

# Ascobulla fragilis (Jeffers, 1856.) u priobalju Istre

---

Amančić, Sven

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Pula / Sveučilište Jurja Dobrile u Puli**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:137:344232>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

[Digital Repository Juraj Dobrila University of Pula](#)



SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI

SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ ZNANOST O MORU

**SVEN AMANČIĆ**

***Ascobulla fragilis* (Jeffreys, 1856)**

**U PRIOBALJU ISTRE**

Završni rad

Pula, 2020.

SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ ZNANOST O MORU

**SVEN AMANČIĆ**

***Ascobulla fragilis* (Jeffreys, 1856)**

**U PRIOBALJU ISTRE**

Završni rad

JMBAG: 0303065292, redoviti student

Studijski smjer: Znanost o moru

Predmet: Beskralješnjaci mora

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Interdisciplinarne prirodne znanosti

Znanstvena grana: Znanost o moru

Mentor: izv.prof.dr.sc. Andrej Jaklin

Pula, 2020.



## IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, dolje potpisan Sven Amančić, kandidat za prvostupnika (*baccalaureus*) Znanosti o moru, ovime izjavljujem da je ovaj Završni rad rezultat isključivo mog vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima, te da se oslanja na objavljenu literaturu kao što to pokazuju korištene bilješke i bibliografija. Izjavljujem da niti jedan dio Završnog rada nije napisan na nedozvoljen način, odnosno da je prepisan iz kojega necitiranog rada, te da ikoji dio rada krši bilo čija autorska prava. Izjavljujem također, da niti jedan dio rada nije iskorišten za neki drugi rad pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj ili radnoj ustanovi.

Student:

---

U Puli, 2020. godine



## IZJAVA

### O korištenju autorskog djela

Ja, Sven Amančić dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj završni rad pod nazivom „*Ascobulla fragilis* (Jeffreys, 1856) U PRIOBALJU ISTRE“ koristi na način da gore navedeno autorsko djelo, kao cjeloviti tekst trajno objavi u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli te kopira u javnu internetsku bazu završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice (stavljanje na raspolaganje javnosti), sve u skladu sa Zakonom o autorskom pravu i drugim srodnim pravima i dobrom akademskom praksom, a radi promicanja otvorenoga, slobodnoga pristupa znanstvenim informacijama.

Za korištenje autorskog djela na gore navedeni način ne potražujem naknadu.

U Puli, 2020. godine

Potpis

---

## ZAHVALA

Zahvaljujem svom mentoru, izv.prof.dr.sc. Andreju Jaklin na predloženoj temi, pomoći, susretljivosti te savjetima tijekom pisanja ovog završnog rada.

Zahvaljujem se dipl. inž. biol. Moiri Buršić i izv. prof. dr. sc. Mauru Štifaniću na pomoći i sugestijama prilikom obrade podataka.

Također zahvaljujem cimerima i kolegama koji su bili uz mene i uljepšali ovaj period studiranja.

Posebno želim izraziti zahvalu svojoj obitelji na podršci i najviše na strpljenju tijekom mog cjelokupnog školovanja.

Povjerenstvo za ocjenjivanje i obranu:

Predsjednik: dr.sc. Paolo Paliaga, doc.

Član: dr.sc. Andrej Jaklin, izv.prof.

Član: dr.sc. Ijiljana Iveša, izv.prof.

Datum i mjesto obrane završnog rada:

Rad je rezultat samostalnog istraživačkog rada.

Sven Amančić

---

## Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Vrsta puža <i>Ascobulla fragilis</i> (Jeffreys, 1856)	1
1.2. Sjeverni Jadran	2
1.3. Pojava vrste <i>Caulerpa cylindracea</i> Sonder u sjevernom Jadranu	3
1.4. DNA barkodiranje	3
1.5. CILJ	5
2. MATERIJALI I METODE	6
2.1. Istraživano područje	6
2.2. Izolacija DNA	6
2.3. PCR umnažanje	7
2.4. Provjera gel elektroforezom	8
2.5. Pročišćavanje	8
2.6. Sekvence organizma	9
2.7. Morfologija ispitivanog uzorka	9
3. REZULTATI	10
3.1. MB-77_jgHCO	10
3.2. MB-77_jgLCO	12
3.3. Rezultati pretrage BOLD i GenBank baza	13
3.3.1. Sistematika ispitivanog uzorka	14
3.4. Morfologija ispitivanog uzorka	16
4. RASPRAVA	17
5. ZAKLJUČCI	19
6. LITERATURA	20
7. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	23
8. BASIC DOCUMENTATION CARD	24

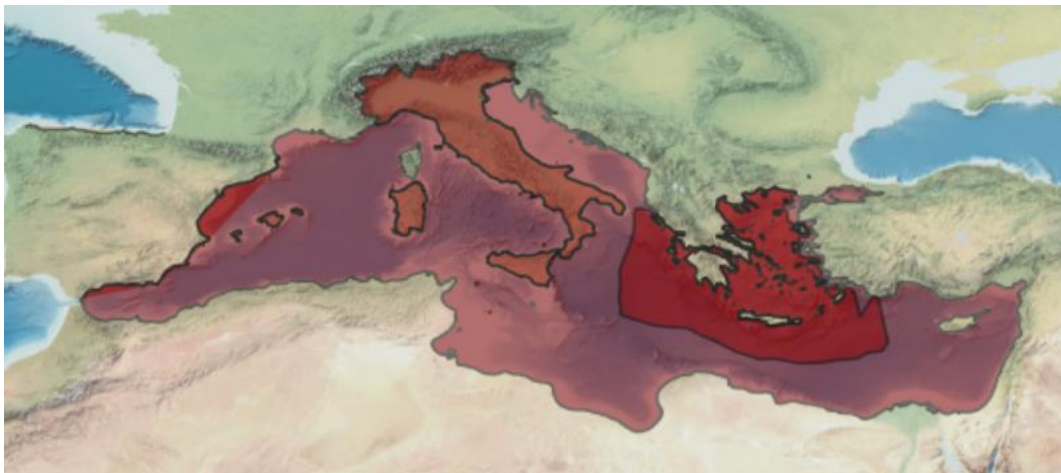


# 1. UVOD

## 1.1. Vrsta puža *Ascobulla fragilis* (Jeffreys, 1856)

*Ascobulla fragilis* je vrsta puža (Gastropoda Heterobranchia: Saccoglossa) iz porodice Volvatellidae (Slika 2). Jedinke ove vrste žive pod površinom sedimenta, te su morfološki dobro prilagođene za rovanje oblikom glavenog štita (Gavagnin i sur., 1994). Primarna ishrana puža *Ascobulla fragilis* sastoji se od makroalgi roda *Caulerpa* koji oštrim radularnim zubom probija staničnu stijenku alge te isisava staničnu citoplazmu. Kao obrambeni mehanizam, kad je puž uznemiren, ispušta bijelu mukoznu tekućinu koja sadrži toksične metabolite (Gavagnin i sur., 1994; Rudman, 2006b).

Iako poprilično rasprostranjena uzduž zapadne obale Italije (Fasulo i sur., 1981), vrsta *A. fragilis* je prvi put zabilježena i opisana u priobalnom moru Piedmontea (Jeffreys, 1856). Do sada su nalazi vrste *A. fragilis* opaženi po cijelom Sredozemlju od obala Španjolske do Italije, u južnom Jadranu i obalama Grčke (WORMS, 2020), kao i u Atlantskom oceanu, na području Madeire i Azora (Zenetos i sur., 2016).



Slika 1. Rasprostranjenost vrste *A. fragilis* (preuzeto iz World Register of Marine Species,

<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=141969#distributions>).



