VILNIAUS UNIVERSITETAS

GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Biomokslų institutas

Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedra

Mikrobiologijos studijjų programos IV kurso studentė

EVA KUTYŠ

Bakalauro baigiamasis darbas

OOMICETŲ GENOTOKSINIO IR CITOTOKSINIO POVEIKIO LAŠIŠINIŲ ŽUVŲ EMBRIONAMS TYRIMAI

Darbo vadovė: dr. Milda Stankevičiūtė

Gamtos tyrimų centras,

Ekotoksikologijos laboratorija

Vilnius, 2023

TURINYS

SANTRUMPOS 3
ĮVADAS 4
1. LITERATŪROS APŽVALGA 6
1.1. Oomicetai 6
1.1.1. *Saprolegnia* 6
1.2. Oomicetų infekcija žuvyse 8
1.2.1. Oomicetų poveikis žuvims ankstyvoje vystymosi stadijoje 8
1.2.2. Oomicetų poveikis suaugusioms žuvims 10
1.3. Ląstelės branduolio pažaidos kaip geno- ir citotoksinio poveikio biožymenys 11
2. MEDŽIAGOS IR METODAI 13
2.1. Darbe naudotos medžiagos, įranga ir organizmai 13
2.1.1. Darbe naudotos medžiagos 13
2.1.2. Darbe naudota įranga 13
2.1.3. Darbe naudoti organizmai 13
2.2. Eksperimentiniai tyrimai 14
2.3. Šlakio embrionų kraujo mėginių ruošimas 15
2.4. Branduolio pažaidų vertinimas šlakio embrionų eritrocituose 15
2.4.1. Eritrocitų branduolio pažaidų nustatymas 15
2.4.2. Statistinė analizė 17
3. REZULTATAI 18
3.1. Genotoksinio poveikio įvertinimas 18
3.2. Citotoksinio poveikio įvertinimas 21
3.3. Suminio genotoksinio ir citotoksinio poveikių palyginimas 23
4. REZULTATŲ APTARIMAS 26
IŠVADOS 29
SANTRAUKA 30
SUMMARY 31
FINANSINĖ PARAMA 32
LITERATŪROS ŠALTINIAI 33

SANTRUMPOS

1. 8-forma – „8“ formos branduolys
2. AT – atauga
3. BP – branduolio pumpuras
4. BPs – branduolio pumpuras su nukleoplazmine jungtimi
5. DB – dvibranduolė ląstelė
6. DBt – dvibranduolė ląstelė su nukleoplazmine jungtimi
7. Fr – fragmentacija
8. kfv – kolonijas formuojantys vienetai
9. MB – mikrobranduolys
10. PLB – pagrindinis ląstelės branduolys
11. ROS – Reaktyviosios deguonies formos (angl. *Reactive oxygen species*)
12. SAR – *Stramenopiles-Alveolata-Rhizaria*
13. SN – standartinis nuokrypis
14. SOD – Superoksido dismutazė

ĮVADAS

Oomicetų gebėjimas infekuoti platų įvairių organizmų rūšių spektrą sukelia didelius ekonominius nuostolius ir alina natūralias buveines. (Philips *et al*., 2008). Šiuo metu geriausiai ištirti yra augalus infekuojantys oomicetai, kuomet gyvūnams patogeniniški oomicetai yra mažiau tiriami (Derevnina *et al*., 2016). Viena iš svarbiausių oomicetų infekcijų yra saprolegniozė, ši „šaltamėge“ antrinė žuvų infekcija yra antra pagal svarbą liga akvakultūrose. Kasmet mažiausiai 10% nelaisvėje auginamų lašišų būna užsikrėtusios saprolegniozės sukėlėjų, bet kartais šis skaičius gali siekti ir iki 50%. Saprolegniozės protrūkiai sukelia didžiulius ekonominius nuostolius, o sparčiai plečiantis akvakultūros sektoriui ši problema tampa vis aktualesnė (Phillips *et al*., 2008; Brudeseth *et al*., 2013; Liu *et al*., 2015).

Anksčiau saprolegniozė akvakultūrose buvo kontroliuojama naudojant organinį dažą malachito žalumą, bet dėl toksiškumo ir teratogeniškumo 2002 m. ši saprolegniozės prevencinė priemonė buvo uždrausta naudoti akvakultūrose visame pausaulyje. Iki šiol nėra jokios kitos medžiagos, tinkamos saprolegniozės prevencijai (Srivastava *et al*., 2004; Barde *et al*., 2020). Vakcinacija akvakultūros sektoriuje yra taikoma kaip ligų prevencijos priemonė, tačiau oomicetų infekcijos atveju, vakcinacija nėra efektyvi, kadangi dauguma žuvų nuolat turi kontaktą su oomicetais bei po vakcinacijos nepastebimas žuvų imuniteto prieš saprolegniozę atsiradimas (Gudding ir van Muiswinkel, 2013; Barde *et al*., 2020).

Efektyvių priemonių saprolegniozės gydymui nebuvimas lemia jog, ši liga kelia daug rūpesčių akvakultūrose. Siekiant ligos protrūkių prevencijos rekomenduojamas tik optimalių gyvenimo sąlygų palaikymas, kuomet yra atsižvelgiama į taisyklingą maitinimą, žuvų laikymo tankį ir geros vandens kokybės palaikymą (Barde *et al*., 2020). Nors ir yra įmanoma prislopinti kai kurių saprolegniozės sukėlėjų rūšių augimą mažomis druskų koncentracijomis ir taip pat sumažinti saprolegniozės infekcijos sukeltą osmosinį stresą infekuotose žuvyse, tai oomicetų augimo ir daugeliu atveju saprolegniozės infekcijos nesustabdo (Ali, 2005; van West, 2006).

Darbo tikslas:

Įvertinti skirtingų oomicetų rūšių citogenetinį poveikį šlakio (*Salmo trutta trutta*) embrionams, naudojant mikrobranduolių ir kitų branduolio pažaidų testą.

Darbo uždaviniai:

1. Eritrocitų branduolio pažaidų metodu nustatyti skirtingų oomicetų rūšių genotoksinį poveikį *S. trutta trutta* embrionams.
2. Eritrocitų branduolio pažaidų metodu įvertinti skirtingų oomicetų rūšių citotoksinį poveikį *S. trutta trutta* embrionams.
3. Statistiniais metodais palyginti skirtingų oomicetų rūšių suminį genotoksinį poveikį *S. trutta trutta* embrionams akutės stadijoje.
4. Statistiniais metodais palyginti skirtingų oomicetų rūšių suminį citotoksinį poveikį *S. trutta trutta* embrionams akutės stadijoje.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Oomicetai

Oomicetai – tai klasė eukariotinių mikroorganizmų, kurie priklauso *Stramenopiles-Alveolata-Rhizaria* (SAR) supergrupei (McCarthy and Fitzpatrick, 2017). Oomicetų, kurie dėl savo polinkio formuoti filamentines struktūras dažnai yra vadinami „vandens pelėsiais“ ir anksčiau buvo priskiriami grybams, kilmė smarkiai skiriasi nuo grybelinių organizmų ir yra genetiškai artimesnė fotosintezę vykdantiems rudadumbliams ir titnagdumbliams (Kamoun, 2003; Lamour *et al*., 2007).

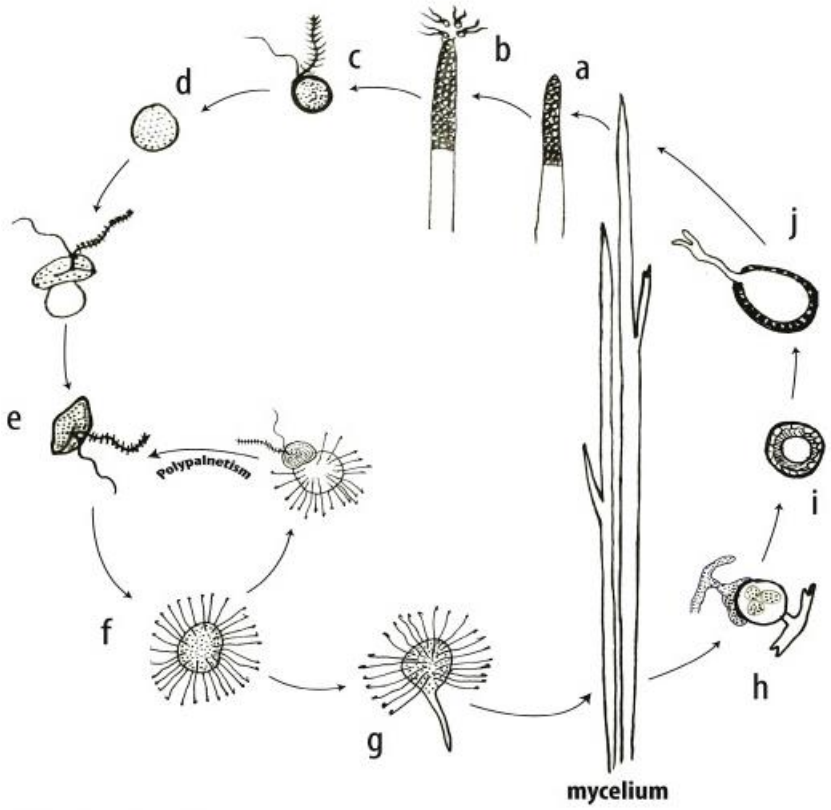
Oomicetai yra randami daugelyje ekosistemų ir yra prisitaikę prie saprotrofinio ir patogeninio gyvenimo tipų (Philips *et al*., 2008; Thines, 2014). Patogeniniai oomicetai geba infekuoti labai platų organizmų spektrą: dumblius, augalus, protistus, grybus, nariuotakojus ir stuburinius gyvūnus ir yra atsakingi už agrokultūrų ir akvakultūrų nykimą (Kamoun, 2003; Philips *et al*., 2008). Remiantis moksliniais literatūros duomenimis patogeniniai oomicetai, kurie dažniausiai infekuoja augalus priklauso *Phytophora*, *Pythium*, *Aphanomyces* ir *Peronospora* gentims, o gyvūnus infekuojančios gentys yra *Saprolegnia*, *Achlya* ir *Lagenidium* (Thines, 2014; Sapkota ir Nocolaisen, 2015).

Taksonomiškai oomicetai yra skirtomi į tris poklasius: *Hipidiomycetidae*, *Peronosporomycetidae* ir *Saprolegniomycetidae. Saprolegniomycetidae* yra sudaryta iš būrių: *Leptomitales* ir *Saprogleniales,* o į *Saprolegniales* šeimą – *Saprolegniaceae* įeina gentys kurios gali sukelti mikozes vandens gyvūnuose: *Achlya* ir *Saprolegnia*, iš kurių geriausiai ištyrinėta yra *Saprolegnia* gentis (Beakes ir Ford, 1983; Choi *et al*., 2019; Magray *et al*., 2019).

1.1.1. Saprolegnia

Iš visų vandens gyvūnams patogeninių oomicetų geriausiai ištyrinėti yra *Saprolegnia* gentis. *Saprolegnia* dauginasi lytiniu būdu (S strategija) ir nelytiniu būdu (R strategija) (1.1 pav.) (Andersson ir Cerenius, 2002). Parazituojant šeimininką *Saprolegnia* naudojasi nelytinio dauginimosi būdu, kuris taip pat buvo pastebėtas kai kuriose kitose patogeninių oomicetų

gentyses ir yra asocijuojamas su saprolegniozės sukėlimu (Andersson ir Cerenius. 2002; Earle ir Hintz, 2014).



1.1 pav. *Saprolegnia* gyvenimo ciklas. R strategija: a) sporangė su zoosporomis, b) sporangės atsidarymas, zoosporų išleidimas, c) pirminė zoospora, d) pirminė cista, e) antrinė zoospora, f) antrinė cista su „kabliais“, g) dygstanti cista. S strategija: h) oogonės ir anteridžio kompleksas, i) oospora, j) dygstanti oospora (Magray *et al*., 2019).

Nepalankiomis sąlygomis, esant nepapankamai maistinių medžiagų *Saprolegnia* pradeda daugintis nelytiniu būdu, kuomet sporangės išleidžia pirmines zoosporas, jos suformuoja pirmines cistas, kurios išleidžia judresnes antrines zoosporas, o antrinės zoosporos yra pagrindinis saprolegniozės infekcijos vienetas (Andersson ir Cerenius, 2002; Phillips *et al*., 2008; Earle ir Hintz, 2014). Antrinėm zoosporom prisitvirtinus prie šeimininko, susiformuoja antrinės cistos, kurios diferencijuoja į hifus ir proliferuoja ant šeimininko (van West, 2006; Srivastava *et al*., 2018).

