

# Populacijska genetika Plemenite periske *Pinna nobilis* na osnovu markera Citokrom oksidaze I

---

Jovanovski, Rajna

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:137:173006>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-05**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Fakultet prirodnih znanosti

**RAJNA JOVANOVSKI**

**POPULACIJSKA GENETIKA PLEMENITE PERISKE *PINNA NOBILIS* NA  
OSNOVU MARKERA CITOKROM OKSIDAZE I**

Završni rad

Pula, rujan 2022. godine

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Fakultet prirodnih znanosti

**RAJNA JOVANOVSKI**

**POPULACIJSKA GENETIKA PLEMENITE PERISKE *PINNA NOBILIS* NA  
OSNOVU MARKERA CITOKROM OKSIDAZE I**

Završni rad

**JMBAG:** 0303079155, redoviti student

**Studijski smjer:** Znanost o moru

**Predmet:** Genetika i evolucija

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** Interdisciplinarne prirodne znanosti

**Znanstvena grana:** Znanost o moru

**Mentor:** Izv.prof.dr.sc. Mauro Štifanić

Pula, rujan 2022. godine



### IZJAVA O KORIŠTENJU AUTORSKOG DJELA

Ja, Rajna Jovanovski dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj Završni rad pod nazivom Populacijska genetika Plemenite periske *Pinna nobilis* na osnovu markera

Citokrom oksidaze I

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 s 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, \_\_\_\_\_

Potpis

\_\_\_\_\_



### IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, dolje potpisani Rajna Jovanovski, kandidat za prvostupnika Znanosti o moru ovime izjavljujem da je ovaj Završni rad rezultat isključivo mogega 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 nedozvoljeni način, odnosno da je prepisan iz kojega necitiranog rada, te da ikoji dio rada krši bilo čija autorska prava. Izjavljujem, također, da nijedan dio rada nije iskorišten za koji drugi rad pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj ili radnoj ustanovi.

Student

---

U Puli, \_\_\_\_\_

## **Zahvala**

Ovim putem želim se zahvaliti izv. prof. dr. sc. Mauru Štifanić na pomoći, razumijevanju i posvećenom vremenu pri izradi ovog završnog rada.

Također, zahvaljujem se svim profesorima i predavačima na prenesenom znanju i iskustvu, te kolegama na pomoći i lijepim uspomenama.

Veliko hvala mojim bližnjima na velikoj potpori tijekom studiranja.

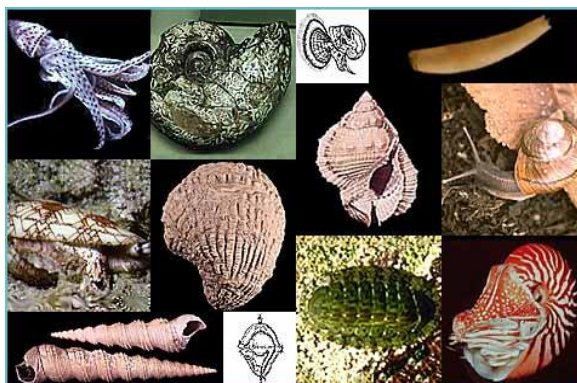
## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Mekušci ( <i>Mollusca</i> ).....	1
1.2. Školjkaši ( <i>Bivalvia</i> ).....	2
1.2.1. Morfologija i fiziologija.....	3
1.2.2. Razmnožavanje.....	5
1.3. Porodica <i>Pinnidae</i> .....	6
1.3.1. Rasprostranjenost i gustoća <i>P. nobilis</i> u Sredozemnom moru.....	10
1.3.2. Zaštita vrste.....	11
1.3.3. Masovni pomor.....	11
1.4. Filogenija.....	12
1.5. Populacijska genetika.....	14
1.5.1. Citokrom oksidaza I.....	16
1.6. Populacijska genetika <i>P. nobilis</i> .....	17
1.7. Cilj istraživanja.....	18
2. MATERIJALI I METODE.....	19
2.1. Uzorci.....	19
2.2. Analiza DNA sljedova.....	20
3. REZULTATI I RASPRAVA.....	21
3.1. Konstrukcija filogenetskih stabala.....	21
3.2. Tablični prikaz promjena.....	24
3.3. Usporedba sa sljedovima iz ostalih regija Mediterana.....	26
4. ZAKLJUČAK.....	30
5. LITERATURA.....	31
6. SAŽETAK.....	36

# 1. UVOD

## 1.1. Mekušci (*Mollusca*)

Koljeno mekušaca (*Mollusca*) jedno je od najvećih u životinjskom carstvu. Dijeli se u sedam razreda: *Aplacophora* (bezljušturaši), *Bivalvia* (školjkaši), *Cephalopoda* (glavonošci), *Gastropoda* (puževi), *Monoplacophora* (jednoljušturaši), *Polyplacophora* (mnogoljušturaši) i *Scaphopoda* (koponošci) (Bunje, 2003.).



Slika 1. – raznolikost mekušaca. (Izvor:

<https://ucmp.berkeley.edu/mollusca/mollusca.html>)

Nekoliko karakteristika koje su specifične za ovo koljeno jesu ljuštura, plaštana šupljina, receptori i stopalo. Ljuštura je prisutna u više razreda, s time da je kod razreda *Cephalopoda* i *Aplacophora* došlo do redukcije ljušture. Plaštana šupljina se nalazi u područjima gdje plašt nije srastao s tijelom, a u njoj su smještene ktenidije (škrge mekušaca), kemoreceptori i tjelesni otvori (crijevni, gonopori i nefridiopori) (Habdija i sur, 2011.). Kemoreceptori se još nazivaju i osfradiji, vrlo su bitni jer organizmu omogućuju procjenu kakvoće medija u kojemu se nalazi. Kada govorimo o razvijenosti tjelesnih šupljina, mekušci pripadaju skupini shizocelnih hemocelomata kod kojih je prilikom embrionalnog razvitka došlo do stapanja primarnih i sekundarnih tjelesnih šupljina (Habdija i sur, 2004.). Optjecajni sustav je otvoren i građen je od srca, pripadnih krvnih žila, hemocela i hemolimfe (Habdija i sur., 2011.). Srce se nalazi u perikardu te tjera krv aortom u manje arterije koje se zatim izljevaju u hemocelne sinuse i oplakuju organe. Najčešći respiratorni pigment je hemocijanin, s time da su u nekih svojiti prisutni i hemoglobin i hemeritrin. Za ekskreciju su zaduženi metanefridiji, tj. žlijezda čija je uloga otklanjanje otpada nastalog u metaboličkom



procesu (Habdija i sur., 2004.). Prehrana im je jako raznolika, od karnivora do herbivora, detritivora ili filtratora (Habdija i sur, 2011.).

Mekušci obitavaju na raznim staništima, od kopnenih do vodenih (morski i slatkovodni). Od ukupno 50 000 opisanih vrsta, 30 000 je morskih stoga je vidljivo da su u velikom broju zastupljeni u morskim staništima (Gosling, 2003.). Imaju vrlo dug i bogat fosilni zapis koji datira unatrag više od 550 milijuna godina, stoga su paleontolozima jedna od najčešćih vrsta organizama koju koriste za proučavanje povijesti života. Jedan od manje poznatih razreda je *Monoplacophora* (jednoljušturaši) koji broji oko 20 opisanih vrsta i jedno je od važnijih otkrića u modernoj biologiji. Prvotno je bio poznat kao fosil iz Paleozoika, da bi se 1952. godine uz obalu Kostarike otkrila živa vrsta *Neopilina galathea*. Do otkrića je došlo tek nedavno jer se ovaj razred većinom nalazi u dubokom oceanu, te je samim time mogućnost otkrića otežana.

Rasprostranjenost mekušaca je raznolika, od kopnenih planinskih vrhova sve do dubokog mora, a veličine organizama variraju od 20 metara dugih divovskih lignji, *Architeuthis dux* (Steenstrup, 1857.), pa sve do aplakofora koje su duljine svega milimetar ili manje. Kroz povijest mekušci su imali važnost i za čovjeka kao izvor hrane, alat pa i kao nakit, s obzirom na to da se školjke nekih mekušaca smatraju lijepima i vrijednima (Bunje, 2003.).

## **1.2. Školjkaši (*Bivalvia*)**

Razred *Bivalvia* sa svojih otprilike 7500 opisanih vrsta jedan je od sedam razreda u koljenu *Mollusca* (Gosling, 2003.). U Jadranskom moru utvrđeno je zasad oko 320 vrsta. Većinom žive sjedilačkim i polusjedilačkim načinom života, osim nekoliko iznimaka koji mogu i plivati pomoću svojih ljuštura izbacujući i uvlačeći vodu u plaštanu šupljinu. Ovi organizmi većinom preferiraju mekani sediment u koji se ukopavaju svojim stopalom, a kako bi sve funkcioniralo plašt im je prilagođen za donos i odnos vode iznad sedimenta u kojem obitavaju. Naime, voda struji kroz plaštanu šupljinu i tako uzimaju kisik i hranjive tvari, a izbacuju ugljikov dioksid. Također, u vodu izbacuju i ekskrecijske produkte te gamete (Habdija i sur., 2011.).

### 1.2.1. Morfologija i fiziologija

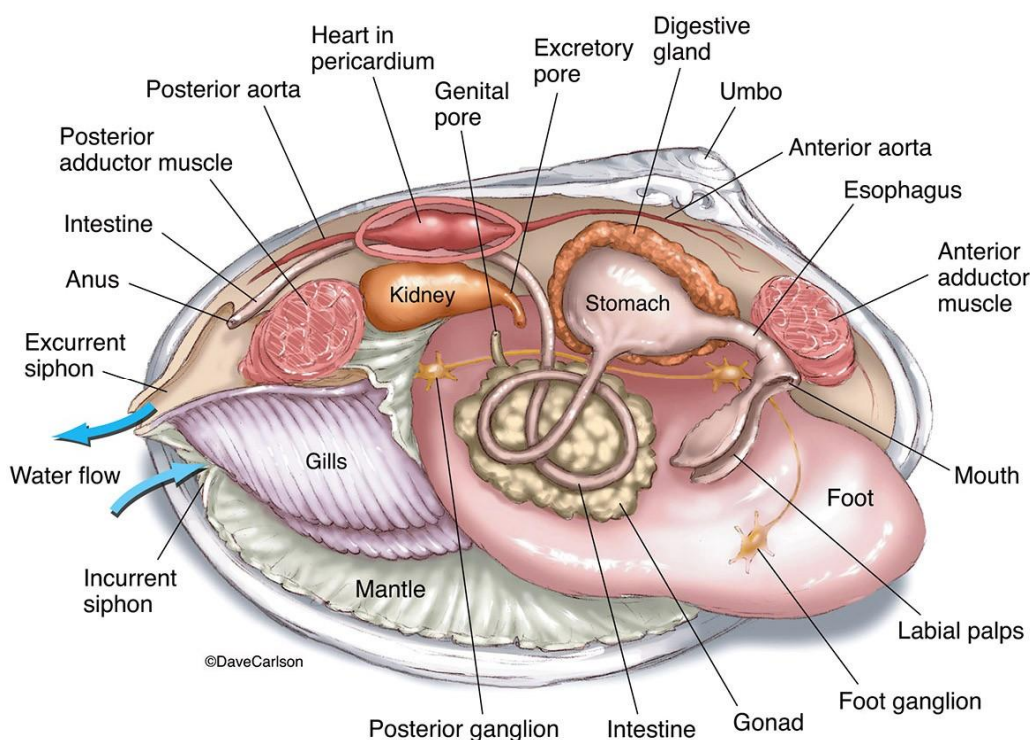
Naziv školjkaš povezan je s građom jer ima dvije ljuštore koje se zajedno nazivaju školjka, a podijeljene su na lijevu i desnu i spojene su ligamentom. Ljuštura je uglavnom građena od tri sloja, i to vanjski (organski) sloj koji se naziva periostrakum, zatim srednji vapnenački sloj ostrakum (kristali kalcijeva karbonata najčešće aragonit ili mješavina kalcita i aragonita) i unutarnji sloj koji je također vapnenački i naziva se hipostrakum. Umbo ili vrh školjke je ujedno i najstariji dio ljuštore te se oko njega koncentrično raspoređuju zone prirasta (Habdija i sur., 2011.).