Slika 2. Vrsta *Ascobulla fragilis* (Jeffreys, 1856). (1a) ventralni pogled, (1b) dorzalni pogled (iz: Prkić i sur., 2019).

## 1.2. Sjeverni Jadran

Sjeverni Jadran je najsjeverniji dio Sredozemnog mora koji obuhvaća dio Jadrana sjeverno od linije koja povezuje Zadar i Anconu. Ono predstavlja najplići dio kontinentalnog šelfa Jadranskog mora (sjeverno od Zadra ne prelazi 100m dubine). Zapadna i sjeverna obala su pjeskovite, dok je istočna obala hridinasta, razvedena i puna otoka (Poulain i sur., 2001).

Zbog zatvorene cirkulacije i slabog miješanja vodenog stupca tijekom toplijeg razdoblja godine može doći do hipoksije i rjeđe anoksije u pridnom sloju. Uslijed zagrijavanja površinskog sloja zajedno sa nedostatkom miješanja vodenog stupca javlja se cvat fitoplanktona. U pridnom sloju je fotosintetska proizvodnja kisika krajnje ograničena zbog niskog intenziteta sunčeve svjetlosti. Ta pojava se odvija u prvoj polovici jeseni i traje sve do studenog kada počinje prevladavati ciklonalno strujanje i pridnom sloju se nadoknađuje kisik (Poulain i sur., 2001).

### 1.3. Pojava vrste *Caulerpa cylindracea* Sonder u sjevernom Jadranu

Vrsta *Ascobulla fragilis* je pronađena na invazivnoj zelenoj algi *Caulerpa cylindracea*. Alga je po prvi put zabilježena u Jadranu u jesen 2000. godine kraj Hvara (43°9'20"N; 16°25'10"E), na kamenitom dnu na dubinama od 5-15 m. Prva zabilježena naselja bila su promjera od 1-6 m i protezale se u 100 m obalne linije (Žuljević i sur., 2003). U sjevernom Jadranu je vrsta *C. cylindracea* pronađena 2004.g. u priobalju Vrsara (45°80'42.2"; 13°35'0 98" E). Zauzimala je površinu od 843 m<sup>2</sup>. U roku od godinu dana je prekrivala površinu od 2.000 m<sup>2</sup>, a 2006. godine već 6.000 m<sup>2</sup>. Vrsta *C. cylindracea* se najviše naselila na pješčano-kamenita dna (~60%), te u područja pod antropogenim utjecajem (71%), kao i u područja zaštićena od utjecaja valova. Gusta naselja alge do 2014. g. zabilježena su duž cijele zapadne obale Istre, zauzimajući 88% površine na 10.000 m<sup>2</sup> (Iveša i sur., 2015).

Transport i akvakultura su poznati i priznati vektori prijenosa alohtonih vrsta. Prosječno jedna do dvije naturalizirane alohtone vrste budu uvedene u registar ihtiofaune Jadrana po desetljeću. Zbog lokalnog ispuštanja tijekom prijevoza školjkaša i morskog transporta sjeverni Jadran je najviše pod utjecajem alohtonih vrsta (Zenetos i sur., 2016).

### 1.4. DNA barkodiranje

Iako je očuvanje bioraznolikosti danas od ključne važnosti, taksonomska i faunistička istraživanja na kojima se temelji su nedostatna. Barkodiranje morskih beskralješnjaka još uvijek nije široko rasprostranjeno u Hrvatskoj, međutim takva istraživanja su već u tijeku diljem svijeta te je većina dosadašnjih barkodova upravo određena za morske organizme (Barco i sur., 2015). DNA barkodiranje je metoda molekularne taksonomije koja omogućuje identifikaciju rodova i vrsta temeljem sekvenci DNA koje se razlikuju među organizmima od interesa (Ćosić, 2014). Danas je ovo uobičajena metoda u taksonomskim istraživanjima s ciljem identifikacije vrsta (Hebert i sur., 2003). Ona može biti uvelike koristan alat kod određivanja određenih skupina ili razvojnih stadija raznih beskralješnjaka kod kojih je izuzetno problematično odrediti vrstu samo na temelju

morfologije (Boyer i sur., 2011; Meyer i sur., 2013), te u slučaju kada imamo oštećen organizam ili samo komadić tkiva (Schander i Willassen, 2005).

Sistem DNA barkodiranja životinja je zasnovan na molekularnoj raznolikosti 648 bp regije na 5' kraju mitohondrijskog gena (COI), podjedinice I proteinskog kompleksa citokrom c oksidaze, koji se umnožava PCR metodom (Geller i sur., 2013; Blanco-Bercial i sur., 2014). Za barkodiranje se koristi mitohondrijski genom životinja jer nema introne te su rekombinacije rijetke (Saccone i sur., 1999). Divergencija COI sekvenci među pripadnicima iste vrste je najčešće manja od 2% pa se stoga COI može koristiti za vrlo točna istraživanja populacijske genetike, filogeografije, specijacije i sistematike (Ćosić, 2014; Mičetić Stanković i sur., 2018).

Broj barkodiranih morskih vrsta u stalnom je porastu. Bucklin i sur. (2011) su došli do brojke od 18.270 barkodiranih morskih vrsta, što je tek 9.5% od ukupno 192.702 poznatih i registriranih morskih životinjskih vrsta. Danas je barkodirano preko osam milijuna sekvenci diljem svijeta (preuzeto s: <http://v3.boldsystems.org/>), stoga je od izuzetne važnosti da i hrvatski znanstvenici prate taj trend (Kučinić i sur., 2017; Mičetić Stanković i sur., 2018).

Barkodovi biljnih i životinjskih uzoraka su pohranjeni u bazi podataka Barcode of Life Database (BOLD) (<https://www.boldsystems.org/>) i Banci Gena (GenBank) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Web platforma BOLD i GenBank koristili su se u ovom radu kao izvor baze podataka publiciranih barkodova te će cijeli proces barkodiranja pratiti njihove smjernice.

PCR (lančana reakcija polimerazom, od engl. Polymerase Chain Reaction) je metoda koja, u kratkom vremenu, umnožava određene sekvence DNA. Reakcija PCR sastoji se od tri djela: 1. faza denaturacije, 2. faza sparivanja početnica i 3. faza produljivanja lanaca DNA. Kontinuiranim ponavljanjem denaturacije, sparivanja i produljivanja u nekoliko ciklusa količina umnožene DNA eksponencijalno raste. Kvaliteta produkta dobivenih lančanom reakcijom polimeraze se ispituje gel elektroforezom koja omogućuje utvrđivanje prisutnosti i veličine dobivenih produkta uspoređujući ih s DNA markerima poznatih veličina. Produkti sekvenciranja PCR mogu biti prikazani grafovima i slovima tzv. FASTA format (eng. FAST-ALL) koji može koristiti sva slova abecede za kodiranje aminokiselina ili za određenih nukleotidnih baza na lancu DNA.

