su dvjema metodama: i) lov pomoću vrša za rakove (LiNi vrše) s mamcem koje su ostavljane preko noći i prikupljane sljedeći dan (Slika 3), ii) ručno hvatanje jedinki noću uz pomoć naglavnih svjetiljki (Slika 4). Uzorkovane populacije rakova (Slika 5) odabrane su prema dostupnim podacima o rasprostranjenosti različitih vrsta rakova u Hrvatskoj (Slika 1) te prisutnosti patogena *A. astaci* u određenim populacijama (Maguire i sur. 2018).

Tablica 1. Broj i vrsta prikupljenih jedinki slatkovodnih desetonožnih rakova te lokacije i datum njihovog prikupljanja.

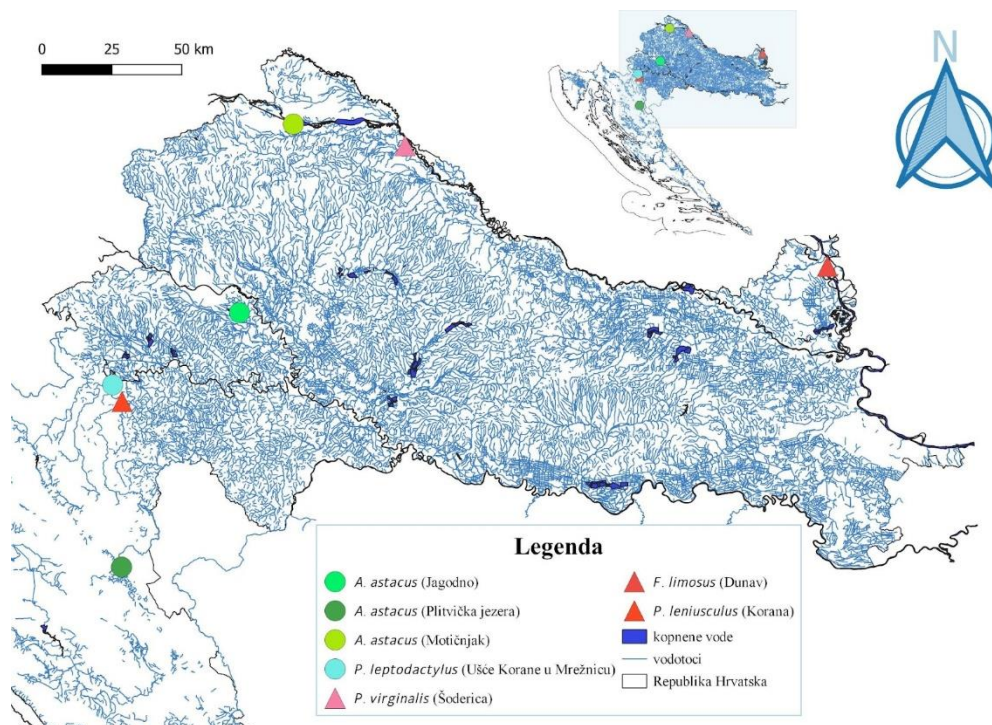
VRSTA	LOKACIJA	KOORDINATE LOKACIJA	DATUM	BROJ PRIKUPLJENIH JEDINKI
<i>Astacus astacus</i>	Jezero Jagodno	45°42'5"N 16°8'39"E	11.05.2022.	1
<i>Astacus astacus</i>	Vodotoci iz jezera Burgeti	44°52'30.7"N 15°36'37.2"E	16.05.2022.	6
<i>Astacus astacus</i>	Jezero Motičnjak	46°18'31.9"N 16°23'27.5"E	04.06.2022.	6
<i>Pontastacus leptodactylus</i>	Ušće Mrežnice u Koranu	45°27'57.9"N 15°33'56.3"E	15.08.2022.	4
<i>Faxonius limosus</i>	Rijeka Dunav	45°49'34.4"N 18°50'56.7"E	02.10.2022.	5
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana	45°24'42.5"N 15°36'33.9"E	26.04.2022.	16
<i>Procambarus virginalis</i>	Jezero Šoderica	46°14'20.5"N 16°54'33.5"E	12.07.2022.	4
Ukupno				42



Slika 3. Lov LiNi vršama za rakove s mamcem: lijevi prikaz je na dan postavljanja vrše s mamcem, desni prikaz je sljedeći dan s ulovljenim rakovima (jedinke *A. astacus*) u NP Plitvička jezera (fotografija: Lovrenčić L.).



Slika 4. Prikaz metode lova jedinki *P. virginalis* ručnim hvatanjem noću uz pomoć naglavnih svjetiljki u jezeru Šoderica (fotografija: Hudina S.).



Slika 5. Lokacije uzorkovanja zavičajnih (oblik kruga) i invazivnih (oblik trokuta) vrsta slatkovodnih deseteronožnih rakova (izradio: Petrokov L.).

Životinje su na dan uzorkovanja na ledu prevezene do laboratorija, gdje su individualno smještene u akvarije s pumpama za prozračivanje. Rad s invazivnim i zavičajnim vrstama u laboratoriju bio je reguliran dozvolama za držanje invazivnih vrsta rakova i dozvolom za uzorkovanje zavičajnih rakova, izdanih od strane Ministarstva gospodarstva i održivog razvoja, koje posjeduju ko-mentorica i članica projektnog tima (Sandra Hudina i Ivana Maguire). Svakog dana pratio sam stanje jedinki, a vodu sam mijenjao dvaput tjedno. Životinje nisam hranio kako bi bile pod većim fiziološkim stresom, za što se pretpostavlja da pogoduje proliferaciji vodenih plijesni na organizmu.

3.2. Uzgoj akseničnih laboratorijskih kultura vodenih plijesni

3.2.1. Priprema krute hranjive podloge PG1 s antibioticima

Krutu hranjivu podlogu PG1 (Viljamaa-Dirks i Heinikainen 2019) pripremio sam miješanjem pet različitih otopina, pri čemu sam svaku komponentu pripremio zasebno, sterilizirao autoklaviranjem, nakon čega sam određene volumene pojedinih komponenti pomiješao zadanim redoslijedom.

Otopina 1 sadrži 3 g Bacto peptona (Biolife) otopljenog u 100 mL destilirane vode.

Otopina 2 sadrži 6 g D (+) glukoza monohidrata (Kemika) otopljenog u 100 mL vode.

Otopina 3 sadrži:

- 1,70 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (Sigma);
- 1,45 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (Sigma);
- 0,20 g $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (Sigma);
- 3,70 g KCl (Sigma);
- 0,55 g dinatrijeve soli etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA; Sigma) otopljenih u 1000 mL destilirane vode.

Otopina 4 je fosfatni pufer čiji je pH = 7,0, a dobije se miješanjem:

- otopine A: 0,067 M (9,5 g/L) Na_2HPO_4 (Sigma)
- otopine B: 0,067 M (9,2 g/L) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (Sigma).

Pripremljene otopine A i B sam zasebno sterilizirao i nakon autoklaviranja pomiješao 611 mL otopine A i 389 mL otopine B.

Otopina 5 sadrži 12 g agara (Biolife) otopljenog u 600 mL vode.

Svaku sam od ovih otopina zasebno autoklavirao pri temperaturi od 121 °C kroz 20 minuta, a zatim ohladio na temperaturu od oko 45 °C. Kako bi se izbjeglo stvaranje taloga, otopine sam pomiješao sljedećim redoslijedom; prvo sam u 600 mL otopine 5 dodao 100 mL otopine 4, nakon toga jednaki volumen otopine 3, zatim 100 mL otopine 1 te jednaki volumen otopine 2. Završno, mikropipetom sam u otopinu volumena 1L dodao otopine antibiotika: 500 µL ampicilina i 500 µL oksolonične kiseline (Sigma, koncentracija matičnih otopina 20 µg/mL, a radnih koncentracija 0,01 µg/mL). Ukupni volumen tako priređenog medija je 1 L što je dovoljno za otprilike 35 - 40 Petrijevih zdjelica s oko 25 mL otopine. U sterilnim uvjetima laminara, otopinu sam izlio u zdjelice, ostavio hranjive podloge da se ohlade na sobnu temperaturu, te ih zatim pohranio pri 4 °C.

Prilikom pripreme tekuće hranjive podloge PG1 slijedio sam sličan postupak kao za pripremu krute hranjive podloge PG1, uz dvije modifikacije: i) otopina 5 sadržavala je destiliranu vodu bez otopljenog agara, ii) u završnom dijelu postupka nisu dodavani antibiotici.