Građa tijela je bilateralno simetrična, a unutar plašta, koji služi kao zaštita unutarnjih organa i zaštita od predatora nalazi se prostrana plaštana šupljina koja je prostor u kojem se nalaze škrge (ktenidije), stopalo, te iznad njega utroba. Sam plašt se sastoji od dva reznja tkiva, vrlo je tanak, a sastoji se od vezivnog tkiva s hemolimfnim žilama, živcima i mišićima koji su dobro razvijeni u blizini ruba plašta, s time da je rub plašta najčešće tamno pigmentiran radi zaštite od štetnog efekta sunčevog zračenja. Plašt na svojoj unutarnjoj površini ima cilije čija je uloga usmjeravanje čestica na škrge i odbijanje težih čestica koje se usmjeravaju duž kanala za odbacivanje prema otvoru za ekshalaciju. Najvažnija tjelesna tekućina u tijelu školjkaša je hemolimfa koja u sebi sadrži stanice, tj. hemocite koje lebde u bezbojnoj plazmi. Kao i kod sisavaca krv, u fiziologiji školjkaša hemolimfa igra važnu ulogu. Hemolimfa školjkašima služi kao medij za izmjenu plinova, osmoregulaciju, distribuciju hranjivih tvari, te eliminaciju štetnih tvari. Osim toga, služi i kao fluidni „kostur“ koji daje privremenu stabilnost stopalu i rubu plašta.

Prema građi škrge školjkaše možemo podijeliti na četiri skupine: *Protobranchia*, *Filibranchia*, *Eulamellibranchia* i *Septibranchia*. Škrge kod školjkaša imaju veliku površinu, a k tome i respiratornu i hranidbenu ulogu. Bogato su opskrbljene hemolimfom te se tako odvija izmjena plinova. Osim respiratorne uloge, sudjeluju u bioakumulaciji teških metala i pesticida. Posljedica izloženosti teškim metalima kao što su olovo, cink i bakar uzrokuje oštećenje škrge i degenerativne posljedice kao što su gubitak cilija i spajanje filamenata, šupljih cijevi unutar kojih cirkulira hemolimfa. Međutim, škrge imaju malu pomoć specijaliziranih proteina metalotioneina, koji vežu na sebe teške metale, i vitamin C koji hvata slobodne

radikale, a oboje su rasprostranjeni u tkivima škrga i probavnih žlijezda (Gosling, 2003.).

Odrasle jedinice imaju mehanizam kojim reagiraju na promjene vanjskog saliniteta i to zatvaranjem zalistaka ljušture, i to kako bi prilagodile unutarstaničnu koncentraciju iona, aminokiselina i drugih malih molekula s ciljem održavanja konstantnog volumena stanice. Školjkaši su osmokonformeri što znači da imaju sposobnost regulacije osmotskog potencijala svoje izvanstanične tekućine, odnosno hemolimfe. S obzirom da je prvi odgovor školjkaša na fluktuacije saliniteta zatvaranje svojih ljuštura, tkiva budu izolirana od osmotskih promjena u vanjskom mediju. Ovakav način nije dugotrajno rješenje, stoga ako razdoblje promjene saliniteta potraje duže vrijeme, školjkaš će biti prisiljen regulirati volumen stanica potražnjom za kisikom i hranom (Bayne i sur., 1976.). Kada se u konačnici postigne osmotska ravnoteža, hranjenje i disanje se vraća u početnu brzinu, tj. ubrza se, a razdoblje koje je potrebno za potpunu aklimatizaciju ovisi o opsegu početne promjene saliniteta (Almada-Villela, 1984.).



Slika 2 . – unutrašnja građa školjkaša (Izvor: <http://anatomynote.com/wp-content/uploads/2019/09/13735/Mollusk-shellfish-anatomy-diagram.jpg>)

### 1.2.2. Razmnožavanje

Reproduktivni ciklus školjkaša je godišnji, a to uključuje razdoblje gametogeneze, odnosno proces kojim nastaju spolne stanice, te nakon toga slijedi jedan produženi ili čak nekoliko događaja mrijesta. Ostatak godine ostaje za razdoblje rekonstrukcije gonada. Sam ciklus kod školjkaša se odvija tako da u spermatogenezi (procesu razvoja spermija), primarne spermatogonije prolaze kroz ponovljene mitotske podjele kako bi proizvele sekundarne spermatogonije, koje zatim prolaze kroz mejozu kako bi postale spermatociti, te oni stvaraju spermatide koji se diferenciraju u bičaste spermatozoide čija duljina iznosi oko 25-60  $\mu\text{m}$ . S druge strane, proces oogeneze (razvoja jajnih stanica) ima sličan obrazac kao i spermatogeneza jer oogonije prolaze kroz ponovljenu mitozu dajući sekundarne oogonije koje zatim ulaze u mejozu, ali se zaustavljaju u fazi profaze mejoze I, te preostale mejotske faze završavaju nakon oplodnje. Postoje neki glavni čimbenici koji uvelike utječu, a i određuju vrijeme gametogeneze i to za mnoge vrste. Hrana i temperatura glavni su čimbenici koji imaju utjecaj na proces razmnožavanja, hrana možda i više s obzirom na to da je sam proces gametogeneze energetski zahtjevan i stoga ovisi o dostupnoj opskrbi hranom, pohranjenim energetskim rezervama ili oboje. Većina školjkaša, jajašca i spermije iz genitalnih kanala izbacuje izravno u vodeni stupac u kojem se događa oplodnja. Oplodeno jajašce se dijeli i razvija u nakupinu stanica koja pomoću cilija (trepetljika) koje se pojave 4–5 sati nakon oplodnje može plivati. Zatim 24 sata nakon oplodnje ličinka je u stadiju trepetljikastog trohofora koji počinje lučiti prvu ljušturu ličinke. Stadij veliger ličinke nastupa nakon što je ličinka veličine od 100–120  $\mu\text{m}$  u duljinu, te se brzo nakon toga počinje lučiti druga ljuštura na kojoj se sad već vide linije rasta. U stadiju veligera ličinke plutaju pri površini, a kasnije kad nastupi stadij pediveligera (stadij u kojem se ličinka može kretati putem stopala) u kojoj se počinje stvarati ljuštura te školjkaš dobiva na težini, pada na dno i započinje bentički život. Ličinke su spremne za to kada dostignu veličinu od 250-300  $\mu\text{m}$ , iako su mnoge u stanju odgoditi proces dok ne postanu veće. Kao i kod odraslih jedinki, čimbenici koji utječu na razvoj ličinki su hrana, temperatura i salinitet (Gosling, 2003.).

### 1.3. Porodica *Pinnidae*

Porodica *Pinnidae* pripada redu *Anisomyaria*, tj. školjkašima koji imaju veliki stražnji aduktorski mišić (zatvarač), dok je prednji aduktor mali ili nedostaje. *Pinnidae* su rasprostranjene diljem svijeta pretežito u toplim umjerenim i tropskim morima, a većina vrsta nalazi se u pješčanim i muljevitim dnima, i to do dubine od 10 do oko 25 m. Ovi školjkaši uglavnom žive okomito ugrađeni u mekanu podlogu (Turner i Rosewater, 1958.). U znanstvenom svijetu predstavljaju se kao 3 glavna roda, a to su: *Atrina*, *Pinna* i *Streptopinna*. U porodici *Pinnidae* broji se oko 70 vrsta, od kojih u rod *Atrina* spada 30 vrsta, u rod *Pinna* 39 vrsta i u rod *Streptopinna* 1 vrsta (WoRMS, 2022.).

Rod *Pinna* ima škrge, koje uz trepetljikave, imaju i manji broj tkivnih interfilamentnih spojeva koji se nazivaju pseudolamelibranhijali. Takav tip građe škrge spada u red *Filibranchia*. Također, rod *Pinna* čini ekološku skupinu školjkaša koji žive pričvršćeni na podlozi (epifauna) pomoću bisusnih niti. Kod takvih vrsta stopalo je svedeno na bisusni kompleks s bisusnim stopalnim žlijezdama. Vrste roda *Pinna* djelomično su ukopane u mekani sediment, a bisusnim nitima su u svrhu stabilizacije pričvršćene na kamenje u dubokim slojevima sedimenta. Zanimljivo je da dugačke bisusne niti periski su korištene, i još se koriste u turističke svrhe i za proizvodnju tkanina (Habdija i sur., 2011.).

*Pinna nobilis* ima oblik šiljastog trokuta, a vanjska površina ukrašena je ljuskastim lamelama koje su više naglašene kod juvenilnih primjeraka (Milišić, 1991.). *Pinna nobilis* (Linne, 1758.) hrvatskog naziva Plemenita periska (engl. Noble pen shell), školjkaš (*bivalvia*) je koji pripada obitelji *Pinnidae* (periske).

Trenutna klasifikacija prema WORMS (World Register of Marine Species) je sljedeća:

<b>Carstvo</b>	<i>Animalia</i>
<b>Koljeno</b>	<i>Mollusca</i>
<b>Razred</b>	<i>Bivalvia</i>
<b>Podrazred</b>	<i>Autobranchia</i>
<b>Red</b>	<i>Ostreida</i>
<b>Porodica</b>	<i>Pinnidae</i>
<b>Rod</b>	<i>Pinna</i>

Vrsta	<i>Pinna nobilis</i>
-------	----------------------

Najveći je školjkaš Sredozemnog mora, u kojem je endem, a najveća visina joj doseže i do 1 m, s time da prosječna veličina iznosi od 30 do 60 cm. Vanjska boja ljušture je svjetlo smeđa, a s unutrašnje strane boja je opalosedefasta. Najčešće obitava na području pjeskovito-muljevitog dna, gdje uglavnom naseljava livade morskih cvjetnica, s time da povremeno uspijeva i među kamenjem (Milišić, 1991.), te boravi na mjestima smanjenog hidrodinamizma. Jadransko more je vrlo pogodno stanište za ovu vrstu, u kojem je bila vrlo rasprostranjena prije masovnog pomora (Cabanelas-Reboredo i sur., 2019.).

*P. nobilis* možemo pronaći kao dio biocenoze morskih cvjetnica *Posidonia oceanica* i *Cymodocea nodosa*, tj. na sedimentu između izdanaka (Bakran-Petricioli i sur., 2011.). Obično je zabodena u okomitom položaju na dubini od 2-20 m, no može biti i na dubini do 40 m.



Slika 3. – jedinka *Pinna nobilis* zabodena u mekanom supstratu. (Izvor slike: [https://www.mispecies.com/especiales/Todo-lo-que-te-interesa-saber-sobre-la-Nacra-Pinna-nobilis/#.Ypnn4\\_1BzIV](https://www.mispecies.com/especiales/Todo-lo-que-te-interesa-saber-sobre-la-Nacra-Pinna-nobilis/#.Ypnn4_1BzIV) )

Prije negoli se jedinka pričvrsti, ona svojim stopalom traži odgovarajuću podlogu, najčešće stabilnu i nepomičnu, gdje se zatim bisusnim nitima, koje su kompleksan sistem kojemu je zadaća da fiksira jedinku za supstrat, pričvršćuje za podlogu (Basso i sur., 2015.). Pričvršćivanje za morsko dno bisusnim nitima dovelo je do smanjenja prednjeg mišića aduktora u odnosu na stražnji kao rezultat prilagodbe. *P. nobilis* je hermafrodit s dominirajućim muškim spolom u ranijoj dobi, te ženskim spolom u starijoj (Milišić, 1991.), a gamete ne sazrijevaju istodobno čime izbjegava samooplodnju. Spolnu zrelost dostiže u drugoj godini života. Razmnožavanje se odvija putem faze raspršivanja, a ličinka je pelagička. Kod takve vrste ličinačkog stadija to može biti slaba točka pri razmnožavanju vrste jer rani stadij razvoja je posebno osjetljiv na uvjete u okolišu, koji često znaju biti ekstremni. Iz tog razloga, vrijeme mriještenja odgovara optimalnim uvjetima okoliša. Endogeni čimbenici u samog školjkaša kao i okolišni čimbenici kontroliraju vrijeme i trajanje reproduktivnog ciklusa. No, malo je dostupnih informacija o ličinačkom stadiju ove vrste, te se pretpostavlja da se mrijest odvija krajem ljetnih mjeseci i početkom jeseni (Basso i sur., 2015.).