## **1.5. CILJ**

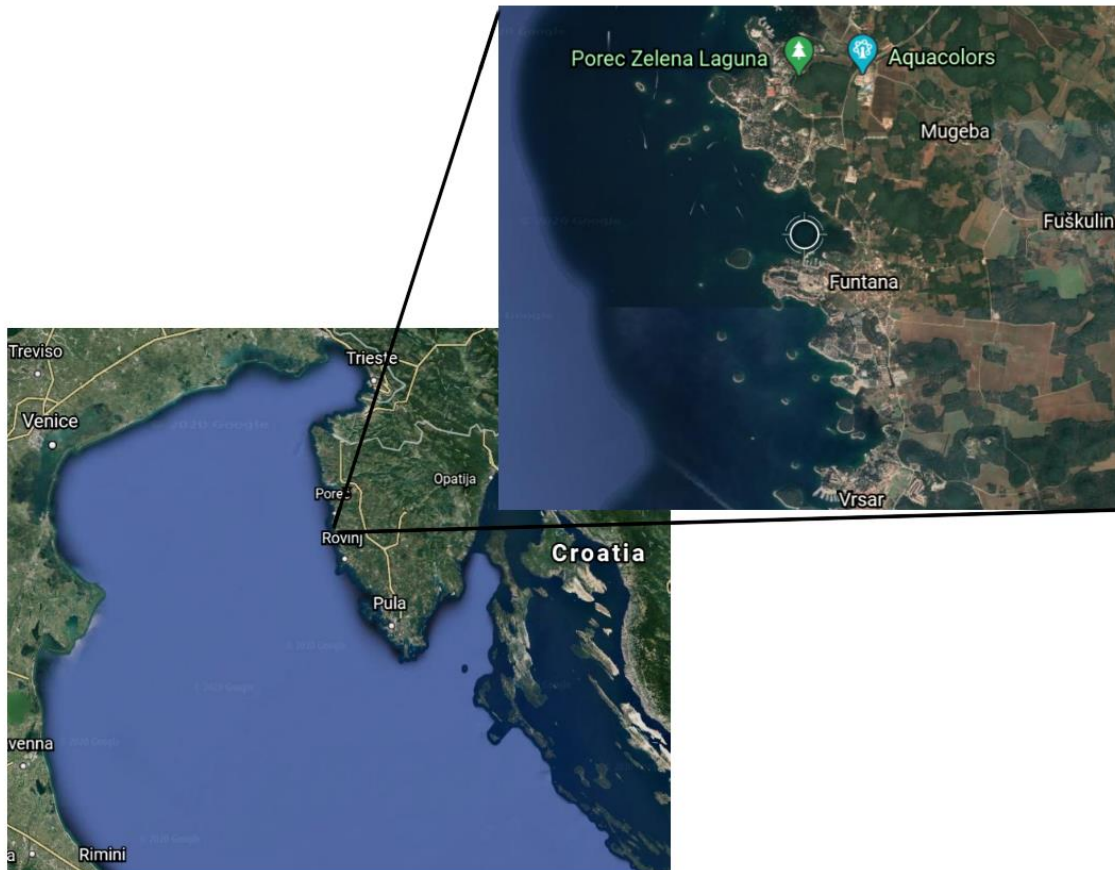
- 1) Cilj istraživanja je potvrditi morfološku te taksonomsku identifikaciju pronađenog uzorka primjenjujući metodu DNA barkodiranja.

## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. Istraživano područje

Ispitivani uzorak pronađen je u naselju zelene alge *Caulerpa cylindracea* u priobalju Funtane (45°10'827", 13°35'519"), na dubini od 11 metara.

Područje je uzorkovano u 4 replikata koristeći van Veen grabilo površine 0,1m<sup>2</sup>.



Slika 3. Sjeverni Jadran i lokacija nalazišta uzorka (preuzeto s Google Earth, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

### 2.2. Izolacija DNA

Izolacija DNA provedena je koristeći QIAamp DNA Micro set (Qiagen, Engleska). Najprije smo homogenizirali uzorak i prenijeli ga u mikrocentrifugalnu tubu od 1,5 ml, dodali 180 µl pufera ATL, te pustili da se ugrije na sobnu temperaturu (15-25°C). Nakon toga smo dodali 20 µl proteinaze K i miješali 15 sec, ostavili u termomikser i pustili da se inkubira na 56°C preko noći kako bi se raspali tj, liziral fragmenti homogeniziranog

tkiva. Da bi dodatno lizirali tkivo dodali smo iduće jutro 200 µl pufera AL, te miješali naknadnih 15 sec. U smjesu smo zatim dodali 200 µl etanola (96-100%), protresli 15 sec te inkubirali 5 min na sobnoj temperaturi (15-25°C). Otopinu iz mikrocentrifugalne tube smo oprezno prebacili u QIAampMinElute tubu od 2 ml, pazeći da ne dotaknemo rub tube i centrifugirali 1 min na 8000 opm. Prikupili smo supernatant i prebacili u novu epruvetu od 2 ml. Zatim smo oprezno dodali 500 µl pufera AW1, ponovno centrifugirali 1 minutu na 8000 opm, te prebacili supernatant u novu epruvetu od 2 ml, a talog smo odbacili. Otopini u tubi QAampMinElute dodali smo 500 µl pufera AW2 i centrifugirali 1 min na 8000 opm te smo supernatant prebacili u novu epruvetu od 2 ml i otopinu još jednom centrifugirali na 14.000 opm 3 min. Supernatant u tubi QIAampMinElute smo prebacili u novu čistu mikrocentrifugirajuću epruvetu od 1.5 ml. Zbog utjecaja pH na nizvodne reakcije pročistili smo DNA u otopini, procesom zvanim elucija, dva puta vodom; rađene su dvije elucije jer je u PCR i na gel elektroforezu stavljeno razrjeđenje druge elucije (10 puta razrijeđena druga elucija). Pri prvoj eluciji dodali smo 50 µl pufera AE, a pri drugoj eluciji 100 µl pufera AE. Kako bi povećali prinos, otopinu DNA smo inkubirali 1 min na sobnoj temperaturi i centrifugirali na maksimalnoj brzini (14000 opm) 1 min. Čista izolirana smjesa DNA nalazi se u supernatantu.

### **2.3. PCR umnažanje**

Nakon izolacije DNA slijedi lančana reakcija polimerazom (PCR) prilikom čega su korištene početnice (primeri) jgLCO, jgHCO (Geller i sur., 2013). U ovom slučaju PCR je rađen za uzorak veličine 20 µl.

Uzorak od 20 µl je činila mješavina u kojoj je bilo:

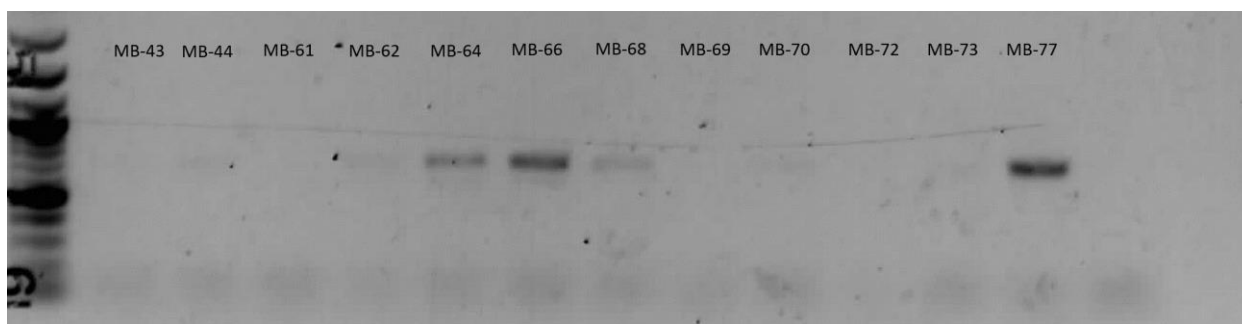
- 1 x DreamTaq™ reakcijskog pufera s 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Thermo Scientific)
- 0.2 mM dNTP mix (Qiagen)
- 0.5 µM početnice (npr. jgLCO)
- 0.5 µM početnice (npr. jgHCO)
- 1.0 U DreamTaq polymerase (Thermo Scientific)
- 3 µl DNA

PCR uvjeti su postavljeni ovako:

- početna denaturacija na 95°C 1 minutu;
- 35 ciklusa denaturacije na 95°C 45 sekundi, sparivanja početnica s DNA na 48°C 45 sekundi, te produljivanje (polimerizacija) DNA na 72°C 45 sekundi;
- završno produljivanje na 72°C 7 minuta.

