



Sveučilište u Splitu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Doktorski studij Biofizika

Doktorski rad

**SASTAV RODA *PSEUDO-NITZSCHIA* U OBALNIM
VODAMA SREDNJEG JADRANA, MOLEKULARNA I
MORFOLOŠKA KARAKTERIZACIJA**

Tina Bonačić

Split, ____ 2026.



University of Split

Faculty of Science

Doctoral Study of Biophysics

Doctoral thesis

COMPOSITION OF THE GENUS *PSEUDO-NITZSCHIA* IN THE COASTAL WATERS OF THE CENTRAL ADRIATIC, MOLECULAR AND MORPHOLOGICAL CHARACTERISATION

Tina Bonačić

Split, ____ 2026.

Ova doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za fitoplankton i toksičnost školjkaša Instituta za oceanografiju i ribarstvo u Splitu, pod vodstvom mentorice dr. sc. Jasne Arapov, više znanstvene suradnice i komentorice dr. sc. Ivane Bušelić Garber, znanstvene suradnice, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog studija „Biofizika“ na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Splitu. Istraživanje je provedeno u okviru uspostavnog istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost (UIP-2022-02-3249) „Ekologija i toksičnost vrsta roda *Pseudo-nitzschia* u obalnim vodama srednjeg i južnog Jadrana “(PSEUDOTOX)“.

Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet

Odjel za fiziku, Doktorski studij Biofizika

SASTAV RODA *PSEUDO-NITZSCHIA* U OBALNIM VODAMA SREDNJEG JADRANA,
MOLEKULARNA I MORFOLOŠKA KARAKTERIZACIJA

Doktorski rad Tine Bonačić, mag. ing. oecol. er prot. mar., kao dio obaveza potrebnih da se dobije doktorat znanosti izrađen je pod vodstvom mentorice dr. sc. Jasne Arapov i komentorice dr. sc. Ivane Bušelić Garber. Dobiveni akademski naziv i stupanj: doktorica prirodnih znanosti.

Povjerenstvo za ocjenu i obranu doktorskog rada u sastavu:

1. _____

Dr.sc. Živana Ninčević Gladan, znanstvena savjetnica u trajnom izboru
(Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split - predsjednica)

2. _____

Dr. sc. Danijela Šantić, znanstvena savjetnica
(Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split - članica)

3. _____

Dr. sc. Tomislav Radić, znanstveni savjetnik
(Institut za jadranske kulture i melioraciju krša, Split - član)

Potvrđuje da je disertacije obranjena dana _____.

Voditelj doktorskog studija: izv. prof. dr. sc. Damir Kovačić

Dekanica: prof. dr. sc. Ana Maravić

ZAHVALE

Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za fiziku, Doktorski studij Biofizika

SASTAV RODA *PSEUDO-NITZSCHIA* U OBALNIM VODAMA SREDNJEG JADRANA, MOLEKULARNA I MORFOLOŠKA KARAKTERIZACIJA

Tina Bonačić

Rad je izrađen na Institutu za oceanografiju i ribarstvo, Split

Sažetak

U ovom je istraživanju po prvi put sveobuhvatnim pristupom određen sastav i prostorno-sezonska raspodjela vrsta *Pseudo-nitzschia* na četiri uzgajališta školjkaša srednjeg Jadrana tijekom dvogodišnjeg razdoblja. Rod *Pseudo-nitzschia* sastavni je dio jadranske fitoplanktonske zajednice, a pojedine vrste proizvode neurotoksin domoičnu kiselinu (DK), odgovornu za amnezijsko trovanje školjkašima (ASP). Uspostavljene stanične kulture i sastav vrsta u okolišnim uzorcima određen je morfološki (FE-SEM/STEM) i molekularno (Sanger sekvenciranje: ITS, LSU, *rbcL*; metabarkodiranje: ITS1 i *rbcL*). Sveobuhvatni pristup omogućio je razlučivanje kriptičnih i pseudo-kriptičnih vrsta te procjenu utjecaja sezone i područja na strukturu zajednice. Uspostavljene su 362 kulture roda *Pseudo-nitzschia*, u kojima je određeno 10 vrsta. Morfološkom i molekularnom analizom okolišnih uzoraka određeno je 12 *Pseudo-nitzschia* do razine vrste. Značajnost prostornog faktora potvrđena je u Velebitskom kanalu, dok je sezonski obrazac pokazao na svim istraživanim područjima najveću raznolikost u hladnijem dijelu godine (jesen i zima). Rezultati potvrđuju visoku raznolikost roda *Pseudo-nitzschia* u srednjem Jadranu te pokazuju da se najveća taksonomska preciznost postiže integracijom morfoloških i molekularnih metoda. Rezultati istraživanja predstavljaju temelj za pouzdanije praćenje potencijalno toksičnih populacija.

(119 stranica, 36 slika, 10 tablica, 141 literaturni navod, 8 priloga, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u: Nacionalnoj Sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Sveučilišnoj knjižnici u Splitu, Knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu, Knjižnici Instituta za oceanografiju i ribarstvo u Splitu.

Ključne riječi: (*Pseudo-nitzschia*, FE-SEM/STEM, ITS, LSU, *rbcL*, Sanger sekvenciranje, kriptične vrste, metabarkodiranje)

Mentorica: Dr.sc. Jasna Arapov, viša znanstvena suradnica

Komentorica: Dr. sc. Ivana Bušelić Garber, znanstvena suradnica

Ocjenjivači: 1. Dr.sc. Živana Ninčević Gladan, znanstvena savjetnica u trajnom izboru

2. Dr. sc. Danijela Šantić, znanstvena savjetnica

3. Doc. dr. sc. Tomislav Radić, znanstveni savjetnik

Rad prihvaćen: (datum sjednice Vijeća)

COMPOSITION OF THE GENUS *PSEUDO-NITZSCHIA* IN THE COASTAL WATERS OF THE CENTRAL ADRIATIC, MOLECULAR AND MORPHOLOGICAL CHARACTERISATION

Tina Bonačić

Thesis performed at the Institute of Oceanography and Fisheries, Split

Abstract

In this study, the composition and seasonal-spatial distribution of *Pseudo-nitzschia* species were determined for the first time using a comprehensive integrative approach across four shellfish farming and harvesting areas of the central Adriatic Sea over a two-year period. The genus *Pseudo-nitzschia* is a regular component of the Adriatic phytoplankton community, and several of its species produce the neurotoxin domoic acid (DA), the causative agent of amnesic shellfish poisoning (ASP). Cell cultures and species composition in environmental samples were characterised using morphological (FE-SEM/STEM) and molecular methods (Sanger sequencing: ITS, LSU, *rbcL*; metabarcoding: ITS1 and *rbcL*). This integrative approach enabled the discrimination of cryptic and pseudo-cryptic species and the assessment of seasonal and regional influences on community structure. A total of 362 *Pseudo-nitzschia* cultures were established, within which 10 species were confirmed. Morphological and molecular analyses of environmental samples identified 12 *Pseudo-nitzschia* species. The significance of the spatial factor was most evident in the Velebit Channel, while seasonal patterns across all study areas showed the highest species diversity during the colder part of the year (autumn and winter). Overall, the results demonstrate high *Pseudo-nitzschia* diversity in the central Adriatic and show that the greatest taxonomic resolution is achieved by integrating morphological and molecular approaches. These findings provide a basis for more reliable monitoring of potentially toxic populations and for improved risk assessment related to domoic acid occurrence in shellfish aquaculture areas.