Embrionalni razvitak započinje spiralnim brazdanjem i razvijanjem trohoforme ličinke, zatim se iz trohoforme ličinke razvija veliger ličinka, koja tada, na leđnoj strani ima ljušturu, a na trbušnoj strani razvija se stopalo. Ličinke *P. nobilis* kada su u stupnju planktonske veliger ličinke plutaju vodenim stupcem do trenutka kada se smjeste na dno i pričvrste putem bisusnih niti. Nekoliko istraživanja iznosi da je potrebno razdoblje od 5-10 dana do pričvršćivanja, no ne može se sa sigurnošću reći koliko to razdoblje iznosi. Takva disperzija ličinki u vodenom stupcu može biti slaba točka populacije jer su ličinački stadiji posebno osjetljivi na ekstremne ekološke uvjete. U povoljnim uvjetima životni vijek *P. nobilis* je i do 50 godina (Habdija i sur., 2011.).

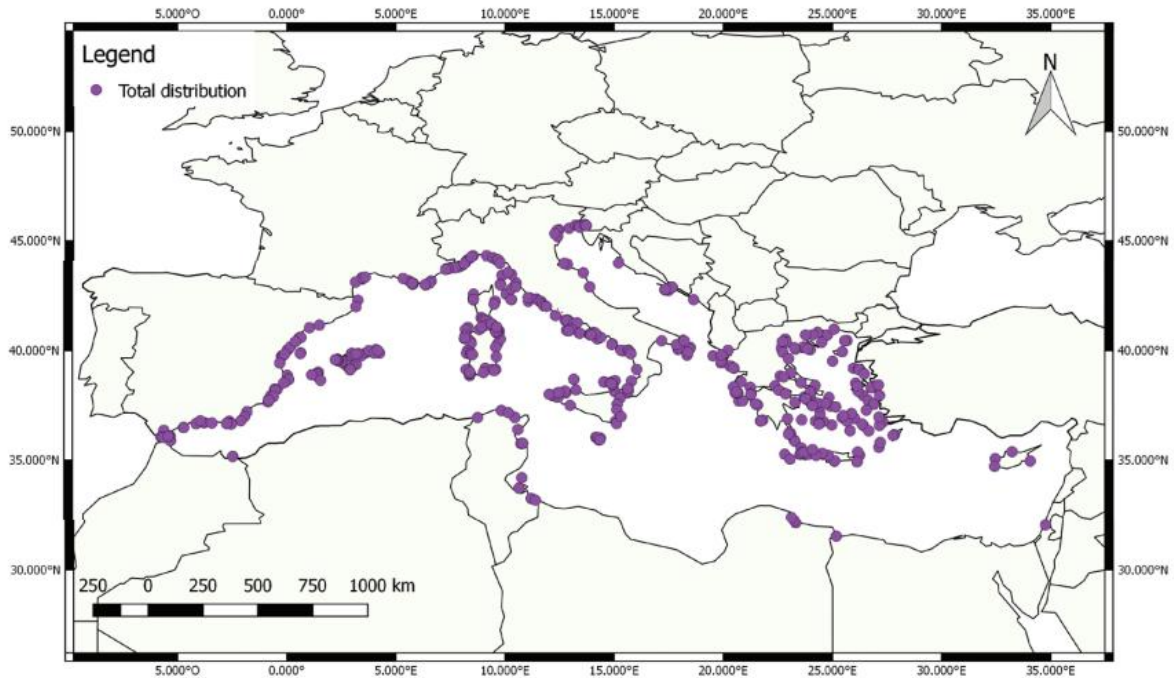
Filtratorski je organizam, odnosno koristi metodu suspenzijskog ili filtratorskog hranjenja gdje škrge pomoću svojih cilija koje se nalaze u traktu uklanjaju suspendirane čestice iz vode koja se pumpa kroz plaštanu šupljinu te koristi škrge za hranjenje, pa su se iz tog razloga kod organizama koji imaju takav način hranjenja škrge znatno povećale kako bi se mogle nositi s tom sekundarnom ulogom. Gosling (2003.) kaže: „U divljini se školjkaši hrane raznim suspendiranim česticama (seston) kao što su bakterije, fitoplankton, mikrozooplankton, detritus, ali i otopljenim organskim materijalom (DOM, od engl. Dissolved Organic Matter), kao što su

aminokiseline i šećeri.“. Upravo taj način hranjenja školjkaša ima veliku ekološku ulogu za područje u kojem se nalazi i u kojem filtrira velike količine detritusa i tako doprinosi prozirnosti vode. Ključan faktor u dostupnosti hrane je hidrodinamizam, a prostorna distribucija, orijentacija ljuštore kao i veličinska struktura doprinose pozitivno ili negativno utjecaju hidrodinamizma (Basso i sur., 2015.). Ljuštore *P. nobilis* osiguravaju tvrdi površinu unutar ekosustava s mekim dnom, koji je koloniziran od strane mnogih različitih bentoskih vrsta, a pri velikoj gustoći može stvoriti biološke grebene velike raznolikosti. Razne zajednice epibionata nalaze se na površini ove vrste, neke od njih su: mekušci (*Mollusca*), koji su ujedno i dominantni, zatim kolutičavci (*Annelida*), spužve (*Porifera*), rakovi (*Crustacea*), mješćinice (*Ascidacea*), žarnjaci (*Cnidaria*), bodljikaši (*Echinodermata*) i mahovnjaci (*Ectoprocta*). Osim toga, izdvojile su se i dvije vrste komenzalnih rakova pazikuća *Pontonia pinnophylax* (Otto, 1821.) i *Nepinnotheres pinnotheres* (Linnaeus, 1758.) (Basso i sur., 2015.). Također, igra ključnu ulogu u trofičkoj mreži, služeći kao plijen drugih vrsta, primjerice Obična hobotnica *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797.) (Rabaoui i sur., 2008.).

Nažalost, antropogeni utjecaj koji je u posljednjih nekoliko godina sve izraženiji ima utjecaj i na ovu vrstu tako da uzrokuje mortalitet jedinki ili populacije na određenom području. Od mehaničkog oštećenja primjenom raznih ribolovnih alata (mreže potegače) ili usred sidrenja (pogotovo u ljetnih mjeseci), do uništavanja staništa koje je uzrokovano eutrofikacijom obalnih područja (posljedica su hipoksija i anoksija) i onečišćenje okoliša.



### 1.3.1. Rasprostranjenost i gustoća *P. nobilis* u Sredozemnom moru



Slika 4. – Mapirani prikaz distribucije vrste *Pinna nobilis* na području Sredozemnog mora. Podaci su prikupljeni iz znanstvenih istraživanja, od strane NATURA 2000 Network Viewer-a, sive literature i dojava građana, i pretvoreni u kompletan prikaz (Marrocco i sur., 2019.) (Izvor slike: //doi.org/10.3897/natureconservation.33.30397)

Rasprostranjenost *P. nobilis* na osnovu 4 izvora podataka (NATURA 2000, Network Viewer, sive literature i dojava građana) pokazuje da je najveća rasprostranjenost na sjevero-istočnoj i sjevero-zapadnoj strani Sredozemnog mora. No, ne može se sa sigurnošću utvrditi je li na južnom dijelu mala rasprostranjenost ili su istraživački naponi koncentrirani samo na određenim područjima (Marrocco i sur., 2019.). Prema ostalim istraživanjima Egejsko more ima najveću gustoću, a slijedi ga Jadransko more, zatim Tirensko te Jonsko more. Najčešće su uočene u livadama *Cymodocea nodosa* i *Posidonia oceanica*. Isto tako, ustanovljen je trend smanjenja broja jedinki s povećanjem dubine, s time da je primijećena veća gustoća u prvih 10 – 12 metara (Basso i sur., 2015.).

### 1.3.2. Zaštita vrste

Mediterranski bazen je na udaru zagrijavanja, te to utječe na organizme koji se nalaze na tom području. Mijenjanjem temperature mora dolazi do pomaka u dostupnosti hrane zbog sve češćih cvjetanja fitoplanktona, pa samim time i povećanja broja planktona, a mijenja se i lokalna hidrodinamika, te je sve veća acidifikacija (Basso i sur., 2015.). Opasnost predstavljaju i invazivne vrste kojih je upravo zbog promjene temperature i globalnog transporta sve više na području Mediterana. Primjerice makroalga *Lophocladia lallemandii* koja potencijalno može utjecati na izvore hrane, a istraživanja su pokazala kako su markeri oksidativne štete pronađeni u škrgama i probavnoj žlijezdi periske, tako uzrokujući ovoj vrsti biološki stres. Poznato je kako je ova vrsta važno stanište za mnoge vrste kojima pruža tvrdi podlogu i koji imaju suživot s ovom vrstom. Od 2016. godine taj broj se još više smanjio s obzirom na „Masovni pomor periski“ (Mass Mortality Event - MME) (Cabanelas-Reboredo, 2019.). Tako je ova vrsta završila na IUCN-ovom popisu kritično ugroženih vrsta (engl. CR – Critical endangered). Još od 1992. godine prema Direktivi Europskog vijeća 92/43 / EEC o očuvanju prirodnih staništa i divlje faune i flore, *P. nobilis* je pod strogom zaštitom (Prilog IV.) (IUCN, 2019.) i kao ugrožena vrsta Protokolom o posebno zaštićenim područjima i biološkoj raznolikosti u Sredozemnom moru iz Barcelonske konvencije (Prilog II.). Stoga, svako namjerno hvatanje ili ubijanje primjeraka *P. nobilis* strogo je zabranjeno (Vazquez-Luis i sur., 2017.).

### 1.3.3. Masovni pomor

Prvo spominjanje masovnog pomora *P. nobilis* (engl. Mass mortality event, MME) dogodilo se u jesen 2016. godine (krajem rujna i početkom listopada) kada je gotovo istodobno otkrivena vrlo visoka smrtnost jedinki *P. nobilis* na nekoliko točaka u Sredozemnom moru, kod Španjolske, i to uzorci međusobno odvojeni nekoliko stotina kilometara. Vidljivi znakovi ove bolesti uključivali su simptome kao što je polagano zatvaranje ljuštura, recesiju plašta, gubitak snage sifona, smanjivanje mase i slično (Vazquez-Luis i sur., 2017.). Kod primijećenih umirućih jedinki uočene su početne patološke promjene koje su se povezivale s vrstom parazita iz roda *Haplosporidium*, tj. vrsta *Haplosporidium pinnae* (Šarić i sur., 2020.). Javljaju se faze

sporulacije u epitelu tubula probavne žlijezde, uključujući sporonte, sporociste (max. duljine do 30  $\mu\text{m}$ , s više od 50 spora) (Catanese i sur. 2018.). Dinamika rasprostranjenosti *H. pinnae* modulira se uvjetima okoliša, tj. nakon dolaska pomoću struja na određeno područje parazit je podložan uvjetima u tom okolišu. Prema istraživanjima, izražavanje bolesti povezano je s temperaturom koja iznosi iznad 13.5 °C i rasponom saliniteta od 36.5 – 39.7 psu (Cabanellas-Reboredo i sur., 2019.).

Nije trebalo puno vremena da se ubrzo primijete znakovi MME-a i u cijelom mediteranskom bazenu. Duž obala Francuske, zatim Grčke, Cipra, Italije pa i sjeverne Afrike. Osim parazita iz roda *Haplosporidium*, nekoliko slučajeva uočenih u Italiji, Grčkoj i Španjolskoj povezano je i s bakterijama iz roda *Mycobacterium sp.* Daljnja ispitivanja potvrdila su kako u onih jedinki koje su bile zaražene nekim od tih parazita (*Mycobacterium*, *Haplosporidium*, *Vibrio spp.* i *Perkinsus sp.*) nije pronađen isključivo jedan, već dva ili više patogena u jedinki, što je povećavalo složenost patogeneze bolesti.