3.2.2. Sekcija uginulih rakova/egzuvija

Nakon smrti i/ili presvlačenja egzoskeleta jedinki, dijelove egzoskeleta koristio sam za uzgoj laboratorijskih kultura vodenih plijesni. Pojednog raka sam stavio na Petrijevu zdjelicu ispunjenu sterilnom destiliranom vodom, gdje sam mu pomoću skalpela i pincete izrezao ventralnu abdominalnu kutikulu i pereiopode pri njihovoj bazi te zatim izrezane dijelove prebacio u drugu zdjelicu s destiliranom vodom (Slika 6). Kako bih smanjio kontaminaciju na hranjivoj podlozi, u ovom sam koraku pereiopode sastrugao skalpelom te im pri bazi odstranio višak tkiva (ako je secirana uginula jedinka), a u idućem koraku u Petrijevoj zdjelici s destiliranom vodom bih pereiopode i ventralnu abdominalnu kutikulu dodatno očistio sterilnim vatenim štapićima. Zatim bih pereiopode položio u Petrijevu zdjelicu ispunjenu 70%-tnim etanolom (radi smanjenja bakterijske kontaminacije), a nakon 30-45 sekundi premjestio bih ih u četvrtu Petrijevu zdjelicu s destiliranom vodom (Slika 6). Ventralnu abdominalnu kutikulu položio sam u Petrijevu zdjelicu s autoklaviranom destiliranom vodom te inkubirao pri 4 °C (Slika 6). Vodu sam mijenjao svakog dana radi smanjenja kontaminacije te promatrao jesu li se na kutikuli pojavile hife, a nakon 7-10 dana nasadio bih kutikulu na hranjivu podlogu PG1 (opisano u odjeljku 3.2.3.).

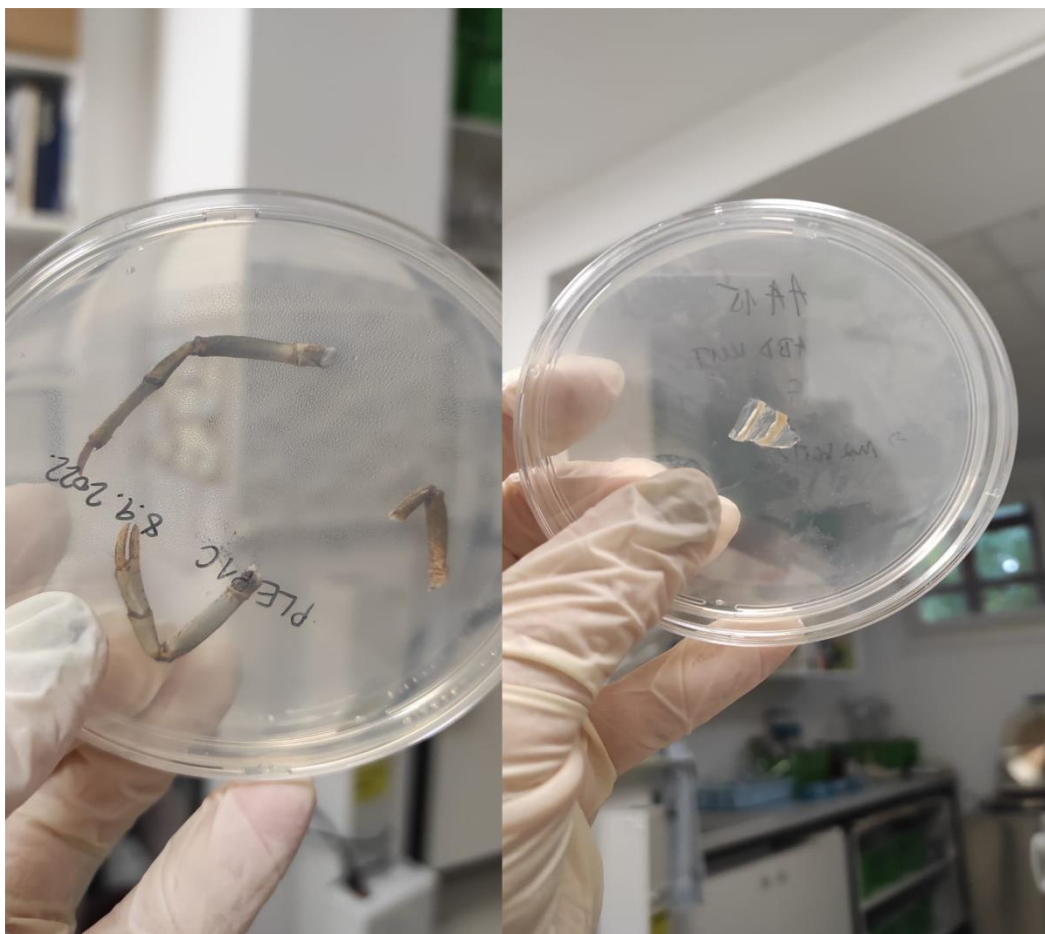
Prilikom cijelog postupka koristio sam rukavice i sterilan pribor za sekciju. Pošto ovaj postupak i postupak opisan u odjeljku 3.2.3. nisu provođeni u laminaru, u blizini je korišten Bunsenov plamenik s otvorenim plamenom za stvaranje sterilnih uvjeta i sprječavanje kontaminacije kultura. Prije polaganja na hranjivu podlogu, pereopode i ventralnu abdominalnu kutikulu stavio bih na sterilni papirnati ubrus koji bi upio višak tekućine na tkivu i time smanjio potencijalnu kontaminaciju na hranjivoj podlozi.



Slika 6. Seciranje dijelova račjeg egzoskeleta kao priprema za polaganje na hranjivu podlogu (fotografija: Petrokov L.).

3.2.3. Polaganje dijelova račjeg egzoskeleta na hranjivu podlogu i uzgoj akseničnih kultura vodenih plijesni

Nakon što je papirnatim ubrusima uklonjen višak vode, pereiopodi i ventralna abdominalna kutikula položeni su na krutu hranjivu podlogu PG1 s antibioticima (Slika 7). Pereiopode sam blago utisnuo u podlogu na području zglobova nogu, budući su to područja na kojima vodene plijesni lakše prodiru u kutikulu rakova.



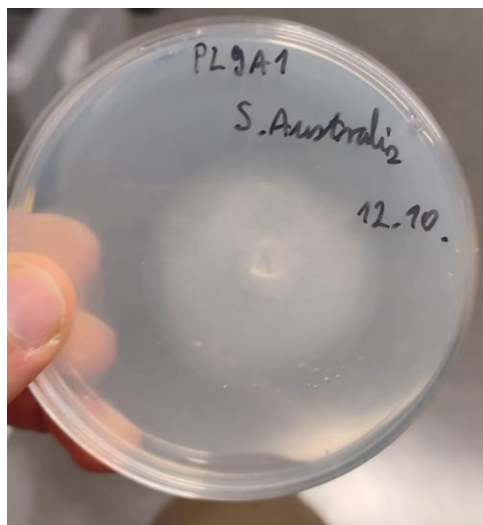
Slika 7. Polaganje pereiopoda (lijevo) i ventralne abdominalne kutikule (desno) na krutu hranjivu podlogu PG1 (fotografija: Lovrenčić L.).

Kada sam primijetio rast kolonija koje svojom morfologijom, odnosno makroskopski (oblik samog izolata) i mikroskopski (cenocitne hife) odgovaraju vodenim plijesnima, precijepio sam ih na svježu podlogu. Prije precijepivanja, na svježoj podlozi napravio sam procijep (Slika 8). Postupkom pravljenja procijepa onemogućeno je širenje jednostaničnim bakterijskim kontaminantima cjelokupnom hranjivom podlogom, dok vodene plijesni mogu prijeći procjep budući da rastu u obliku hifa. Na taj se način korištenjem procijepa kultura vodenih plijesni može pročistiti od bakterijske kontaminacije.

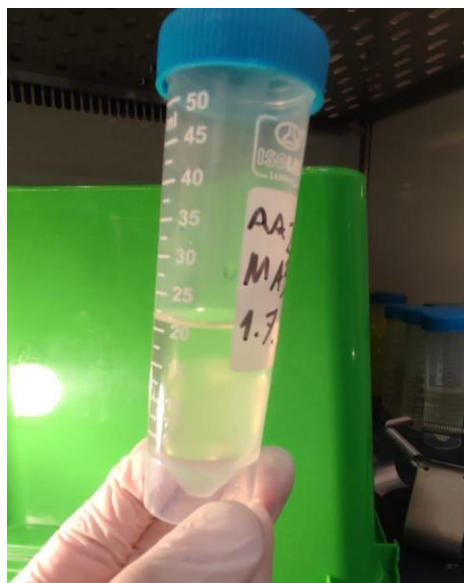


Slika 8. Prikaz laboratorijske kulture s procjepom. (Foto: Hudina S.)

Kada bi hife porasle do druge strane procjepa, precijepio bi ih na svježu podlogu s ciljem dobivanja aksenične kulture (Slika 9). Precijepijvanje sam izvodio tako što sam sterilnim skalpelom izrezao komadić agara prorašten micelijem s rubnog (najmlađeg) dijela laboratorijske kulture i nacijepio komadić na svježu hranjivu podlogu. Nakon što sam dobio akseničnu kulturu pojedinog izolata, komadić agara prorašten micelijem bih precijepio u 20 mL tekućeg PG1 medija. Kada bi u tekućem mediju izrasla odgovarajuća biomasa micelija (Slika 10), skalpelom bih uklonio ostatke agara te bih biomasu micelija pohranio na -20 C° do izolacije DNA (deoksiribonukleinska kiselina, engl. *deoxyribonucleic acid*).



Slika 9. Izgled aksenične kulture *S. australis* izolata šifre PL9A1 s vrste raka *P. leniusculus* na PG1 hranjivoj podlozi (fotografija: Petrokov L.).



Slika 10. Izgled narasle aksenične kulture vodenih plijesni u tekućem PG1 mediju (fotografija: Petrokov L.).