(119 pages, 36 figures, 10 tables, 141 references, 8 supplementary materials, original in Croatian)

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, University Library in Split, Library of the Faculty of Science, University of Split, Library of the Institute of Oceanography and Fisheries, Split)

Keywords: (*Pseudo-nitzschia*, FE-SEM/STEM, ITS, LSU, *rbcL*, Sanger sequencing, cryptic species, metabarcoding)

Mentor: Jasna Arapov, PhD, Senior scientific associate

Co-mentor: Ivana Bušelić Garber, PhD, Scientific associate

Reviewers: 1. Živana Ninčević-Gladan, PhD, Senior Research Advisor (tenured)

2. Danijela Šantić, PhD, Research Advisor

3. Tomislav Radić, PhD, Research Advisor

Thesis accepted: (datum sjednice Vijeća)

SADRŽAJ

Popis slika

Popis tablica

Popis kratica

1. UVOD	1
1.1 Fitoplankton	1
1.2. Dijatomeje	2
1.3. Morfološka obilježja stanica <i>Pseudo-nitzschia</i>	3
1.4. Razmnožavanje <i>Pseudo-nitzschia</i>	6
1.5. Molekularna obilježja stanica <i>Pseudo-nitzschia</i>	7
1.6. Domoićna kiselina i amnezijsko trovanje školjkašima (ASP)	8
1.7. Kratki pregled dosadašnjih istraživanja	9
1.8. Cilj i temeljne hipoteze istraživanja	12
2. MATERIJALI I METODE	13
2.1. Područje istraživanja	13
2.1.1. Velebitski kanal	14
2.1.2. Šibenski zaljev	14
2.1.3. Kaštelanski zaljev	15
2.1.4. Malostonski zaljev	16
2.2. Izolacija i uspostava staničnih kultura	17
2.2.1. Morfološka analiza	18
2.2.2. Molekularna analiza	20
2.2.3. Bioinformatička analiza	23
2.3. Okolišni uzorci	24
2.3.1. Morfološka analiza	24
2.3.2. Molekularna analiza	25
2.3.3. Statistička analiza	26
2.3.4. Bioinformatička analiza	27
2.4. Dostupnost podataka	27
3. REZULTATI	27
3.1. Morfološka obilježja kultura	29
3.1.1. <i>Pseudo-nitzschia allochroa</i> Zingone, Percopo i Sarno	31
3.1.2. <i>Pseudo-nitzschia calliantha</i> Lundholm, Moestrup i Hasle	32
3.1.3. <i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i> (Cleve) Heiden	33
3.1.4. <i>Pseudo-nitzschia fraudulenta</i> (Cleve) Hasle	34
3.1.5. <i>Pseudo-nitzschia galaxiae</i> Lundholm i Moestrup	35
3.1.6. <i>Pseudo-nitzschia hasleana</i> Lundholm	36
3.1.7. <i>Pseudo-nitzschia mannii</i> Amato i Montresor	37
3.1.8. <i>Pseudo-nitzschia multistriata</i> H. Takano	38
3.1.9. <i>Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima</i> (Hasle) Hasle	39
3.1.10. <i>Pseudo-nitzschia subfraudulenta</i> (Hasle) Hasle	40

3.2. Molekularna obilježja kultura	41
3.3. Morfološka obilježja okolišnih uzoraka	51
3.3.2. <i>Pseudo-nitzschia brasiliiana</i> Lundholm, Hasle i Fryxell	53
3.3.3. <i>Pseudo-nitzschia linea</i> Lundholm, Hasle i Fryxell	54
3.3.4. <i>Pseudo-nitzschia lundholmiae</i> Limteng, Leaw, Lim	55
3.4. Prostorna raspodjela okolišnih uzoraka.....	56
3.5. Sezonska raspodjela okolišnih uzoraka	61
3.6. Bioinformatička analiza okolišnih podataka	64
3.7. Molekularna obilježja okolišnih uzoraka.....	66
3.7.1. <i>rbcL</i> genski biljeg	66
3.7.2. ITS1 genski biljeg	71
4. RASPRAVA	76
4.1. Morfološka i molekularna analiza kultura	76
4.2. Morfološka analiza okolišnih uzoraka.....	79
4.3. Molekularna analiza okolišnih uzoraka <i>rbcL</i> genskim biljegom	81
4.4. Molekularna analiza okolišnih uzoraka ITS1 genskim biljegom.....	82
4.5. Utjecaj prostorne i sezone raspodjele	83
5. ZAKLJUČCI	86
6. LITERATURA	87
7. PRILOZI	94
8. SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU	114
9. SAŽETAK NA ENGLESKOM JEZIKU	115
10. ZNANSTVENI RADOVI I SUDJELOVANJA NA ZNANSTVENIM SKUPOVIMA ..	116
11. KRATKI ŽIVOTOPIS	118

Popis slika

Slika 1.1. Morfologija stanice *Pseudo-nitzschia*, 1) stanica u bočnom položaju, presjek kroz apikalnu ravninu i 2) stanica u valvalnom položaju. AA predstavlja apikalnu os.

Slika 1.2. *Pseudo-nitzschia calliantha*. Mikrografija elektronskog mikroskopa (FE-SEM/STEM) sa označenim dijelovima stanice koji služe za određivanje vrste.

Slika 1.3. Morfološka obilježja pora različitih vrsta *Pseudo-nitzschia*. A) *P. delicatissima/cuspidata* kompleks, B) *P. calliantha*, C) *P. caciantha*. Preuzeto iz Lundholm i sur., 2003.

Slika 1.4. Prikaz životnog ciklusa penatne dijatomeje. Preuzeto iz Marić Pfannkuchen, 2013.

Slika 2.1. Područje istraživanja i prikaz postaja: (a) V: Velebitski kanal, (b) S: Šibenski zaljev, (c) K: Kaštelanski zaljev, (d) M: Malostonski zaljev.

Slika 2.2. Prikaz Velebitskog kanala s pripadajućim koordinatama (V; 44.2696° S, 15.5165° I).

Slika 2.3. Prikaz Šibenskog zaljeva s pripadajućim koordinatama (S; 43.7441° S, 15.8712° I).

Slika 2.4. Prikaz Kaštelanskog zaljeva s pripadajućim koordinatama (K; 43.5208° S, 16.2717° I).

Slika 2.5. Prikaz Malostonskog zaljeva s pripadajućim koordinatama (M; 42.8676° S, 17.6871° I).

Slika 2.6. Pretražni elektronski mikroskop (FE-SEM; Mira3tescan, Brno, Češka).

Slika 2.7. Prikaz rezultata gel elektroforeze na agaroznom gelu nakon amplifikacije ITS regije primjenom izravnog PCR-a na uzorcima staničnih kultura.

Slika 2.8. Krug na slici predstavlja površinu filtera na kojem se nalaze profilirane stanice. Unutar kruga su prikazane dvije linije (vertikalni i horizontalni transekt). Svaki transekt označava 30-ak vidnih polja.

Slika 3.1. *Pseudo-nitzschia allochroa*: (a) 2 stanice u bočnom položaju na svjetlosnom mikroskopu; (b) cijela valva, SEM; (c) središnji dio površine valve sa središnjom porom, SEM; (d,e) krajevi valve, SEM; (f) valvocopula sa redovima perforacija, SEM. Mjerne skale: (a,b) 5 µm; (c–f) 500 nm.

Slika 3.2. *Pseudo-nitzschia calliantha*: (a) cijela valva, SEM; (b) lanac u bočnom položaju na svjetlosnom mikroskopu; (c) središnji dio površine valve sa središnjom porom, SEM; (d) središnji dio površine valve sa središnjom porom STEM; (e) struktura poroida sa prikazom sektora, SEM i (f) STEM; (g,h) krajevi valve, SEM i (i) STEM; (j) valvocopula sa redovima perforacija, SEM i (k) STEM. Mjerne skale: (a,b) 10 µm; (g–i) 1 µm; (c–f,j,k) 500 nm.