1.2 Oomicetų infekcija žuvyse

Saprolegniozė – tai paplitusi žemesniųjų stuburinių gyvūnų antrinė infekcinė liga, kurią kelia oomicetai tokie kaip *Saprolegnia* ir kai kurios kitos gentys (*Achlya*, *Leptitopegnia*) (Densmore ir Green, 2007). *Saprolegnia* gentis yra daugiausiai saprotrofiniai ir nekrotrofiniai organizmai, bet kai kurių *Saprolegnia* rūšių, tokių kaip *Saprolgenia parasitica,* kamienai gali būti labai virulentiški ir sukelti saprolegniozę lašišinėse žuvyse kaip pirminę infekciją (Torto-Alalibo *et al*., 2005). Oomicetai infekuoja žuvų ikrus, embrionus ir suaugusias žuvis. Saprolegniozė pasireiškia žuvų epidermio audinių pažeidimais, o infekcijos eigoje pradeda matytis medvilnę primenantys pilkšvai balti, apvalūs regionai, kuriuos sudaro filamentinis micelis (van West, 2006; Baldissera *et al*., 2020).

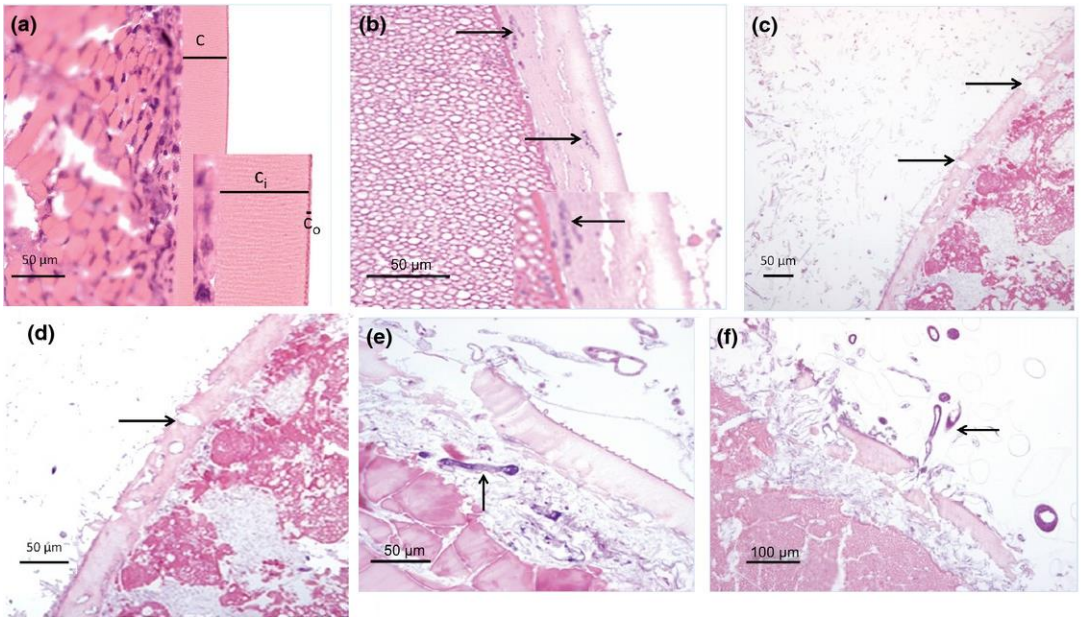
1.2.1. Oomicetų poveikis žuvims ankstyvojo vystymosi stadijose

Saprolegnia spp. infekuoja didelį spektrą gėlavandenių žuvų ikrų ir embrionų. Žuvų embriogenezėje polinkis į saprolegniozę yra nulemiamas žuvų rūšies ikrų dydžio ir choriono storio. Žuvų rūšių kaip paprastojo karpio (*Cyprinus carpio*) arba geltonojo šamo (*Pelteobagrus fulvidraco*) embrionai yra palyginti mažesnio dydžio ir oomicetai juos geba infekuoti kur kas greičiau, nei didesnius lašišinių žuvų embrionus (Chukanhom ir Hatai, 2004; Cao *et al*., 2012; van den Berg *et al*., 2013; Songe *et al*., 2015).

Gyvi lašišinių žuvų embrionai turi mažesnį polinkį oomicetų infekcijai zoosporomis negu mirę embrionai ir neapvaisinti ikrai dėl savo apvalkalo – choriono, kuris suteikia efektyvią mechaninę apsaugą (Thoen *et al*., 2011). Dėl šios priežasties dažniausiu gyvų embrionų užsikrėtimo saprolegnioze priežastimi tampa fizinis sąlytis su oomicetų miceliu, kurio židinys atsiranda ant infekuoto neapvaisinto ikro arba mirusio embriono (Cao *et al*., 2012). Oomicetų hifams apaugant žuvų embrionus, dėl didelio micelio kiekio embrionų dujų apykaita yra apribojama ir jie yra „uždusinami“. Nepilnai miceliu apaugę embrionai taip pat gali ilgainiui žūti tikėtinai dėl nežinomo invazijos mechanizmo arba oomicetų sintetinamų medžiagų (Thoen *et al*., 2011).

Ant lašišinių žuvų embrionų, sergančių saprolegnioze, dažnai yra randamos tokio *Saprolegnia* genties rūšys kaip: *S. australis, S. diclina, S. ferax ir S. parasitica* (Sakaguchi *et al*., 2019). Saprolegniozės metu oomicetų hifai ardo chorioną ir skverbiasi gilyn link citoplazmos. Manoma, kad *Saprolegnia* gentyje, didžiausius lašišinių žuvų nuostolius sukelia *S. diclina* ir *S. parasitica* rūšys, kuomet *S. ferax* yra siejama su padidėjusiu amfibijų mirtingumu ontogenezėje (Songe *et al*., 2016; Sakaguchi *et al*., 2019; Groffen *et al*., 2019).

Gyvų embrionų infekcijos *S. diclina* metu, hifai skverbiasi per embriono chorioną mechaniu spaudimu ir kataliziniu aktyvumu ko pasekmėje jį suardo. Priešingai nei *S. diclina*, *S. parasitica* choriono nesunaikina ir įprastai lemia choriono porų arba kitų pažeidimų atsiradimą. *S. parasitica* ir *S. diclina* hifams prasiskverbus per embriono chorioną, embriono citoplazmoje prasideda vakuolizacijos procesas ir formuojasi cistos (1.2 pav.) (Songe *et al*., 2016; Sakaguchi *et al*., 2022).



1.2 pav. Sveiko (a), *S. parasitica* (b-d) ir *S. diclina* (e-f) užkrėstų atlantinės lašišos (*Salmo salar*) embrionų histologinės nuotraukos. (a) paveikslėlyje yra pavaizduotas sveikas žuvies embrionas, su plonesniu išoriniu choriono sluoksniu (c_o) ir storesniu vidiniu choriono sluoksniu (c_i). Embrionas su nežymiai pažeistu chorionu (b), rodyklės rodo *S. parasitica* hifus. Embrionas su stipriau pažeistu chorionu (c), chorione yra susidarę plyšiai ir vakuolės (pažymėta rodyklėmis), o ant choriono matomi *S. parasitica* hifai. (d) paveikslėlyje yra embriono nuotrauka, kuri detaliau parodo embriono chorione atsiradusius plyšius poras ir vakuoles. (e) paveikslėlis rodo *S. diclina* sukeltus choriono pažeidimus ir pokyčius citoplazmoje, rodykle pažymėta po chorionu susiformavusi cista. (f) paveikslėlyje pavaizduoti

stiprūs choriono pažeidimai sukelti *S. diclina*, kai kuriose vietose chorionas yra pilnai suardytas, rodyklė rodo *S. diclina* hifą (Songe *et al*., 2016).

Dėl *S. diclina* ir *S. parasitica* infekcijos mechanizmų skirtumų yra manoma, kad šios oomicetų rūšys, nors ir labai panašios tarpusavyje, naudoja skirtingas išgyvenimo strategijas ir *S. diclina* yra labiau linkusi į nekrotrofinį gyvenimo būdą, kuomet *S. parasitica* yra linkusi į biotrofizmą (Songe *et al*., 2016).

1.2.2. Oomicetų poveikis suaugusioms žuvims

Suaugusiose žuvyse saprolegniozės sukėlėju dažniausiai yra *Saprolegnia* antrinės zoosporos, kurios yra mobilios ilgesnį laiką negu pirminės zoosporos (van West, 2006). Pagrindiniu matomu saprolegniozės požymiu yra pilkšvai baltų, vatą arba vilną primenančių regionų, kurie infekcijos eigoje gali padengti net 80% žuvies paviršiaus, atsiradimas. Dažniausiai oomicetų micelis pradeda augti ant pelekų, akių, galvos ir burnos zonų, o tolimesnėje infekcijos eigoje pasireiškia ir tokie požymiai kaip nusilpimas, letargiškumas, pusiausvyros sutrikimai ir sulėtėję šeimininko refleksai (El-Hakim *et al*., 2020). Taip pat dėl šios infekcijos gali atkibti žvynai, apsiniaukti akys ir ilgainiui infekcijos vietoje dermyje atsiranda nekrotinės sritys ir uždegimas. Kartais infekcijos *S. parasitica* metu uždegiminis atsakas nepasireiškia, dėl ko manoma, kad kai kurie šios rūšies kamienai geba nuslopinti šeimininko imuninį atsaką (van West, 2006; El-Hakim *et al*., 2020; Mahfouz *et al*., 2019).

Negydoma saprolegniozės infekcija pasibaigia žuvies žūtimi, kurią dažniausiai sukelia osmoreguliacijos sutrikimas, nors taip pat žuvis gali mirti ir dėl negebėjimo vykdyti dujų apykaitą arba maistinių medžiagų nepakankamumo, jeigu micelis pradeda augti ant žuvies žiaunų arba burnoje (van West, 2006; El-Hakim *et al*., 2020). Infekuotos žuvies gyvenimo trukmė priklauso nuo tokių faktorių kaip: infekcijos vieta, pažeistų audinių tipas, patogeno augimo greitis, individualus žuvies atsparumas stresui ir šeimininko paviršiaus mikrobiota (van West, 2006; Larousse and Galiana, 2017; El-Hakim *et al*., 2019).

Saprolegniozė pasižymi šeimininko imunosupresija, hematologinių rodiklių pakitimais, osmoreguliacijos sutrikimais ir oksidacinio streso sukėlimu (Thoen *et al*., 2011; Saha *et al*., 2017; Mehrabi *et al*., 2019; Baldissera *et al*., 2020). Oksidacinis stresas pasireiškia kaip oksidantų ir antioksidantų pusiausvyros sutrikimas ir dažnai atsiranda infekcijos metu, kaip

organizmo savigynos mechanizmas (Castro *et al*., 2017; Sies, 2018). Yra nustatyta, kad infekcijos *S. ferax* metu reaktyvių deguonies formų (ROS) kiekis Nilinėse tilapijose (*Oreochromis niloticus*) ir infekcijos *S. parasitica* metu, baltojo amūro (*Ctenopharyngodon idella*) kepenyse smarkiai padidėja (Zahran ir Risha, 2013; Baldissera *et al*., 2020). Infekcijos šiomis oomicetų rūšimis metu antioksidantinių fermentų sistema yra pažeidžiama, superoksido dismutazės (SOD) aktyvumas ženkliai sumažėja (*C. idella* kepenyse SOD aktyvumas gali sumažėti apie 95%), kas prisideda prie šeimininko susilpninimo ir greitesnės infekcijos eigos (Zahran ir Risha, 2013; Baldissera *et al*., 2020).

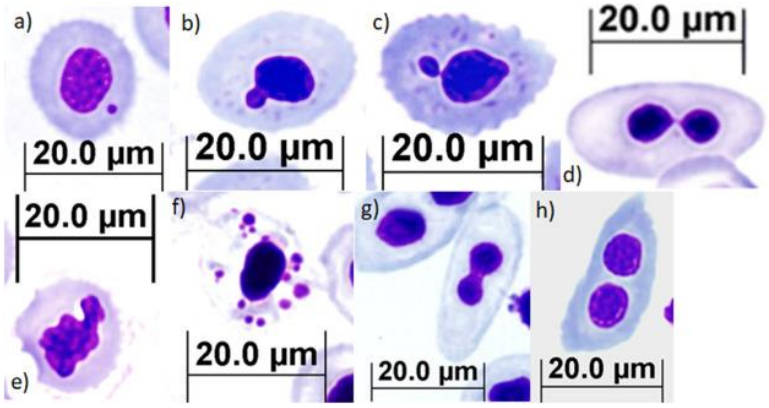
Kuomet organizmo antioksidacinė sistema nesusitvarko su oksidaciniu stresu, ROS pradeda reaguoti su biomolekulėmis kaip baltymai arba DNR, taip pat paveikdamos ląstelių homeostazę, genomo stabilumą ir ląstelių branduolių morfologiją (Viña *et al*., 2018; Baldissera *et al*., 2020). Uždegiminėse sąlygose padidėjęs ląstelių proliferacijos greitis taip pat yra siejamas su padidėjusiu kiekiu klaidų, galimai, genetinių pažeidimų dažniu mitozėje, kas taip pat lemia ląstelių vystymąsi pro-apoptotine linkme (Kratzer *et al*., 2012). Padidėjęs apoptotinių ląstelių ir branduolio pažaidų kiekis audiniuose gali būti sukeltas ROS arba genotoksinų poveikio (Tadin 2019). Ankstyvose uždegimo stadijose, dėl ROS sukeltų DNR pažaidų gali atsirasti ląstelių branduolių morfologiniai pakitimai – branduolių pažaidos. (Kratzer *et al*., 2012; Sommer *et al*., 2020; Tadin, 2019).