3.3. Izolacija DNA

Izolaciju DNA proveo sam slijedeći standardni protokol kompleta NucleoSpin® Microbial DNA (Macherey Nagel, Njemačka), uz određene modifikacije s ciljem dobivanja maksimalne koncentracije i prinosa DNA. Dio micelija dobiven rastom u tekućoj hranjivoj podlozi PG1

resuspendirao sam u 100 μ L pufera BE (*buffer elution*; iz Macherey Nagel NucleoSpin® Microbial DNA kompleta). Nakon toga, proveo sam razbijanje i lizu stanica u trajanju od 25 min pri srednjoj jačini Macherey-Nagel kuglicama tipa B ili C (Corning vortex mixer, USA) uz dodatak pufera MG, a potom proveo ceintrifugiranje pri 11,000 x g kroz 30 s. Nakon vezanjanja DNA na silikatnu kolonu, ispiranje sam napravio nanošenjem: i) 500 μ L pufera BW (*buffer wash*; iz Macherey Nagel NucleoSpin® Microbial DNA kompleta) uz centrifugiranje pri 11,000 x g kroz 30 s, ii) 500 μ L pufera B5 (iz Macherey Nagel NucleoSpin® Microbial DNA kompleta) uz centrifugiranje pri 11,000 x g kroz 30 s. Eluciju DNA s kolone radio sam na način da sam na kolonu nanio 100 μ L pufera BE pa proveo centrifugiranje pri 11,000 x g kroz 30 s. Kako bih dobio maksimalnu koncentraciju DNA, skupio sam eluat koji sadrži DNA te isprao kolonu s istih 100 μ L eluata. Dobivene uzorke genomske DNA izolata pohranio sam na -20 °C.

3.4. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) molekularna je *in vitro* metoda u kojoj se točno određeni dijelovi DNA umnožavaju u veliki broj identičnih kopija. Svaki PCR protokol ima tri osnovna koraka: i) denaturacija lanaca DNA (engl. *denaturation*), ii) vezanje (engl. *annealing*) oligonukleotidnih početnica (engl. *oligonucleotide primer*) na komplementarne segmente DNA od interesa i iii) sinteza lanca komplementarnog originalnom lancu DNA (engl. *elongation*).

Koristeći genomsku DNA svakog izolata kao kalup, proveo sam dvije PCR-reakcije:

i) umnažanje ITS (engl. *internal transcribed spacer*) regije univerzalnim početnicama ITS5 i ITS4 (White i sur. 1990, poglavlje 3.5.1). Sekvenciranjem dobivenih PCR-produkata i naknadnom filogenijskom analizom sekvenci moguća je taksonomska identifikacija izolata vodenih plijesni do razine vrste (Poglavlje 3.4.1.).

ii) umnažanje ITS regije početnicama 42 i 640 (Oidtmann i sur. 2006) koje su specifične za patogena *A. astaci* (Oidtmann i sur., 2006, poglavlje 3.4.2.). Ukoliko se dobije fragment očekivane veličine od 569 pb znači da izolat pripada vrsti *A. astaci*, a ako amplifikacija izostane znači da se radi o nekoj drugoj vrsti.

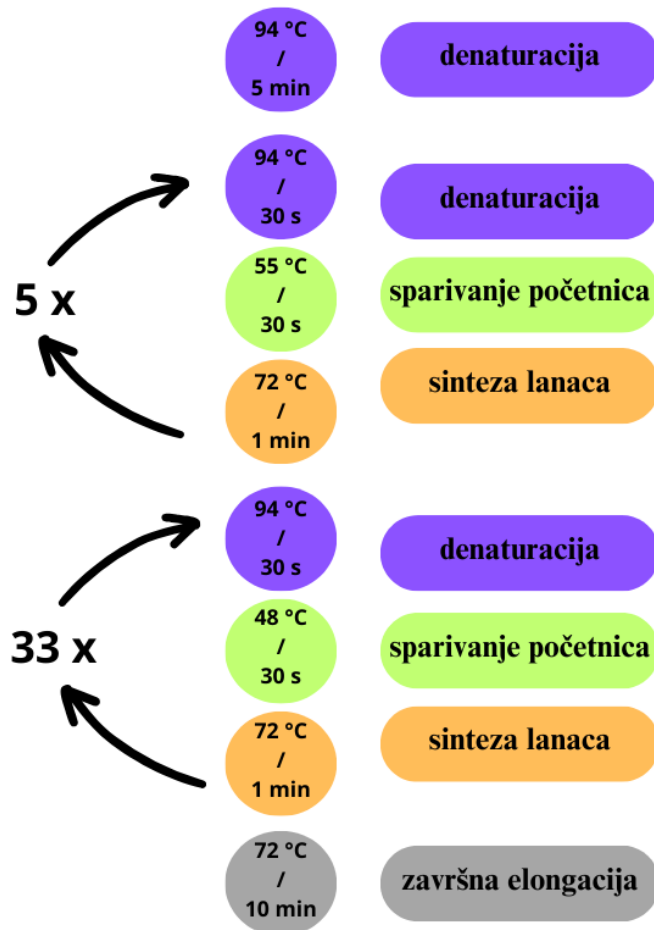
Objek PCR-reakcije izvodio sam u uređaju Alpha Cyclor 1 (PCRmax). Dvije su PCR-reakcije provedene zbog specifičnosti početnica 42 i 640 za detekciju *A. astaci* bez sekvenciranja te njihove osjetljivosti na vrlo niske koncentracije izolirane DNA ovog patogena (Buller 2007), dok umnažanje ITS regije univerzalnim početnicama ITS4 i ITS5 omogućuje konciznije poravnanje za filogenijske analize koristeći iste početnice za sve dobivene sekvence.

3.4.1. Umnažanje ITS regije izolata PCR-reakcijom

PCR-reakcijom umnožena je ITS regija svakog izolata koristeći uzvodnu (engl. *forward*) početnicu ITS5F (White i sur. 1990) i nizvodnu (engl. *reverse*) početnicu ITS4R (White i sur. 1990). Sastav reakcijske smjese naveden je u Tablici 2, a uvjeti PCR-reakcije (Martin i Winka 2000) na Slici 11. Kao pozitivnu kontrolu koristio sam genomsku DNA vrste *Saprolegnia parasitica* CBS 223.65, a kao negativnu destiliranu vodu.

Tablica 2. PCR-smjesa za umnožavanje ITS regije.

Genomska DNA pojedinog izolata (kalup)	1 µL
Reakcijska smjesa za PCR EmeraldAmp® PCR 2X Master Mix (TAKARA)	12,5 µL
Nizvodna početnica ITS4R (10 µM otopina, konačna koncentracija 0,2 µM)	0,5 µL
Uzvodna početnica ITS5F (10 µM otopina, konačna koncentracija 0,2 µM)	0,5 µL
dH₂O	10,5 µL
Ukupno	25 µL



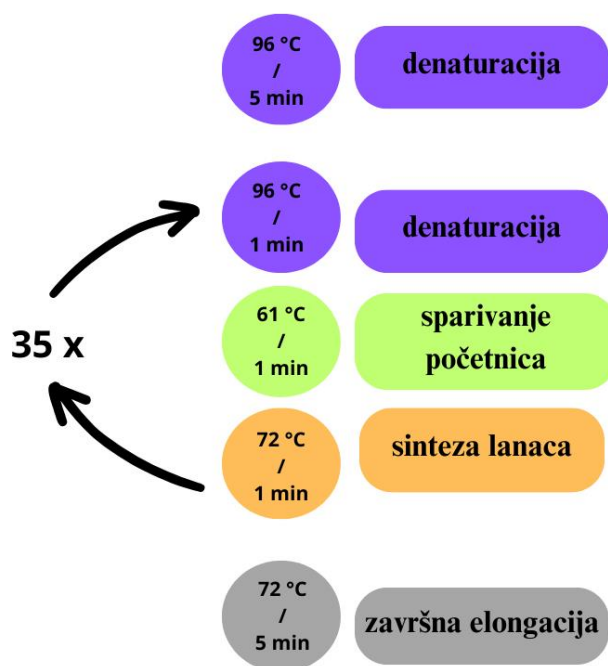
Slika 11. Uvjeti PCR-reakcije umnažanja ITS regije izolata.

3.4.2. PCR-test za detekciju patogena *A. astaci*

Kako bih detektirao pripada li određena izolirana DNA vrsti *A. astaci*, koristio sam PCR-test detekcije uz upotrebu specifičnih početnica za umnažanje ITS fragmenta 5.8 rRNA gena *A. astaci*: uzvodna početnica 42R i nizvodna početnica 640F (Oidtmann i sur. 2006). Sastav reakcijske smjese za navedenu PCR-reakciju naveden je u Tablici 3, a uvjeti reakcije na Slici 12. Kao pozitivnu kontrolu koristio sam genomsku DNA vrste *A. astaci* PEC8, genotip B, a kao negativnu destiliranu vodu.

Tablica 3. PCR-smjesa za detekciju *A. astaci*.

Genomska DNA pojedinog izolata (kalup)	1 μL
Reakcijska smjesa za PCR EmeraldAmp® PCR 2X Master Mix (TAKARA)	12,5 μL
Uzvodna početnica 42R (10 μM otopina, konačna koncentracija 0,5 μM)	1,25 μL
Nizvodna početnica 640F (10 μM otopina, konačna koncentracija 0,5 μM)	1,25 μL
dH₂O	9 μL
Ukupno	25 μL



Slika 12. Uvjeti PCR-reakcije za umnažanje ITS fragmenta 5.8 rRNA gena *A. astaci*.