Slika 3.3. *Pseudo-nitzschia delicatissima*: (a–c) cijela valva, SEM; (d) središnji dio stanice sa središnjom porom, SEM; (e) središnji dio stanice sa središnjom porom, SEM STEM; (f,g) krajevi valve, SEM; (h) valvocopula sa redovima perforacija, SEM i (i) STEM. Mjerne skale: (a) 10 µm; (b,c) 5 µm; (d–i) 1 µm.

Slika 3.4. *Pseudo-nitzschia fraudulenta*: (a) cijela valva, SEM; (b) središnji dio valve sa središnjom porom, SEM; (c) struktura poroida sa detaljem sektora, SEM; (d) valvocopula sa redovima perforacija, SEM; (e,f) krajevi valve, SEM. Mjerne skale: (a) 10 µm; (b) 2 µm; (c,e,f) 1 µm; (d) 500 nm.

Slika 3.5. *Pseudo-nitzschia galaxiae*: (a) cijela valva, SEM; (b) središnji dio valve sa središnjom porom, SEM (c) kraj valve; (d) cijela valva, STEM; (e) središnji dio valve sa središnjom porom, STEM; (f) kraj valve, STEM. Mjerne skale: (a, d) 10 µm; (b, c, e, f) 1 µm.

Slika 3.6. *Pseudo-nitzschia hasleana*: (a) cijela valva, SEM (b) središnji dio valve sa središnjom porom; strelice označavaju 2 poroida koja se povremeno pojavljuju unutar iste strije, (c) struktura valvocopule. Mjerne skale: a = 10 µm; b, c = 1 µm.

Slika 3.7. *Pseudo-nitzschia mannii*: (a) cijela valva, SEM; (b) prikaz lanca u bočnom na svjetlosnom mikroskopu; (c) središnji dio sa središnjom porom, SEM i (d) STEM; (e) struktura poroida s prikazom sektora, SEM i (f) STEM; (g,h) krajevi valve, SEM; (i) valvocopula sa redovima perforacija, SEM ; (j) valvocopula s redovima perforacija STEM. Mjerne skale: (a,b) 10 µm; (c,d) 1 µm; (g–i) 1 µm; (e,f,j) 500 nm.

Slika 3.8. *Pseudo-nitzschia multistriata*: (a) cijela valva, SEM; (b) lanac u bočnom položaju na svjetlosnom mikroskopu; (c) središnji dio stanice bez središnje pore, SEM i (d) STEM; (e,f) krajevi valve, SEM; (g) valvocopula s redovima perforacija, SEM; (h) valvocopula s redovima perforacija STEM; (i,j) krajevi valve, STEM. Mjerne skale: (a,b) 10 µm; (e,f,i,j) 1 µm; (c,d,g,h) 500 nm.

Slika 3.9. *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*: (a) cijela valva, SEM; (b) središnji dio valve sa središnjom porom, SEM i (c) središnji dio valve sa središnjom porom, STEM; (d,e) krajevi valve, SEM; (f) valvocopula sa redovima perforacija, SEM; (g) valvocopula sa redovima perforacija, STEM. Mjerne skale: (a) 10 µm; (d,e) 1 µm; (b,c,f,g) 500 nm.

Slika 3.10. *Pseudo-nitzschia subfraudulenta*: (a) cijela valva, SEM; (b) lanac u bočnom položaju a na svjetlosnom mikroskopu; (c) središnji dio valve sa središnjom porom, SEM i (d) STEM; (e) detalj strija valve s jednim redom poroida, SEM; (f) struktura poroida sa prikazom sektora, SEM; (g) struktura poroida sa prikazom sektora, STEM; (h) valvocopula sa redovima perforacija, SEM; (i,j) krajevi valve, SEM; (k) valvocopula sa redovima perforacija, STEM. Mjerne skale: (a,b) 10 µm; (c–e,i,j) 1 µm; (f–h,k) 500 nm.

Slika 3.11. Filogenetsko stablo dobiveno Bayesovom analizom ITS biljega. Prikazane su posteriorne vjerojatnosti > 0,90 (90%). Bayesova inferencija (BI) provedena je primjenom GTR+G+I modela uz minimalno 4000000 generacija Markovljevog lanca Monte Carlo (MCMC), sa stopom uzorkovanja svakih 1000 generacija i dijagnostičkim intervalom također od 1000 generacija. Izolati sekvencirani u ovom istraživanju prikazani su crvenom bojom. Mjerna skala predstavlja 0,2 zamjene nukleotida po mjestu.

Slika 3.12. Filogenetsko stablo dobiveno Bayesovom analizom LSU biljega. Prikazane su posteriorne vjerojatnosti > 0,90 (90%). Bayesova inferencija (BI) provedena je primjenom GTR+G+I modela uz minimalno 4000000 generacija Markovljevog lanca Monte Carlo (MCMC), sa stopom uzorkovanja svakih 1000 generacija i dijagnostičkim intervalom također od 1000 generacija. Izolati sekvencirani u ovom istraživanju prikazani su crvenom bojom. Mjerna skala predstavlja 0,2 zamjene nukleotida po mjestu.

Slika 3.13. Filogenetsko stablo dobiveno Bayesovom analizom *rbcL* biljega. Prikazane su posteriorne vjerojatnosti > 0,90 (90%). Bayesova inferencija (BI) provedena je primjenom GTR+G+I modela uz minimalno 4000000 generacija Markovljevog lanca Monte Carlo (MCMC), sa stopom uzorkovanja svakih 1000 generacija i dijagnostičkim intervalom također od 1000 generacija. Izolati sekvencirani u ovom istraživanju prikazani su crvenom bojom. Mjerna skala predstavlja 0,2 zamjene nukleotida po mjestu.

Slika 3.14. Kombinirano filogenetsko stablo dobiveno Bayesovom analizom ITS, LSU i *rbcL* biljega. Prikazane su posteriorne vjerojatnosti > 0,90 (90%). Bayesova inferencija (BI) provedena je primjenom GTR+G+I modela uz minimalno 10000000 generacija Markovljevog lanca Monte Carlo (MCMC), sa stopom uzorkovanja svakih 1000 generacija i dijagnostičkim intervalom također od 1000 generacija. Izolati sekvencirani u ovom istraživanju prikazani su crvenom bojom. Mjerna skala predstavlja 0,1 zamjene nukleotida po mjestu.

Slika 3.15. *Pseudo-nitzschia brasiliensis*: (a) cijela valva, SEM; (b) središnji dio valve bez središnje pore; (c) zaobljeni kraj stanice. Mjerne skale: (a) 10 µm; (b) 1 µm; (c) 500 nm.

Slika 3.16. *Pseudo-nitzschia lineata*: (a) cijela valva, SEM; (b) središnji dio valve bez središnje pore; (c) široko zaobljeni vrhovi stanice. Mjerne skale: (a) 10 µm; (b) 1 µm; (c) 500 nm.

Slika 3.27. *Pseudo-nitzschia lundholmiae*: (a) cijela valva, SEM; (b) središnji dio valve sa središnjom porom. Mjerne skale: (a) 10 µm; (b) 500 nm.

Slika 3.18. Relativni udio zabilježenih *Pseudo-nitzschia* na istraživanim područjima tijekom 2022. i 2023. godine.