Prvi zabilježen slučaj na hrvatskoj obali Jadrana zabilježen je u proljeće 2019. godine na najjužnijem dijelu, odnosno blizu poluotoka Pelješca, da bi se sredinom ljeta odnosno u kolovozu zamijetilo još novih slučajeva oko 300 km od prethodne lokacije, odnosno na sjeverozapadnoj strani Dugog otoka (plaža Sakarun). Već krajem ljeta i početkom jeseni iste godine potvrđeni su i ostali slučajevi MME-a u srednjem Jadranu s tendencijom širenja sjevernije (Šarić i sur., 2020.).

#### **1.4. Filogenija**

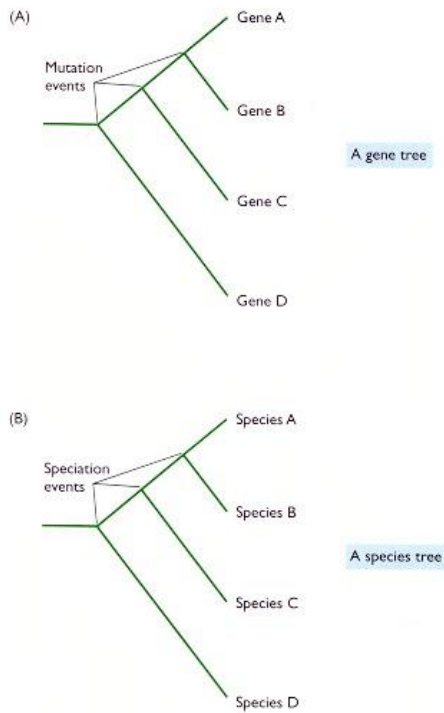
Filogenija je područje biologije koje se bavi proučavanjem evolucijskih odnosa između vrsta ili nekih drugih taksonomskih jedinica organizama. Najbolji uvid u evolucijsku povijest organizama na Zemlji daju fosilni zapisi. No, s obzirom da zapisi najčešće nisu potpuni i nalaze se u fragmentima, usporedba je prije razvitka tehnologije mogla biti morfološka i fiziološka, te su se radile pretpostavke i nije se moglo napraviti detaljno filogenetsko stablo (Nei i Kumar, 2000.).

Prvotno je Linnaeus u 18. stoljeću prakticirao tradicionalne metode za razvrstavanje organizama prema njihovim sličnostima i razlikama. Postavio je okvir za kasnije

evolucijske sheme tako da je dijelio organizme u hijerarhijski niz taksonomskih kategorija, počevši od carstva i napredujući prema dolje kroz koljeno, razred, red, porodicu do roda i vrste. To je bilo morfološke prirode, a molekularni podaci predstavljeni su 1904. godine, kada je George Nuttall koristio imunološke testove, a jedan od njegovih ciljeva je bio smjestiti ljude u njihov ispravan evolucijski položaj u odnosu na druge primare. Iako, pristup nije bio široko prihvaćen do kasnih 1950-ih godina uglavnom zbog tehničkih ograničenja.

Za molekularnu filogenetiku, sljedovi proteina i DNA molekula pružaju najdetaljnije i najnedvosmislenije podatke. Danas je uz dostupnost sekvenciranja DNA molekula postala prevladavajuća u odnosu na proteinske sekvence, uglavnom zato što DNA daje više filogenetskih informacija od proteina. Naime, nukleotidni sljedovi para homolognih gena imaju veći sadržaj informacija od sekvenci aminokiselina odgovarajućih proteina. Nakon što se naprave molekularne analize, cilj većine filogenetskih istraživanja je mogućnost rekonstrukcije filogenetskih stabala koji služe kako bi se opisali evolucijski odnosi između proučavanih organizama. Kod rekonstrukcije filogenetskih stabala najčešće se dodaje jedna vanjska skupina (engl. „outgroup“), a to je homologni gen za koji znamo da je manje povezan s prethodnima koje smo unijeli u analizu. Ovakva stabla, odnosno genska stabla koja su temeljena na molekularnim podacima, imaju prednost pred stablima koja su dobivena morfološkim usporedbama. Međutim, stablo gena nije isto što i stablo vrste, jer unutarnji čvorovi u stablu nisu ekvivalentni. Na slici 5. je prikazana razlika između stabla gena i vrste, odnosno kod stabla gena unutarnji čvor predstavlja divergenciju gena predaka u dva različita gena s različitim sekvencama DNA i uzrok tome je mutacija.

S druge strane, kod stabla vrste unutarnji čvor predstavlja događaj specijacije. Do specijacije dođe nakon što se populacija predaka podijeli u dvije skupine koje se ne mogu križati (primjerice ako su skupine geografski izolirane) (Brown, 2002.).



Mutacija i specijacija se ne događaju istovremeno, mutacija bi čak mogla prethoditi specijaciji, a time se zaključuje da su početno oba alela gena prisutna kod još nepodijeljene populacije predaka. Kada i dođe do podjele populacije, oba alela će vjerojatno biti prisutna u svakoj od dvije skupine, a nakon podjele nove populacije mutiraju i razvijaju se neovisno (Brown, 2002.).

Slika 5. – razlika između rekonstrukcijskog stabla gena (A) i stabla vrste (B). (Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21122/figure/A8890/?report=objectonly>)

## 1.5. Populacijska genetika

Populacijska genetika bavi se proučavanjem genetskog sastava populacija, uključujući distribucije i promjene u učestalosti genotipova i fenotipova kao odgovor na procese prirodne selekcije, genetski drift, mutacije i protok gena. Prilikom proučavanja koristi se principima koji se prikazuju kroz matematičko-statističke metode. Jedno od popularnijih je Hardy-Weinbergovo pravilo, nazvano po engleskom matematičaru Hardyju, te njemačkom liječniku Weinbergu koji su ovo pravilo ustanovili neovisno jedan o drugome 1908. godine. Ovo pravilo prikazuje da u velikoj populaciji u kojoj dolazi do panmiksije (slučajnog parenja), frekvencije gena i genotipova su stalne, odnosno postižu ravnotežu. Ovo pravilo vrijedi samo za populacije u kojima se ne događaju mutacije, migracije, genetski drift i prirodna selekcija. Ukoliko se događaju takve promjene, populacija se nalazi u genskoj neravnoteži, a to ukazuje na evolucijsku promjenu (Pavlica, 2012.). Slučajno parenje ili panmiksija jedan je od teorijskih čimbenika pri čemu u prirodnim populacijama svaki član ima jednaku šansu da se pari s bilo kojim drugim članom u populaciji.

Važan evolucijski čimbenik je i prirodna selekcija koja se događa kada neke varijante u populaciji nadvladaju druge varijante kao rezultat bolje prilagođenosti okolišu i tako imaju utjecaj na genetski sastav populacije (Okasha, 2008.). Kada u populaciji nevezano s prirodnom selekcijom, slučajno dođe do gubitka alela to se naziva genetski otklon („drift“). Važan čimbenik je veličina populacije s obzirom da kod manjih populacija dolazi do veće mogućnosti za genetski drift. U prirodi dolazi do drastične redukcije populacije izazvane raznim prirodnim katastrofama, primjerice kod *Pinna nobilis* u prethodno spomenutom masovnom pomoru (MME), ili nekim antropogenim djelovanjem populacije prolaze kroz Učinak uskog grla (engl. bottleneck effect) i preživljavaju samo jedinke određenih genotipova i u tom slučaju dolazi do smanjenja varijabilnosti gena u populaciji (Pavlica, 2012.). Mutacije su nasljedne i nasumične promjene genetskog materijala koje se mogu javiti spontano ili pod utjecajem specifičnih fizičkih, kemijskih ili bioloških čimbenika. Mutacije su izvor novih alela, pa to rezultira povećanom genetskom raznolikošću. S druge strane, mutacije mogu biti čimbenik za prirodnu selekciju (Altukhov, 2006.).

Što se tiče prostorne podjele populacija važno je spomenuti migracije, gdje se manja grupa jedinki odvoji od glavne populacije s ciljem osnivanja nove kolonije na drugoj (novoj) geografskoj lokaciji (Pavlica, 2012.). Često se u literaturi spominje otočni model populacijske strukture, koji se može podijeliti na dva primjera. Kod jednog primjera događa se podjela vrste na veliki broj (beskonačan) gdje su nasumično parene subpopulacije, od kojih svaka ima jednaku vjerojatnost i identičan intenzitet razmjene gena sa zajedničkim genskim fondom, tzv. „gene pool“. S druge strane, može biti velika panmiktička populacija (za pojednostavljenje možemo je predstaviti kao „kopno“) koja je okružena velikim brojem izoliranih genetski diferenciranih malih kolonija („otoka“) od kojih svaka kolonija prima gene s „kopna“ (Altukhov, 2006.). Ovakav primjer raspodjele populacija nazivamo i učinak utemeljitelja (engl. founder effect). Za posljedicu ovakva preraspodjela ima smanjenje genetske varijabilnosti, te promjenu učestalosti alela u „otočnoj“ populaciji (Pavlica, 2012.). Nedavna istraživanja govore o tome da su današnje stope izumiranja 100 do 1000 puta veće no što su bile prije antropogenog utjecaja. To se odnosi na različite tipove staništa i taksonomski raznolike skupine. Nažalost, kako vrijeme protječe stopa izumiranja se ubrzava. U najvećoj mjeri takva izumiranja uzrokovana su antropogenim aktivnostima (onečišćenje okoliša, prekomjerno iskorištavanje, gubitak

staništa kao posljedica, te globalne promjene). Zbog takvog pritiska na ekosustav, te i na same populacije može doći do izolacije populacija, a samim time i smanjenjem veličine same populacije da bi rezultat bio gubitak genetske raznolikosti. Važna interdisciplinarna grana populacijske genetike je konzervacijska genetika kojoj je cilj proučavati (razumjeti) dinamiku gena kako bi se u konačnici izbjeglo izumiranje. Genetska raznolikost je pokazatelj razine rizika od izumiranja, što znači da velika genetska raznolikost povećava stabilnost ekosustava, a upravo održavanje visoke razine genetske raznolikosti jedan je od glavnih ciljeva za očuvanje populacija i biološke raznolikosti (Peyran i sur., 2021.). Kako bismo mogli analizirati genetski sastav populacija, potrebni su molekularni markeri. Tri najčešće korištena su citokrom oksidaza I (COI), mikrosateliti i 16S rDNA marker. U daljnjem tekstu opisana je citokrom oksidaza I kao marker koji je korišten u ovom istraživanju.

### **1.5.1. Citokrom oksidaza I**

Deoksiribonukleinska kiselina (DNA) je molekula koja u sebi sadrži biološke upute koje su za svaku vrstu jedinstvene (NHGRI, 2020.). Unutar životinjske stanice DNA možemo pronaći na dva mjesta; u mitohondrijima i onda se ona naziva mitohondrijska DNA (mtDNA) i njena dužina iznosi oko 15 do 20 kilobaza. Drugo mjesto je u jezgri i ona se naziva nuklearna DNA (nDNA) i čini 99.9% sve stanične DNA. Budući da će u ovom radu biti riječ o molekularnom markeru Citokrom oksidaza I, koji je gen mtDNA, bitno je nabrojati neke značajke po čemu se mtDNA izdvaja. Naime, mtDNA ima način nasljeđivanja koji je prvenstveno po majčinoj liniji što znači da sve jedinke s određenim genotipom mtDNA najvjerojatnije pripadaju istom majčinom klonu. Isto tako, mtDNA evoluirala je pet do deset puta brže od nDNA, i upravo zbog veće stope mutacije veća je vjerojatnost da će pokazati razlike između populacija ili vrsta (Gosling, 2003.).