3.5. Elektroforeza u agaroznom gelu

Elektroforeza u agaroznom gelu metoda je kojom se razdvajaju fragmenti DNA i koja omogućuje određivanje njihove kvalitete i koncentracije. Fragmenti se u gelu odnosno električnom polju kreću različitom brzinom, što ovisi o njihovoj molekularnoj masi, odnosno kraći se fragmenti DNA kreću brže od duljih. Izuzev molekularne mase, pokretljivost fragmenata DNA ovisi i o sastavu pufera za elektroforezu, koncentraciji agaroze u gelu, konformaciji molekule te jačini

napona koji djeluje u električnom polju (Lee i sur. 2012). Koristio sam 1%-tni agarozni gel i 1x TAE pufer (40 mM Tris; 20 mM octena kiselina; 1 mM EDTA) te sam u 80 mL otopine dodao 4 μ L boje za vizualizaciju DNA (GelStar™ NucleicAcid Gel Stain 10,000X, Lonza, Švicarska), promiješao i izlio u kadnicu za elektroforezu. Prije elektroforeze sam 2 μ L uzorka DNA pomiješao s 1 μ L boje za nanošenje uzoraka (sadrži 30 mL glicerola, 25 mg boje brom-fenol plavo, 10 mL vode) i 3 μ L destilirane vode. Ova se boja koristi kako bi uzorci DNA smjestili na dno jažice (povećava gustoću uzoraka), a budući da se molekule DNA ne vide tijekom elektroforeze, omogućuje i vizualizaciju puta molekula DNA kroz gel (boja brom-fenol plavo putuje brže prema anodi od molekula DNA). Elektroforezu sam proveo pri naponu od 100 V u puferu 1x TAE kroz 45 minuta koristeći aparaturu Owl Easy Cast B1 Mini Gel Electrophoresis System (Thermo scientific, SAD). Elektroforezom u agaroznom gelu analizirani su uzorci genomske DNA i fragmenti DNA dobiveni PCR-om. Za provjeru veličine fragmenata u gelu koristio sam molekularni biljeg DirectLoad™ 50 bp DNA Step Ladder (Sigma-Aldrich). Nakon završetka elektroforeze, fragmente DNA u gelu vizualizirao sam pod UV-svjetlom (UVIpure, UVITEC Cambridge) i fotografirao.

3.6. Izrada filogenijskog stabla i molekularna identifikacija izolata

U servisu za sekvenciranje *Mycrosynth Austria GmbH* PCR-amplikoni su pročišćeni i određena im je primarna struktura sekvenciranjem Sangerovom dideoksi metodom koristeći identične početnice koje su korištene u PCR-reakcijskoj smjesi. Dobivene kromatograme analizirao sam i uredio (uz uklanjanje manje kvalitetnih početnih i krajnjih dijelova kromatograma) u programu BioEdit, a uređene sekvence pohranio sam u FASTA formatu. Višestruko sam poravnao sekvence izolata s odabranim referentnim sekvencama (Sandoval-Sierra i sur. 2014a; Viljamaa-Dirks i Heinikainen 2019) preuzetim iz NCBI baze podataka koristeći program MAFFT, a potom to poravnanje analizirao i uredio u programu BioEdit. Uređeno višestruko poravnanje koristio sam za izradu filogenijskog stabla metodom maksimalne vjerojatnosti (engl. *maximum likelihood*, ML) u programu MEGA. Filogenijsko stablo je generirano koristeći supstitucijski model GTR (engl. *General Time Reversible model*; Tavare, 1986). Kako bih dobio što robusnije stablo, koristio sam vrijednost od 500 *bootstrap* ponavljanja, a stablo sam ukorijenio vanjskom

grupom (*Achlya caroliniana* Coker (1910)). Dobiveno stablo uređeno je alatom iTOL (*Interactive Tree of Life*; <https://itol.embl.de/>).

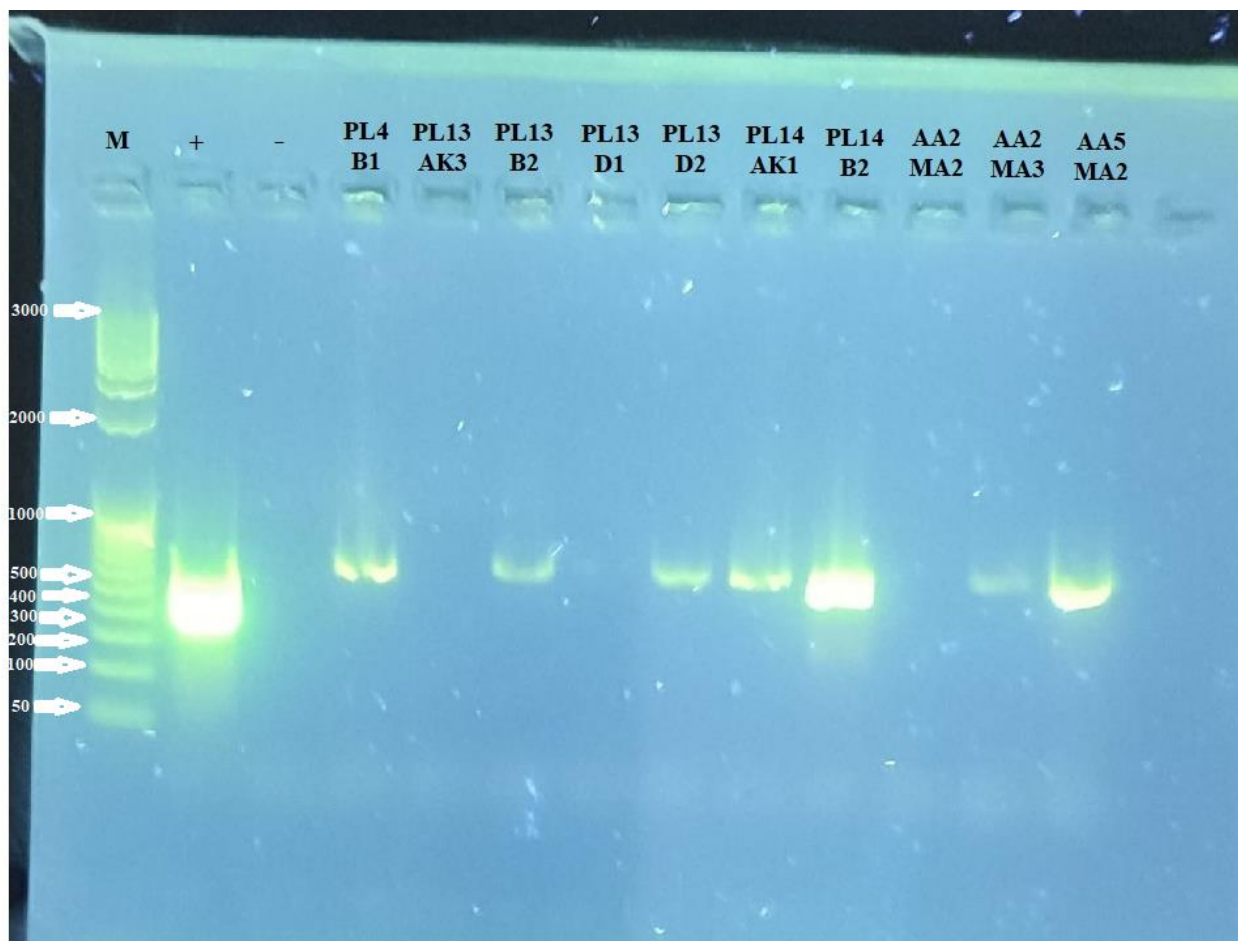
4. REZULTATI

Ukupno je sakupljeno 54 izolata vodenih plijesni s kutikula uzorkovanih vrsta rakova (Prilog 1). Najviše izolata vodenih plijesni izolirano je s kutikule vrste *P. leniusculus* (35/54, 65 %). Izolati vodenih plijesni izolirani su još s vrste *A. astacus* s dvije lokacije uzorkovanja: i) iz jezera Motičnjak (11/54, 20 %), ii) iz vodotoka u NP Plitvička jezera (8/54, 15 %; Tablica 1). S drugih lokacija i vrsta rakova nisu uspješno izolirane vodene plijesni (Tablica 4). Najveći broj izolata izoliran je s pereiopoda (29/54, 54 %), a manje ih je izolirano s abdominalnih kutikula (15/54, 28 %) te sa svlakova (10/54, 18 %).

Tablica 4. Lokacije uzorkovanih vrsta rakova te pripadajući broj izolata vodenih plijesni.