Slika 3.19. Dvodimenzionalna PCoA ordinacija glavnih koordinata prikazuje raspodjelu roda *Pseudo-nitzschia* u odnosu na godišnja doba.

Slika 3.20. Dvodimenzionalna PCoA ordinacija glavnih koordinata prikazuje raspodjelu roda *Pseudo-nitzschia* u odnosu na postaje.

Slika 3.21. Prikaz raspodjele sekvenci metabarkodiranja okolišnih uzoraka roda *Pseudo-nitzschia* između četiri istraživana područja (Kaštelanski zaljev, Malostonski zaljev, Šibenski zaljev i Velebitski kanal) temeljen na *rbcL* markeru. Slika omogućuje usporedbu relativne brojnosti sekvenci pojedinih vrsta među područjima te ukazuje na razlike u zastupljenosti.

Slika 3.22. Kružni dijagram prikazuje raspodjelu i relativnu brojnost sekvenci roda *Pseudo-nitzschia* temeljeno na *rbcL* markeru. Debljina povezujućih linija odražava udio pojedinih vrsta unutar svakog područja.

Slika 3.23. Prikaz raspodjele sekvenci metabarkodiranja okolišnih uzoraka roda *Pseudo-nitzschia* između četiri istraživana područja (Kaštelanski zaljev, Malostonski zaljev, Šibenski zaljev i Velebitski kanal) temeljen na ITS1 markeru. Slika omogućuje usporedbu relativne brojnosti sekvenci pojedinih vrsta među područjima te ukazuje na razlike u zastupljenosti.

Slika 3.24. Kružni dijagram prikazuje raspodjelu i relativnu brojnost sekvenci roda *Pseudo-nitzschia* temeljeno na ITS1 markeru. Debljina povezujućih linija odražava udio pojedinih vrsta unutar svakog područja.

Popis tablica

Tablica 2.1. Početnice korištene u PCR reakcijama za različite umnožene regije.

Tablica 2.2. Uvjeti PCR reakcija amplifikacije ITS, LSU i *rbcL* regije s pripadajućim setovima početnica i specifičnim protokolima primjenjenim na svaku regiju.

Tablica 2.3. Početnice korištene za umnažanje genske regije ITS1 i *rbcL* tijekom metabarkodiranja Illumina NovaSeq 6000 uređajem.

Tablica 3.1. Popis izoliranih vrsta *Pseudo-nitzschia*, broj kultura, postaja uzorkovanja, sezona izolacije i metode korištene prilikom analize.

Tablica 3.2. Morfometrijska obilježja uspostavljenih kultura vrsta *Pseudo-nitzschia*. Podaci koji su označeni podebljano prikazuju najmanje i najveće vrijednosti (raspon), dok su srednje vrijednosti navedene ispod. Broj mjerenja (n) naveden je u zagradama ispod svake vrste.

Tablica 3.3. Morfometrijska obilježja *Pseudo-nitzschia* vrsta iz okolišnih uzoraka. Podaci koji su označeni podebljano prikazuju najmanje i najveće vrijednosti (raspon), dok su srednje vrijednosti i standardne devijacije navedene ispod. Broj mjerenja (n) naveden je u zagradama ispod svake vrste.

Tablica 3.4. Rezultati PERMANOVA analize sastava zajednice *Pseudo-nitzschia* obzirom na prostorni i sezonski faktor.

Tablica 3.5. Usporedni test za procjenu značajnosti razlika između razina pojedinog faktora (sezone i područja).

Tablica 3.5. SIMPER analiza područja i vrsta *Pseudo-nitzschia*.

Tablica 3.6. SIMPER analiza sezonske varijabilnosti zajednice *Pseudo-nitzschia*.

Popis kratica

BI – Bayesova inferencija

BLAST – alat za usporedbu nukleotidnih i proteinskih sekvenci (engl. Basic Local Alignment Search Tool)

bp – bazni parovi

CRAN – repozitorij programskog okruženja R (engl. Comprehensive R Archive Network)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

DNase/RNase-free – bez nukleaza (enzima za razgradnju nukleinskih kiselina)

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

FE-SEM – pretražni elektronski mikroskop s emisijom polja (engl. Field Emission Scanning Electron Microscope)

FigTree – softver za prikaz i uređivanje filogenetskih stabala

f/2 medij – standardni medij za uzgoj mikroalgi

GTR – generalizirani vremenski reverzibilni model evolucije nukleotida (engl. General Time Reversible)

ITS – unutarnji transkripcijski međuprostor ribosomalne DNA (engl. Internal Transcribed Spacer)

LSU – regija velike podjedinice ribosomalne DNA (engl. Large Subunit rRNA gene)

MCMC – Markovljeve lančane Monte Carlo metode (engl. Markov Chain Monte Carlo)

MEGA – softver za analizu molekularne evolucije (engl. Molecular Evolutionary Genetics Analysis)

NCBI – Nacionalni centar za biotehnoške informacije (engl. National Center for Biotechnology Information)

PCR – lančana reakcija polimeraze (engl. Polymerase Chain Reaction)

PCoA – analiza glavnih koordinata (engl. Principal Coordinates Analysis)

PERMANOVA – permutacijska multivarijatna analiza varijance (engl. Permutational Multivariate Analysis of Variance)

PRIMER – softver za multivarijatne ekološke analize (engl. Plymouth Routines In Multivariate Ecological Research)

RPM – okretaji u minuti (engl. Revolutions Per Minute)

Q5 – visokofidelitetni PCR Master Mix (engl. Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix)

QIAGEN – komercijalni proizvođač molekularnih reagensa

rbcL – gen za veliku podjedinicu enzima ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza

RNA – ribonukleinska kiselina

SD – standardna devijacija

SIMPER – analiza doprinosa vrsta sličnosti/različitosti zajednica (engl. Similarity Percentage Analysis)