DNA barkodiranje, odnosno identifikacija taksona korištenjem kratkih univerzalnih sekvenci, omogućava identifikaciju vrste iz uzorka. Kratki fragmenti DNA koji opstaju u okolišu mogu ujedno omogućiti procjenu lokalne biološke raznolikosti iz tla ili vode. Za životinje je predložena genska regija od 658 parova baza u genu koji kodira mitohondrijska citokrom oksidaza podjedinica I (Valentini i sur., 2009.).

Citokrom oksidaza podjedinica I (u nastavku COI) gen je mtDNA koji se koristi za različite evolucijske analize. To je mitohondrijski periferni membranski protein kojemu je zadaća da prenosi elektrone tijekom oksidativne fosforilacije (Cooper i Hausman, 1939.). Termostabilan je i relativno otporan na denaturaciju (Keilin i Hartree, 1939.). Također, jedan je od najpopularnijih markera koji se primjenjuje u populacijskoj genetici, kao i za filogeografska istraživanja širom životinjskog carstva (Derycke i sur., 2010.). Bez obzira na varijabilnost rasporeda gena i njegovog broja, među bilateralnim životinjama postoji visok stupanj očuvanosti sastava i broja gena koji kodiraju bjelančevine mitohondrija (Pietan i sur., 2016.).

## 1.6. Populacijska genetika *P. nobilis*

U radu Peyran i sur., 2021., u Lionskom zaljevu (franc. Golfe du Lion), koji se nalazi na južnoj obali Francuske, napravljena je analiza 960 uzoraka *P. nobilis* uzorkovanih na 8 lokaliteta s različitim okolišnim uvjetima. Populacija se pokazala homogenom na cijelom području uzorkovanja, uključujući i uzorke iz zatvorenih laguna i luka. Ti rezultati upućuju na to da sve uzorkovane jedinke *P. nobilis* pripadaju velikoj homogenoj populaciji u Lionskom zaljevu. Rezultati podržavaju hipotezu o velikoj efektivnoj veličini populacije koja odražava visok polimorfizam, čak i uz prisutnost fragmentiranih i izoliranih staništa. Ova hipoteza je uobičajena kod morskih sesilnih vrsta koje imaju vanjsku reprodukciju. Naime, jedinke počnu sinkronizirati oslobađanje svojih gameta s ciljem osiguravanja što veće vjerojatnosti uspješne vanjske oplodnje (Mendo i sur., 2014.).

S obzirom na to da je *P. nobilis* uzastopni hermafrodit (objašnjeno u poglavlju 1.3.), a iz istraživanja u zaljevu Alfacs (Španjolska) dobiveni su podatci da se oko 38% jedinki iz kontroliranih uvjeta, te 20% iz divlje populacije, pojavilo kao istovremeno muškog i ženskog spola, što je dovelo do samooplodnje (Prado i sur., 2020.). Ovakav načina razmnožavanja može smanjiti genetsku raznolikost i poticati veće stope inbreedinga, odnosno parenje genetički-srodnih jedinki (Peyran i sur., 2021.). Posljedica parenja u srodstvu uzrokuje malu zalihu gena, zbog genetički sličnih jedinki. Također, smanjuje se fitness jedinki (sposobnost preživljavanja i razmnožavanja) kod prirodnih populacija zbog homozigotnih potomaka. Svi ti



čimbenici vode do smanjenja reproduktivnog uspjeha populacije, odnosno smanjivanje veličine populacije (Pavlica, 2012.). Velika stopa genetske raznolikosti vodi k tome da postoji i velika stopa mrijesta, a održavanje visoke genetske raznolikosti je temelj očuvanja vrste jer genetska raznolikost čuva sposobnost vrste da se lakše prilagodi promjenama u okolišu i povećava se otpornost populacije (Peyran i sur, 2021.).

## **1.7. Cilj istraživanja**

Ciljevi istraživanja su:

- analiza prikupljenih DNA sekvenci molekularnog markera Citokrom oksidaza podjedinica I (COI) Plemenite periske (*Pinna nobilis*) u svrhu proučavanja populacijske genetike ove vrste,
- kroz konstrukciju filogenetskog stabla uvidjeti evolucijske odnose između uzorkovanih jedinki,
- usporedba naših uzoraka s uzorcima iz ostatka Mediterana.

## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. Uzorci

DNA sljedovi korišteni u ovom radu dobiveni su kao rezultati HRZZ projekta pod nazivom DNA barkodiranje bioraznolikosti hrvatske faune (IP-2016-06-9988). Uzorci školjkaša iz kojih potječu korišteni COI DNA sljedovi uzorkovani su tijekom 2018. i 2019. godine na lokacijama prikazanima na slici 6.



Slika 6. – Lokacije uzorkovanja *P. nobilis*. (Izvor: arhiva HRZZ projekta: DNA barkodiranje bioraznolikosti hrvatske faune (IP-2016-06-9988)).

U istraživanju je korišteno 47 uzoraka koji su prikupljeni na 7 lokacija duž hrvatske obale i otoka Jadranskog mora.

## 2.2. Analiza DNA sljedova

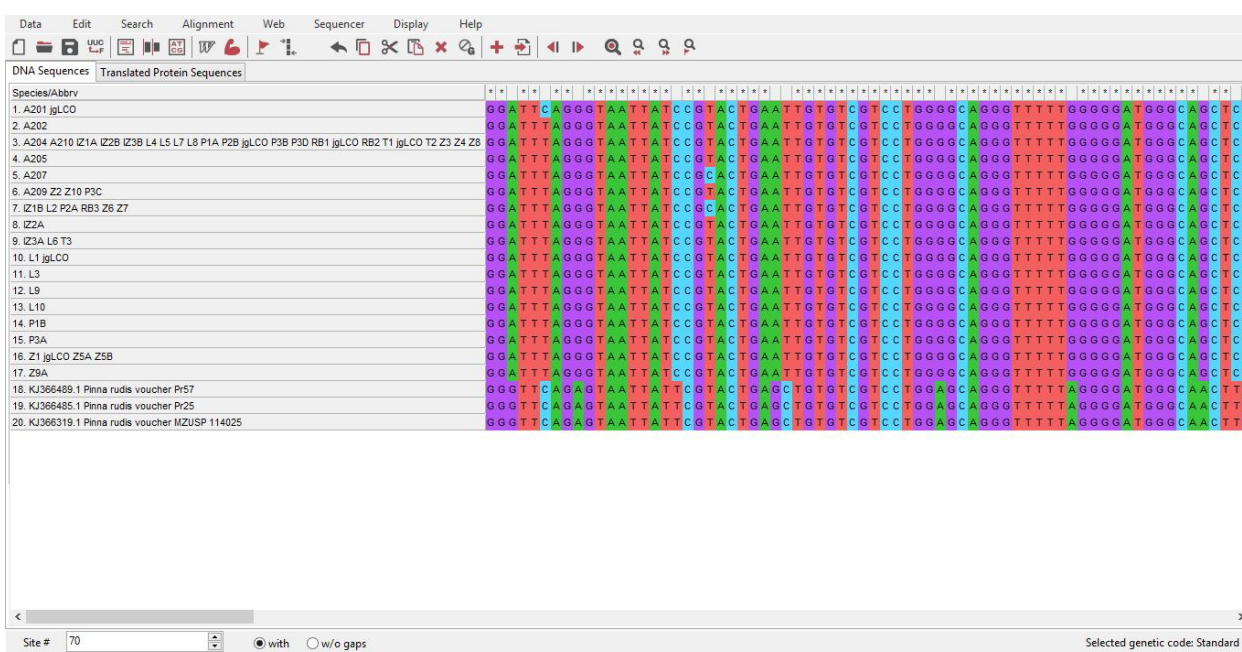
Za potrebe analize podataka korišten je programski paket MEGA-X verzija 10.2.4., koji pruža alate za istraživanje i analizu DNA i proteinskih sekvenci iz evolucijske perspektive (Kumar i sur., 2018.). Sekvence su formatirane u FASTA tekstualni format, u kojem su parovi baza ili aminokiseline predstavljeni pomoću jednoslovnih IUPAC (The International Union of Pure and Applied Chemistry) kodova. Zatim pomoću BLAST-a (The Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul i sur., 1990.), koji pronalazi regije sličnosti između bioloških sekvenci, koristeći A204 (jednu od najčešćih), od *P. nobilis* sekvenci za pretraživanje, iz NCBI nukleotidne baze (NCBI, 2004.), izvučene su tri sekvence vrste *Pinna rudis* koje su korištene kao vanjska skupina, za potrebe ukorjenjivanja filogenetskog stabla.

FASTA datoteka je zatim otvorena u MEGA programskom paketu i sljedovi su poravnati (engl. Alignment) pomoću ClustalW metode (Thompson i sur., 1994.). ClustalW je sustav za poravnavanje bilo kojeg broja homolognih nukleotidnih ili proteinskih sekvenci (Thompson i sur., 1994.). ClustalW u praksi je široko korišten sustav koji može biti zaseban, a u ovom slučaju korišten je u sklopu MEGA programskog paketa (Tamura i sur., 2011.). Prije početka sravnjivanja, svim sljedovima odrezani su krajevi na način da svi sljedovi budu jednake duljine, odnosno da počinju i završavaju na istom homolognom nukleotidu. Poravnati sljedovi su zatim korišteni za konstrukciju filogenetskog stabla, koristeći Neighbour-Joining metodu (Nei i Kumar, 2000.). Napravljena je i analiza podržanosti (engl. Bootstrap) od 1000 ponavljanja, radi utvrđivanja kvalitete, odnosno reproducibilnosti konstruiranog filogenetskog stabla (Nei i Kumar, 2000.). Ova metoda ne utječe na razmještaj grana na stablu, tj. na točnost razmještaja. Također, filogenetska mreža dobivena metodom najveće štedljivosti (engl. maximum parsimony) napravljena je u TCS 1.21 programu, koji je računalni program za procjenu genealogije gena, odnosno praćenja evolucijskih odnosa među haplotipovima (Clement i sur., 2000.). Kako bi promjene u nukleotidnom sljedu lakše vizualizirali napravljena je tablica (Tablica 1) s prikazom vrste i brojem promjena u DNA sljedovima koja prikazuje distribuciju različitosti u odnosu na najčešći haplotip (koji ujedno predstavlja i konsenzus svih utvrđenih haplotipova).

### 3. REZULTATI I RASPRAVA

#### 3.1. Konstrukcija filogenetskih stabala

Pomoću MEGA-X programskog paketa napravljeno je višestruko poravnanje (engl. Multiple alignment) 47 uzoraka<sup>1</sup> COI sljedova 3 uzorka vrste *Pinna rudis* preuzete iz NCBI nukleotidne baze podataka. Identični sljedovi grupirani su zajedno i predstavljeni samo jednom sekvencom. Podrijetlo sljedova vidljivo je iz naziva, a početak višestruko poravnatih sljedova vidljiv je na slici 7.