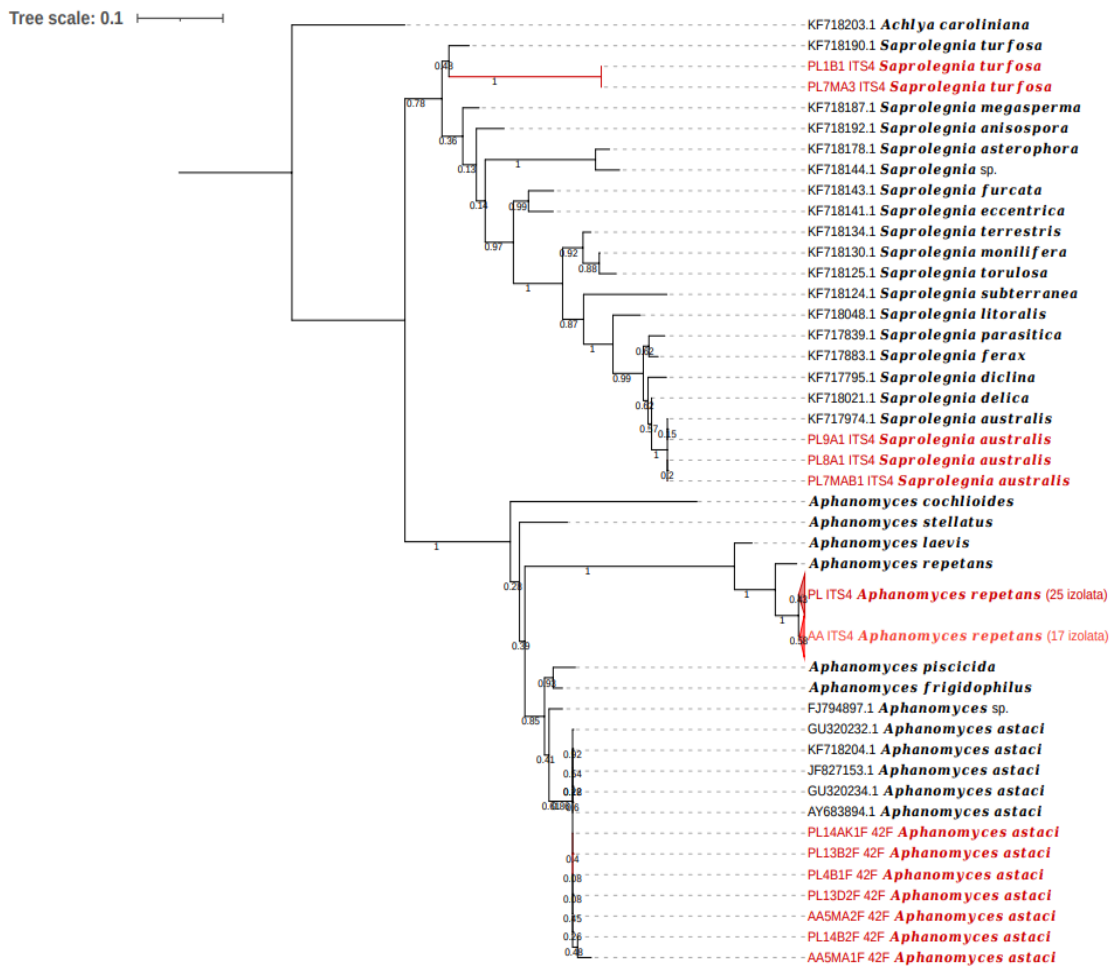
Uzorkovana vrsta raka	Lokacija	Broj izolata vodenih plijesni
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana	35
<i>Astacus astacus</i>	Jezero Jagodno	0
<i>Astacus astacus</i>	Vodotoci iz jezera Burgeti	8
<i>Astacus astacus</i>	Jezero Motičnjak	11
<i>Procambarus virginalis</i>	Jezero Šoderica	0
<i>Pontastacus leptodactylus</i>	Ušće Mrežnice u Koranu	0
<i>Faxonius limosus</i>	Rijeka Dunav	0
Ukupno		54

Sedam izolata bilo je pozitivno na PCR-test za specifičnu detekciju patogena *A. astaci* (Oidtman i sur. 2006), odnosno na agaroznom gelu bila je vidljiva vrpca od 569 pb (Slika 13). Pet pozitivnih izolata dobiveno je s jedinki *P. leniusculus* iz rijeke Korane, a dva su izolata dobivena s jedinki *A. astacus* iz vodotoka u NP Plitvička jezera (Slika 13; Prilog 1).



Slika 13. Primjer rezultata PCR-testa za detekciju patogena *A. astaci* izoliranih iz kutikule rakova *P. leniusculus* (PL) i *A. astacus* (AA). M – molekularni marker DirectLoad™ 50 bp DNA StepLadder. + - pozitivna kontrola, genomski DNA vrste *A. astaci* PEC8, genotip B, - - negativna kontrola, dH₂O. Na gel je nanoseno po 5 µL PCR-produkata (fotografija: Petrokov L.).

PCR-reakcijom umnažanja ITS regije DNA izolata, sekvenciranjem PCR-produkata te filogenijskom analizom dobivenih sekvenci identificirano je 54 izolata vodenih plijesni, od kojih većina (49 izolata) pripada rodu *Aphanomyces*, a ostatak (5 izolata) rodu *Saprolegnia* (Slika 2, Prilog 1). Dva izolata vrste *Saprolegnia turfosa* (Minden) Gäum i tri izolata vrste *Saprolegnia australis* dobivena su s jedinki *P. leniusculus*. Najveći broj izolata (42) pripada vrsti *Aphanomyces repetans*, od čega je 25 izolata s uzorkovanih jedinki *P. leniusculus*, dok je preostalih 17 izolata s uzorkovanih jedinki *A. astacus* (11 izolata s lokacije Motičnjak, a šest iz NP Plitvička jezera).



Slika 14. Filogenijsko stablo izolata vodenih plijesni (crveno) s kutikule rakova *Pacifastacus leniusculus* (PL) i *Astacus astacus* (AA) te ITS sekvenci referentnih sojeva (crno; Sandoval-Sierra i sur. 2014a; Viljamaa-Dirks i Heinikainen 2019). Na grananjima su prikazane *bootstrap* vrijednosti. AK - Abdominalna kutikula, M - svlak.

5. RASPRAVA

U posljednjih je stotinjak godina brojnost populacija europskih zavičajnih rakova u značajnom opadanju zbog višestrukih antropogenih pritisaka (Maguire i sur. 2011; Maguire i sur. 2018), među kojima je jedna od najznačajnijih introdukcija i širenje patogene vodene plijesni *A. astaci* u europske slatkovodne sustave. Iz tog je razloga utjecaj i rasprostranjenost ovog patogena intenzivno istraživana (Ungureanu i sur. 2020; Becking i sur. 2022), dok su druge vrste vodenih plijesni koje mogu nastanjivati kutikulu rakova i također imati negativne učinke na domaćina mnogo manje istražene (Makkonen i sur. 2010; Kozubikova-Balcarova i sur. 2013; Dragičević i sur. 2020b). Stoga su u ovom radu po prvi put uzgojeni izolati vodenih plijesni s kutikule različitih vrsta slatkovodnih rakova u Hrvatskoj.

Rezultati su potvrdili od prije poznatu prisutnost patogena *A. astaci* u populacijama riječnog raka *A. astacus* u NP Plitvička jezera i signalnog raka *P. leniusculus* u rijeci Korani (Maguire i sur. 2016; Pavić i sur. 2020). Međutim, za neke populacije u kojima je ranije utvrđena prisutnost *A. astaci* metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom (*F. limosus* u rijeci Dunav 2003. godine te *P. leptodactylus* u jezeru Jagodno 2012. i 2013. godine; Maguire i sur. 2016), rezultati ovog rada nisu potvrdili nalaz patogena. Više je mogućih razloga neuspješne izolacije. Moguće je da je sakupljeni uzorak bio premali (jedna jedinka *A. astacus* iz jezera Jagodno i pet *F. limosus* iz Dunava) odnosno jedinke u populaciji na kojima je prisutan patogen *A. astaci* zbog malog broja prikupljenih jedinki ovih vrsta nisu zahvaćene (Prilog 1). Drugi je mogući razlog, iako manje vjerojatan, da patogen *A. astaci* više nije prisutan u uzorkovanim populacijama, unatoč tome što je ranije (2003. - 2013. godina) bio prisutan. Izvjesnije je to da u populacijama postoji tzv. niska koncentracija patogena (engl. *low pathogen load*) dovoljna da vrsta preživi u populaciji, a da pritom ne uzrokuje povećani mortalitet. Osim toga, poznato je da vodene plijesni, uključujući patogena *A. astaci*, u kulturi često rastu sporije od drugih mikroorganizama pa ih lako prerastu gljive i/ili bakterije, što otežava/onemogućuje njihovu izolaciju (Diéguez-Uribeondo i sur. 2009; Korkea-Aho i sur. 2022). Navedeno može objasniti i činjenicu da s nekih vrsta rakova (*P. leptodactylus*, *F. limosus* i *P. virginalis*) nije dobiven ni jedan izolat vodenih plijesni, iako je malo vjerojatno da ni jedna vrsta vodenih plijesni nije bila prisutna na njihovim kutikulama.