## 2.4. Provjera gel elektroforezom

Elektroforeza je rađena u 1% agaroznom gelu kojem smo dodali etidij-bromid. Uzrak smo stavili na gel te elektroforezu proveli na 70V u trajanju od 20 minuta i zatim fotografirali pod UV lampom (Slika 4).



Slika 4. Provjera izolirane DNA elektroforezom (MB77 - *Ascobulla fragilis*).

Nakon što je elektroforeza pokazala uspješno umnožen odsječak DNA bili smo sigurni da ima dovoljno produkta koji se može pročistiti i poslati dalje na sekvenciranje.

## 2.5. Pročišćavanje

Pročišćavanje se provodi dodavanjem uzorku 0.05  $\mu$ l egzonukleaze I, 0.1  $\mu$ l AnP (Antarctic Phosphatase) i 1.85  $\mu$ l Milli-Q vode. U našem slučaju uzorku od 18  $\mu$ l dodali smo otopljenu smjesu od 2  $\mu$ l koju je činila 1  $\mu$ l Exonuclease I i 0.5 U AnP. Nakon toga uzroci su stavljeni u PCR na program koji se sastoji od dva koraka: 45 minuta aktivnost enzima na 37°C i 15 minuta denaturacije na 80°C.



## 2.6. Sekvence organizma

Dvosmjerno sekvenciranje PCR produkta napravljeno je od strane Macrogen Inc. (Amsterdam, Nizozemska), koristeći amplifikacijske početnice jgLCO i jgHCO. Dobivene datoteke sljedova organizma (MB-77\_jgHCO (Slika 5) i MB-77\_jgLCO (Slika 8)) su provjerene i uređene koristeći program BioEdit v. 7.2.5 (Hall, 1999) i Geneious Prime v.11.0.3+7.

Identifikacijski alat BOLD-a (<https://www.boldsystems.org/>, pristupljen u ožujku 2019.) korišten je za usporedbu DNA barkoda amplificiranog iz našeg uzorka vrste *A. fragilis* s barkod podacima dostupnim u BOLD bazi. FASTA format se ukucava u kućicu “enter sequence” na stranici BOLD te na stranici BLAST u kućicu “Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)”. BLAST alatom je prvo pretražena baza podataka Banke Gena. Pretrage su napravljene korištenjem algoritma megablast, kako bi se pronašle sekvence najsličnije onima u Banci Gena.

## 2.7. Morfologija ispitivanog uzorka

Kako bi se utvrdile morfološke karakteristike ispitivanog uzorka odrađena je slika svjetlosnim mikroskopom od strane izv.prof.dr.sc. Andreja Jaklina u Centru za Istraživanje Mora, Instituta Ruđer Bošković, Rovinj.

### 3. REZULTATI

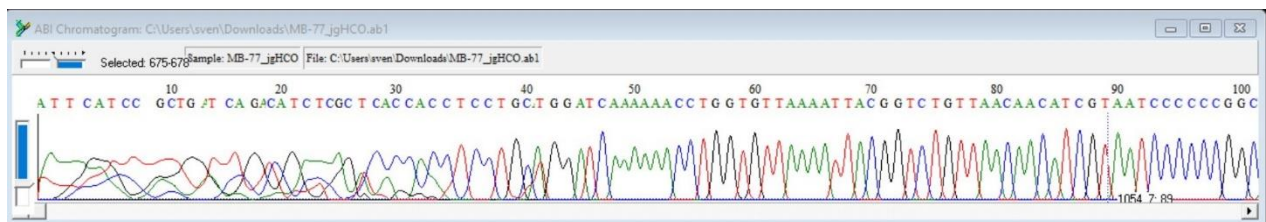
Rezolucija signala se predvidljivo i očekivano gubila na početku i na kraju sekvenca pri čemu se počeo javljati „šum“. Duljine dobivene sekvence ispitivanog uzorka (1648 bp), pronađenog u naselju zelene makroalge *Caulerpa cylindracea*, su duže od zabilježenih sekvenci u GenBank (658 bp). Razumljivo očitane nukleotidne baze završavaju na cca. 680 bp što odgovara za usporedbu s barkod podacima dostupnim u bazama BOLD i Gen Bank.

#### 3.1. MB-77\_jgHCO

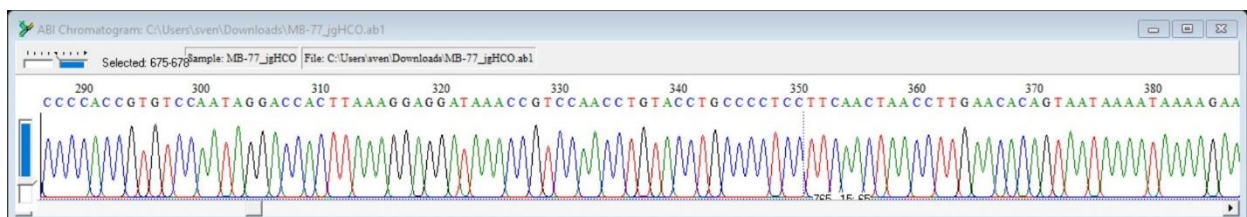
Zbog šuma u signalu kod barkodirane sekvence MB-77\_jgHCO početak iščitavanja jasno definiranih nukleotidnih baza započinje na 43. bazi "G" (Slika 5).

Pri sredini barkodirane sekvence moguće je jasno iščitati slijed baza. Rezolucija signala je jasna i bez šuma, baze su jednake udaljenosti, svaka je označena samo jednom bojom što ukazuje da ne dolazi do preklapanja s drugim bazama (Slika 6).

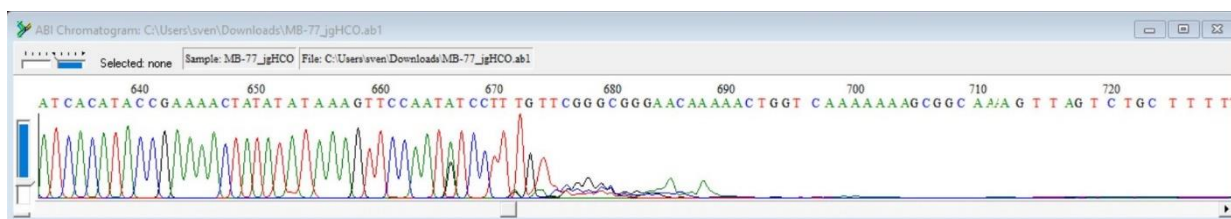
Na kraju barkodirane sekvence rezolucija signala opada i dolazi do šuma. Zadnja jasno definirana nukleotidna baza je "T" na 674. mjestu, a očitani slijed baza nakon nije u potpunosti točan (Slika 7).



Slika 5. Grafički prikaz početaka barkodirane sekvence MB-77\_jgHCO.



Slika 6. Grafički prikaz djela razumljivo iščitanih nukleotidnih baza barkodirane sekvence MB-77\_jgHCO.



Slika 7. Grafički prikaz kraja razumljivo iščitanih nukleotidnih baza barkodirane sekvence MB-77\_jgHCO.

## FASTA FORMAT

Prikazan FASTA format barkodirane sekvence MB-77\_jgHCO ima odrezane krajeve kojim rezolucija signala nije dovoljno jaka da jasno i točno iščita slijed nukleotidnih baza.