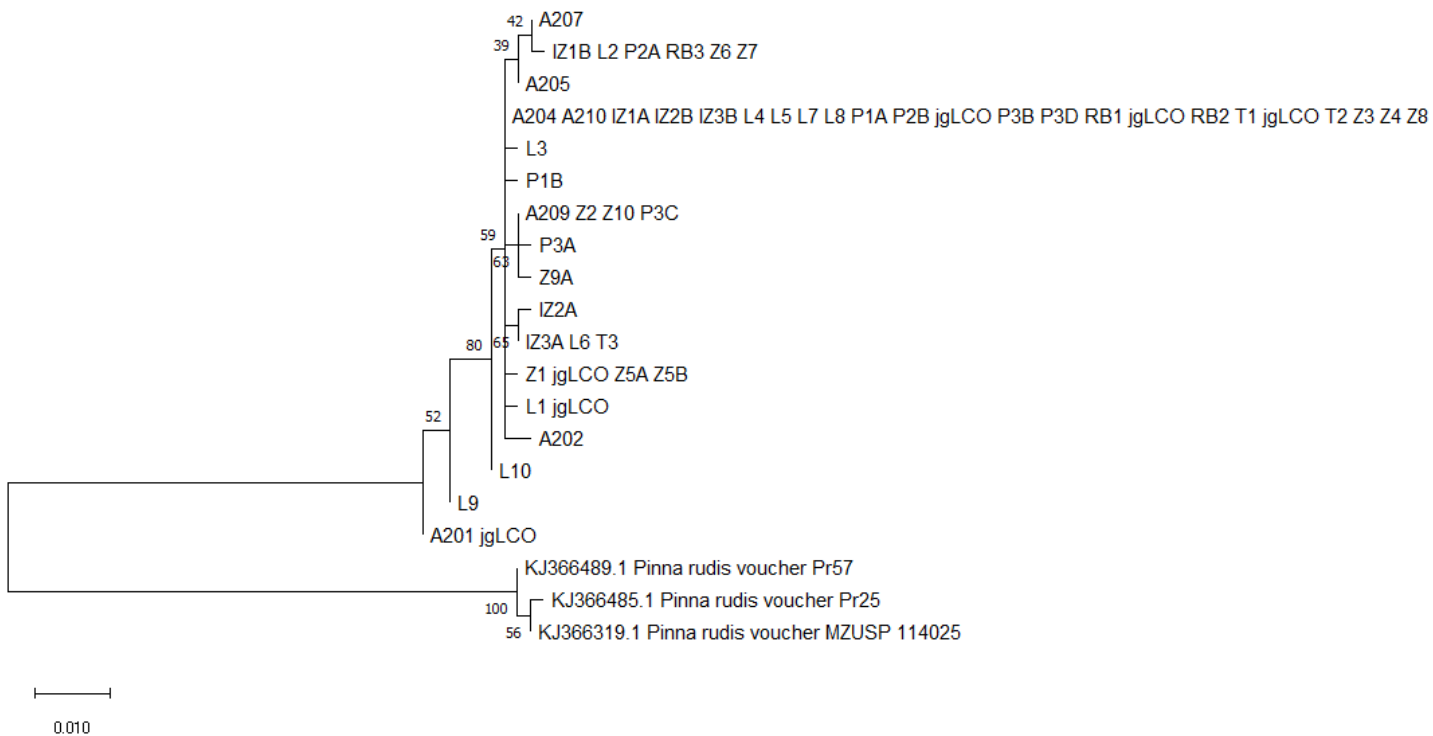


Slika 7.– Početak višestruko poravnanih sljedova nukleotida *P. nobilis* i vanjske skupine *Pinna rudis* pomoću ClustalW alata u MEGA-X programu. S lijeve strane nalaze se nazivi sekvenci prema postajama na kojima su uzorci uzeti. Zvezdice (\*) koje se nalaze pri samom vrhu označavaju da se na tom mjestu u svim sljedovima nalazi isti nukleotid, odnosno označava potpunu konzerviranost dotičnog mjesta, dok na mjestima gdje oznake (\*) nema vidljiva je određena raznolikost u sljedovima. Duljina poravnatih sljedova iznosi 553 bp.

<sup>1</sup> Iako se u analiziranim podacima pojavljuje 48 različitih naziva DNA sljedova, ustvari se radi o 47 različitih uzoraka, jer je uzorak jedinke Z5 sekvenciran dva puta pa se u analizi pojavljuje kao Z5A i Z5B.

Prilikom konstrukcije filogenetskog stabla korištena je „Bootstrap“ metoda, te je vidljivo jasno razdvajanje dviju različitih vrsta, odnosno vrste *Pinna nobilis* i *Pinna rudis*, a podržanost grananja je relativno slaba što je rezultat velike međusobne sličnosti naših uzoraka. Ako je „bootstrap“ vrijednost, odnosno broj uz grananje manji, time je i grananje nepouzdanije. Na ovom filogenetskom stablu vidimo da jedino vanjska skupina ima vrijednost bootstrapa od 100%, što znači da je jedino ovo grananje u potpunosti pouzdano (slika 8).

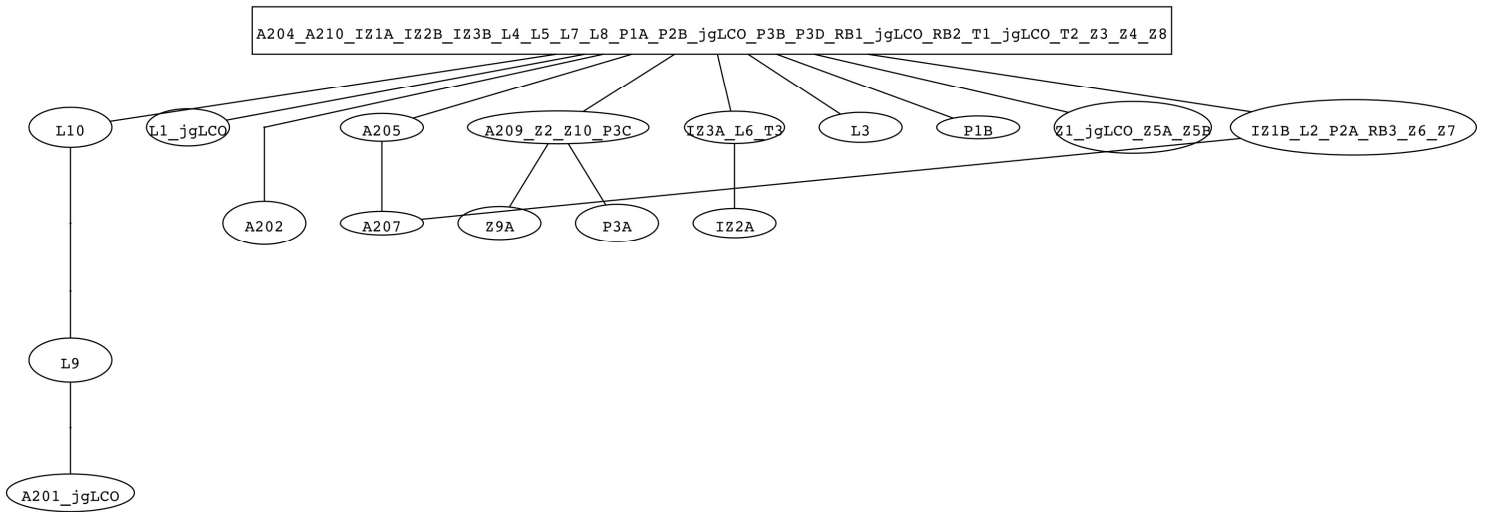
Ako ovo filogenetsko stablo sagledamo kroz tablično prikazane promjene (tablica 1), osim jednog izuzetka, sve ostale promjene su tihe mutacije koje ne mijenjaju kodiranu aminokiselinu, što vrlo jasno pokazuje da su svi ovi uzorci u bliskom srodstvu, što je ujedno i temelj za slabu podržanost grananja i za neznatne evolucijske udaljenosti vidljive iz filogenetskog stabla. Sličan obrazac pokazuje i istraživanje na 25 lokacija diljem Mediterana (Sanna i sur., 2013.), gdje se pokazuju genske varijabilnosti između regija Sardinija-Korzika, otok Elba, Sicilija i Venecijanska laguna u odnosu na regiju Egejskog mora i Tuniške obale. Naime, samo jedna točkasta mutacija odvaja egejske i tuniške uzorke od onih sa Sardinije-Korzike, otoka Elbe, Sicilije i Venecijanske lagune, što je još jedan dokaz povezanosti podrijetla populacija periski diljem regija Mediterana.



Slika 8. – Filogenetsko stablo dobiveno pomoću Neighbour-joining metode i analize podržanosti (engl. Bootstrap) u MEGA-X programu. Za potrebe ukorjenjivanja korištena je tzv. vanjskaskupina od 3 nukleotidna slijeda vrste *Pinna rudis*. Početna slova u nazivima sekvenci predstavljaju: Z – Zambratija, RB – Rovinj, T – Tunarica, L – Ližnjan, IZ – Iž, P – Pirovac, A – Telašćica. Broj i slovo iza broja označavaju redni broj uzorka na određenoj lokaciji. Na dnu slike prikazano je mjerilo (0.010) koje povezuje duljinu ogranaka s brojem supstitucija po nukleotidu. Za testiranje pouzdanosti filogenetskog stabla učinjeno je 1000 ponavljanja. Horizontalne grane stabla prikazuju filogenetske razlike među sekvencama. Što je horizontalna grana duža, to je veća različitost sekvenci.

Prilikom konstrukcije filogenetske mreže (slika 9), koja prikazuje mrežu haplotipova, izdvaja se velika grupa uzoraka (A204) koja je ujedno i ishodišni haplotip iz kojeg su evoluirali svi ostali uzorci. Također, većina uzoraka je blisko povezana osim uzoraka A201 jgLCO i L9 koji su uzorci s najviše promjena, odnosno mutacija što je prikazano u nastavku u tablici 1. Isto tako, uzorci A205 i A207 su međusobno povezani, a dijeli ih jedna tiha mutacija više kod uzorka A207. Grupa uzoraka IZ1B i uzorak A207 također se razlikuju po samo jednoj tihoj mutaciji. Prema međusobnoj povezanosti u

filogenetskoj mreži zaključujemo da je haplotip A207 najvjerojatnije nastao ili iz A205 ili iz IZ1B.



Slika 9. – Prikaz filogenetske mreže konstruirane u TCS 1.21 programu metodom najveće štedljivosti (engl. Maximum parsimony) (Clement i sur., 2000.). Haplotipovi koji su razdvojeni s više mutacijskih koraka ostaju nepovezani, u ovom slučaju to je vanjska skupina *Pinna rudis* koja na slici nije prikazana radi jasnijeg prikaza odnosa između naših uzoraka.

### 3.2. Tablični prikaz promjena

Najveća skupina sekvenci (A204) predstavlja konsenzus kod obrade naših podataka, a isto tako to dokazuje da je upravo ta skupina ishodišni haplotip za većinu uzorkovanih sekvenci. Iz rezultata je vidljiva niska diferencijacija među haplotipovima (tablica 1) s obzirom na samo jednu (IZ2A) točkastu mutaciju koja uzrokuje promjenu jedne aminokiseline u proteinu. Dok se kod tih mutacija izdvajaju 2 uzorka, A201 jgLCO (8 mutacija) i L9 (4 mutacije) kod kojih je primijećen veći broj tih mutacija u

odnosu na ostale uzorke, međutim ove mutacije ne utječu na promjene u genskom produktu. No, na filogenetskom stablu i u filogenetskoj mreži ti uzorci se izdvajaju od ostalih zbog većeg broja tih mutacija.

**Tablica 1.** – Distribucija različitosti u odnosu na konsenzus između svih uzoraka DNA sekvenci. U tablici su prikazane promjene u nukleotidnom slijedu za pojedine sekvence, ukupno mutacija po pojedinoj sekvenci te zasebno točkaste mutacije (Missense mutacije), koje mijenjaju aminokiselinu, i tihe mutacije, koje ne utječu na genski produkt, tj. sekvenca proteina se ne mijenja. Na prvoj bazi je ukupno od svih uzoraka 5 mutacija, od toga samo jedna Missense mutacija, na drugoj bazi nije pronađena nijedna mutacija, dok na trećoj bazi ukupnih je 27 mutacija od čega nijedna Missense mutacija.