Vodene plijesni *A. repetans*, *S. australis* i *S. turfosa* prvi su puta u Hrvatskoj izolirane s kutikule rakova. U ovom su istraživanju vrste *S. australis* i *S. turfosa* izolirane sa signalnog raka u rijeci Korani (tri izolata *S. australis*, dva izolata *S. turfosa*). Vrsta *S. australis* bila je ranije izolirana na području Hrvatske i to u pastrvskim ribnjacima (Solin, Kostanjevac i Gračani), većinom iz vode, a nekoliko izolata i s kože odraslih pastrva (Pavić i sur. 2021a). Ovo je prvi potvrđeni nalaz vrste *S. turfosa* u Hrvatskoj te na kutikuli rakova općenito. Rezultati ovog istraživanja i ranijeg istraživanja Pavić i suradnika (2021a) ukazuju na široku rasprostranjenost vrste *S. australis* u slatkovodnim vodotocima Hrvatske, a literaturni podaci ukazuju i na njezinu globalnu važnost (Hirsch i sur. 2008; Krugner-Higby i sur. 2010; Sandoval-Sierra i sur. 2014b; Pavić i sur. 2021a). Poznato je da vrste iz roda *Saprolegnia* mogu biti oportuni patogeni rakova, prodirući kroz oštećene dijelove kutikule (Makkonen i sur. 2010; Kozubikova-Balcarova i sur. 2013). Primjerice, utvrđeno je da je vrsta *S. australis* u Wisconsinu 2005. godine bila uzročnik ulcerativnih lezija na kutikuli rakova vrsta *Faxonius propinquus* (Girard, 1852) i *Faxonius rusticus* (Girard, 1852) u gotovo 10% populacije (Krugner-Higby i sur. 2010). Osim toga, izolirana je i s bodljibradih rakova u jezeru u Njemačkoj 2005. godine gdje je zabilježeno opadanje brojnosti jedinki u populaciji (Hirsch i sur. 2008). S obzirom da od unosa signalnog raka u rijeku Koranu zabilježenog 2011. godine nisu zabilježeni masovni pomori signalnog raka (Hudina i sur. 2013), može se pretpostaviti da vrsta *S. australis* nema negativni utjecaj na ovu populaciju, isto kao i patogene vodene plijesni *A. astaci* i *S. parasitica* za koje se zna da su prisutne u ovoj populaciji (Maguire i sur. 2016; Pavić i sur. 2021b; Grbin i sur. 2023). Što se tiče vrste *S. turfosa*, ona je prije ovog istraživanja pronađena u tlu i u vodenom stupcu (Dick 1963; Markovskaja 2006) pa se može pretpostaviti da se radi o saprofitskoj vrsti, a ne parazitskoj.

Ovo je prvi nalaz vrste *A. repetans* na kutikuli vrste *A. astacus*. *A. repetans* saprofitska je vrsta ranije izolirana s kutikule rakova *P. leniusculus*, *P. clarkii* i *A. pallipes* (Royo i sur. 2004; Cammà i sur. 2010) koja u kulturi pokazuje iznimno veliku sposobnost repetitivnog stvaranja novih generacija zoospora (Cammà i sur. 2010) i koloniziranja kutikule rakova (Royo i sur. 2004). Osim toga, odlikuje ju relativno brzi rast, što joj omogućuje da preraste sporijerastuće vrste poput *A. astaci* (Royo i sur. 2004; Diéguez-Uribeondo i sur. 2009). U ovom su istraživanju jedinke rakova s iste geografske lokacije držane u odvojenim posudama u istom akvariju. Može se pretpostaviti da je s vremenom unutar istog akvarija vrsta *A. repetans* postala dominantna u odnosu na *A. astaci*. To je vjerojatno razlog velikog udjela izolata *A. repetans* među izolatima vodenih plijesni u ovom

istraživanju (77 %) te postojanja miješanih kultura *A. repetans* i *A. astaci* (Prilog I). Prema istraživanju Maguire i suradnika (2016), može se pretpostaviti genotip izolata *A. astaci* potvrđenih u ovom istraživanju (genotip A izolata *A. astaci* s kutikule *A. astacus*, genotip B izolata *A. astaci* s kutikule *P. leniusculus*). U obje populacije rakova (*A. astacus* u NP Plitvička jezera, *P. leniusculus* u rijeci Korani) nisu zabilježeni značajni pomori izazvani račjom kugom, a literaturni podaci također ukazuju na nisku virulenciju genotipa A prema vrsti *A. astacus* (Svoboda i sur. 2012) odnosno genotipa B prema vrsti *P. leniusculus* (Becking i sur. 2015). Zbog toga se može pretpostaviti da je saprofitska brzorastuća vrsta, poput *A. repetans*, bila u mogućnosti proliferirati u akvarijima i prevladati među sakupljenim izolatima. U filogenijskom stablu (Slika 14) vidljivo je grupiranje izolata *A. repetans* u dvije grupe: onih izoliranih s kutikule *Astacus astacus* te onih izoliranih s kutikule *Pacifastacus leniusculus*, što upućuje na postojanje dva različita soja vrste *A. repetans* među navedenim vrstama. Istovremeno, izolati vodenih plijesni šifri AA5MA1, AA5MA2, PL4B1, PL13D2, PL14AK1 i PL14B2 utvrđeni su kao *A. astaci*, ali i kao *A. repetans*, što ukazuje na to da su ti izolati predstavljali miješane kulture vodenih plijesni (Prilog I).

Zaključno, ovaj rad donosi nove podatke o vodenim plijesnima koje nastanjuju kutikulu rakova čiji je utjecaj na domaćina, kao i njihov međuodnos s drugim vrstama vodenih plijesni na kutikuli rakova vrlo slabo istražen. Stoga se otvara niz pitanja na koja bi trebalo odgovoriti u nastavku istraživanja. Primjerice, trebalo bi utvrditi jesu li izolati vrste *S. australis* sa signalnog raka različitog genotipa i različite virulencije prema rakovima, salmonidima i drugim domaćinima od izolata iste vrste ranije utvrđenih u Hrvatskoj (Pavić i sur. 2021a), odnosno je li u ovom slučaju invazivni signalni rak u Hrvatsku donio i druge potencijalne patogene osim uzročnika račje kuge *A. astaci*. Nadalje, s obzirom na to da rezultati ovog rada nisu potvrdili prisutnost *A. astaci* u određenim populacijama za koje je ranije potvrđena prisutnost zaraze ovim patogenom, potrebno je neinvazivnim metodama detekcije *A. astaci* provjeriti je li patogen još uvijek prisutan u istim populacijama (Pavić i sur. 2020). Također, potrebno je provesti daljnja *in vivo* istraživanja i eksperimentalne zaraze (engl. *infection trials*) kako bi se utvrdili točni učinci ovih vrsta vodenih plijesni na organizam rakova.

6. ZAKLJUČAK

- Vodene plijesni iz roda *Aphanomyces*, *A. astaci* (uzročnik račje kuge) i *A. repetans* (saprofit), izolirane su s kutikula rakova *P. leniusculus* i *A. astacus*. Vodene plijesni iz roda *Saprolegnia*, *S. turfosa* (saprofit) i *S. australis* (oportunistički patogen rakova) izolirane su s kutikule signalnog raka *P. leniusculus*.
- S kutikule jedinki vrsta *P. leptodactylus*, *F. limosus* i *P. virginalis* nisu uspješno izolirane vodene plijesni, vjerojatno zbog relativno sporog rasta micelija u odnosu na rast većine drugih mikroorganizama.
- Potvrđena je prisutnost uzročnika račje kuge u populaciji signalnog raka u rijeci Korani te u populaciji riječnog raka u NP Plitvička jezera.
- Vrsta *S. turfosa*, ranije poznata iz tla i vode, prvi je put izolirana s kutikule rakova.

7. LITERATURA

- Ballesteros I., Martín M. P., Diéguez-Uribeondo J. (2006): First isolation of *Aphanomyces frigidophilus* (Saprolegniales) in Europe. **Mycotaxon** 95, 335-340.
- Becking T., Kiselev A., Rossi V., Street-Jones D., Grandjean F., Gaulin E. (2022): Pathogenicity of animal and plant parasitic *Aphanomyces* spp and their economic impact on aquaculture and agriculture. **Fungal Biology Reviews** 40, 1-18.
- Becking T., Mrugała A., Delaunay C., Svoboda J., Raimond M., Viljamaa-Dirks S., Petrussek A., Grandjean F., Braquart-Varnier C. (2015): Effect of experimental exposure to differently virulent *Aphanomyces astaci* strains on the immune response of the noble crayfish *Astacus astacus*. **Journal of invertebrate pathology** 132, 115-124.
- Buaya A. T., Thines M. (2020): An overview on the biology and phylogeny of the early-diverging oomycetes. **Philippine Journal of Systematic Biology** 14, 1-20.
- Buller N. (2007): Further Research and Laboratory trials for diagnostic tests for the detection of *Aphanomyces invadans* (EUS) and *A. astaci* (Crayfish Plague). FRDC Project, 2004/091.
- Cammà C., Ferri N., Zezza D., Marcacci M., Paolini A., Ricchiuti L., Lelli R. (2010): Confirmation of crayfish plague in Italy: detection of *Aphanomyces astaci* in white clawed crayfish. **Diseases of aquatic organisms** 89(3), 265-268.
- Dick M. W. (1963): The Occurrence and Distribution of Saprolegniaceae in Certain Soils of South-East England: III. Distribution in Relation to pH and Water Content. **The Journal of Ecology** 51(1), 75.

Diéguez-Uribeondo J., Cerenius L., Söderhäll K. (1994): *Saprolegnia parasitica* and its virulence on three different species of freshwater crayfish. **Aquaculture** 120(3-4), 219-228.