TBE – TRIS–borat–EDTA pufer

Tm – temperatura taljenja početnica u PCR reakciji

UV – ultraljubičasto zračenje

1. UVOD

1.1 Fitoplankton

Oceani prekrivaju oko 70,8% Zemljine površine te imaju ključnu ulogu u biogeokemijskim procesima u biosferi. Fotosintetski procesi važni su za izmjenu plinova između atmosfere i hidrosfere čime izravno utječu na globalnu klimu. Među najvažnijim organizmima u morskom ekosustavu ističe se fitoplankton koji ima ključnu ulogu u primarnoj proizvodnji oceana. Osobito su važni u globalnom ciklusu ugljika jer predstavljaju najveći dugoročni rezervoar anorganskog ugljika u biosferi te učinkovito sudjeluju u izmjeni CO₂ između atmosfere i hidrosfere. Fotosintetski procesi u oceanima omogućuju fiksaciju atmosferskog ugljikova dioksida u organsku tvar, čime izravno utječu na koncentraciju stakleničkih plinova i klimatski sustav Zemlje. Putem tzv. biološke pumpe dio fiksiranog ugljika transportira se u dublje slojeve oceana, gdje biva pohranjen tisućama godina, čineći oceanske ekosustave jednim od glavnih regulatora atmosferskog CO₂. Procjenjuje se da je fitoplankton odgovoran za 95% ukupne fotosinteze u oceanima te sudjeluje u vezivanju oko 40% globalnog ugljika (Parsons i sur., 1984; Falkowski i sur., 1998; Bristov i sur., 2017). Autotrofni i miksotrofni plankton razvija se u površinskom dijelu oceana, epipelagijalu. U tom sloju odvija se najveći dio primarne proizvodnje i biološke aktivnosti. Unatoč visokoj produktivnosti, epipelagijal obuhvaća samo 5% volumena svih oceana. Uz epipelagijal (do 200 m), morski okoliš obuhvaća i mezopelagijal (200–1000 m) s ograničenim prodorom svjetlosti, batipelagijal (1000–4000 m) koji je u potpunosti afotičan, abisopelagijal (4000–6000 m) te hadalopelagijal (ispod 6000 m), vezan uz oceanske brazde i obilježen ekstremnim uvjetima okoliša. Razvoj populacija i raspodjela fitoplanktona ovisi o fizikalnim (svjetlost, temperatura, gibanja morske vode), kemijskim (salinitet, koncentracija nutrijenata) i biološkim čimbenicima (interspecijski i intraspecijski odnosi) (Viličić i sur., 2009; Thurman i Trujillo, 2014; Mann i Lazier, 2006). Njihova sposobnost zadržavanja u vodenom stupcu rezultat je niza morfoloških i fizioloških prilagodbi, uključujući specifičnu staničnu građu, razlike u gustoći staničnih struktura te prisutnost lipidnih kapljica. Organizmi fitoplanktona su jednostanični i kolonijalni, autotrofni i miksotrofni mikroorganizmi – eukariotske alge i prokariotske cijanobakterije. Prokariotske skupine fitoplanktonske zajednice obuhvaćaju cijanobakterije, koje frakcijom najčešće pripadaju pikoplanktonu (0,2–2 µm) (Reynolds, 2006; Falkowski i Raven, 2007). Eukariotski predstavnici obuhvaćaju više taksonomskih skupina, uključujući zelene alge (Chlorophyta), dijatomeje (Bacillariophyta), dinoflagelate (Dinophyceae), haptofite (Haptophyta, uključujući kokolitofori) te brojne druge taksonomske skupine. Organizme ove zajednice karakterizira izrazit raspon veličina, približno od 0,2 do 200 µm, pri čemu se razlikuju pikoplankton (0,2–2 µm), nanoplankton (2–20 µm) i mikropilankton (20–200 µm) (Sieburth i sur., 1978).

Populacije fitoplanktona nejednolike su raspoređene poput oblaka u atmosferi, čija je veličina od nekoliko centimetara do nekoliko kilometara. Oblak fitoplanktona razvija se u području s povoljnim ekološkim uvjetima za početak fotosinteze. Razvoj gustih populacija fitoplanktona naziva se cvjetanjem mora i opisuje se znatnim porastom brojnosti ili biomase te promjene staničnih koncentracija pigmenta u odnosu na godišnju prosječnu vrijednost (Viličić, 2003).

Povoljni uvjeti pri kojima brojnost fitoplanktonskih stanica raste su: dovoljna koncentracija glavnih nutrijenata i mikronutrijenata, odgovarajući salinitet, stabilne vremenske prilike i dovoljna gustoća

početne populacije (kritična gustoća). Oko 300 vrsta fitoplanktona može izazvati intenzivno cvjetanje ili obojene plime u određenim okolišnim uvjetima (Smayda, 1997). Boja mora mijenja se zbog prisutnosti povećane količine pigmenta pa obojena plima može biti crvena, smeđa, žuta ili zelena. Pomoćni pigmenti (karotenoidi i fikobilini) prenose Sunčevu energiju na klorofil *a*, zajednički pigment kod svih algi, a procesom fotosinteze stanice iz anorganskih spojeva tvore organske spojeve (autotrofija). Manje stanice obično razvijaju gušće populacije od većih stanica, a sastav pigmenata ovisi o svjetlosnim uvjetima razvoja (Jeffrey i sur., 1997; Smayda, 1997; Kirk, 2011).

Jednostanične alge sadrže klorofil *a* i pomoćne fotosintetske pigmente raspoređene u plastidima (eukarioti) ili u citoplazmi (prokarioti). Fitoplanktonske skupine posjeduju različite fotosintetske pigmente koji omogućuju apsorpciju svjetlosti u širokom rasponu valnih duljina, približno od 400 do 700 nm. Primarni pigment je klorofil *a*, prisutan u svim fotosintetskim organizmima, koji apsorbira svjetlost u plavom (oko 450 nm) i crvenom dijelu spektra (oko 662 nm). Sekundarni pigmenti uključuju klorofil *c*, koji apsorbira uglavnom plavo svjetlo te karotenoide, poput fukoksantina, koji učinkovito apsorbiraju plavo-zeleni dio spektra (oko 450–540 nm). Uz njih, fikobilini, karakteristični za cijanobakterije i neke alge, uključuju fikocijanin, koji apsorbira narančasto-crveno svjetlo (oko 620 nm) te fikoeritrin, koji apsorbira zeleno svjetlo (oko 550–565 nm). Raznolikost fotosintetskih pigmenata omogućuje učinkovitu fotosintezu u različitim svjetlosnim uvjetima i na različitim dubinama vodenog stupca (Falkowski i Raven, 2007; Kirk, 2011; Jeffrey i sur., 1997; Smayda, 1997).

Uz visoki udio u globalnoj primarnoj proizvodnji fitoplankton obavlja niz ekoloških funkcija u morskom ekosustavu. Osim sudjelovanja u biogeokemijskim ciklusima ugljika, dušika, silicija i fosfora, fitoplankton je usko povezan i s procesima u atmosferi. Tijekom masovnih cvjetanja pojedine skupine fitoplanktona, poput kokolitoforida, proizvode i oslobađaju hlapljive sumporne spojeve, ponajprije dimetilsulfid. Oslobođeni dimetilsulfid prelazi u atmosferu, gdje sumporni aerosoli sudjeluju u stvaranju oblaka iznad oceana te time mogu utjecati na klimatske i meteorološke procese (Treguer i sur., 1995; Falkowski i sur., 1998; Hasle, 2002; Viličić, 2003).

1.2. Dijatomeje

Dijatomeje (Bacillariophyta) predstavljaju jednu od ekološki najvažnijih skupina eukariotskog fitoplanktona. Jednostanični su fotoautotrofni organizmi, rasprostranjeni u vodenim i vlažnim okolišima s predstavnicima u pelagičkom i bentoskom području te u epifitskim zajednicama (Car i Kaleli, 2025). Dijatomeje (alge kremenjašice) posjeduju specifičan preoblikovani periplast koji tvori frustulu (ljušturicu) građenu od amorfnog silicijevog opala ($\text{SiO}_2 \times n\text{H}_2\text{O}$), nastalog sintezom silicija iz morskog okoliša u obliku ortosilicijeve kiseline (H_4SiO_4) i njezinih polimera (Lelong i sur., 2012). Veća valva služi kao poklopac (epiteka) i pokriva manji dio valve (hipoteka) (Slika 1.1.). U unutrašnjosti stanica nalaze se izrazito velike vakuole koje zauzimaju do 90% staničnog prostora (Lelong i sur., 2012). S obzirom na građu ljušturice, dijatomeje se razvrstavaju u dvije glavne morfološke skupine: centrične dijatomeje (Centrales) te penatne dijatomeje (Pennales). Centrične dijatomeje imaju radijalnu simetriju i pretežito su planktonske. Penatne dijatomeje imaju bilateralnu simetriju te su u najvećem broju povezane s bentoskim i epifitskim staništima iako uključuju i značajan broj pelagičkih vrsta, poput roda *Pseudo-nitzschia*. Tradicionalno se vrste roda