	Uzorci	Ukupno	Missense mutacije	Tihe mutacije	1.baza	2.baza	3.baza
1.	A201 jgLCO	8	0	8	0	0	8
2.	A202	2	0	2	1	0	1
3.	A204A210 IZ1A IZ2B IZ3B L4 L5 L7 L8 P1A P2B jgLCO P3B P3D RB1 jgLCO RB2 T1 jgLCO T2 Z3 Z4 Z8	0	0	0	0	0	0
4.	A205	1	0	1	1	0	0
5.	A207	2	0	2	1	0	1
6.	A209 Z2 Z10 P3C	1	0	1	0	0	1
7.	IZ1B L2 P2A RB3 Z6 Z7	1	0	1	0	0	1
8.	IZ2A	3	1	2	2	0	1
9.	IZ3A L6 T3	1	0	1	0	0	1
10.	L1 jgLCO	1	0	1	0	0	1
11.	L3	1	0	1	0	0	1
12.	L9	4	0	4	0	0	4



13.	L10	1	0	1	0	0	1
14.	P1B	1	0	1	0	0	1
15.	P3A	2	0	2	0	0	2
16.	Z1 jgLCO Z5	1	0	1	0	0	1
17.	Z9A	2	0	2	0	0	2
<b>PROMJENE UKUPNO</b>		<b>32</b>	<b>1</b>	<b>31</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>27</b>

### 3.3. Usporedba sa sljedovima iz ostalih regija Mediterana

Radi boljeg prikaza bliske povezanosti naših uzoraka s ostatkom uzoraka iz ostalih regija Mediterana, uspoređeni su pojedini uzorci, odnosno skupine uzoraka, gdje je jasno vidljiva učestalost ponavljanja određenih sekvenci uzorkovanih u različitim regijama Mediterana (tablica 2). S potpunom regijom preklapanja (1-553 bp) 76 % naših periski ima 100% podudaranje sa sekvencama koje su već od prije deponirane u NCBI bazi, a potječu iz drugih regija u Mediteranu. S druge strane, 100% podudaranje no s kraćim brojem nukleotida, odnosno regijom preklapanja od 328-553 ima 91% naših sekvenci, a to također pokazuje veliku povezanost naših sekvenci s onima u ostatku Mediterana.

**Tablica 2.** – Prikaz uzoraka s potpunim preklapanjem (1-553) i djelomičnim preklapanjem, duljine 225 nukleotida (328-553) te duljine 306 nukleotida (247-553), u odnosu na uzorke ostalih regija Mediterana. S desne strane nalazi se pristupni broj (poveznica) putem kojeg se može pristupiti opisu sekvenci na stranici NCBI baze podataka, regija preklapanja naših sekvenci i uspoređivanih te lokacija uzorkovanja uspoređivanih uzoraka.

	Uzorci (553 nukl.)	100% identične sekvence (pristupni broj u NCBI bazi, regija preklapanja, lokacija)
1.	A201 jgLCO	/
2.	A202	<a href="#">gi 1208596071 KY321757.1</a> , 1-553, Banyuls, Španjolska <a href="#">gi 490150483 JX854923.1</a> , 328-553, Korzika (Isola Piana), Francuska
3.	A204 A210 IZ1A IZ2B IZ3B L4 L5 L7 L8 P1A P2B jgLCO P3B P3D RB1 jgLCO RB2 T1 jgLCO T2 Z3 Z4 Z8	<a href="#">gi 1208596069 KY321756.1</a> , 1-553, Banyuls, Španjolska <a href="#">gi 146186356 EF536827.1</a> , 247-553, Epanomi, Grčka *JX854977.1 - JX854788.1
4.	A205	*JX854977.1 - JX854788.1
5.	A207	*JX854977.1 - JX854788.1
6.	A209 Z2 Z10 P3C	<a href="#">gi 1208596095 KY321769.1</a> , 1-553, Murcia, Španjolska *JX854977.1 - JX854788.1
7.	IZ1B L2 P2A RB3 Z6 Z7	<a href="#">gi 1208596129 KY321786.1</a> 1-553, Mallorca, Španjolska <a href="#">gi 146186356 EF536827.1</a> , 247-553, Epanomi, Grčka *JX854977.1 - JX854788.1
8.	IZ2A	/
9.	IZ3A L6 T3	<a href="#">gi 1208596141 KY321792.1</a> , 1-553, Alicante, Španjolska <a href="#">gi 490150285 JX854824.1</a> , 328-553, Sardinija, Ospedale Marino, Italija
10.	L1 jgLCO	<a href="#">gi 146186356 EF536827.1</a> , 247-553, Epanomi, Grčka *JX854977.1 - JX854788.1
11.	L3	<a href="#">gi 1208596081 KY321762.1</a> , 1-553, Ibiza, Španjolska <a href="#">gi 146186356 EF536827.1</a> , 247-553, Epanomi, Grčka *JX854977.1 - JX854788.1
12.	L9	/
13.	L10	<a href="#">gi 146186356 EF536827.1</a> , 247-553, Epanomi, Grčka *JX854977.1 - JX854788.1
14.	P1B	*JX854977.1 - JX854788.1
15.	P3A	/
16.	Z1 jgLCO Z5	<a href="#">gi 1208596105 KY321774.1</a> , 1-553, Mallorca, Španjolska <a href="#">gi 90797173 DQ448216.1</a> , 203-553, Epanomi-Thermaikos, Grčka <a href="#">gi 574455138 KF612603.1</a> , 328-553, laguna Bizerte, Tunis <a href="#">gi 490150633 JX854998.1</a> , 328-553, otok Elba (Capo Enfolo), Italija <a href="#">gi 490150395 JX854879.1</a> , 328-553, Sardinija, Oristano (Sa Mardini i

		Torre Vecchia), Italija <a href="#">gi 490150377 JX854870.1</a> , 328-553, Sardinija, Oristano (Sa Mardini i Torre Vecchia), Italija <a href="#">gi 490150367 JX854865.1</a> , 328-553, Sardinija, Porto Ottiolu, Italija <a href="#">gi 490150237 JX854800.1</a> , 328-553, Sardinija, Baia di Porto Conte, Italija <a href="#">gi 490150233 JX854798.1</a> , 328-553, Sardinija, Baia di Porto Conte, Italija
17.	Z9A	*JX854977.1 - JX854788.1

\*8 sekvenci (regija preklapanja: 328-553) JX854977.1 - JX854788.1 uzorkovane na 7 lokacija u Italiji sa pristupnim poveznicama:

[gi|490150591|JX854977.1](#), Sicilija (Ognina di Siracusa), [gi|490150585|JX854974.1](#), , Sicilija (Capo Passero), [gi|490150453|JX854908.1](#), Sardinija, Isola di La Maddalena (Cala Camiciotto), [gi|490150447|JX854905.1](#), Sardinija, Isola di La Maddalena (Cala Camiciotto), [gi|490150385|JX854874.1](#), Sardinija, Oristano (Sa Mardini i Torre Vecchia), [gi|490150359|JX854861.1](#), Sardinija, Monte Petrosu (Sassi piatti i Isola Cava, [gi|490150235|JX854799.1](#), Sardinija, Baia di Porto Conte, [gi|490150213|JX854788.1](#), 328-553, Sardinija, Baia di Porto Conte.

U radu Wesselmann i sur., 2018. navodi se da analiza cijelog Mediterana nije pokazala (koristeći duže sekvence 597 bp COI) genetsku diferencijaciju između uzorkovanih populacija, a koristeći kraće sekvence (243 bp COI) nije vidljiva jasna podjela između zapadnog i istočnog mediteranskog bazena, a istaknula se Venecijanska laguna kao područje s najrazličitijim jedinkama. Iako je Jadran poluzatvorene prirode to nije uzrok različitosti uzoraka iz Venecijanske lagune, jer je vidljivo da sličnost naših sekvenci sa sekvencama iz ostalih regija Mediterana govore suprotno, stoga objašnjenje za takvu različitost u Venecijanskoj laguni je da brodovi koji putem balastnih voda mogu donijeti (kao i odnijeti) larve periski pridonose povećanju različitosti. Stoga, pretpostavlja se da uzimajući u obzir uzorkovanja u zapadnom Mediteranu i uzimajući podatke od uzorkovanja cijelog Mediterana, postoji velika raznolikost i niska međupopulacijska diferencijacija (Wesselmann i sur., 2018.). S obzirom da su svi naši uzorci na proteinskoj razini (osim jednog izuzetka IZ2A) identični, imaju i visoki postotak sličnosti s uzorcima iz zapadnog Mediterana.

Kroz druga istraživanja naziru se dvije regije koje se mogu grupirati, a to su regije Sardinija, Korzika, otok Elba i Sicilija, te Egejsko more. Ova podjela na zapadni i istočni Mediteran mogla bi se protumačiti kao moguća posljedica smanjenog protoka gena između istočnog i zapadnog Mediterana. Još jedna pretpostavka bila bi postojanje Sicilijanskog tjesnaca i Alžirske struje, koja predstavlja hidrodinamičku barijeru između Tunisa i Sicilije (Sanna i sur., 2013.). Međutim ne može se sa sigurnošću utvrditi takva hipoteza s obzirom na to da su se određeni haplotipovi pojavljivali na obje strane Mediterana, kao i zbog činjenice da obje strane nisu jednakom mjerom istraživane.

S obzirom da kroz ova istraživanja kao i naše istraživanje, nije vidljiva velika divergencija među uzorcima diljem Mediterana, dalo bi se naslutiti da svi uzorci *P. nobilis* imaju zajedničko, i to vrlo blisko podrijetlo. U tom slučaju, niska genetska raznolikost kroz populaciju mogla bi biti negativan čimbenik ako dođe do utjecaja na vrstu, primjer toga je i Masovni pomor periski, koji se proširio diljem Mediterana, jer takva populacija ima približno jednak odgovor na utjecaj i sposobnost prilagodbe, a samim time i manju stopu preživljavanja i očuvanja populacije.

## 4. ZAKLJUČAK

Analizom 47 prikupljenih sekvenci Plemenite periske (*Pinna nobilis*) ustanovljeno je da neke sekvence imaju identičan nukleotidni slijed. Ukupan broj različitih haplotipova je 17, a najčešći haplotip (A204,...) je sekvenciran iz 20 različitih uzoraka i prisutan je na svih 7 uzorkovanih postaja. Ostale grupe broje po 4 uzoraka (A209,...) s 3 postaje, 6 uzoraka (IZ1B,...) sa 5 postaja, 3 uzorka (IZ3A,...) s 3 postaje, te 2 uzorka (Z1 jgLCO,...) s 1 postaje. Ostale sekvence koje nisu grupirane, izdvajaju se s obzirom na promjene koje su se dogodile u nukleotidnom slijedu. Kod njih su pronađene tihe mutacije koje nemaju značajan učinak na proteinskoj razini. Analiza sličnosti naših sekvenci sa sekvencama iz ostatka Mediterana na DNA razini pokazala je da regija preklapanja koja obuhvaća cijele sekvence (1-553) pokazuje 100%-tnu identičnost čak 76% naših sekvenci sa sekvencama iz drugih regija Mediterana, dok kraća regija duljine 225 nukleotida (328-553) pokazuje 100%-tnu identičnost čak 91% naših sekvenci sa sekvencama iz drugih regija Mediterana. Na konstruiranom filogenetskom stablu vidljiva je slaba podržanost grananja, kao i neznatne evolucijske udaljenosti, te samo jedan uzorak s jednom missense mutacijom. Takvi rezultati daju zaključak, da su svi naši uzorci u bliskom srodstvu, a usporedbom istraživanja iz ostalih regija Mediterana naši uzorci također imaju veliku srodnost s ostatkom, a najviše sa zapadnim dijelom Mediterana. Naši rezultati dodatno potkrepljuju zaključke drugih autora, da su svi uzorci iz cijelog Mediterana u vrlo bliskom srodstvu.

## 5. LITERATURA

Almada-Villela, P. (1984.), The Effects of Reduced Salinity on the Shell Growth of Small *Mytilus edulis*. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 64(1), str. 171-182. doi:<https://doi.org/10.1017/S0025315400059713>

Altukhov, Y.P. (2006.), The theoretical principles of population genetics, Intraspecific Genetic Diversity, Springer, Berlin, Heidelberg, str. 5. – 42.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990.), Basic local alignment search tool, J Mol. Biol., 215(3): 403-10. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2

Bakran-Petricioli, T.,(2011.), Priručnik za određivanje morskih staništa u Hrvatskoj prema Direktivi o staništima EU, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb, str. 54.-55.