1.3. Ląstelės branduolio pažaidos kaip geno- ir citotoksinio poveikio biožymenys

Mikrobranduolių (MB) testas yra klasikinės citogenetikos metodas, naudojamas norint nustatyti genotoksinį cheminių medžiagų poveikį (Sommer *et al*., 2020). MB susidaro iš acentrinių chromosomos fragmentų (klastogeninis mechanizmas) arba visos chromosomos (aneugeninis mechanizmas) anafazės metu neįtrauktos į dukterinių ląstelių branduolius (Palhares ir Grisolia, 2002; Ali *et al*., 2008; Obiakor *et al*., 2012).

Kartu su MB genotoksinio ir citotoksinio poveikio įvertintinimui gali būti naudojami ir kiti biožymenys (1.3 pav.). Branduolio pumpurai (BP), branduolio pumpurai su nukleopolazmine jungtimi (BPs), branduolio ataugos (AT) ir dvibranduolės ląstelės su

nukleoplazmine jungtimi (DBt) yra genotoksinio poveikio biožymenys, tuo tarpu dvibranduolės ląstelės (DB), aštuoneto formos branduoliai (8-forma) ir branduolio fragmentacijos (Fr) yra citotoksinio poveikio biožymenys (Bolognesi *et al.,* 2013; Valskienė *et al*., 2018; Sommer *et al*., 2020).



1.3 pav. Genotoksinės (a-d) ir citotoksinės (e-h) branduolio pažaidos žuvų eritrocituose: a) mikrobranduolys (MB) strimelės (*Clupea harengus membras*), b) branduolio pumpuras (BP) menkės (*Gadus morhua*), c) menkės eritrocito branduolio pumpuras su nukleoplazmine juntimi (BPs), d) dvibranduolis eritrocitas su nukleoplazminiu tiltu (DBt) strimelėje, e) fragmentuotas branduolys (Fr) strimelėje, f) apoptozė (Ap) strimelėje, g) aštuoneto formos branduolys (8) plekšnės (*Platichthys flesus*) periferinio kraujo eritrocituose ir h) dvibranduolis eritrocitas (DB) plekšnėje (Valskienė *et al*., 2018).

Šios ląstelių pažaidos yra siejamos su chromosominiais nestabilumo atvejais, genų amplifikacijos pokyčiais, DNR reparacijos baltymų kompleksų šalinimu ir ląstelės dalijimosi sutrikimais (Bolognesi ir Hayashi, 2011; Obiakor *et al*., 2012; Valskienė *et al*., 2018; Shao *et al*., 2019).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Darbe naudotos medžiagos, įranga ir organizmai

2.1.1. Darbe naudotos medžiagos:

Carl Roth, Vokietija: Giemsa dažai;

Carl Roth, Vokietija: Imersinis aliejus;

Millipore, Vokietija: Weise buferio tabletės;

Prekybos centrai: pluoštinių kanapių sėklos.

2.1.2. Darbe naudota įranga:

Šviesinis mikroskopas – Olympus BX51 (Japonija)

2.1.3. Darbe naudoti organizmai:

Šlakio (*Salmo trutta trutta*) embrionai akutės stadijoje gauti iš Žuvininkystės tarnybos prie Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministerijos Rytų regiono žuvivaisos skyriaus (Meškerinė, Lietuva). Gamtos tyrimų centro (GTC) Ekotoksikologijos laboratorijoje šlakio embrionai buvo laikomi specialiuose inkubatoriuose ir naudojami šiame darbe aprašytiems eksperimentiniams tyrimams atlikti.

Lašišinės žuvys *S. trutta trutta* buvo pasirinktos kaip modelinis organizmas skirtingų oomicetų rūšių patogeniškumo tyrimams dėl jų kultūrinės bei komercinės vertės. Taip pat oomicetų sukieliamos saprolegniozės yra paplitusios ir aptinkamos tiek laukinėse lašišinių žuvų populiacijose, tiek ir žuvivaisos ūkiuose. Pastaraisiais metais kai kuriose lašišinių žuvų upėse yra stebimi „grybelinių“ infekcijų protrūkiai, tačiau veiksniai skatinantys šias epidemijas, yra mažai žinomi.

Oomicetai:

1) *Saprolegnia parasitica*
2) *S. ferax*
3) *S. diclina*
4) *S. australis*
5) *Achlya ambisexualis*
6) *Newbya oligacantha* (anksčiau *Achlya oligacantha*)

Šios oomicetų rūšys buvo išskirtos iš žuvininkystės ūkiuose, priklausančių Žuvininkystės tarnybai prie Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministerijos, surinktų vandens mėginių bei nuo saprolegnioze užsikrėtusių žuvų (*S. trutta*). Oomicetai buvo išskiriami iš surinktų mėginių panaudojant kibimo metodiką (Seymour, 1970). Oomicetų izoliatai buvo kelis kartus persėjami siekiant išgryninti kultūras. Oomicetai buvo izoliuoti ir identifikuoti iki rūšies remiantis morfologiniais (Seymour, 1970; Rietmüller, 2000; Dick, 2001; Markovskaja, 2006) ir molekuliniais metodais (rDNR vidinio transkribuoto tarpiklio (ITS) geno srities analizės) Gamtos Tyrimų Centro (GTC) Mikologijos laboratorijoje.

2.2. Eksperimentiniai tyrimai

Eksperimentiniams tyrimams su žuvimis atlikti *S. parasitica, S. ferax, S. diclina, S. australis, A. ambisexualis ir N oligacantha* kolonijos buvo auginamos ant pluoštinių kanapių sėklų GTC Ekotoksikologijos laboratorijoje. Siekiant nustatyti išskirtų oomicetų rūšių citogenetinį potencialą *S. trutta trutta* embrionai akutės stadijoje buvo veikiami išvardintomis oomicetų rūšimis 14 parų 3000 kfv (kolonijas formuojantys vienetai)/ml koncentracijoje, darbe naudoti parametrai nurodyti 2.1 lentelėje.

2.3. Šlakio embrionų kraujo mėginių ruošimas

S. trutta trutta embrionų kraujo mėginiai (~ 1-2 μL) buvo ruošiami pincetu suspaudus iš choriono išimtą embrioną ir braukiant jį per objektinį stiklelį. Tuomet mėginiai buvo 2 valandas džiovinami kambario temperatūroje, buvo fiksuojami etanolyje (10 min.) ir dažomi 10% Giemsa dažais fosfatiniame buferyje (pH = 6,8) 60 minučių.

2.1 lentelė. Atlikto eksperimentinio tyrimo pagrindiniai parametrai.

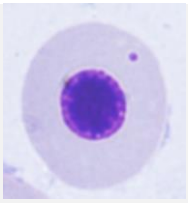
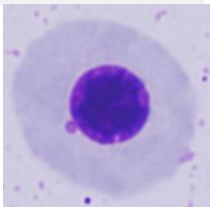
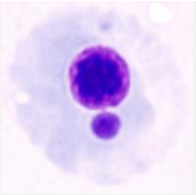
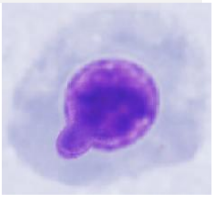
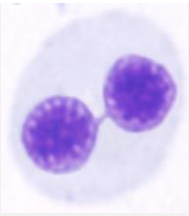
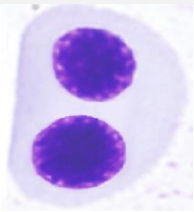
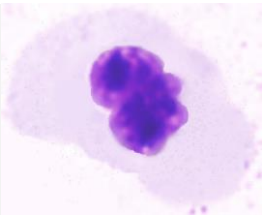
Žuvies rūšis				***Salmo trutta trutta***			
Eksperimento trukmė	14 parų						
Poveikio grupės	Kontrolė	*S. parasitica*	*S. ferax*	*S. diclina*	*S. australis*	*A. ambisexualis*	*N. oligacantha*
Poveikio koncentracija	Švarus vanduo	3000 kfv/ml	3000 kfv/ml	3000 kfv/ml	3000 kfv/ml	3000 kfv/ml	3000 kfv/ml
Pakartojimų skaičius	3						
Imties dydis (N)	75						
Kraujo mėginių skaičius (pakartojime/iš viso)	11/33						
Vandens temperatūra, °C	6,80 ± 0,12						
pH	8,67 ± 0,17						
Deguonies koncentracija, mg/l	9,60 ± 0,65						
Eksperimento tipas	Statinis						

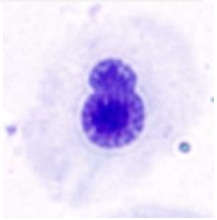
2.4. Branduolio pažaidų vertinimas šlakio embrionų eritrocituose

2.4.1 Eritrocitų branduolio pažaidų nustatymas

Ląstelių branduolio pažaidos identifikuotos pagal Heddle, 1973; Carrasco *et al.,* 1990; Heddle *et al.,* 1991; Al-Sabti ir Metcalfe, 1995; Fenech, 2000, 2003 ir Stankevičiūtės *et al*., 2022 aprašytus kriterijus (2.2 lentelė). Bendrieji ląstelės branduolio pažaidų vertinimo kriterijai: ląstelės citoplazma turi būti nepažeista, ląstelės nepersidengusios bei branduolio pažaida turi būti toje pačioje plokštumoje kaip ir pagrindinis ląstelės branduolys (PLB).

2.2. lentelė. Kriterijai pagal kuriuos buvo vertinamos eritrocitų branduolio pažaidos.

Branduolio pažaida	Spalva ir chromatino kondensacija	Forma ir dydis	Padėtis PLB atžvilgiu	Atspindi šviesą?	Pastabos	Mikrofotografija
MB (Mikrobranduolys)	Sutampa arba labai panaši su PLB	Apvali, 1/3-1/20 PLB skersmens	Darinys už PLB ribų, su PLB nesijungia	Ne	Vienoje ląstelėje gali būti daugiau nei vienas MB, esant daug MB, ląstelė gali būti apoptotinė (atkreipti dėmesį į chromatino kondensaciją)	
BP (Branduolio pumpuras)	Sutampa arba labai panaši su PLB	Apvali, 1/3-1/20 PLB skersmens	Darinys vientisas su PLB, ties jungimosi vieta turi susiaurėjimą	Ne		
BPs (Branduolio pumpuras su nukleopazmine jungtimi)	Sutampa arba labai panaši su PLB	Apvali arba elipsoidinė, 1/3-1/20 PLB skersmens	Darinys nėra vientisas su PLB, jungiasi plona nukleoplazmine jungtimi – tiltu	Ne	Darinys morfologiškai primena MB, bet turi jungtį su PLB.	
AT (Branduolio autauga)	Sutampa arba labai panaši su PLB	Pailga, ne apvali	Darinys vientisas su PLB, ties jungimosi vieta neturi susiaurėjimo	Ne		
DBt (Dvibranduolio ląstelė su nukleoplazmine jungtimi)	Sutampa arba labai panaši su kitu branduoliu	Vienas branduolys negali būti mažesnis nei 1/3 kito branduolio skersmens	Nėra PLB, yra du branduoliai sujungti nukleoplazmine jungtimi – tiltu	Ne	DBt morfologiškai panašu į DB, bet sujungtą nukleoplazminiu tiltu.	
DB (Dvibranduolė ląstelė)	Sutampa arba labai panaši su kitu branduoliu	Vienas branduolys negali būti mažesnis nei 1/3 kito branduolio skersmens	Nėra PLB, yra du nesujunti branduoliai	Ne		
Fr (Branduolio fragmentacija)	Branduolio spalva ir chromatino kondensacija gali būti netolygi	PLB yra netaisyklingos formos, gali turėti „kampuotus“ kraštus	Ši pažaida apima visą PLB	Ne	Esant dideliam chromatino kondensacijos skirtumui atsižvelgiama ar nėra citoplazmos vakuolizacijos. Jeigu citoplazma vakuolizuota ląstelė yra ansktyvoje nekrozės stadijoje ir ši	

					pažaida nėra įskaitoma	
8-forma („8“ formos branduolys)	PLB spalva ir chromatino kondensacija yra tolygi	PLB yra „8“ formos, turi persmauką, kuri dalina PLB į dvi vienodas arba panašaus dydžio dalis	Ši pažaida apima visą PLB	Ne		

Eritrocitų branduolių pažaidos buvo naudojamos kaip biožymenys norint nustatyti oomicetų keliamą genotoksinį ir citotoksinį poveikį *S. trutta trutta* embrionams.