Diéguez-Uribeondo J., García M. A., Cerenius L., Kozubíková E., Ballesteros I., Windels C., Weiland J., Kator H., Söderhäll K., Martín M. P. (2009): Phylogenetic relationships among plant and animal parasites, and saprotrophs in *Aphanomyces* (Oomycetes). **Fungal Genetics and Biology** 46(5), 365-376.

Dobrović A., Maguire I., Boban M., Grbin D., Hudina S. (2021): Reproduction dynamics of the marbled crayfish *Procambarus virginalis* Lyko, 2017 from an anthropogenic lake in northern Croatia. **Aquatic Invasions** 16(3), 482–498.

Dragičević P., Faller M., Kutleša P., Hudina S. (2020a): Update on the signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) range expansion in Croatia: a 10-year report. **BioInvasions Records** 9(4), 793–807.

Dragičević P., Bielen A., Petrić I., Hudina S. (2020b): Microbial pathogens of freshwater crayfish: A critical review and systematization of the existing data with directions for future research. **Journal of Fish Diseases** 44(3), 221–247.

Gottstein S., Hudina S., Lucić A., Maguire I., Ternjej I., Žganec K. (2011): Crveni popis rakova (Crustacea) slatkih i bočatih voda Hrvatske. **Državni zavod za zaštitu prirode**.

Grbin D., Geček S., Miljanović A., Pavić D., Hudina S., Žučko J., Rieder J., Pisano S. R. R., Adrian-Kalchhauser I., Bielen A. (2023): Comparison of exoskeleton microbial

communities of co-occurring native and invasive crayfish species. **Journal of Invertebrate Pathology** 201, 107996.

Hudina S., Kutleša P., Trgovčić K., Duplić A. (2017): Dynamics of range expansion of the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) in a recently invaded region in Croatia. **Aquatic Invasions** 12(1), 67-75.

Hudina S., Žganec K., Lucić A., Trgovčić K., Maguire I. (2013): Recent invasion of the karstic river systems in Croatia through illegal introductions of the signal crayfish. **Freshwater Crayfish** 19(1), 21-27.

Hirsch P. E., Nechwatal J., Fischer P. (2008): A previously undescribed set of *Saprolegnia* spp in the invasive spiny-cheek crayfish (*Orconectes limosus*, Rafinesque). **Fundamental and Applied Limnology/Archiv für Hydrobiologie** 172(2), 161-165.

Jussila J., Francesconi C., Theissinger K., Kokko H., Makkonen J. (2021): Is *Aphanomyces astaci* Loosing its Stamina: A Latent Crayfish Plague Disease Agent From Lake Venesjärvi, Finland. **Freshwater crayfish** 26 (2), 139-144.

Kokko H., Koistinen L., Harlioğlu M. M., Makkonen J., Aydın H., Jussila J. (2012): Recovering Turkish narrow clawed crayfish (*Astacus leptodactylus*) populations carry *Aphanomyces astaci*. **Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems** 404, 12.

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.

Kozubikova-Balcarova E., Koukol O., Martin M. P., Svoboda J., Petrusek A., Diéguez-Uribeondo J. (2013): The diversity of oomycetes on crayfish: Morphological vs. molecular identification of cultures obtained while isolating the crayfish plague pathogen. **Fungal Biology** 117(10), 682-691.

Krugner-Higby L., Haak D., Johnson P. T., Shields J. D., Jones III W. M., Reece K. S., Meinke T., Gendron A., Rusak J. A. (2010): Ulcerative disease outbreak in crayfish *Orconectes propinquus* linked to *Saprolegnia australis* in Big Muskellunge Lake, Wisconsin. **Diseases of Aquatic Organisms** 91(1), 57-66.

Lee P. Y., Costumbrado J., Hsu C. Y., Kim Y. H. (2012): Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. **Journal of Visualized Experiments** 62, e3923.

Lovrenčić L., Temunović M., Gross R., Grgurev M., Maguire I. (2022): Integrating population genetics and species distribution modelling to guide conservation of the noble crayfish, *Astacus astacus*, in Croatia. **Scientific reports** 12(1), 2040.

Lowe S., Browne M., Boudjelas S., De Poorter M. (2000): 100 of the World's Worst Invasive Alien Species: A Selection from the Global Invasive Species Database. **The Invasive Species Specialist Group (ISSG). Auckland, New Zealand** 6.

Maguire I., Klobučar G. (2003): Appearance of *Orconectes limosus* in Croatia. **Crayfish news** 25(3), 7.

Maguire I., Jelić M., Klobučar G. (2011): Update on the distribution of freshwater crayfish in Croatia. **Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems** 401, 31.

Maguire I., Klobučar G., Žganec K., Jelić M., Lucić A., Hudina S. (2018): Recent changes in distribution pattern of freshwater crayfish in Croatia– threats and perspectives. **Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems** 419, 2.

Maguire I., Jelić M., Klobučar G., Delpy M., Delaunay C., Grandjean F. (2016): Prevalence of the pathogen *Aphanomyces astaci* in freshwater crayfish populations in Croatia. **Diseases of Aquatic Organisms** 118(1), 45–53.

Maguire I., Klobučar G., Faller M., Machino Y., Kučinić M., Žužul M. (2006): Updates on the distribution of the white-clawed and narrow-clawed crayfish in Croatia. **Crayfish News** 28, 4–5.

Makkonen J., Kokko H., Henttonen P., Kivistik M., Hurt M., Paaver T., Jussila J. (2010): Fungal isolations from Saaremaa, Estonia: noble crayfish (*Astacus astacus*) with melanised spots. **Freshwater Crayfish** 17, 155-158.

Markovskaja S. (2006): Saprolegniaceae (Peronosporomycetes) in Lithuania. II. The genus *Saprolegnia*. **Botanica Lithuanica** 12(2), 97–112.

Martín M. P., Winka K. (2000): Alternative Methods of extracting and Amplifying Dna from lichens. **The Lichenologist** 32(2), 189–196.

- Oidtmann B., Geiger S., Steinbauer P., Culas A., Hoffmann R. W. (2006): Detection of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish by polymerase chain reaction. **Diseases of Aquatic Organisms** 72, 53-64.
- Pavić D., Miljanović A., Grbin D., Šver L., Vladušić T., Galuppi R., Tedesco P., Bielen A. (2021a): Identification and molecular characterization of oomycete isolates from trout farms in Croatia, and their upstream and downstream water environments. **Aquaculture** 540, 736652.
- Pavić D., Bielen A., Hudina S., Špoljarić I., Grandjean F., Jussila J., Maguire I. (2021b): Distribution of *Aphanomyces astaci* Schikora, 1906, the causative agent of crayfish plague, in the Plitvice Lakes National Park, Croatia. **BioInvasions Records** 10(3), 654-668.
- Pavić D., Čanković M., Petrić I., Makkonen J., Hudina S., Maguire I., Vladušić T., Šver L., Hrašćan R., Orlić K., Bielen A. (2020). Non-destructive method for detecting *Aphanomyces astaci*, the causative agent of crayfish plague, on the individual level. **Journal of Invertebrate Pathology** 169, 107274.
- Phillips A. J., Anderson V. L., Robertson E. J., Secombes C. J., Van West P. (2008): New insights into animal pathogenic oomycetes. **Trends in microbiology** 16(1), 13-19.
- Royo F., Andersson G., Bangyeekhun E., Múzquiz J. L., Söderhäll K., Cerenius L. (2004): Physiological and genetic characterisation of some new *Aphanomyces* strains isolated from freshwater crayfish. **Veterinary microbiology** 104(1-2), 103-112.
- Samardžić M., Lucić A., Maguire I., Hudina S. (2014): The first record of the marbled crayfish (*Procambarus fallax* (Hagen, 1870) f. *virginalis*) in Croatia. **Crayfish News** 36, 4.

- Sandoval-Sierra J. V., Martín M. P., Diéguez-Uribeondo J. (2014a) Species identification in the genus *Saprolegnia* (Oomycetes): defining DNA-based molecular operational taxonomic units. **Fungal biology** 118(7), 559-578.
- Sandoval-Sierra J. V., Latif-Eugenin F., Martín M. P., Zaror L., Diéguez-Uribeondo J. (2014b): *Saprolegnia* species affecting the salmonid aquaculture in Chile and their associations with fish developmental stage. **Aquaculture** 434, 462–469.
- Smith R. I. (1940): Studies on two strains of *Aphanomyces laevis* found occurring as wound parasites on crayfish. **Mycologia** 32(2), 205-213.
- Söderhäll K., Cerenius L. (1999): The crayfish plague fungus: history and recent advances. **Freshwater Crayfish** 12, 11-35.
- Söderhäll K., Dick M. W., Clark G., Fürst M., Constantinescu O. (1991): Isolation of *Saprolegnia parasitica* from the crayfish *Astacus leptodactylus*. **Aquaculture** 92, 121-125.
- Svoboda J., Mrugała A., Kozubíková-Balcarová E., Petrusek A. (2016): Hosts and transmission of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci*: a review. **Journal of Fish Diseases** 40(1), 127–140.
- Svoboda J., Kozubíková E., Kozák P., Kouba A., Koca S. B., Diler Ö., Diler I., Policar T., Petrusek A. (2012): PCR detection of the crayfish plague pathogen in narrow-clawed crayfish inhabiting Lake Eğirdir in Turkey. **Diseases of Aquatic Organisms** 98(3), 255-259.