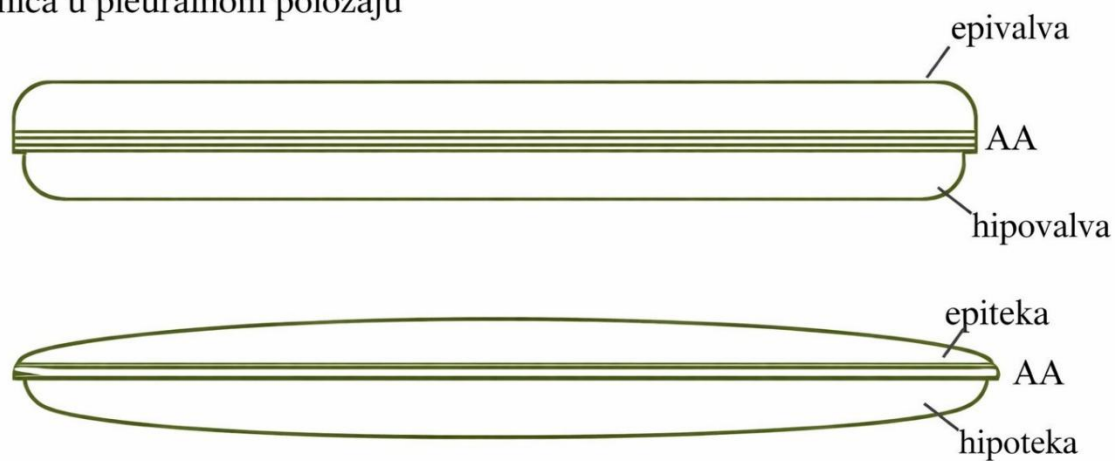
Pseudo-nitzschia razvrstavaju na temelju morfoloških obilježja u dvije glavne skupine: skupinu *P. delicatissima*, sa širinom stanice manjom od 3 µm i skupinu *P. seriata*, sa širinom stanice većom od 3 µm. Ipak, neke vrste, poput *P. multistriata* i *P. pungens*, obuhvaćaju obje morfokategorije zbog preklapanja širine stanica. Prisutnost kriptičnih i pseudo-kriptičnih vrsta (Amato i sur., 2007, 2019; Bates i sur., 2018) unutar ovoga roda ograničava preciznost tradicionalno korištenih morfoloških metoda te nameće potrebu za sveobuhvatnim pristupom koji kombinira morfološke i molekularne analize. Kriptične vrste predstavljaju genetički jasno odvojene evolucijske linije koje nije moguće morfološki razlikovati. Pseudo-kriptične vrste također su genetički odvojene, ali među njima postoje male ali mjerljive morfološke razlike koje se mogu pouzdano utvrditi elektronskom mikroskopijom.

Pigmenti imaju ključnu ulogu u prikupljanju Sunčeve energije za fotosintezu, ali sudjeluju i u fotoprotektivnim procesima i u antioksidativnoj zaštiti. Glavni fotosintetski pigment dijatomeja je klorofil *a*, dok je klorofil *c* prisutan u manjim količinama te sudjeluje kao pomoćni pigment u apsorpciji svjetlosne energije. Najznačajniji sporedni pigment je fukosantin koji dominira u odnosu na ostale karotenoide. Uz njega se pojavljuju i β-karoten, diadinoksantin i diatoksantin, koji imaju dodatnu ulogu u fotoprotekciji (Dijkman i Kromkamp., 2006; Falkowski i Raven., 2007; Kirk, 2011; Kuczynska i sur., 2015).

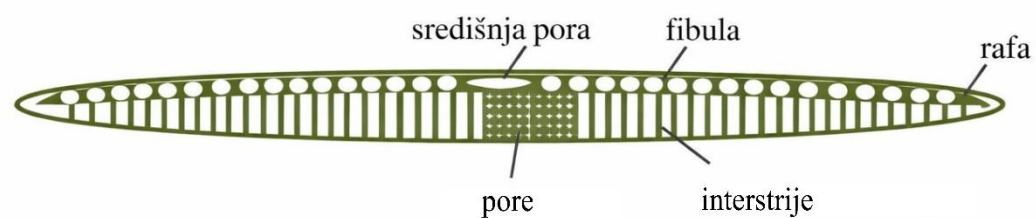
1.3. Morfološka obilježja stanica *Pseudo-nitzschia*

Stanice roda *Pseudo-nitzschia* se u morskoj vodi nalaze pojedinačno ili u lancima povezane apikalnim krajevima. Najčešće su ravne poput igle ili blago sigmoidalne. U valvalnom položaju oblik može varirati od lanceolatnog do linearnog, sa zaobljenim ili šiljastim krajevima. U bočnom položaju stanice su najčešće fuziformne ili pravokutne te obično sadrže dva kloroplasta, smještena s obje strane jezgre (Hasle, 1994; Lundholm i sur., 2004). Sve vrste imaju rafu, uzdužnu pukotinu smještenu na rubu valve. Rafa se proteže duž cijele valve, a na dvjema valvama položena je na suprotnim stranama, što je obilježje simetrije tipa *Nitzschia*. U nekih vrsta rafa je prekinuta u središtu pa se u tom području nalazi središnja pora (porus centralis) smještena na ojačanom središnjem čvoru (nodulus centralis). S unutrašnje strane rafa je poduprta fibulama, čime se tvori rafa s kanalom (Marić Pfannkuchen, 2013). Valve sadrže strije, tj. slabije silicificirane trake sa sitnim porama. Strije se izmjenjuju s jače silicificiranim interstrijama. Njihova je građa važno morfološko obilježje. Strije mogu biti uniserijatne (s jednim redom pora) ili multiserijatne (s više redova pora) (Slika 1.2.). (Marić Pfannkuchen, 2013).