Branduolių pažaidos siejamos su genotoksiniu poveikiu apima: MB, BP, BPs, AT, DBt.

Branduolių pažaidos siejamos su citotoksiniu poveikiu apima: DB, Fr, 8-forma.

Siekiant įvertinti bendrą genotoksinį ir citotoksinį poveikį, buvo apskaičiuotos suminės geno- ir citotoksiškumo vertės. Suminis genotoksiškumas (∑Genotoksiškumas) ir suminis citotoksiškumas (∑Citotoksiškumas) išreikšti kaip stebėtų genotoksinių ar citotoksinių pažaidų suma.

S. trutta trutta embrionų kraujo mėginiai buvo analizuojami šviesiniu mikroskopu (naudojant 100x imersinį objektyvą). Kiekviename mėginyje išanalizuota po 2000 eritrocitų, kuriuose buvo fiksuojamos eritocitų branduolio pažaidos. Branduolio pažaidų dažnis išreikštas promilėmis (pažaidos dažnis 1000 eritrocitų).

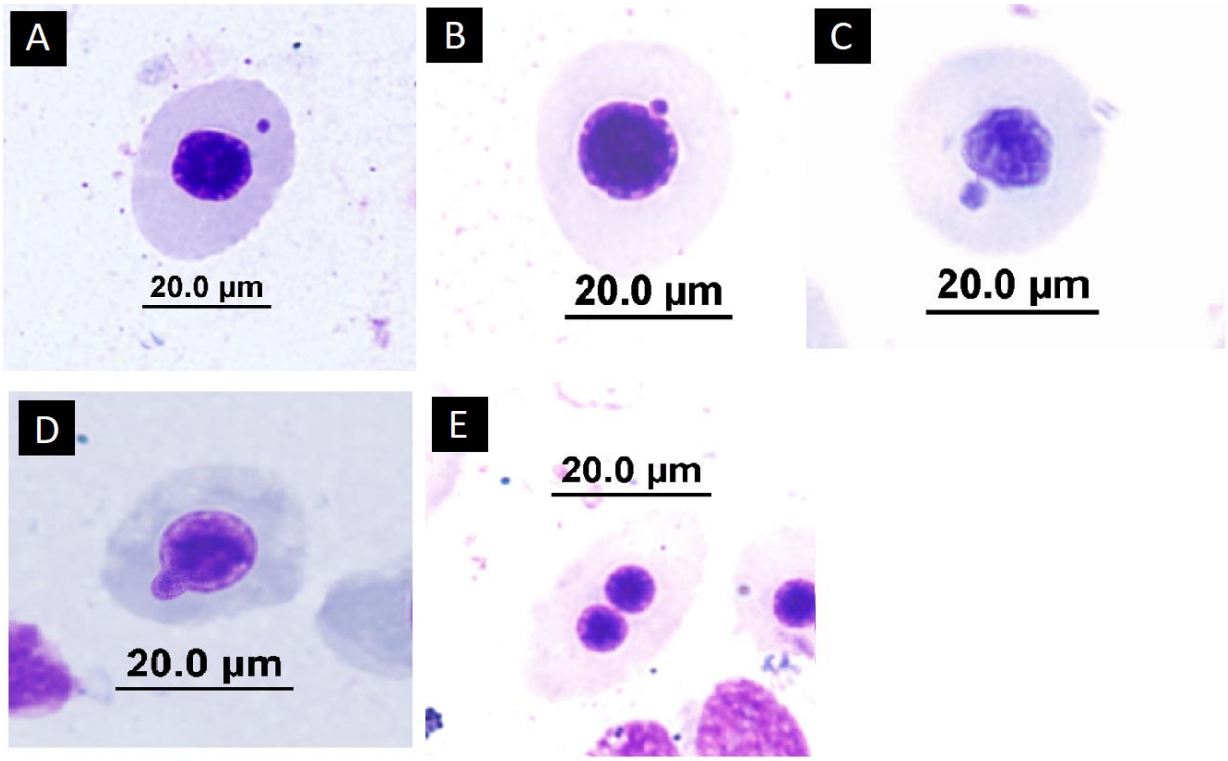
2.4.2 Statistinė analizė

Shapiro-Wilk ir Levene testai buvo naudoti įvertinti duomenų normalumo bei lygių dispersijų prielaidas. Neparametriniams duomenims analizuoti buvo panaudotas Kruskal-Wallis testas. Statistinė analizė atlikta „R“ (4.1.1) ir „R studio“ (1.4.1717) programine įranga.

3. REZULTATAI

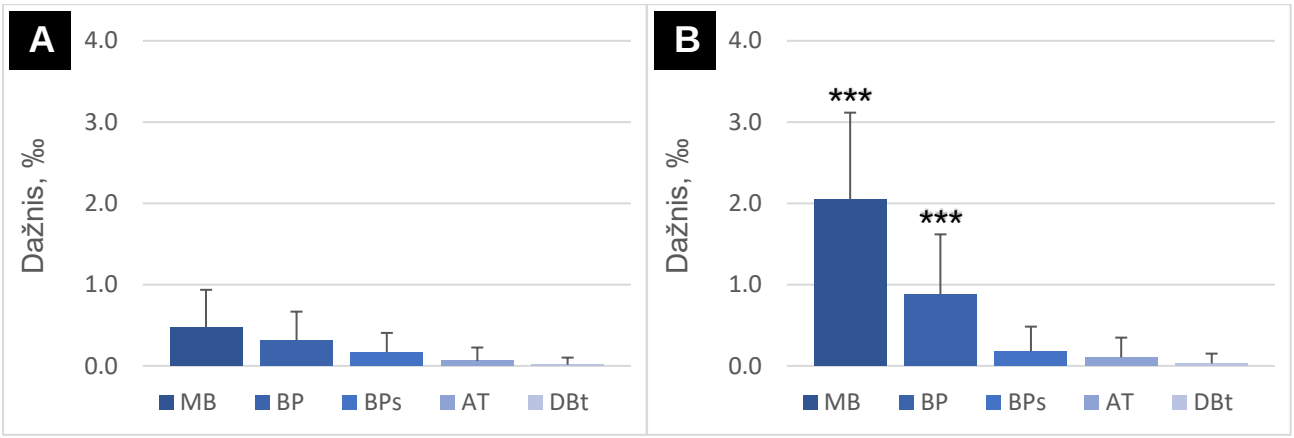
3.1. Genotoksinio poveikio įvertinimas

Išanalizavus *S. trutta trutta* embrionų kraujo mėginius, kontrolinėje ir oomicetais paveiktose grupėse buvo aptiktos šios genotoksinį poveikį indikuojančios pažaidos: MB, BP, BPs, AT ir DBt (3.1 pav.)



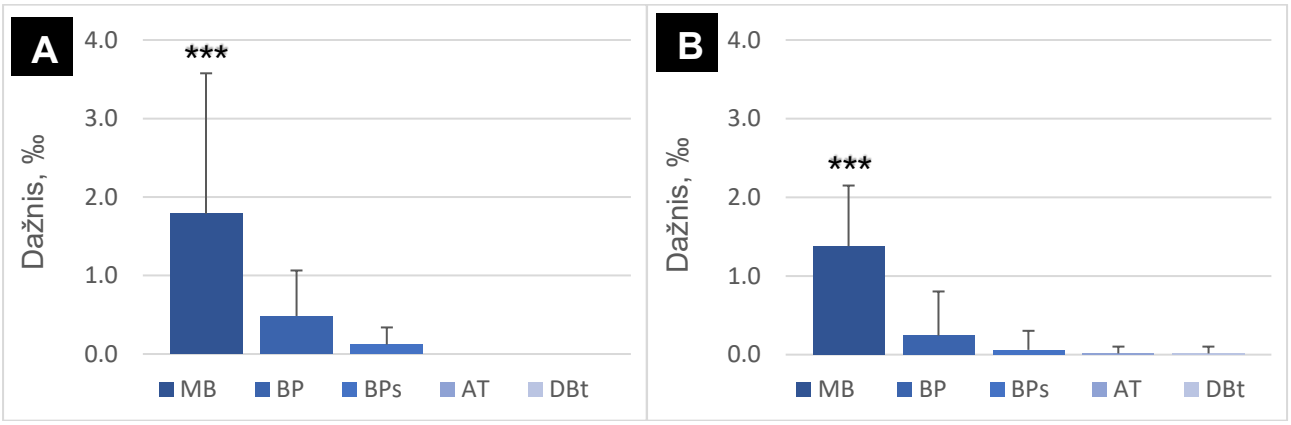
3.1 pav. Eritrocitų branduolio pažaidos, naudotos kaip genotoksinio poveikio biožymenys, aptiktos išanalizavus šlakio (*S. trutta trutta*) embrionų akutės stadijoje kraujo mėginius. A- mikrobranduolys (MB), B- branduolio pumpuras (BP), C- branduolio pumpuras su nukleoplazmine jungtimi (BPs), D- atauga (AT), E – dvibranduolė ląstelė su nukleoplazmine jungtimi (DBt).

S. parasitica poveikio grupėje nustatytas MB ($H = 38,79$; $P < 0,001$) dažnis buvo 4,35 karto, o BP ($H = 14,29$; $P < 0,001$) dažnis 2,76 karto didesnis nei kontrolinės grupės žuvų eritrocituose ir šie skirtumai buvo statistiškai reikšmingi (3.2 pav.: B).



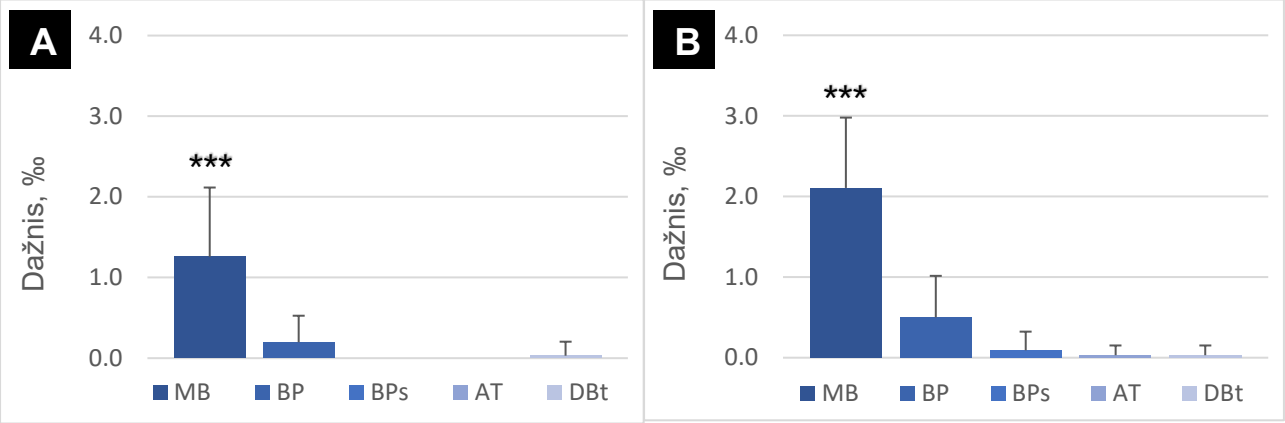
3.2 pav. Genotoksinių pažaidų dažnis šlakio (*S. trutta trutta*) embrionų eritrocituose po 14 parų kontrolinėje (A) grupėje ir po poveikio *S. parasitica* (B) (3000 kfv/ml). MB – mikrobranduoliai, DBt – dvibranduolės ląstelės su nukleoplazmine jungtimi, BPs – branduolio pumpurai su nukleoplazmine jungtimi, BP – branduolio pumpurai, AT – branduolio ataugos. Pateikti vidurkiai + SN (n = 33) Žvaigždutės (*) žymi reikšmingus skirtumus lyginant su kontroline grupe (* – $P \leq 0{,}05$; ** – $P \leq 0{,}01$; *** – $P \leq 0{,}001$).

S. ferax poveikio grupėje nustatytas MB dažnis buvo 3,81 karto didesnis nei kontrolinės grupės žuvų eritrocituose ir šie skirtumai buvo statistiškai reikšmingi (H = 26,73; $P < 0{,}001$), o AT ir DBt nebuvo aptikti (3.3 pav.: A). *S. diclina* poveikio grupėje nustatytas MB dažnis buvo 2,94 karto didesnis nei kontrolinės grupės žuvų eritrocituose ir šie skirtumai buvo statistiškai reikšmingi (H = 23,90; $P < 0{,}001$) (3.3 pav.:B).