>MB-77\_jgHCO

GGATCAAA

```

AAACCTGGTGTAAAATTACGGTCTGTAAACAACATCGTAATCCCCCGG
CAAGCACAGGTAAAGATAGCAGTAGTAAGAAAGCCGTTACAAGAACCGAT
CATACAATAAATTTAATCGCTCAAATCTTATTCCAGGAGATCGTATATT
AAAAATAGTAGTAATAAAGTTAATAGCCCCTAAAATAGAAGATATCCCCG
CTAAGTGTAATGAAAAAATAGCCAAGTCAACAGATGCCCCACCGTGTCCA
ATAGGACCACTTAAAGGAGGATAAACCGTCCAACCTGTACCTGCCCCTCC
TTCAACTAACCTTGAACACAGTAATAAAAATAAAGAAGGAGGAAGAAGTC
AAAACCTTATATTATTTATTCGTGGAAATCTCATATCAGGTGCTCCAATT
AGTATTGGTACCATTCAATTTCCAAACCCTCCAATTATTAAGGCATAAC
TATAAAAAAATTATAACGAATGCGTGAGCCGTAACAATAACATTATAAA
AATGGTCATCACCTAAAAAGCCCCAGCTGTTCTTAGCTCAAACCGAATT
AATAAGCTTAGTCCAGTTCCTACTAGTCCACATCACATACCGAAAACCTAT
ATATAAAGTTCCAATATCCTTTGT

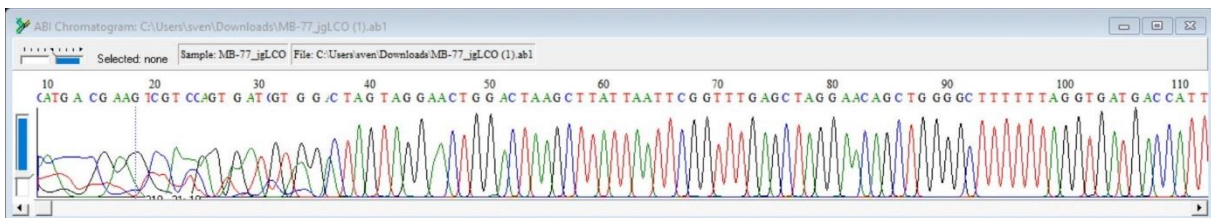
```

### 3.2. MB-77\_jgLCO

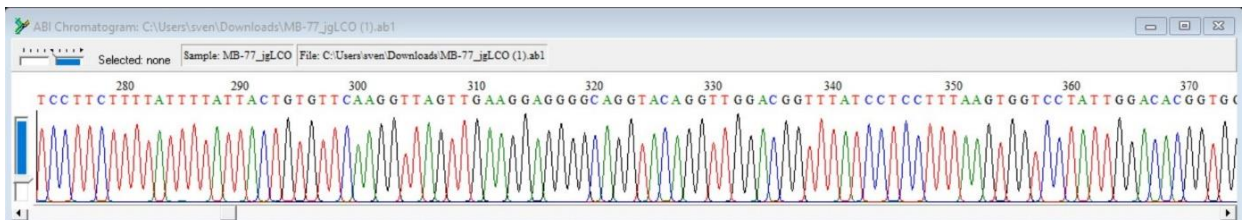
Zbog šuma u signalu kod barkodirane sekvence MB-77\_jgLCO početak iščitavanja jasno definiranih nukleotidnih baza započinje na 37. bazi "C" (Slika 8).

Pri sredini barkodirane sekvence moguće je jasno iščitati slijed baza. Rezolucija signala je jasna i bez šuma, baze su jednake udaljenosti, svaka je označena samo jednom bojom što ukazuje da ne dolazi do preklapanja s drugim bazama (Slika 9).

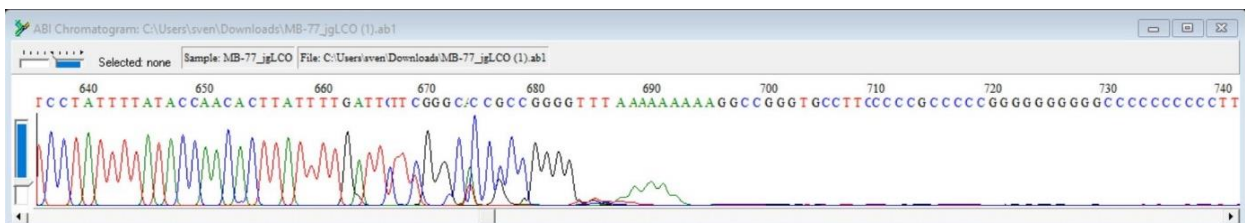
Na kraju barkodirane sekvence rezolucija signala se smanjuje i dolazi do šuma. Iako se smetnje počinju javljati kod baze "C" na 666. mjestu, zadnja jasno definirana nukleotidna baza je "G" na 683. mjestu. Slijed baza nakon gubitka signala nije u potpunosti točan i dolazi do homopolimeričkih regija nukleotida (Slika 10).



Slika 8. Grafički prikaz početaka barkodirane sekvence MB-77\_jgLCO.



Slika 9. Grafički prikaz djela razumljivo iščitanih nukleotidnih baza barkodirane sekvence MB-77\_jgHCO.



Slika 10. Grafički prikaz kraja razumljivo iščitanih nukleotidnih baza barkodirane sekvence MB-77\_jgLCO.

## FASTA FORMAT

Prikazan FASTA format barkodirane sekvence MB-77\_jgHCO ima odrezane krajeve kojim jačina signala nije dovoljno jaka da jasno i točno iščita slijed nukleotidnih baza.

```
>MB-77_jgLCO
CTAGTAGGAACTGG
ACTAAGCTTATTAATTCGGTTTGAGCTAGGAACAGCTGGGGCTTTTTTAG
GTGATGACCATTTTTATAATGTTATTGTTACGGCTCACGCATTCGTTATA
ATTTTTTTTATAGTTATGCCTTTAATAATTGGAGGGTTTGGAAATTGAAT
GGTACCAATACTAATTGGAGCACCTGATATGAGATTTCCACGAATAAATA
ATATAAGGTTTTGACTTCTTCCTCCTTCTTTTATTTTACTGTGTTCA
AGGTTAGTTGAAGGAGGGGCAGGTACAGGTTGGACGGTTTATCCTCCTTT
AAGTGGTCCTATTGGACACGGTGGGGCATCTGTTGACTTGGCTATTTTTT
CATTACACTTAGCGGGGATATCTTCTATTTTAGGGGCTATTAACCTTTATT
ACTACTATTTTTAATATACGATCTCCTGGAATAAGATTTGAGCGATTA
TTTATTTGTATGATCGGTTCTTGTAACGGCTTTCTTACTACTGCTATCTT
TACCTGTGCTTGCCGGGGGATTACGATGTTGTTAACAGACCGTAATTTT
AACACCAGGTTTTTTGATCCAGCAGGAGGTGGTGATCCTATTTTATACCA
ACACTTATTTTGATTCTTCGGGCACCGCCGGGGTTTAAAAAAAAGGCCG
GGTGCCTTCCCCCGCCCCGGGGGGGGGGCCCCCCCCCTTCCAAAAGGT
AAAAAGATGGGCAGCG
```

### 3.3. Rezultati pretrage BOLD i GenBank baza

Usporedbom DNA barkoda kojeg smo dobili ekstrakcijom DNA iz uzorka sa barkod podacima dostupnim u BOLD bazi i Gen Bank, dobili smo podudarnost od 95%, čime smo potvrdili da je naš ispitivani uzorak roda *Ascobulla* (Tablica 1).

Tablica 1. Postotak podudaranosti sekvence DNA uzorka sa podacima GenBank.