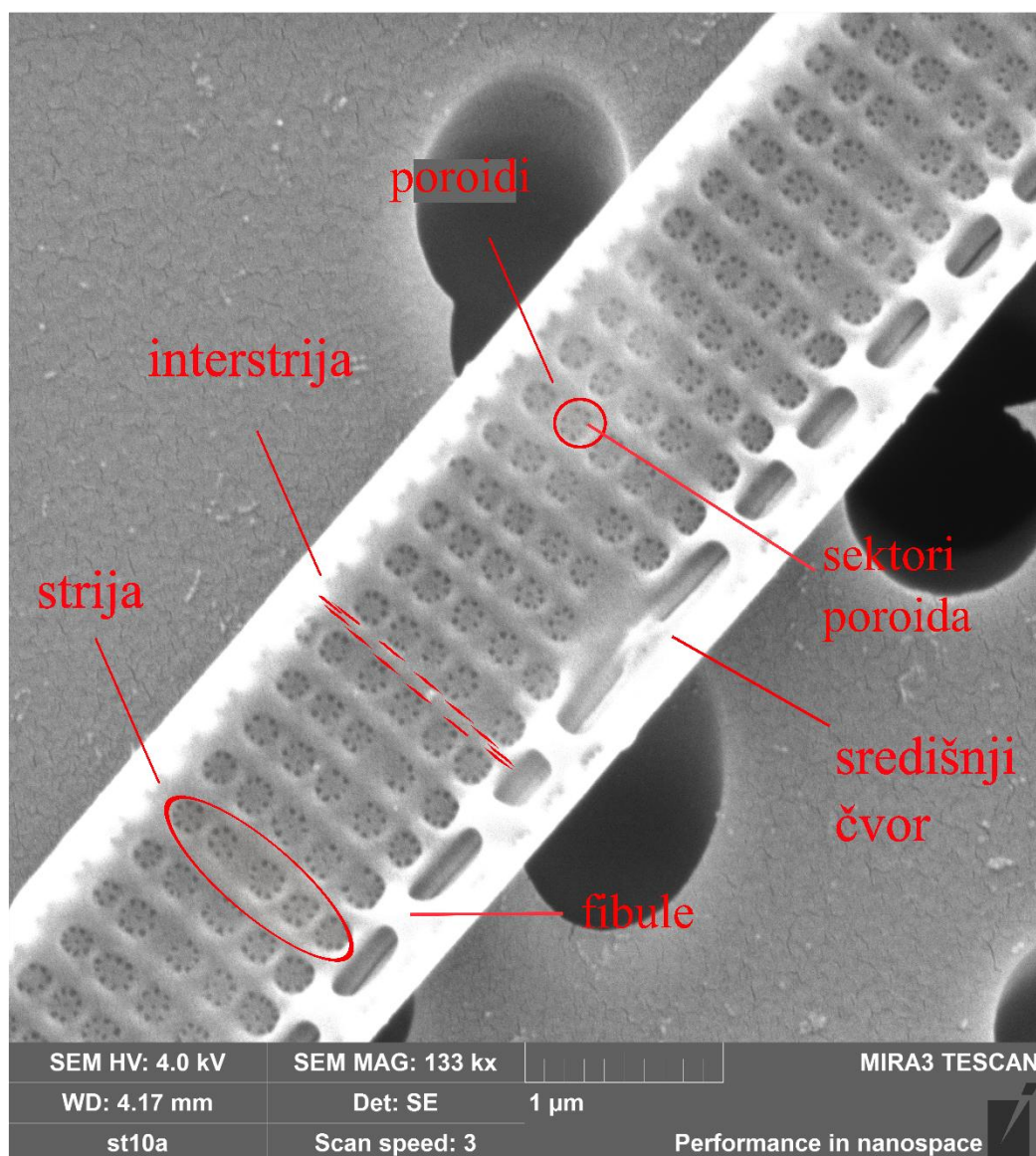
1. Stanica u pleuralnom položaju



2. Stanica u valvalnom položaju



Slika 1.1. Morfologija stanice *Pseudo-nitzschia*, 1) stanica u bočnom položaju, presjek kroz apikalnu ravninu i 2) stanica u valvalnom položaju. AA predstavlja apikalnu os.

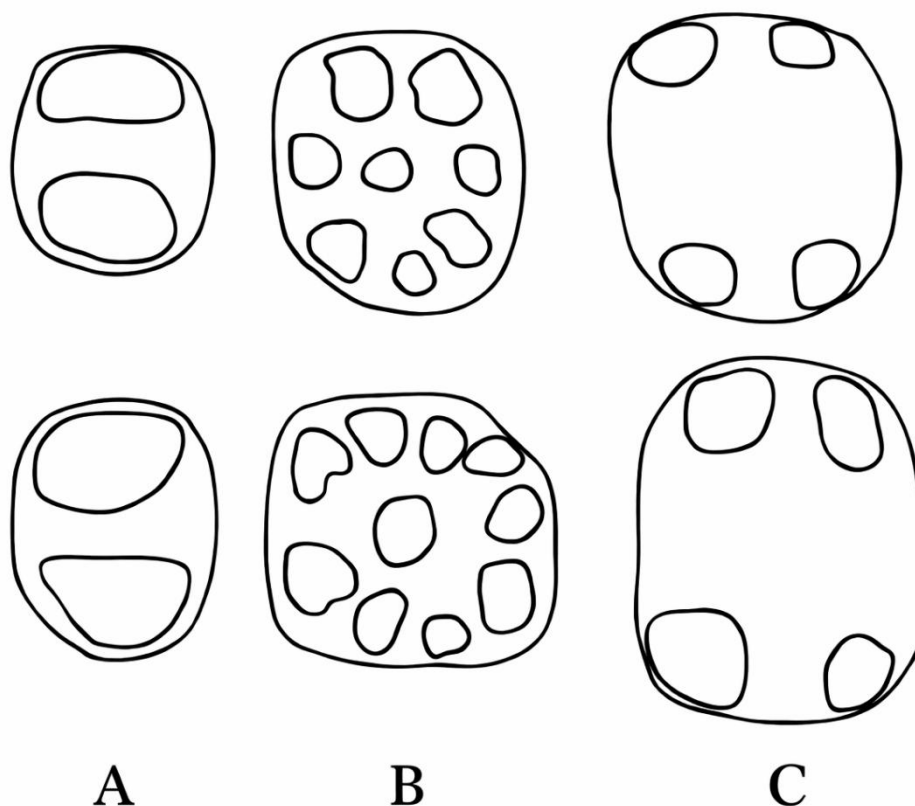


Slika 1.2. *Pseudo-nitzschia calliantha*. Mikrografija elektronskog mikroskopa (FE-SEM/STEM) sa označenim dijelovima stanice koji služe za određivanje vrste.

U unutrašnjosti pora se nalazi tanak silicijev sloj, perforiran u specifičan uzorak, poznat kao cribrum ili velum. Velum je najtanji dio silicijeve ljušturice i predstavlja mjesto gdje se odvija izmjena tvari između stanice i okolnog medija (Marić Pfannkuchen, 2013).

Određivanje pojedinih vrsta roda *Pseudo-nitzschia* moguće je samo pomoću spomenutih morfoloških obilježja, uključujući oblik, dužinu i širinu valve, broj strija i fibulate opis građe pora (Slika 1.3.), prisutnost ili odsutnost središnje pore. Većina struktura se može pouzdano prepoznati samo elektronskim mikroskopom. Taksonomija ovih dijatomeja tradicionalno se temelji na morfološkim obilježjima silicijeve ljušturice, no u novije se vrijeme sve više primjenjuju

molekularne metode koje nadopunjuju morfologiju te omogućuju potvrdu postojećih ili otkrivanje novih vrsta (Lundholm i sur., 2002; 2003).