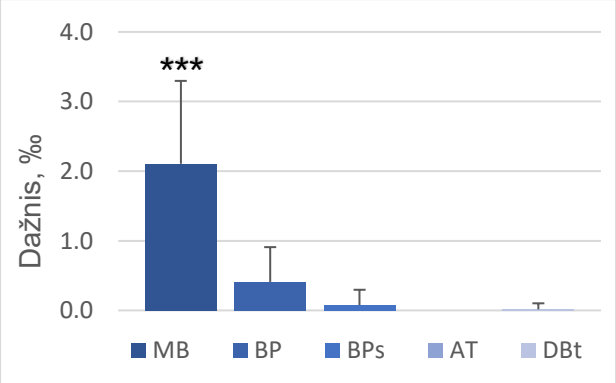
3.3 pav. Genotoksinių pažaidų dažnis šlakio (*S. trutta trutta*) embrionų eritrocituose po 14 parų poveikio *S. ferax* (A) ir *S. diclina* (B) (3000 kfv/ml). MB – mikrobranduoliai, DBt – dvibranduolės ląstelės su nukleoplazmine jungtimi, BPs – branduolio pumpurai su nukleoplazmine jungtimi, BP – branduolio pumpurai, AT – branduolio ataugos. Pateikti vidurkiai + SN (n = 33) Žvaigždutės (*) žymi reikšmingus skirtumus lyginant su kontroline grupe (* – $P \leq 0{,}05$; ** – $P \leq 0{,}01$; *** – $P \leq 0{,}001$).

S. australis poveikio grupėje nustatytas MB dažnis buvo 2,68 karto didesnis nei kontrolinės grupės žuvų eritrocituose ir šie skirtumai buvo statistiškai reikšmingi (H = 16,43; $P < 0,001$), BPs ir AT šioje grupėje nebuvo aptikta (3.4 pav.: A). *A. ambisexualis* poveikio grupėje nustatytas MB dažnis buvo 4,48 karto didesnis nei kontrolinės grupės žuvų eritrocituose ir šie skirtumai buvo statistiškai reikšmingi (H = 44,09; $P < 0,001$) (3.4 pav.: B).



3.4 pav. Genotoksinių pažaidų dažnis šlakio (*S. trutta trutta*) embrionų eritrocituose po 14 parų poveikio *S. australis* (A) ir *A. ambisexualis* (B) (3000 kfv/ml). MB – mikrobranduoliai, DBt – dvibranduolės ląstelės su nukleoplazmine jungtimi, BPs – branduolio pumpurai su nukleoplazmine jungtimi, BP – branduolio pumpurai, AT – branduolio ataugos. Pateikti vidurkiai + SN (n = 33) Žvaigždutės (*) žymi reikšmingus skirtumus lyginant su kontroline grupe (* – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$; *** – $P \leq 0,001$).

N. oligacantha poveikio grupėje nustatytas MB dažnis buvo 4,48 karto didesnis nei kontrolinės grupės žuvų eritrocituose ir šie skirtumai buvo statistiškai reikšmingi (H = 30,65; $P < 0,001$) (3.5 pav.).



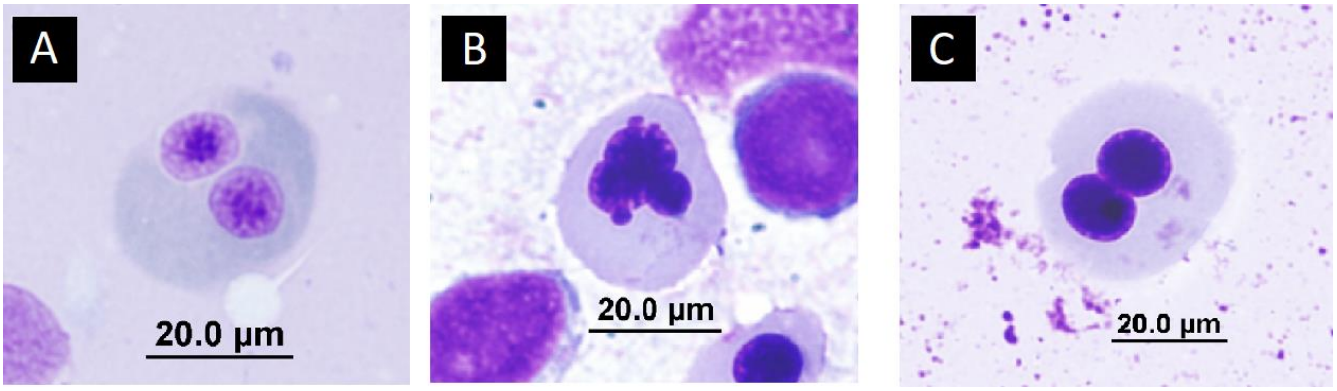
3.5 pav. Genotoksinių pažaidų dažnis šlakio (*S. trutta trutta*) embrionų eritrocituose po 14 parų poveikio *N. oligacantha* (3000 kfv/ml). MB – mikrobranduoliai, DBt – dvibranduolės ląstelės su nukleoplazmine jungtimi, BPs – branduolio pumpurai su nukleoplazmine jungtimi, BP – branduolio pumpurai, AT – branduolio ataugos.

Pateikti vidurkiai + SN (n = 33) Žvaigždutės (*) žymi reikšmingus skirtumus lyginant su kontroline grupe (* – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$; *** – $P \leq 0,001$).

N. oligacantha poveikio grupėje AT nebuvo aptikta.

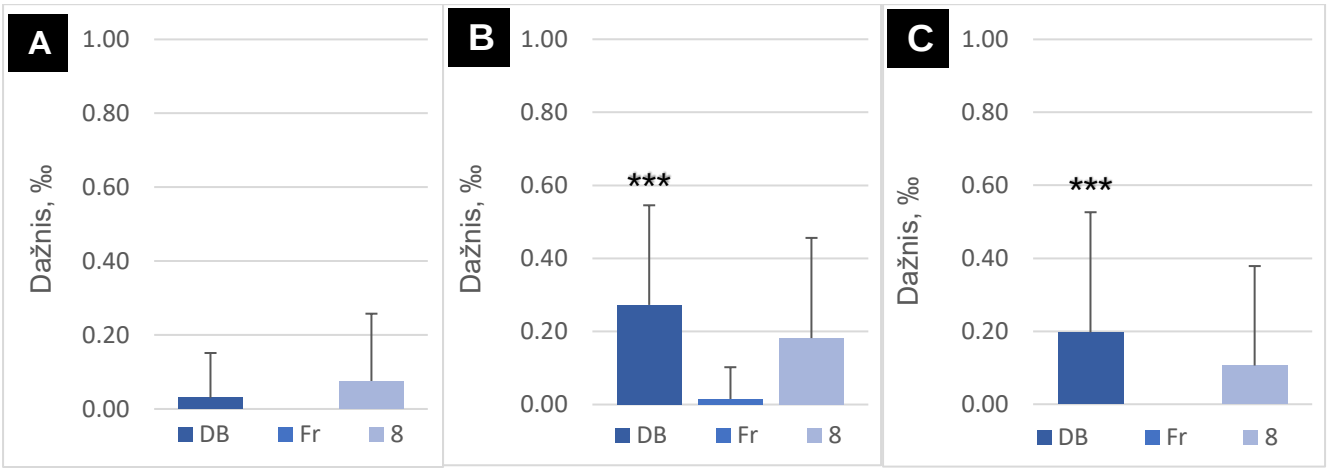
3.2. Citotoksinio poveikio įvertinimas

Išanalizavus šlakio embrionų kraujo mėginius, kontrolinėje ir oomicetais paveiktose grupėse buvo aptiktos šios citotoksinį poveikį indikuojančios eritrocitų branduolio pažaidos: DB, Fr, 8 formos branduoliai (3.6 pav.). Nė vienoje iš eksperimentinių grupių nebuvo aptikta Ap ląstelių, todėl Ap į tolesnę analizę nėra įtraukta.



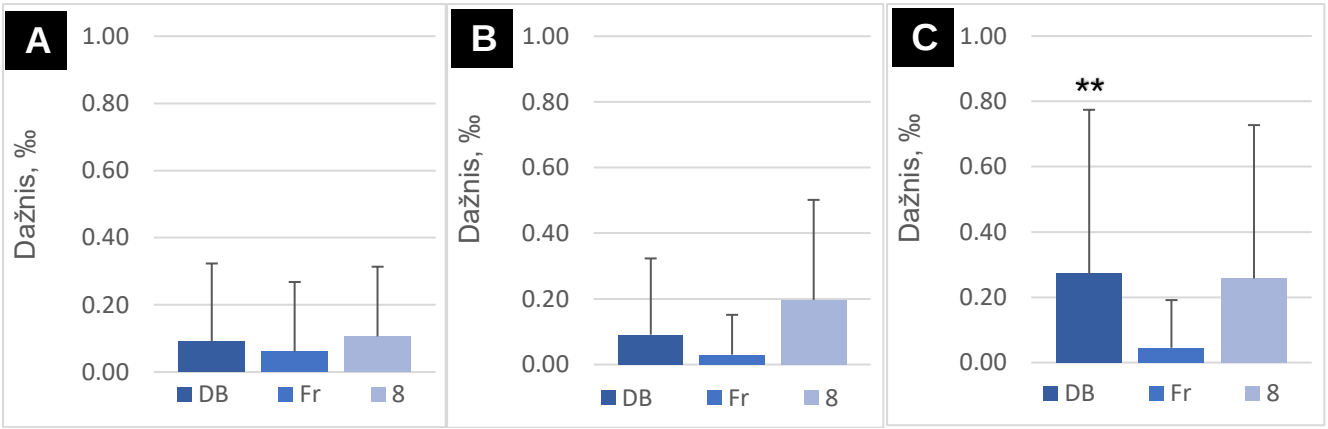
3.6 pav. Eritrocitų branduolio pažaidos naudotos kaip citotoksinio poveikio biožymenys, aptiktos išanalizavus šlakio (*Salmo trutta trutta*) embrionų akutės stadijoje kraujo mėginius. A – dvibranduolė ląstelė (DB), B – ląstelė su fragmentuotu branduoliu (Fr), C – "8" formos branduolys (8).

S. parasitica poveikio grupėje nustatytas DB dažnis buvo 9 kartus didesnis nei kontrolinės grupės žuvų eritrocituose ir šie skirtumai buvo statistiškai reikšmingi (H = 13,36; $P < 0,001$) (3.7 pav.: B). *S. ferax* poveikio grupėje nustatytas DB dažnis buvo 6,5 karto didesnis nei kontrolinės grupės žuvų eritrocituose ir šie skirtumai buvo statistiškai reikšmingi (H = 6,66 ; $P = 0,001$), šioje grupėje Fr nebuvo aptikta (3.7 pav.: C).



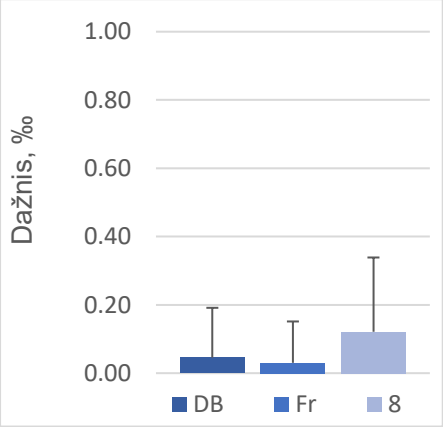
3.7 pav. Citotoksinių pažaidų dažnis šlakio (*S. trutta trutta*) embrionų eritrocituose po 14 parų kontrolinėje grupėje (A), *S. parasitica* (B) ir *S. ferax* (C) paveiktose grupėse (3000 kfv/ml). DB – dvibranduolė ląstelė, Fr – fragmentacija, 8-forma – aštuoneto formos branduolys. Pateikti vidurkiai + SN (n = 33). Žvaigždutės (*) žymi reikšmingus skirtumus lyginant su kontrole (* – $P \leq 0{,}05$; ** – $P \leq 0{,}01$; *** – $P \leq 0{,}001$).

S. diclina ir *S. australis* poveikio grupėse nebuvo nustatyti statistiškai reikšmingi citotoksinių pažaidų dažnių pokyčiai palyginti su kontroline grupe (3.8 pav.: A, B). *A. ambisexualis* poveikio grupėje nustatytas DB dažnis buvo 9 kartus didesnis nei kontrolinės grupės žuvų eritrocituose ir šie skirtumai buvo statistiškai reikšmingi ($H = 9{,}17$; $P = 0{,}002$) (3.8 pav.: C).