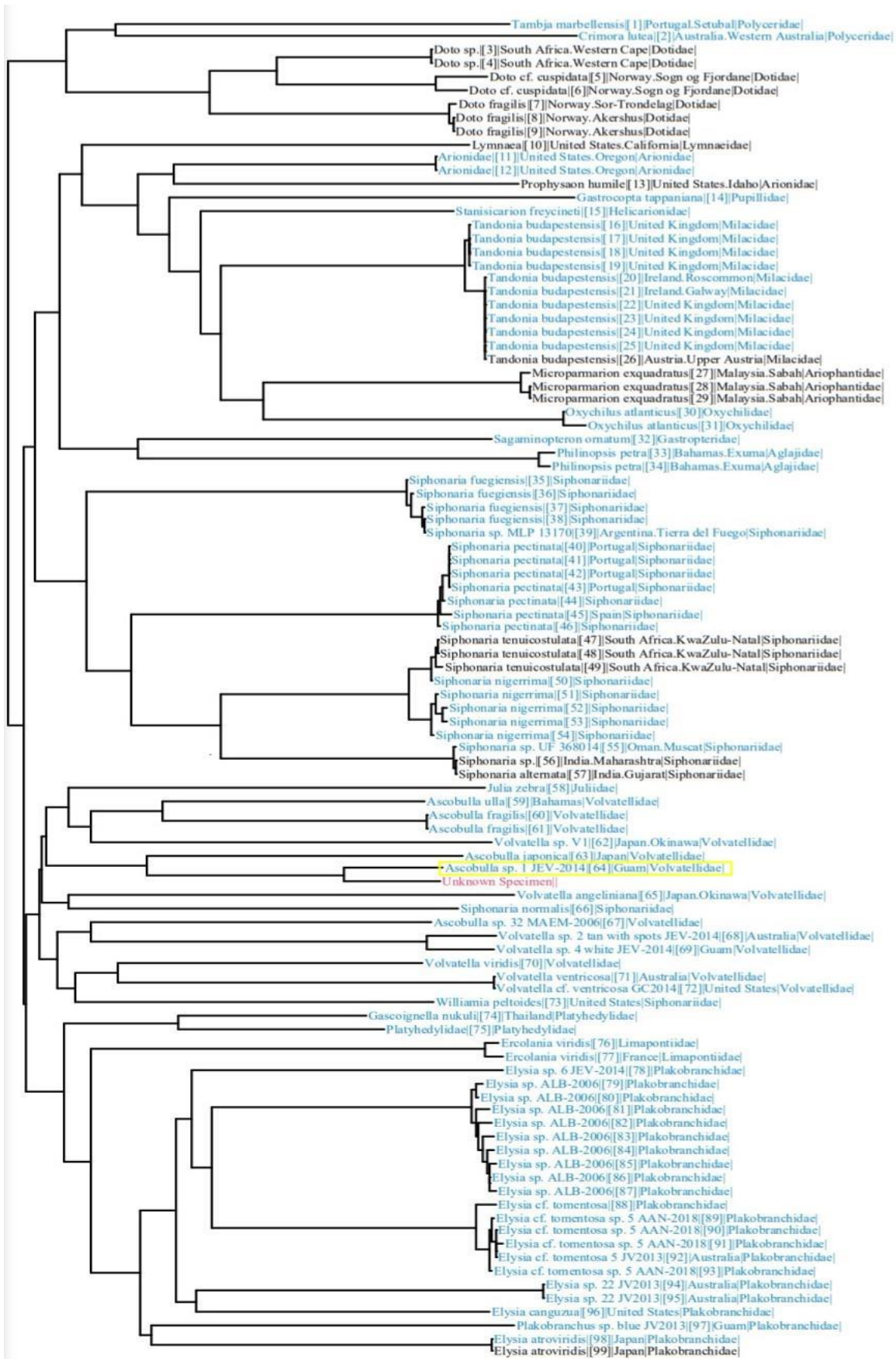
Uzorak	Poklapanje (%)	GenBank identifikacijski broj sekvence	Identificirana vrsta
MB77 - <i>Ascobulla fragilis</i>	95	KM086346.1	<i>Ascobulla</i> sp.

### 3.3.1. Sistematika ispitivanog uzorka

Filogenetičkom analizom temeljenu na rezultatima dobivenim barkodiranjem DNA mogli smo odredit taksonomsku pripadnost ispitivanog uzorka, nađenog u priobalju Funtane. Filogenetsko stablo konstruirano koristeći COI sekvence na Slici 11. pokazuje srodne rodove i vrste po sekvencama dostupnim u GenBank i BOLD bazi. Crvenim označeno je naša dobivena sekvenca. Vrsta *Ascobulla* sp., označena žutim, koja se usporedbom iz dostupnih sekvenca najviše poklapa sa ispitivanom sekvencom, predstavlja filogenetski najbližeg srodnika našeg uzorka. Taj ishod upućuje da je naš ispitivani uzorak vrste *Ascobulla* sp.

Tablica 2. Sistematika vrste *A. fragilis*

Kraljevstvo	Animalia
Koljeno	Mollusca
Razred	Gastropoda
Podrazred	Heterobranchia
Nadred	Sacoglossa
Nadporodica	Oxynooidea
Porodica	Volvatellidae
Rod	<i>Ascobulla</i>
Vrsta	<i>Ascobulla fragilis</i>



Slika 11. Filogenetsko stablo uzorka MB77 - *A. fragilis* (Preuzeto s BOLD Systems <https://www.boldsystems.org/>).

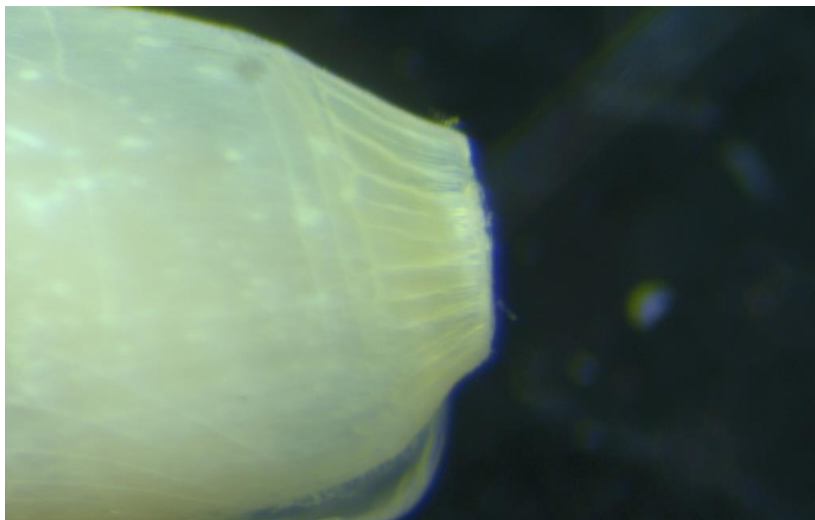
### 3.4. Morfologija ispitivanog uzorka

Jedinke prikupljene vrste su analizirane i slikane pod svjetlosnim mikroskopom kako bi pokazali izgled ljušture.

Pripadnici roda *Ascobulla* posjeduju tanku, izduženo-valjkastu, kalcificiranu kućicu (Slika 12). Na apeksu kućice se nalaze jasno izražene linije orijentirane po uzdužnoj osi kućice (Slika 13).



Slika 12. Vrsta *A. fragilis* (Jeffreys, 1856). Snimio A. Jaklin.



Slika 13. Apeks kućice puža *Ascobulla fragilis*. Snimio A. Jaklin



## 4. RASPRAVA

Jedan od uzroka širenja vrste *A. fragilis* prema višim geografskim širinama, u hladnija mora, je najvjerojatnije pojava invazivne alge *C. cylindracea* kojom se ova vrsta puža hrani. Ova alga je prvi put zabilježena u sjevernom Jadranu u Vrsaru 2004. U periodu od 2008. do 2014. prosječna temperatura vode sjevernog Jadrana bila je u porastu; minimalne temperature su također fluktuirale od 9,01 do 12,59 °C. Hladnije temperature utječu na vegetativni ciklus alge, što smanjuje sposobnost rasta, čime ju čine podložnijom predaciji uzrokujući regresiju alge. Postepeno dugogodišnje zagrijavanje vodenog stupca uz degradaciju obale te antropogeni utjecaj omogućili su izražavanju invazije alge *C. cylindracea* u priobalju sjevernog Jadrana (Iveša i sur., 2015).