Tavare S. (1986): Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. **Lectures on Mathematics in the Life Sciences** 17, 57–86.

Todorov M., Trichkova T., Hubenov Z., Jurajda P. (2020): *Faxonius limosus* (Rafinesque, 1817)(Decapoda: Cambaridae), a new invasive alien species of European Union concern in Bulgaria. **Acta Zoologica Bulgarica** 72, 113-121.

Ungureanu E., Mojžišová M., Tangerman M., Ion M. C., Pârvulescu L., Petrussek A. (202): The spatial distribution of *Aphanomyces astaci* genotypes across Europe: introducing the first data from Ukraine. **Freshwater Crayfish** 25(1), 77-87.

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

White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications** 18(1), 315–322.

NN 144/2013 (2013): Pravilnik o strogo zaštićenim vrstama. Narodne novine, 144/2013.

IUCN (2022) The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2023-2. <https://www.iucnredlist.org> (pristupljeno 15. 07. 2019.).

100 of the World's Worst Invasive Alien Species (2013) http://www.iucngisd.org/gisd/100_worst.php (pristupljeno 15.07.2023.).

Interactive Tree Of Life. Version 6.8.1. <https://itol.embl.de/> (pristupljeno 04.02.2023.).

8. PRILOZI

Prilog I. Izolati vodenih plijesni s kutikule rakova. U imenima izolata oznake AA (*Astacus astacus*) i PL (*Pacifastacus leniusculus*) označavaju vrstu raka s koje je izolat uzgojen. Oznake AK (abdominalna kutikula) i M (svlak) označavaju tip uzorka kutikule. Oznaka ‘+’ u stupcu *A. astaci* označava one izolate kod kojih je specifičnim *A. astaci*-PCR-testom potvrđena prisutnost patogena *A. astaci*.

Šifra izolata	Vrsta raka	Lokacija	PCR-test detekcije <i>A. astaci</i>	Taksonomska identifikacija do vrste temeljem filogenijske analize
AA2MA1	<i>Astacus astacus</i>	Vodotoci iz jezera Burgeti		<i>Aphanomyces repetans</i>
AA2MA2	<i>Astacus astacus</i>	Vodotoci iz jezera Burgeti		<i>Aphanomyces repetans</i>
AA5MA1	<i>Astacus astacus</i>	Vodotoci iz jezera Burgeti	+	<i>Aphanomyces astaci</i> <i>Aphanomyces repetans</i>
AA5MA2	<i>Astacus astacus</i>	Vodotoci iz jezera Burgeti	+	<i>Aphanomyces astaci</i> <i>Aphanomyces repetans</i>
AA5MD2	<i>Astacus astacus</i>	Vodotoci iz jezera Burgeti		<i>Aphanomyces repetans</i>
AA12AK1	<i>Astacus astacus</i>	Jezero Motičnjak		<i>Aphanomyces repetans</i>
AA12AK2	<i>Astacus astacus</i>	Jezero Motičnjak		<i>Aphanomyces repetans</i>
AA12A2	<i>Astacus astacus</i>	Jezero Motičnjak		<i>Aphanomyces repetans</i>
AA13AK1	<i>Astacus astacus</i>	Vodotoci iz jezera Burgeti		<i>Aphanomyces repetans</i>
AA14AK1	<i>Astacus astacus</i>	Jezero Motičnjak		<i>Aphanomyces repetans</i>

AA14AK2	<i>Astacus astacus</i>	Jezero Motičnjak		<i>Aphanomyces repetans</i>
AA14A1	<i>Astacus astacus</i>	Jezero Motičnjak		<i>Aphanomyces repetans</i>
AA14B1	<i>Astacus astacus</i>	Jezero Motičnjak		<i>Aphanomyces repetans</i>
AA19AK1	<i>Astacus astacus</i>	Jezero Motičnjak		<i>Aphanomyces repetans</i>
AA19AK2	<i>Astacus astacus</i>	Jezero Motičnjak		<i>Aphanomyces repetans</i>
AA19B1	<i>Astacus astacus</i>	Jezero Motičnjak		<i>Aphanomyces repetans</i>
AA19B2	<i>Astacus astacus</i>	Jezero Motičnjak		<i>Aphanomyces repetans</i>
PL1B1	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana		<i>Saprolegnia turfosa</i>
PL3A1	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana		<i>Aphanomyces repetans</i>
PL3B2	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana		<i>Aphanomyces repetans</i>
PL3C2	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana		<i>Aphanomyces repetans</i>
PL4B1	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana	+	<i>Aphanomyces astaci</i> <i>Aphanomyces repetans</i>
PL4C1	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana		<i>Aphanomyces repetans</i>
PL6MA1	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana		<i>Aphanomyces repetans</i>
PL7MA1	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana		<i>Saprolegnia australis</i>
PL7MA3	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana		<i>Saprolegnia turfosa</i>

PL8A1	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana		<i>Saprolegnia australis</i>
PL9A1	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana		<i>Saprolegnia australis</i>
PL11AK	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana		<i>Aphanomyces repetans</i>
PL12C1	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana		<i>Aphanomyces repetans</i>
PL13AK1	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana		<i>Aphanomyces repetans</i>
PL13AK2	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana		<i>Aphanomyces repetans</i>
PL13B2	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana	+	<i>Aphanomyces astaci</i> <i>Aphanomyces repetans</i>
PL13C1	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana		<i>Aphanomyces repetans</i>
PL13C2	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana		<i>Aphanomyces repetans</i>
PL13D1	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana		<i>Aphanomyces repetans</i>
PL13D2	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana	+	<i>Aphanomyces astaci</i>
PL14AK1	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana	+	<i>Aphanomyces astaci</i> <i>Aphanomyces repetans</i>
PL14A1	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana		<i>Aphanomyces repetans</i>
PL14A2	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana		<i>Aphanomyces repetans</i>
PL14A3	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana		<i>Aphanomyces repetans</i>

PL14B1	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana		<i>Aphanomyces repetans</i>
PL14B2	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana	+	<i>Aphanomyces astaci</i> <i>Aphanomyces repetans</i>
PL14C1	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana		<i>Aphanomyces repetans</i>
PL14C2	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana		<i>Aphanomyces repetans</i>
PL15AK	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana		<i>Aphanomyces repetans</i>
PL16AK1	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana		<i>Aphanomyces repetans</i>
PL16AK3	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Rijeka Korana		<i>Aphanomyces repetans</i>

9. ŽIVOTOPIS

Luka Petrokov rođen je 21. prosinca 1998. godine u gradu Rijeci. Osnovnoškolsko obrazovanje završio je u OŠ Marije i Line Umag, a srednjoškolsko u SŠ Mate Balote Poreč, smjer opća gimnazija. Preddiplomski sveučilišni studij upisao je 2017. godine na Prirodoslovno - matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, smjer Biologija. Akademski naziv prvostupnika biologije stječe 2020. godine izradom završnog rada „Masovni pomori plemenite periske (*Pinna nobilis* Linnaeus, 1758) u Sredozemnom moru” pod vodstvom prof. dr. sc. Tatjana Bakran-Petricioli na Zoologijskom zavodu Prirodoslovno - matematičkog fakulteta. Iste godine upisuje diplomski sveučilišni studij ekologije i zaštite prirode, modul More na Prirodoslovno - matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Član je Udruge studenata biologije – BIUS od 2021. godine. Bio je članom Upravnog odbora Udruge 2021. - 2022. godine te je član Nadzornog odbora od 2022. godine, a sudjelovao je u brojnim projektima Udruge: Istraživačko – edukacijski projekt „Žumberak 2021.”, „Ihtiofauna zagrebačkih potoka 2021.”, „LepidopterISTRA 2021”, „Slatkovodna ihtiofauna zagrebačkih potoka 2021.”, Istraživačko – edukacijski projekt „Histria 2022.”, edukacijsko – istraživački projekt „Zagorje zelene 2023.”. Godine 2021. postao je jedan od osnivača i potpredsjednik Udruge Maremio, u kojoj je kao član sudjelovao u projektima „(A)MARE?!” 2022. godine te „Eko kamp Umag(o)” 2023. godine. Bio je pasivni sudionik na Simpoziju studenata bioloških usmjerenja – SiSB („SiSB2022”). Održao je poster prezentaciju „Oomycete (Oomycota) isolates from the cuticle of crayfish species in Croatia” na „Regional European IAA meeting CrayfIT” 2023. godine. Kao student, 2023. godine radio je za Udrugu Hyla kao sudionik na OPKK projektu „Razvoj sustava praćenja stanja vrsta i stanišnih tipova“, grupa predmeta nabave 9: „Izrada i razvoj programa praćenja za herpetofaunu s jačanjem kapaciteta dionika sustava praćenja i izvješćivanja“ i OPKK projektu „Razvoj sustava praćenja stanja vrsta i stanišnih tipova“, grupa predmeta nabave 11: „Izrada i razvoj programa praćenja za kornjaše s jačanjem kapaciteta dionika sustava praćenja i izvješćivanja“. Položio je vozački ispit B kategorije 2017. godine, a 2021. ispit za „Uvjerenje o osposobljenosti voditelja brodice kategorije A“. Položio je R1 tečaj za ronjenje po asocijaciji CMAS 2021. godine.