3.8 pav. Citotoksinių pažaidų dažnis šlakio (*S. trutta trutta*) embrionų eritrocituose po 14 parų poveikio *S. diclina* (A), *S. australis* (B) ir *A. ambisexualis* (C) (3000 kfv/ml). DB – dvibranduolė ląstelė, Fr – fragmentacija, 8-forma – aštuoneto formos branduolys. Pateikti vidurkiai + SN (n = 33). Žvaigždutės (*) žymi reikšmingus skirtumus lyginant su kontrole (* – $P \leq 0{,}05$; ** – $P \leq 0{,}01$; *** – $P \leq 0{,}001$).

N. oligacantha poveikio grupėje nebuvo nustatyti statistiškai reikšmingi citotoksinių pažaidų dažnių pokyčiai palyginti su kontroline grupe (3.9 pav.).

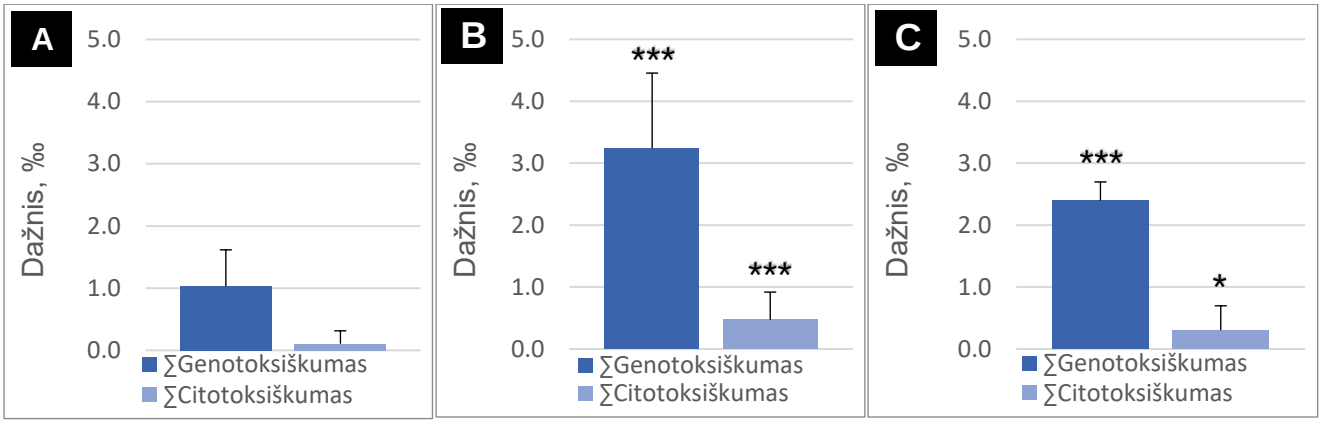


3.9 pav. Citotoksinių pažaidų dažnis šlakio (*S. trutta trutta*) embrionų eritrocituose po 14 parų poveikio *N. oligacantha* (3000 kfv/ml). DB – dvibranduolė ląstelė, Fr – fragmentacija, 8-forma – aštuoneto formos branduolys. Pateikti vidurkiai + SN (n = 33). Žvaigždutės (*) žymi reikšmingus skirtumus lyginant su kontrole (* – $P \leq 0{,}05$; ** – $P \leq 0{,}01$; *** – $P \leq 0{,}001$).

3.3. Suminio genotoksinio ir citotoksinio poveikių palyginimas

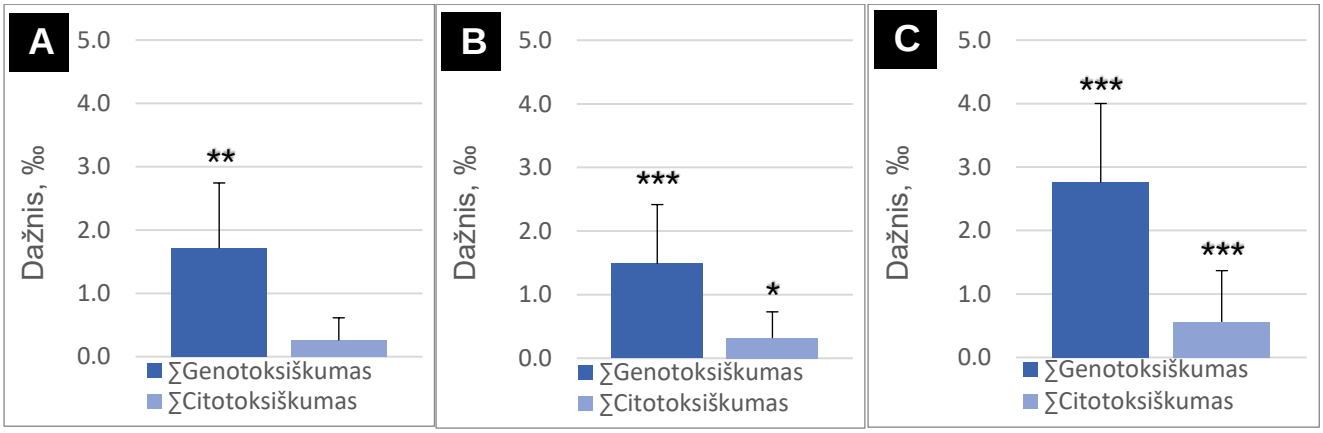
Išanalizavus atskirų genotoksinių ir citotoksinių pažaidų dažnius, buvo apskaičiuotas suminis genotoksiškumas (MB+DBt+BPs+BP+AT) ir citotoksiškumas (DB+8-forma+Fr).

S. parasitica paveiktoje grupėje nustatyti tiek suminio genotoksiškumo (H = 43,83; $P < 0{,}001$), tiek suminio citotoksiškumo (H = 14,13; $P < 0{,}001$) dažniai reikšmingai skyrėsi lyginant su kontroline grupe. *S. parasitica* paveiktų individų eritrocituose suminis genotoksiškumas padidėjo 3,15 karto, o citotoksiškumas – 4,43 karto palyginti su kontroline grupe (3.10 pav.: B). *S. ferax* paveiktoje grupėje suminio genotoksiškumo ir citotoksiškumo, dažniai palyginti su kontroline grupe reikšmingai skyrėsi (H = 18,51; $P < 0{,}001$ ir H = 4,57; $P = 0{,}03$). *S. ferax* paveiktų individų eritrocituose suminis genotoksiškumas padidėjo 2,32, o suminis citotoksiškumas padidėjo 2,86 karto lyginant su kontroline grupe (3.10 pav.: C).



3.10 pav. Suminis genotoksiškumas (∑Genotoksiškumas) ir citotoksiškumas (∑Citotoksiškumas) šlakio (*S. trutta trutta*) embrionony eritrocituose po 14 parų poveikio kontrolinėje grupėje (A) *S. parasitica* (B) ir *S. ferax* (C) (3000 kfv/ml). Pateikti vidurkiai + SN (n = 33). Žvaigždutės (*) žymi reikšmingus skirtumus lyginant su kontrole (* – $P \leq 0{,}05$; ** – $P \leq 0{,}01$; *** – $P \leq 0{,}001$).

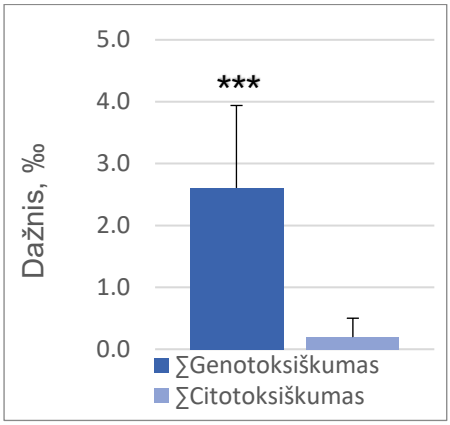
S. diclina paveiktoje grupėje suminio genotoksiškumo dažnis lyginant su kontroline grupe reikšmingai skyrėsi (H = 8,63; P = 0,003). *S. diclina* paveiktų individų eritrocituose suminis genotoksiškumas padidėjo 1,66 karto lyginant su kontroline grupe (3.11 pav.: A). *S. australis* paveiktoje grupėje suminio genotoksiškumo ir citotoksiškumo dažniai lyginant su kontroline grupe reikšmingai skyrėsi (H = 23,80; $P < 0{,}001$ ir H = 4,79; $P = 0{,}03$). *S. australis* paveiktų individų eritrocituose suminis genotoksiškumas padidėjo 1,44 karto, o suminis citotoksiškumas – 3 kartus lyginant su kontroline grupe (3.11 pav.: B). *A. ambisexualis* paveiktoje grupėje tiek suminio genotoksiškumo (36,03; $P < 0{,}001$), tiek suminio citotoksiškumo (H = 17,22; $P < 0{,}001$) dažniai reikšmingai skyrėsi lyginant su kontroline grupe. *A. ambisexualis* paveiktų individų eritrocituose suminis genotoksiškumas padidėjo 2,67 kartus, o citotoksiškumas – 5,29 karto palyginti su kontroline grupe (3.11 pav.: C).



3.11 pav. Suminis genotoksiškumas (∑Genotoksiškumas) ir citotoksiškumas (∑Citotoksiškumas) šlakio (*S. trutta trutta*) embrionony eritrocituose po 14 parų poveikio *S. diclina* (A), *S. australis* (B) ir *A. ambisexualis* (C) (3000

kfv/ml). Pateikti vidurkiai + SN (n = 33). Žvaigždutės (*) žymi reikšmingus skirtumus lyginant su kontrole (* – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$; *** – $P \leq 0,001$).

N. oligacantha paveiktoje grupėje suminio genotoksiškumo, dažnis lyginant su kontroline grupe reikšmingai skyrėsi (H = 24,99; $P < 0,001$) (3.12 pav.).



3.12 pav. Suminis genotoksiškumas (∑Genotoksiškumas) ir citotoksiškumas (∑Citotoksiškumas) šlakio (*S. trutta trutta*) embrionony eritrocituose po 14 parų poveikio *N. oligacantha* (3000 kfv/ml). Pateikti vidurkiai + SN (n = 33). Žvaigždutės (*) žymi reikšmingus skirtumus lyginant su kontrole (* – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$; *** – $P \leq 0,001$).

N. oligacantha paveiktų individų eritrocituose suminis genotoksiškumas padidėjo 2,53 karto lyginant su kontroline grupe.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Siekiant nustatyti skirtingų oomicetų rūšių patogeniškumą lašišinėms žuvims šiame darbe buvo vertinamas skirtingų oomicetų rūšių (*S. parasitica, S. ferax, S. diclina, S. australis, A. ambisexualis, N. oligacantha*) (3000 kfv/ml) citogenetinis poveikis šlakio (*S. trutta trutta*) embrionams naudojant eritrocitų branduolio pažaidų metodą. Šiame darbe, kaip genotoksinio (MB, BP, BPs, AT, DBt) ir citotoksinio (DB, Fr, 8-forma) poveikio biožymenys, buvo analizuojamos eritrocitų branduolio pažaidos, o jų dažniai išreikšti promilėmis (‰, t. y., pažaidos dažnis 1000 eritrocitų). Remiantis mokslinės literatūros apžvalga, pirmieji oomicetų citogenetinio potencialo žuvims tyrimai buvo atlikti Lietuvoje, GTC Ekotoksikologijos laboratorijoje (Stankevičiūtė *et al*., 2022). Tyrime įvertintas genotoksinis ir citotoksinis parazitų koinfekcijos (*S. parasitica* ir *Trichodina sp*.) atskirai bei kartu su cheminiu stresu (metalų mišinys) poveikis paprastajam europiniam ešeriui (*Perca fluviatilis*). Apžvelgtos literatūros duomenimis, tyrimų, siekiančių nustatyti šiame tirtų oomicetų rūšių genotoksinį ir citotoksinį poveikį žuvims ankstyvojo vystymosi stadijose, iki šiol nebuvo atlikta.

Tyrimų metu įvertintas tirtų oomicetų rūšių genotoksinis poveikis šlakio embrionų eritrocituose, remiantis nustatytais suminio genotoksiškumo dažniais, genotoksinis poveikis mažėjo tokia seka: *S. parasitica* (3,24‰) > *A. ambisexualis* (2,76‰) > *N. oligacantha* (2,61‰) > *S. ferax* (2,37‰) > *S. diclina* (1,71‰) > *S. australis* (1,48‰) > kontrolinė grupė (1,03‰).

Taip pat, remiantis suminio citotoksiškumo vertėmis, buvo nustatytas ir tirtų oomicetų rūšių citotoksinis potencialas (mažėjimo tvarka): *A. ambisexualis* (0,56‰) > *S. parasitica* (0,47‰) > *S. australis* (0,32‰) > *S. ferax* (0,30‰) > *S. diclina* (0,26‰) > *N. oligacantha* (0,20‰) > kontrolinė grupė (0,11‰).