Tijekom rutinskog monitoringa pridnenih zajednica zapadne obale Istre zabilježena je nova vrsta stražnjoškržnjaka za sjeverni Jadran. U priobalju Funtane (45°10'827", 13°35'519"), na dubini od 11 metara, u naselju zelene sifonalne alge *C. cylindracea* pronađeno je 9 primjeraka vrste *A. fragilis* (Jeffreys, 1856). Prvotnu identifikaciju pronađenih primjeraka puževa izvršio je dr.sc. A. Jaklin na temelju morfoloških karakteristika kućica prema priloženim slikama uspoređujući ih sa slikama vrste *A. fragilis* iz knjige Stražnjoškržnjaci Jadranskog Mora: Slikoviti Atlas i Popis Svih Hrvatskih Vrsta (Prkić i sur., 2018) i dostupnim slikama na web stranici WORMS (<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=183503>), što je i potvrdio konzultacijama s kolegama u inozemstvu. Sekvenca dobivena barkodiranjem jedne jedinice pokazala je podudarnost od 95% sa sekvencom dostupnom u banci gena koja je zabilježena kao sekvenca vrste *Ascobulla* sp. To znači da se dobiveni rezultat najviše podudara sa vrstom koja je u banci gena i BOLD bazi definirana kao *Ascobulla* sp., no 95% nije dovoljno za definiranje vrste. Najčešće se uzima prag od 97%, dok se preostalih 3% odnosi na varijabilnost unutar vrsta.

U banci gena je dostupna i vrsta *Ascobulla fragilis*, ali je podudaranje sa sekvencom te vrste bilo samo 82.57%, no to ne znači da naša vrsta nije *A. fragilis*. Postoji mogućnost da vrsta koja je zabilježena u GenBank je krivo determinirana te da se jednostavno radi o lošim nukleotidnim sljedovima. Stoga je bitna kombinacija klasične morfološke determinacije i DNA barkodiranja za donošenje konačne odluke o pripadnosti vrsti. Konačnu potvrdu mogla bi dati SEM snimka radule i centralnog zubića. Postupak ekstrakcije radule i pripreme za snimanje elektronskim mikroskopom su u tijeku, i

postupak će biti završen do kraja godine. Međutim, uza sav trud i konzultacije dostupne literature, nije pronađen niti jedan rad koji bi opisao radulu vrste *A. fragilis* iz Sredozemlja.

Određivanje vrsta rodova *Cylindrobulla* i *Ascobulla*, bazirano isključivo na analizi morfoloških karakteristika kućica je vrlo teško, gotovo nemoguće. Iako su kućice gotovo identične, vrste nisu u bliskom srodstvu. Vrste roda *Ascobulla* imaju gotovo ravnu vanjsku usnu kućice, relativno plitko apikalno područje s početkom kućice u sredini kupolaste unutarnje spirale. Vrste roda *Cylindrobulla* imaju savijenu vanjsku usnu, duboko utonuto apikalno područje sa skrivenim vrhom kućice u acentričnoj spirali (Rudman, 2006a). Osim toga, zamjetna je i razlika u glavenom štitu, vidljiva kod živih primjeraka. Kod roda *Cylindrobulla* glaveni štit je plitkom brazdom u posteriornom dijelu podijeljen na dva reznja, dok je kod roda *Ascobulla* brazda znatno duža i posteriorni dijelovi reznjeva su razmaknuti (Laetz i sur., 2014). Pripadnici roda *Ascobulla* posjeduju tanku, izduženo-valjkastu, kalcificiranu kućicu i jasno izražene linije na apeksu kućice (Slike 12 i 13). Pripadnici rodova *Cylindrobulla* i *Ascobulla* žive plitko ispod površine sedimenta, gdje ruju i hrane se rizoidima svojiti roda *Caulerpa* (Gavagnin i sur., 1994).

Pri prvom opisivanju vrste *A. fragilis* Jeffreys, 1856 ju je svrstio pod nazivom *C. fragilis*. S morfološkog stajališta *Cylindrobulla* je smatrana najosnovnijim rodom unutar reda Sacoglossa. Za razliku od ostalih pripadnika ne sadrži produženi zub za probijanje stanične stijenke. Pošto je *Cylindrobulla* temeljna grupa Sacoglossa, smatra se da je sekundarno razvila širi radularni zub koji nije u mogućnosti probiti stijenku alge i/ili se oštrije zub razvio dva puta kroz evoluciju (Laetz i sur., 2014). Radula roda *Cylindrobulla* je sastavljena od kraćih, trokutastih zubića, za razliku od oštrog, duguljastog radularnog zuba roda *Ascobulla* (Rudman, 2006a).

## 5. ZAKLJUČCI

- 1) Metoda DNA barkodiranja utvrdila je taksonomsku identifikaciju pronađenog primjerka kao vrstu *Ascobulla* sp.
- 2) Kombinacijom klasične morfološke determinacije i DNA barkodiranja nepobitno je utvrđeno da pronađeni primjerak pripada vrsti *A. fragilis* (Jeffreys, 1856).
- 3) vrsta *Ascobulla fragilis* (Jeffreys, 1856) pronađena u naselju invazivne alge *Caulerpa cylindracea* u sjevernom Jadranu, u području Funtane na dubini od 11 metara, predstavlja najsjeverniju točku rasprostranjenosti ove vrste u Sredozemlju, što doprinosi obogaćivanju poznavanja malakofaune i bioraznolikosti sjevernog Jadrana

## 6. LITERATURA

Barco, A., Raupach, M.J., Laakmann, S., Neumann, H., Knebelberger, T. (2015) Identification of North Sea molluscs with DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 16(1): 288–297. doi:10.1111/1755-0998.12440

Blanco-Bercial, L., Cornils, A., Copley, N., Bucklin, A. (2014). DNA barcoding of marine copepods: assessment of analytical approaches to species identification. *PLoS currents*, 6. doi:10.1371/currents.tol.cdf8b74881f87e3b01d56b43791626d2

Boyer, S.L., Howe, A.A., Juergens, N.W., Hove, M.C. (2011) A DNA-barcoding approach to identifying juvenile freshwater mussels (*Bivalvia*: Unionidae) recovered from naturally infested fishes. *Journal of the North American Benthological Society*, 30(1): 182–194. doi:10.1899/10-004.1

Bucklin, A., Steinke, D., Blanco-Bercial, L. (2011) DNA barcoding of marine metazoa. *Annual review of marine science*, 3: 471-508. doi:10.1146/annurev-marine-120308-080950

Ćosić, J. (2014) DNA barkodiranje kao metoda u taksonomskoj identifikaciji biljnih i životinjskih vrsta (Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno–matematički fakultet, Biološki odsjek) 1-50 str.

Fasulo, G., Gaglini, A., Terreni G. (1981) Nota su recenti ritrovamenti di u mollusco poco noto, *Cylindrobulla fragilis* (Jeffreys,1856) (Gastropoda: Opisthobranchia) e considerazioni sulla sua collocazione sistematica *Notiziario CRISMA* 3. Vol. 1-3: 27-32.