Bayne, B.L., Widdows, J, Thompson, R.J.(1976.), Physiology II. In: Marine Mussels: Their Ecology and Physiology (ed. B.L. Bayne), str. 207-260., Cambridge University Press, Cambridge

Basso, L., Vazquez-Luis, M., Garcia-March,J.R., Deudero,S., Alvarez,E., Vicente,N., Duarte,C.M., Hendriks,I.E.,(2015.), Chapter three - The Pen Shell, *Pinna nobilis*: A Review of Population Status and Recommended Research Priorities in the Mediterranean Sea, Advances in Marine Biology, Academic Press, vol. 71, str.109-160. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.amb.2015.06.002>

Bunje, P. (2003.). Lophotrochozoa: The Mollusca, UCMP Berkeley. Dostupno na:<https://ucmp.berkeley.edu/taxa/inverts/mollusca/mollusca.php>(Zadnje pristupljeno: 17.05.2022.)

Brown, T.A. (2002.), Genomes: 2nd edition, Chapter 16, Oxford, Wiley-Liss, Molecular Phylogenetics

Cabanellas-Reboredo, M., Vázquez-Luis, M., Mourre, i sur., (2019.), Tracking a mass mortality outbreak of pen shell *Pinna nobilis* populations: A collaborative effort

of scientists and citizens. *Sci Rep* 9, 13355 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49808-4>

Catanese, G., Grau, A., Maria Valencia, J., Rafael Garcia-March, J., Alvarez, E., VazquezLuis, M., Deudero, S., Darriba, S., Carballal, M.J., Villalba, A.,(2018.) *Haplosporidium pinnae* sp. nov., a haplosporidan parasite associated with mass mortalities of the fan mussel, *Pinna nobilis*, in the Western Mediterranean Sea, *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 157., str. 9.-24. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.07.006>.

Cooper, G.M., Hausman, R.E (2004.) *Stanica – molekularni pristup*, Medicinska naklada, Zagreb, treće izdanje, Str.: 409., 581., 683.

Clement, M., Posada, D., Crandall, K., (2000), TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9(10): 1657-1660

Derycke, S., Vanaverbeke, J., Rigaux, A., Backeljau, T., Moens, T., (2010.), Exploring the Use of Cytochrome Oxidase c Subunit 1 (COI) for DNA Barcoding of Free-Living Marine Nematodes, *PloS ONE* 5(10): e13716. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013716>

Gosling, E. (2003.), *Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture*, Blackwell Publish, Velika Britanija, str. 7.-38.

Turner, R.D., Rosewater, J., (1958.), *The Family Pinnidae in the Western Atlantic*, Museum of comparative zoology, Harvard University

Habdija, I., Primc Habdija, B., Radanović, I., Vidaković, J., Kučinić, M., Špoljar, M., Matoničkin, R., Miliša, M. (2004.), *Protista – Protozoa i Metazoa – Invertebrata. Funkcionalna građa i praktikum*, Samobor, Meridijani

Habdija, I., Primc Habdija, B., Radanović, I., Špoljar, M., Matoničkin, R., Vujčić Karlo, S., Miliša, M., Ostojić, A., Sertić Perić, M., (2011.), *Protista – Protozoa – Metazoa – Invertebrata, Strukture i funkcije*, ALFA d.d., Zagreb

International Union for Conservation of Nature (IUCN), (2019.), Dostupno na: <https://www.iucnredlist.org/> (Zadnje pristupljeno: 7.4. 2021.)

Keilin, D., Hartree, E. F., (1939.), Cytochrome and cytochrome oxidase, Royal Society, 127: str. 167- 191. <https://doi.org/10.1098/rspb.1939.0016>

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., (2018.), MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549

Mendo, T., Moltschaniwskyj, N., Lyle, J.M. i sur., (2014.), Role of density in aggregation patterns and synchronization of spawning in the hermaphroditic scallop *Pecten fumatus*, *Mar. biol.* 161, 2857-2868, <https://doi.org/10.1007/s00227-014-2551-2>

Marrocco, V., Zangaro, F., Sicuro, A., Pinna, M. (2019.), A scaling down mapping of *Pinna nobilis* (Linnaeus, 1758) through the combination of scientific literature, NATURA 2000, grey literature and citizen science data, *Nature Conservation* 33: 21-31, <https://doi.org/10.3897/natureconservation.33.30397>

Milišić, N., (1991.), Školjke i puževi Jadrana, Logos, Split, str. 39.

National Human Genome Research Institute (NHGRI) (2020.). Dostupno na: <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Deoxyribonucleic-Acid-Fact-Sheet> (Zadnje pristupljeno: 26.5.2022.)

National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2004), Nucleotide, National Library of Medicine. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide> (Zadnje pristupljeno 26.5.2022.)

Nei, M. i Kumar, S. (2000.), *Molecular Evolution and Phylogenetics*, Oxford, University Press

Okasha, S. (2008.), Population Genetics, *The Stanford Encyclopedia of Philosophy* (Winter 2016 Edition), dostupno na: <https://plato.stanford.edu/archives/win2016/entries/population-genetics> (Zadnje pristupljeno: 18.04. 2022.)

Pavlica, M. (2012.), *Genetika – web udžbenik*, Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, 1. izdanje, dostupno na: <https://www.genetika.biol.pmf.hr/docs/sadrzaj/18-poglavlje/> (Zadnje pristupljeno: 2.5.2022.)



Peyran, C., Boissin, E., Moragel, T., Nebot-Colomer, E., Iwankow, G., Planes, S. (2021), Genetic homogeneity of the critically endangered fan mussel, *Pinna nobilis*, throughout lagoons of the Gulf of Lion (North-Western Mediterranean Sea), Nature portfolio, Scientific Reports, 11:7805, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87493-4>

Pietan, L.L., Spradling, T.A., Demastes, J.W., (2016) The Mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit I Gene Occurs on a Minichromosome with Extensive Heteroplasmy in Two Species of Chewing Lice, *Geomydoecus aurei* and *Thomomydoecus minor*. PLoS ONE 11(9): e0162248. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162248>

Prado, P., Andree, K.B., Trigos, S., Carrasco, N., Caiola, N., Garcia-March, J.R., Tena, J., Fernandez-Tejedor, M., Carella, F., (2020.), Breeding, planktonic and settlement factors shape recruitment patterns of one of the last remaining major population of *Pinna nobilis* within Spanish waters, Hydrobiologia 847, str. 771-786., <https://doi.org/10.1007/s10750-019-04137-5>

Rabaoui, L., Tlig-Zouari, S., Ben Hassine, O. K., (2008), Distribution and habitat of the fan mussel *Pinna nobilis* Linnaeus, 1758.(Mollusca: Bivalvia) along the northern and eastern Tunisian coasts, Tunis, Cahiers de Biologie Marine 49(1): 67-78

Sanna, D., Cossu, P., Dedola, G.L., Scarpa, F., Maltagliati, F., Castelli, A., Franzoi, P., Lai, T., Cristo, B., Curini-Galletti, M., Francalacci, P., Casu, M. (2013) , Mitochondrial DNA reveals Genetic Structuring of *Pinna nobilis* across the Mediterranean Sea, PLoS ONE 8(6): e67372

Šarić, T., Župan, I., Aceto, S., Villari, G., Palić, D., De Vico, G., Carella, F., (2020), Epidemiology of Noble Pen Shell (*Pinna nobilis* L. 1758) Mass Mortality Events in Adriatic Sea Is Characterised with Rapid Spreading and Acute Disease Progression, Pathogens, doi: [10.3390/pathogens9100776](https://doi.org/10.3390/pathogens9100776)

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011), MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Likelihood, Distance, and Parsimony methods. Molecular Biology and Evolution, str. 414

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994.), CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22(22): 4673-80.

Valentini, A., Pompanon, F., Taberlet, P., (2009.), DNA barcoding for ecologists, *Trends in Ecology & Evolution*, vol. 24:2, str. 110.-117.

Vazquez-Luis, M., Alvarez, E., Barrajon, A., Garcia-March, J. R., Grau, A., Hendriks, I. E., Jimenez, S., Kersting, D., Moreno, D., Perez, M., Ruiz, J.M., Sanchez, J., Villalba, A., Deudero, S., (2017.), S.O.S. *Pinna nobilis*: A Mass Mortality Event in Western Mediterranean Sea, *Frontiers in Marine Science*, vol. 4, <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00220>

Wesselmann, M., Gonzalez-Waguemert, M., Serrao, E. A., Engelen, A. H., Renault, L., Garcia-March, J.R., Duarte, C. M., Hendriks, E.I. (2018.), Genetic and oceanographic tools reveal high population connectivity and diversity in the endangered pen shell *Pinna nobilis*, *Scientific Reports*, vol. 8, Art. num. 4770

WoRMS(2022). World Register of Marine Species. Dostupno na: <https://www.marinespecies.org>, doi:10.14284/170 (Zadnje pristupljeno: 4.4.2022.)

## 6. SAŽETAK

Plemenita periska (lat. *Pinna nobilis*) endem je Sredozemnog mora u kojem je i najveći školjkaš čija visina može dosegnuti i do 1 m. Najčešće je nalazimo okomito zabodenu na pjeskovito-muljevitom dnu, gdje naseljava livade morskih cvjetnica (*Posidonia oceanica* i *Cymodocea nodosa*). Ima važnu ekološku ulogu jer je filtratorski organizam te doprinosi prozirnosti vode. Njene ljuštore služe kao tvrda površina koja biva kolonizirana od strane raznih epibionata. Još od 1992. godine nalazi se na popisu ugroženih vrsta, a njen se broj drastično smanjio nakon događaja Masovnog pomora koji je počeo u jesen 2016. godine. U ovom radu analizirano je 47 DNA sljedova s ciljem uvida u populacijsku genetiku vrste, a korišten je molekularni marker Citokrom oksidaza I, jedan od najraširenijih markera koji se koristi za evolucijske analize. Sljedovi su obrađeni u MEGA-X programskom paketu. Uzorkovanje je provedeno tijekom 2018. i 2019. godine na 7 lokacija duž hrvatske obale i otoka Jadranskog mora. Najvećim dijelom vidljivo je da je većina uzoraka genetski identična, odnosno među 47 analiziranih uzoraka pronađeno je 17 različitih haplotipova pri čemu je najbrojniji haplotip pronađen u čak 20 uzoraka i prisutan je na svih 7 uzorkovanih lokacija. Ukupno su detektirane 32 točkaste mutacije od čega samo jedna missense mutacija, dok su ostale tihe mutacije. Isto tako, usporedbom naših istraživanih skupina, pomoću BLAST-a, i ostalih populacija diljem Mediterana, čak 76% naših haplotipova, u punoj duljini od 553 nukleotida, identično je već publiciranim sekvencama uzorkovanih diljem Mediterana.

**Ključne riječi:** Plemenita periska, *Pinna nobilis*, citokrom oksidaza I, populacijska genetika, Mediteran, Jadran

## ABSTRACT

*Pinna nobilis* (lat. *Pinna nobilis*) is endemic to the Mediterranean Sea, where it is the largest bivalve whose height can reach up to 1 m. It is most often found stuck vertically on the sandy-mud bottom, where it inhabits meadows of Seagrass (*Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa*). It has an important ecological role because it is a filter-feeder organism and contributes to water transparency. Its shells serve as a hard surface that is colonized by various epibionts. It has been on the list of endangered species since 1992, and its number decreased drastically after the Mass Mortality event started in the fall of 2016. In this work, 47 DNA sequences were analyzed to gain insight into the population genetics of the species, and the molecular marker Cytochrome Oxidase I was used, one of the most widespread marker used for evolutionary analyses. The sequences were processed in the MEGA-X software package. Sampling was carried out between 2018 and 2019 at 7 locations along the Croatian coast and the islands of the Adriatic Sea. For the most part, it is evident that most of the samples are genetically identical, that is, among the 47 analyzed samples, 17 different haplotypes were found, with the most numerous haplotype being found in 20 samples and present in all 7 sampled locations. A total of 32 point mutations were detected, of which only one was a missense mutation, while the rest were silent mutations. Likewise, by comparing our research groups, using BLAST, and other populations across the Mediterranean, as many as 76% of our haplotypes, in the full length of 553 nucleotides, are identical to already published sequences sampled across the Mediterranean.

**Key words:** Noble pen shell, *Pinna nobilis*, Cytochrome Oxidase I, population genetics, Mediterranean, Adriatic sea