S. parasitica sukėlė didžiausią genotoksinį poveikį (3,24‰ arba 3,15 karto daugiau lyginant su kontrole) ir vieną iš didžiausių citotoksinių poveikių (0,47‰ arba 4,43 karto daugiau lyginant su kontrole) *S. trutta trutta* embrionuose iš tirtų oomicetų rūšių. Tyrimų rezultatus galima pagrįsti mokslinės literatūros duomenimis, kurie teigia, kad *S. parasitica* yra vienas pagrindinių saprolegniozės sukėlėjų, o kai kurie *S. parasitica* kamienai yra labai virulentiški ir netgi gali būti pirminiais žuvų patogenais (Torto-Alalibo *et al*., 2005; Sandoval-Sierra *et al*., 2014). Taip pat gauti rezultatai atitiko minimus mokslinėje literatūroje, kur yra nustatyta, jog *S. parasitica*, koinfekcijoje su *Trichodina sp*. sukelia reikšmingą genotoksinių ir citotoksinių pažaidų dažnių padidėjimą žuvų eritrocituose (Stankevičiūtė *et al*., 2022).

Citogenetinės pažaidos gali būti sukeltos *S. parasitica* sekretuojamų virulentiškumo faktorių, tokių kaip prostoglandinas E_2, kuris sukelia uždegiminį atsaką žuvų leukocituose ir inhibuoja šeimininko ląstelinį imunitetą, o taip pat infekcijos metu padidėjusio oksidacinio streso ir antioksidacinės sistemos sutrikumų (Belmonte *et al*., 2014; Baldissera *et al*., 2020). Nėra žinoma ar *S. parasitica* poveikio grupėje nustatytas genotoksinis poveikis yra tiesiogiai susijęs su *S. parasitica* virulentiškumo faktoriais ar atsiranda netiesioginiu būdu – virulentiškumo faktorių sukelto uždegimo metu kaip savigynos nuo parazito mechanizmo.

S. ferax sukėlė statistiškai reikšmingą suminio genotoksišumo (2,39 arba 2,32 karto daugiau negu kontrolinėje grupėje) ir citotoksiškumo (0,30‰ arba 2,86 karto daugiau lyginant su kontroline grupe) dažnių padidėjimą *S. trutta trutta* embrionuose. Remiantis moksline literatūra, *S. ferax* infekcija sukelia oksidacinį stresą, Zahran ir Risha (2013) tyrimų metu nustatė padidėjusį ROS kiekį ir SOD aktyvumo sumažėjimą Nilinėse tilapijose (*O. niloticus*) paveiktose *S. ferax*.

Su lašišinių žuvų embrionų saprolegniozе daugiausiai yra siejamos tokios oomicetų rūšys kaip: *S. diclina* ir *S. australis,* nors šios rūšys, remiantis tyrimų rezultatais, buvo mažiau patogeniškos lyginant su *S. parasitica* (Sandoval-Sierra *et al*., 2014). *S. diclina* poveikio grupėje nustatytas suminio genotoksiškumo dažnis siekė 1,71‰, kas yra 1,66 karto daugiau negu kontrolėje, o suminis citotoksiškumo dažnis nebuvo statistiškai reikšmingas ($P > 0,05$). *S. australis* sukeltas bendras genotoksiškumas buvo 1,48‰ (1,44 kartus daugiau už kontrolę), o citotoksiškumas 0,32‰ (kas yra 3 kartus daugiau nei kontrolinėje grupėje), kur citotoksiškumas buvo statistiškai reikšmingas, bet ($P = 0,03$) nebuvo taip stipriai išreikštas kaip kitose rūšyse. Remiantis gautais rezultatais, galima teigti, kad skirtingos oomicetų rūšys pasižymi skirtingu genotoksiniu ir citotoksiniu potencialu, tačiau taip pat tirtų rūšių patogeniškumas gali priklausyti ir nuo rūšių kamienų patogeniškumo skirtumų. Atsižvelgiant į tai, kad saprolegniozė yra mišri infekcija, yra tikėtina, kad kitos oomicetų rūšys ima parazituoti šeimininką jau esant kitų rūšių (pvz.: *S. parasitica*) infekcijai ir šeimininko susilpnėjimui. Taip pat *S. diclina* ir *S. australis* daugiausiai yra siejamos su lašišinių žuvų embrionų infekcija, todėl jos gali būti evoliuciškai prisitaikiusios palaikyti savo šeimininko išgyvenimą kuo įmanoma ilgiau, kreipiant ląstelių vystymąsi anti-apoptotinę linkme, veikiant kaip klasikiniai parazitai (Sandoval-Sierra *et al*., 2014; Songe *et al*., 2016; Schaumburg *et al*., 2006; Goebel *et al*., 2001).

Didžiausiu citotoksiniu (0,56‰; 5,29 kartų daugiau nei kontrolėje) ir vienu didžiausių genotoksiniu poveikiu (2,76‰; 2,67 kartų daugiau nei kontrolėje) *S. trutta trutta* embrionuose pasižymėjo *A. ambisexualis*. Mokslinėje literatūroje pateikiami duomenys pabrėžia šios rūšies

patogeniškumą žuvims (Dubey *et al*., 2018; Teresa Vega-Ramírez *et al*., 2013). *N. oligacantha* poveikio grupėje nustatytas genotoksinis poveikis (2,61‰) buvo 2,53 karto didesnis, negu kontrolėje, kuomet reikšmingo citotoksinio poveikio nenustatyta ($P > 0,05$). Remiantis literatūros analize, tyrimų su šiomis oomicetų rūšimis yra atlikta labai mažai, išskyrus jų morfologinę analizę, todėl gautus rezultatus yra sunku palyginti.

Apibendrinant, šiame darbe pirmą kartą nustatytas oomicetų priklausančių *Saprolegnia, Achlya* ir *Newbya* genčių genotoksinis ir citotoksinis poveikis *S. trutta trutta* embrionams. Tyrimų metu gauta naujų mokslinių duomenų apie oomicetų ekotoksikologinį poveikį žuvims, kurie gali būti naudingi tiriant žuvų ligų tokių kaip saprolegniozės protrūkių mechanizmus ir dėsningumus. Taip pat, šis tyrimas gali prisidėti prie naujų įžvalgų tiriant oomicetų rūšių biologiją bei suteikti netiesioginių žinių apie ligų valdymą. Nors filogenetiškai yra labai tolimi, oomicetai kaip ir grybai, yra osmotrofinių organizmų grupė. Jie į aplinką išskiria fermentus, kurie skaido polimerus, tokius kaip celiuliozė, lipidai, baltymai ir ligninas, o susidariusius skaidymo produktus (cukrus, aminorūgštis ir riebalų rūgštis) pasisavina. Ekologinė niša, kurią užima oomicetai, dažniausiai apibrėžiama pagal jų išskiriamus produktus pvz.: toksinai, baltyminiai efektoriai, kurie trikdo šeimininko įmuninį atsaką ar metabolizmą, arba gausybė hidrolizinių fermentų, kurie skaido tarpląstelines makromolekules į mažesnius subvienetus, kuriuos gali pasisavinti (Soanes *et al*., 2007). Todėl tolimesnių tyrimų metu, siekiant išsiaiškinti oomicetų sukeliamo genotoksinio ir citotoksinio poveikio mechanizmus, nustatyti ar stebimas poveikis yra tiesioginis ar netiesioginis, dėmesys turės būti skiriamas išskiriamų medžiagų toksiškumo tyrimams.

IŠVADOS

1. *S. trutta trutta* embrionų eritrocituose buvo nustatytas statistiškai reikšmingas genotoksinių branduolio pažaidų dažnių padidėjimas po 14 parų poveikio šiomis oomicetų rūšimis (3000 kfv/ml):
    a) Mikrobranduolių dažnio padidėjimas: *S. parasitica, S. ferax, S. diclina, S. australis, A. ambisexualis* ir *N. oligacantha;*
    b) Branduolio pumpurų dažnio padidėjimas: *S. parasitica;*
    c) Branduolio pumpurų su nuleoplazmine jungtimi dažnio padidėjimas: *S. diclina.*

2. *S. trutta trutta* eritrocituose, iš visų vertintų citotoksinių pažaidų, nustatytas statistiškai reikšmingas dvibranduolių ląstelių dažnio padidėjimas po 14 parų poveikio *S. parasitica, S. ferax* ir *A. ambisexualis* (3000 kfv/ml).

3. Visos tirtos oomicetų rūšys sukėlė statistiškai reikšmingą suminio genotoksiškumo dažnio padidėjimą. Suminio genotoksiškumo dažnis didėjo tokia seka: *S. parasitica* > *A. ambisexualis* > *N. oligacantha* > *S. ferax* > *S. diclina* > *S. australis* > kontrolinė grupė.

4. *S. parasitca, S. ferax, S. australis* ir *A. ambisexualis* sukėlė statistiškai reikšmingą suminio citotoksiškumo dažnio padidėjimą *S. trutta trutta* embrionų eritrocituose. Suminio citotoksiškumo dažnis didėjo tokia seka: *S. parasitica* > *A. ambisexualis* > *N. oligacantha* > *S. ferax* > *S. diclina* > *S. australis* > kontrolinė grupė.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS
Biomokslų institutas

Eva Kutyš
Bakalauro baigiamasis darbas

OOMICETŲ GENOTOKSINIO IR CITOTOKSINIO POVEIKIO LAŠIŠINIŲ ŽUVŲ EMBRIONAMS TYRIMAI

SANTRAUKA

Saprolegniozė – tai viena labiausiai paplitusių lašišinių žuvų ligų akvakultūros sektoriuje. Anksčiau saprolegniozės protrūkių prevencijai buvo naudojamas organinis dažas – malachito žaluma, bet dėl toksinio poveikio 2002 metais buvo uždraustas naudoti. Iki šiol nėra kitų veiksmingų priemonių kovoje su saprolegniozėmis.

Šiuo metu vienintelė prevencinė priemonė kovoje su oomicetų infekcijomis yra optimalių aplinkos sąlygų palaikymas žuvininkystės ūkiuose. Dėl tyrimų su gyvūnams patogeniškomis oomicetų rūšimis stokos, mažai žinoma apie šių organizmų patogeniškumą skatinančius veiksnius bei patogeniškumo mechanizmus.

Šio darbo metu buvo tiriamas 6 oomicetų rūšių (*Saprolegnia parasitica, S. ferax, S. diclina, S. autralis, Achlya ambisexualis, Newbya oligacantha*) (3000 kfv/ml) genotoksinis ir citotoksinis poveikis šlakio (*S. trutta trutta*) embrionų eritrocituose po 14 parų poveikio. Rezultatai parodė, kad visos tirtos rūšys sukėlė statistiškai reikšmingą genotoksinį poveikį, o reikšmingą citotoksinį poveikį sukelė šios rūšys: *S. parasitica, S. ferax, S. australis* ir *A. ambisexualis*. Didžiausią geno- bei citotoksinį (lyginant su kontrolės grupe) poveikį sukėlė *S. parasitica* ir *A. ambisexualis*.

VILNIUS UNIVERSITY

The Center of Life Sciences

The Institution of Biosciences

Eva Kutyš

Bachelors thesis

THE STUDIES OF GENOTOXIC AND CYTOTOXIC EFFECTS OF OOMYCETE ON SALMONID FISH EMBRYOS

SUMMARY

Saprolegniasis is one of the most common salmonids infections in the aquaculture sector. Previously saprolegniasis outbreaks were prevented with an organic dye – malachite green, due to its toxic effects this dye has been banned worldwide since 2002. As of right now there is no effective way of controlling saprolegniasis.

Nowadays, the only way to prevent oomycete infections is to maintain optimal, stress-free conditions in the fish farms. Because of the lack of animal research regarding oomycete pathogenicity there is very little information about oomycetes pathogenicity inducing factors and the mechanisms of pathogenicity.

In this work, the genotoxic and cytotoxic effects caused by six different oomycete species (*Saprolegnia parasitica, S. ferax, S. diclina, S. autralis, Achlya ambisexualis, Newbya oligacantha*) (3000 cfu/ml) to sea trout (*Salmo trutta trutta*) embryos erythrocytes after 14 days of were evaluated using micronucleus and other nuclear abnormalities test. The results showed that all these species cause statistically significant genotoxicity increase and such species as: *S. parasitica, S. ferax, S. australis* and *A. ambisexualis* caused statistically significant increas of cytotoxicity. The most significant geno- and cytotoxic effects (compared with a control group) were caused by *S. parasitica* and *A. ambisexualis*.

FINANSINĖ PARAMA

Baigiamajame darbe pateiktiems tyrimas atlikti finansavimą skyrė Lietuvos mokslų taryba (LMTLT), Projekto Nr. S-MIP-21-10, MULTIS.