Gavagnin, M., Marin, A., Castelluccio, F., Villani, G., Cimino G. (1994) Defensive relationship between *Caulerpa prolifera* and its shelled sacoglossan predators. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 175: 197-210. doi: [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(94\)90026-4](https://doi.org/10.1016/0022-0981(94)90026-4)

Geller, J., Meyer, C., Parker, M. & Hawk, H. (2013) Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. *Molecular Ecology Resources*, 13: 851-861.

Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.

Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S. L., deWaard, J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512): 313–321. doi:10.1098/rspb.2002.2218

Iveša, Lj., Djakovac, T., Devescovi, M. (2015) Spreading patterns of the invasive *Caulerpa cylindracea* Sonder along the west Istrian Coast (northern Adriatic Sea, Croatia). *Marine Environmental Research*, 107: 1-7. doi:10.1016/j.marinvers.2015.03.008

Jeffreys, J.G. (1856). On the marine Testacea of the Piedmontese coast. *Annals and Magazine of Natural History*. ser. 2, 17: 155-188., available online at <http://biodiversitylibrary.org/page/22069750> 188; pl. 2 fig. 16-17

Kučinić, M., Ćukušić, A., Žalac, S., Podnar, M., Kambarovich Akhmetov, K., Akimbekova, N., Zhumadina, S. M., Vučković, I. (2017) First DNA barcoding and new records of the Mediterranean caddisfly species *Micropterna wagneri* Mal. (Trichoptera, Limnephilidae) in Croatia with note on DNA barcoding and diversity of genus *Micropterna* in Croatia. *Natura Croatica*, 26(1): 81–98. doi:10.20302/nc.2017.26.6

Laetz, E., Christa, G., Händeler, K., Wägele, H. (2014) The *Cylindrobulla/Ascobulla* complex--unraveling problems in identification and adding to *Cylindrobulla* diversity (Gastropoda, Heterobranchia, Sacoglossa) by describing a new species. *Zootaxa* 3893(3): 339–362 doi:10.11646/zootaxa.3893.3.2.

Meyer, R., Weis, A., Melzer, R.R. (2013) Decapoda of southern Chile: DNA barcoding and integrative taxonomy with focus on the genera *Acanthocyclus* and *Eurypodius*. *Systematics and Biodiversity*, 11(3): 389–404. doi:10.1080/14772000.2013.833143

Mičetić Stanković, V., Bruvo Mađarić, B., Jäch, M.A., Kučinić, M. (2018) *Elmis rietscheli* Steffan, 1958 (Insecta: Coleoptera: Elmidae) in Croatia: first record and DNA barcoding. *Natura Croatica*, 27(1): 185–194. doi:10.20302/nc.2018.27.

Poulain, P.-M., H. Korafalou, V., Cushman-Roisin, B. The Northern Adriatic. U: Cushman-Roisin, B. Gačić, M., Poulain, P.-M., & Artegiani, A. (ur.) 2001: Physical

Oceanography of the Adriatic Sea, Kulwer Academic Publishers,143-165.  
doi:10.1007/978-94-015-9819-4

Prkić, J., Petani, A., Igljić, Đ., Lanča, L. (2018) Stražnjoškržnjaci Jadranskog Mora: Slikoviti Atlas i Popis Svih Hrvatskih Vrsta / Opisthobranchs of the Adriatic Sea: Photographic Atlas and List of Croatian Species. Ronilački Klub Sveti Roko, Bibinje. 463 str.

Rudman, W.B, (2006b) Comment on *Ascobulla* sp. from Northern New South Wales  
<http://www.seaslug.forum/net>

Rudman, W.B. (2006a) *Ascobulla*, *Cylindrobulla* spp. <http://www.seaslug.forum/net>

Saccone, C., De Giorgi, C., Gissi, C., Pesole, G., & Reyes, A. (1999) Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene*, 238(1): 195-209. doi: 10.1016/s0378-1119(99)00270-x

Schander, C., Willassen, E. (2005) What can biological barcoding do for marine biology? *Marine Biology Research*, 1(1): 79-83. <https://doi.org/10.1007/s00343-010-9131-1>

World Register of Marine Species (2020) <http://www.marinespecies.org/index.php>

Zenetos, A., Macic, V., Jaklin, A., Lipej, L., Poursanidis, D., Cattaneo-Vietti, R., Beqiraj, S., Betti, F., Poloniato, D., Kashta, L., Katsanevakis S. & Crocetta F. (2016) Adriatic 'opisthobranchs' (Gastropoda, Heterobranchia): shedding light on biodiversity issues. *Marine Ecology*, 37(6): 1239-1255. doi: 10.1111/maec.12306

Žuljević, A., Antolić, B., Onofri, V. (2003) First record of *Caulerpa racemosa* (Caulerpales: chlorophyta) in the Adriatic sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 83: 711-712.

Žuljević, A., Thibaut, T., Elloukal, H., Meinesz, A. (2001) Sea slug disperses the invasive *Caulerpa taxifolia*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* (2001) 81, 343-344 doi: 10.1017/S0025315401003848

## 7. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Završni rad

Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

### ***Ascobulla fragilis* (Jeffreys, 1856) u priobalju Istre**

SVEN AMANČIĆ

#### **SAŽETAK**

Vrsta *Ascobulla fragilis* je vrsta Sacoglossa koja obitava u toplijim područjima Sredozemnog mora. Koristeći radularni zub, hrani se probijajući i isisavajući citoplazmatsku tekućinu alga, primarno roda *Caulerpa*. 2019. godine pronađeno je i prikupljeno po prvi puta 9 primjerka ove vrste u sjevernom Jadranu, u podmorju Funtane. U ovom radu sam potvrdio morfološku identifikaciju vrste *A. fragilis* koristeći metodu DNA barkodiranja. Na kraju sam se dotaknuo problema identifikacije temeljene isključivo na morfologiji između srodnih rodova *Ascobulla* i *Cylindrobulla*. Ovaj nalaz vrste *A. fragilis* u priobalju Funtane predstavlja najsjeverniju točku rasprostranjenosti ove vrste u Mediteranu.

**Ključne riječi:** *Ascobulla fragilis*, *Cylindrobulla fragilis*, DNA barkodiranje, Jadran, sjeverni Jadran

**Mentor:** dr.sc. Andrej Jaklin, izv.prof.

**Ocjenjivači:** dr.sc. Andrej Jaklin, izv.prof

dr.sc. Ljiljana Iveša, izv.prof.

dr.sc. Paolo Paliaga, doc.

## 8. BASIC DOCUMENTATION CARD

Juraj Dobrila University od Pula

Bachelor thesis

University Undergraduate Study Programme – Marine Sciences

### ***Ascobulla fragilis* (Jeffreys, 1856) in the coastal waters of Istra**

SVEN AMANČIĆ

#### **ABSTRACT**

*Ascobulla fragilis* is a species of Sacoglossa that inhabits in warmer parts of the Mediterranean sea. Using a radular tooth, it feeds by piercing and sucking on the cytoplasmic fluid of algae, primarily of the genus *Caulerpa*. In 2019., 9 specimens were for the first time discovered and collected in the northern Adriatic, in the aquatorium of Funtana. In this paper, I confirmed the morphological identification of the species *A. fragilis* using the DNA barcoding method. In the end, I considered a problem regarding identification based exclusively on morphology between the related genera *Ascobulla* and *Cylindrobulla*. This finding of *Ascobulla fragilis* in the coastal waters of Funtana represents the northernmost record of its distribution in the Mediterranean.

**Key words:** *Ascobulla fragilis*, *Cylindrobulla fragilis*, DNA barcoding, Adriatic, northern Adriatic

**Supervisor:** dr.sc. Andrej Jaklin, izv.prof.



**Reviewers:** dr.sc. Andrej Jaklin, izv.prof

dr.sc. Ljiljana Iveša, izv.prof.

dr.sc. Paolo Paliaga, doc.