LITERATŪROS ŠALTINIAI

1. Ali, E.H. (2005) ‘Morphological and biochemical alterations of oomycete fish pathogen Saprolegnia parasitica as affected by salinity, ascorbic acid and their synergistic action’, *Mycopathologia*, 159(2), pp. 231–243.
2. Ali, F.K., El-Shehawi, A.M. and Seehy, M.A. (no date) ‘Micronucleus test in fish genome: A sensitive monitor for aquatic pollution’.
3. Al-Sabti, K. and Metcalfe, C.D. (1995a) ‘Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water’, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 343(2–3), pp. 121–135.
4. Al-Sabti, K. and Metcalfe, C.D. (1995b) ‘Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water’, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 343(2–3), pp. 121–135.
5. Andersson, M.G. and Cerenius, L. (2002) ‘Pumilio Homologue from *Saprolegnia parasitica* Specifically Expressed in Undifferentiated Spore Cysts’, *Eukaryotic Cell*, 1(1), pp. 105–111.
6. Baldissera, M.D. *et al.* (2020) ‘Oxidative stress in liver of grass carp Ctenopharyngodon idella naturally infected with Saprolegnia parasitica and its influence on disease pathogenesis’, *Comparative Clinical Pathology*, 29(2), pp. 581–586.
7. Barde, R.D. (2022) ‘Clinical and pathological investigations in ulcer disease of Cyrinus carpio caused by Aeromonas hydrophila’, *International journal of health sciences*, pp. 3519–3526.
8. Baršienė, J. *et al.* (2014) ‘Environmental genotoxicity and cytotoxicity in flounder (Platichthys flesus), herring (Clupea harengus) and Atlantic cod (Gadus morhua) from chemical munitions dumping zones in the southern Baltic Sea’, *Marine Environmental Research*, 96, pp. 56–67.
9. Beakes, G. and Ford, H. (1983) ‘Esterase Isoenzyme Variation in the Genus Saprolegnia, with Particular Reference to the Fish-pathogenic S. diclina-parasitica Complex’, *Microbiology*, 129(8), pp. 2605–2619.
10. Belmonte, R. *et al.* (2014) ‘Role of Pathogen-Derived Cell Wall Carbohydrates and Prostaglandin E_2 in Immune Response and Suppression of Fish Immunity by the Oomycete Saprolegnia parasitica’, *Infection and Immunity*. Edited by J.A. Appleton, 82(11), pp. 4518–4529.
11. van den Berg, A.H. *et al.* (2013) ‘The impact of the water moulds Saprolegnia diclina and Saprolegnia parasitica on natural ecosystems and the aquaculture industry’, *Fungal Biology Reviews*, 27(2), pp. 33–42.

12. Bolognesi, C. *et al.* (2013) 'The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay – An update and expanded photogallery', *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 753(2), pp. 100–113.
13. Brudeseth, B.E. *et al.* (2013) 'Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming', *Fish & Shellfish Immunology*, 35(6), pp. 1759–1768.
14. Cao, H. *et al.* (2012) 'Identification of an isolate of Saprolegnia ferax as the causal agent of saprolegniosis of Yellow catfish (Pelteobagrus fulvidraco) eggs', *Veterinary Research Communications*, 36(4), pp. 239–244.
15. Carrasco, K.R., Tilbury, K.L. and Myers, M.S. (1990) 'Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological indicator of Chemical Contaminant Effects', *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47(11), pp. 2123–2136.
16. Cheng, R. *et al.* (2015) 'Gingival fibroblasts resist apoptosis in response to oxidative stress in a model of periodontal diseases', *Cell Death Discovery*, 1(1), p. 15046.
17. Choi, Y.-J. *et al.* (2019) 'Characterization of *Achlya americana* and *A. bisexualis* (Saprolegniales, Oomycota) Isolated from Freshwater Environments in Korea', *Mycobiology*, 47(2), pp. 135–142.
18. Chukanhom, K., Hatai, K. and Chukanhom, K. (2004) 'Freshwater fungi isolated from eggs of the common carp (Cyprinus carpio) in Thailand', *Mycoscience*, 45(1), pp. 42–48.
19. Coluzzi, E. *et al.* (2014) 'Oxidative Stress Induces Persistent Telomeric DNA Damage Responsible for Nuclear Morphology Change in Mammalian Cells', *PLoS ONE*. Edited by A.J. Lustig, 9(10), p. e110963.
20. Densmore, C.L. and Green, D.E. (2007) 'Diseases of Amphibians', *ILAR Journal*, 48(3), pp. 235–254.
21. Derevnina, L. *et al.* (2016) 'Emerging oomycete threats to plants and animals', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1709), p. 20150459.
22. Dubey, M.K. *et al.* (2018) 'Taxonomic note on a rare fish infecting freshwater mould Achlya ambisexualis Raper 1939 (Achlyaceae) isolated from Chandraprabha dam, Uttar Pradesh, India', *Indian Journal of Fisheries*, 65(1).
23. Earle, G. and Hintz, W. (2014) 'New Approaches for Controlling Saprolegnia parasitica, the Causal Agent of a Devastating Fish Disease', *Tropical Life Sciences Research*, 25(2), pp. 101–109.

24. Fenech, M. (2000) ‘The in vitro micronucleus technique’, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1–2), pp. 81–95.
25. Fenech, M. *et al.* (2003) ‘HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures’, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534(1–2), pp. 65–75.
26. Fenech, M. *et al.* (2011) ‘Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells’, *Mutagenesis*, 26(1), pp. 125–132.
27. Groffen, J. *et al.* (2019) ‘High mortality in Bufo gargarizans eggs associated with an undescribed Saprolegnia ferax strain in the Republic of Korea’, *Diseases of Aquatic Organisms*, 137(2), pp. 89–99.
28. Gudding, R. and Van Muiswinkel, W.B. (2013) ‘A history of fish vaccination’, *Fish & Shellfish Immunology*, 35(6), pp. 1683–1688.
29. .Hatch, E.M. (2018) ‘Nuclear envelope rupture: little holes, big openings’, *Current Opinion in Cell Biology*, 52, pp. 66–72.
30. Heddle, J. (1973) ‘A rapid in vivo test for chromosomal damage☆’, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 18(2), pp. 187–190.
31. Heddle, J.A. *et al.* (1991) ‘Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, present, and future’, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 18(4), pp. 277–291.
32. Kamoun, S. (2003) ‘Molecular Genetics of Pathogenic Oomycetes’, *Eukaryotic Cell*, 2(2), pp. 191–199.
33. Kratzer, E. *et al.* (2012) ‘Oxidative Stress Contributes to Lung Injury and Barrier Dysfunction via Microtubule Destabilization’, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 47(5), pp. 688–697.
34. Krupina, K., Goginashvili, A. and Cleveland, D.W. (2021) ‘Causes and consequences of micronuclei’, *Current Opinion in Cell Biology*, 70, pp. 91–99.
35. Lamour, K.H., Win, J. and Kamoun, S. (2007) ‘Oomycete genomics: new insights and future directions’, *FEMS Microbiology Letters*, 274(1), pp. 1–8.
36. Larousse, M. and Galiana, E. (2017) ‘Microbial Partnerships of Pathogenic Oomycetes’, *PLOS Pathogens*. Edited by C. Zipfel, 13(1), p. e1006028.
37. Liu, Y. *et al.* (2015) ‘Diversity of Aquatic Pseudomonas Species and Their Activity against the Fish Pathogenic Oomycete Saprolegnia’, *PLOS ONE*. Edited by A. Almeida, 10(8), p. e0136241.

38. Magray, A.R. *et al.* (2019) 'Comprehensive, classical and molecular characterization methods of Saprolegnia (Oomycota; Stramnipila), an important fungal pathogen of fish', *Fungal Biology Reviews*, 33(3–4), pp. 166–179.
39. Mahfouz, N. *et al.* (2019) 'SEASONAL SCREENING OF THE MYCOTIC INFECTIONS OF CULTURED FRESHWATER FISHES IN KAFR EL-SHEIKH GOVERNORATE', *SLOVENIAN VETERINARY RESEARCH*, 56(22-Suppl).
40. McCarthy, C.G.P. and Fitzpatrick, D.A. (2017) 'Phylogenomic Reconstruction of the Oomycete Phylogeny Derived from 37 Genomes', *mSphere*. Edited by A.P. Mitchell, 2(2), pp. e00095-17.
41. Mehrabi, Z. *et al.* (2019) 'Immunostimulatory effect of Aloe vera (Aloe barbadensis) on non-specific immune response, immune gene expression, and experimental challenge with Saprolegnia parasitica in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)', *Aquaculture*, 503, pp. 330–338.
42. Mitkovska, V. and Chassovnikarova, T. (2020) 'Chlorpyrifos levels within permitted limits induce nuclear abnormalities and DNA damage in the erythrocytes of the common carp', *Environmental Science and Pollution Research*, 27(7), pp. 7166–7176.
43. Palhares, D. and Grisolia, C.K. (2002) 'Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment', *Genetics and Molecular Biology*, 25(3), pp. 281–284.
44. Phillips, A.J. *et al.* (2008) 'New insights into animal pathogenic oomycetes', *Trends in Microbiology*, 16(1), pp. 13–19.
45. Saha, H. *et al.* (2017) 'Effects of fluconazole based medicated feed on haemato-immunological responses and resistance of Labeo rohita against Saprolegnia parasitica', *Fish & Shellfish Immunology*, 71, pp. 346–352.
46. Sakaguchi, S.O. *et al.* (2019) 'Molecular identification of water molds (oomycetes) associated with chum salmon eggs from hatcheries in Japan and possible sources of their infection', *Aquaculture International*, 27(6), pp. 1739–1749.
47. Sakaguchi, S.O. *et al.* (2022) 'Infection of oomycetes and bacteria associated with their specific colocalization in chum salmon eggs', *Aquaculture*, 546, p. 737244. Available at:
48. Sapkota, R. and Nicolaisen, M. (2015) 'An improved high throughput sequencing method for studying oomycete communities', *Journal of Microbiological Methods*, 110, pp. 33–39.
49. Shao, Y. *et al.* (2019) 'Integrated zebrafish-based tests as an investigation strategy for water quality assessment', *Water Research*, 150, pp. 252–260.

50. Soanes, D.M., Richards, T.A. and Talbot, N.J. (2007) 'Insights from Sequencing Fungal and Oomycete Genomes: What Can We Learn about Plant Disease and the Evolution of Pathogenicity?', *The Plant Cell*, 19(11), pp. 3318–3326.
51. Sommer, S., Buraczewska, I. and Kruszewski, M. (2020) 'Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), p. 1534.
52. Songe, M.M., Willems, A., Wiik-Nielsen, J., *et al.* (2016) ' *Saprolegnia diclina IIIA* and *S. parasitica* employ different infection strategies when colonizing eggs of Atlantic salmon, *Salmo salar* L.', *Journal of Fish Diseases*, 39(3), pp. 343–352.
53. Songe, M.M., Willems, A., Sarowar, M.N., *et al.* (2016) 'A thicker chorion gives ova of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) the upper hand against *Saprolegnia* infections', *Journal of Fish Diseases*, 39(7), pp. 879–888.
54. Srivastava, S., Sinha, R. and Roy, D. (2004) 'Toxicological effects of malachite green', *Aquatic Toxicology*, 66(3), pp. 319–329.
55. Stankevičiūtė, M. *et al.* (2022) 'Biomarker responses in perch (Perca fluviatilis) under multiple stress: Parasite co-infection and multicomponent metal mixture exposure', *Environmental Research*, 207, p. 112170.
56. Stankevičiūtė, Milda, Gomes, Tânia and González, Juan Antonio Campillo (2022) *Nuclear abnormalities in mussel haemocytes and fish erythrocytes*. ICES Techniques in Marine Environmental Science (TIMES), p. 1798981 Bytes.
57. Thines, M. (2014) 'Phylogeny and evolution of plant pathogenic oomycetes—a global overview', *European Journal of Plant Pathology*, 138(3), pp. 431–447.
58. Thoen, E., Evensen, Ø. and Skaar, I. (2011) 'Pathogenicity of Saprolegnia spp. to Atlantic salmon, Salmo salar L., eggs: Pathogenicity of Saprolegnia to salmon eggs', *Journal of Fish Diseases*, 34(8), pp. 601–608.
59. Torto-Alalibo, T. *et al.* (2005) 'Expressed sequence tags from the oomycete fish pathogen Saprolegnia parasitica reveal putative virulence factors', *BMC Microbiology*, 5(1), p. 46.
60. Valskienė, R. *et al.* (2018) 'Environmental genotoxicity and cytotoxicity levels in herring (Clupea harengus), flounder (Platichthys flesus) and cod (Gadus morhua) inhabiting the Gdansk Basin of the Baltic Sea', *Marine Pollution Bulletin*, 133, pp. 65–76. Available at:
61. Viña, J., Borras, C. and Gomez-Cabrera, M.C. (2018) 'A free radical theory of frailty', *Free Radical Biology and Medicine*, 124, pp. 358–363.

62. van West, P. (2006) ‘Saprolegnia parasitica, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem’, *Mycologist*, 20(3), pp. 99–104.