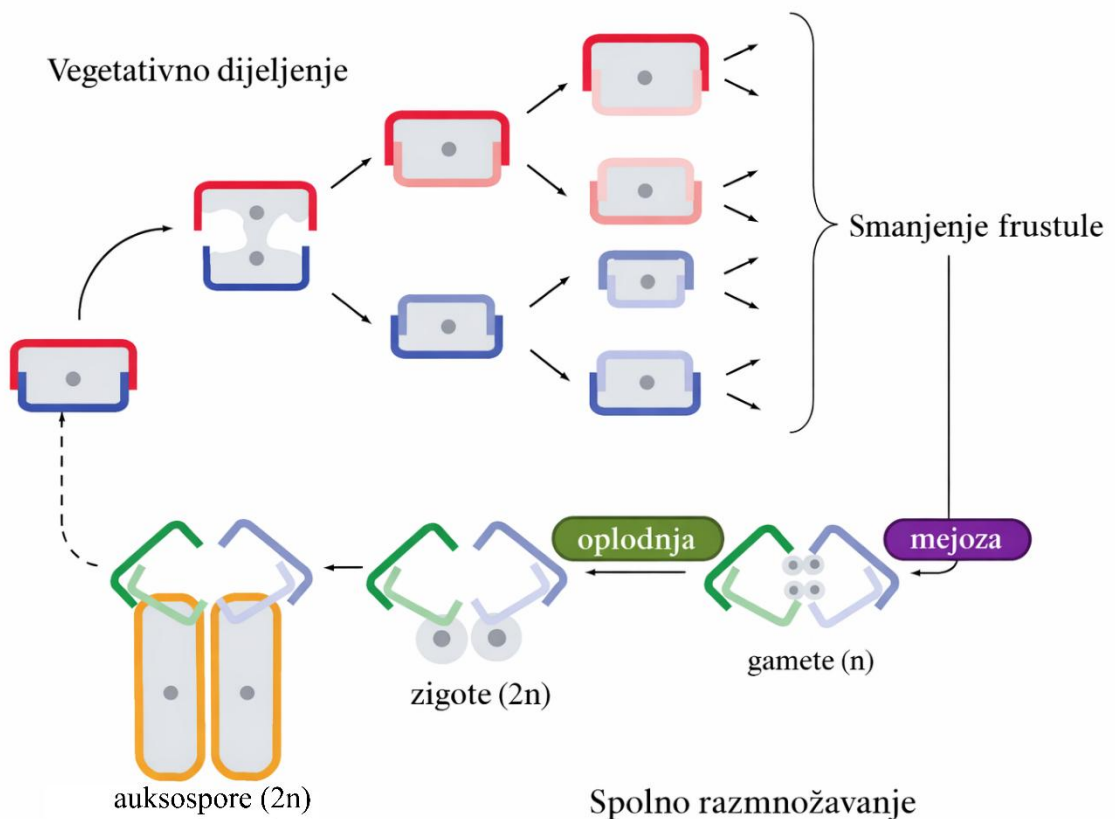


Slika 1.3. Morfološka obilježja pora različitih vrsta *Pseudo-nitzschia*. A) *P. delicatissima/cuspidata* kompleks, B) *P. calliantha*, C) *P. cacialantha*. Preuzeto iz Lundholm i sur., 2003.

1.4. Razmnožavanje *Pseudo-nitzschia*

Vrste roda *Pseudo-nitzschia* razmnožavaju se nespolno i spolno. Nespolnim razmnožavanjem u prirodi stanice se vegetativno dijele. Roditeljska hipoteka (manja teka) postaje epiteka (veća teka) nove stanice (Lelong i sur., 2012). Unutar nove epiteke stvara se i nova hipoteka. Kao rezultat toga, stanice se skraćuju diobom. Donja granica veličine pri kojoj stanica koja nastaje kao posljedica kontinuirane vegetativne diobe nije kod svih stanica ista i obuhvaća širok raspon veličina. Za *P. delicatissimu* to je 20-90% maksimalne duljine stanice, za *P. multiseries* iznosi 23-70%, a za *P. pungens* iznosi 20-60% maksimalne duljine stanice (Amato i sur., 2005; Davidovich i Bates, 1998; Chepurnov i sur., 2005; Lelong i sur., 2012). Kad stanice dosegnu minimalni raspon veličine, gube sposobnost daljnjeg razmnožavanja te postupno ugibaju. Povratak na prvotnu, najveću staničnu veličinu zahtjeva spolno razmnožavanje. Do njega dolazi nakon niza vegetativnih dioba, kada stanice padnu ispod kritične veličine potrebne za održivost populacije (Davidovich i Bates, 1998; Amato i sur., 2005; Lelong i sur., 2012; Marić Pfannkuchen, 2013) (Slika 1.4.).

Većina saznanja o spolnom razmnožavanju, auksosporulaciji, potječe iz laboratorijskih istraživanja vrsta *P. multiseriis* i *P. pungens* (Davidovich i Bates, 1998; Chepurnov i sur., 2005). Faze spolnog ciklusa u prirodi teško su uočljive zbog osjetljivosti gameta, zigota i auksospora. Unatoč tome, 2010. godine prvi put je zabilježeno masovno spolno razmnožavanje ovog roda u prirodnim populacijama te je pokazano da se životni ciklus vrsta *Pseudo-nitzschia* u prirodi odvija u razmacima od približno dvije do tri godine, kao i u laboratorijskim istraživanjima (Alelio i sur., 2010; Holtermann i sur., 2010; Sarno i sur., 2010). Međutim, još nije razjašnjeno kako se u prirodi stanice suprotnih tipova parenja međusobno pronalaze niti što pokreće početak spolnog ciklusa (Lelong i sur., 2012).



Slika 1.4. Prikaz životnog ciklusa penatne dijatomeje. Preuzeto iz Marić Pfannkuchen, 2013.

1.5. Molekularna obilježja stanica *Pseudo-nitzschia*

Najnovija istraživanja roda *Pseudo-nitzschia* objedinjuju morfološke i molekularne metode kako bi se sa što većom točnošću istražile razlike među vrstama, a razlog tome je pojava kriptičnih i pseudo-kriptičnih vrsta (Lundholm i sur., 2003, 2006; Orsini, 2002, 2004; Quijano-Scheggia i sur., 2008). Kriptične vrste su morfološki identične no genetski različite. Pseudo-kriptične vrste su genetski različite i pokazuju neznatne morfološke razlike (Evans i sur., 2007). Iako je određivanje do razine vrste pojednostavljeno molekularnim metodama, taksonomski razvoj roda *Pseudo-nitzschia* se i dalje oslanja na temeljitom razumijevanju morfoloških obilježja. Većina molekularnih

metoda koje se koriste pri određivanju roda *Pseudo-nitzschia* temelji se na DNA sekvenciranju (Sanger) čiji se rezultati koriste za izgradnju filogenetskih stabala te opisivanju razlika među vrstama (Orsini i sur., 2002; Cerino i sur., 2005; Marić Pfannkuchen, 2013; Turk Dermastia i sur., 2023; von Dassow i sur., 2023; Arapov i sur., 2023; Niu i sur., 2024; Bonačić i sur., 2025). Analiza molekularnih rezultata može rasvijetliti kriptične komplekse koji se tradicionalnim mikroskopskim metodama ne mogu odrediti do razine vrste. U većini istraživanja roda *Pseudo-nitzschia* se koristi genski biljeg ITS (ITS1 – 5.8S – ITS2) (Lundholm i sur., 2003, 2006; Orsini i sur., 2004; Amato i sur., 2007; Kaczmarska i sur., 2007; Casteleyn i sur., 2009; Thessen i sur., 2009; Marić Pfannkuchen, 2013; Grbin i sur., 2017; Lim i sur., 2018; Arapov i sur., 2023; Turk Dermastia i sur., 2020; Giulietti i sur., 2021; Roche i sur., 2022; Sterling i sur., 2022; Bonačić i sur., 2025), LSU fragment (Niu i sur., 2024; Arapov i sur., 2023; von Dassow i sur., 2023), dok novija istraživanja uključuju *rbcL* genski biljeg (Turk Dermastia i sur., 2020; Bonačić i sur., 2025). Pomoću molekularnih metoda određen je velik broj vrsta i razriješene su dvojbe među kriptičnim i pseudo-kriptičnim vrstama. Ono što se prije smatralo grupama novim molekularnim istraživanjima je potvrđeno da *P. pseudodelicatissima* i *P. cuspidata* čine dobro odvojene cjeline, tj. vrste: *P. calliantha*, *P. caciaantha*, *P. manni*, *P. hasleana*, *P. fryxelliana* i grupu *P. pseudodelicatissima/P. cuspidata* (Orsini i sur., 2004; Lundholm i sur., 2006; Quijano-Scheggia i sur., 2008). Unutar pseudo-kriptičnog kompleksa *P. delicatissima*, molekularno su odvojene *P. allochrysa* i *P. delicatissima*. Iako Lim i sur., (2018) tvrde da *P. pseudodelicatissima* i *P. cuspidata* molekularno nisu razjašnjenje, prema Bonačić i sur., (2025) filogenetsko stablo pokazalo je vidljivu interspecifičku varijaciju među njima. Molekularna analiza genskim biljezima informativan je podatak posebice za kriptične i pseudo-kriptične komplekse. Proširenje i napredovanje javno dostupnih baza sekvenci, posebice *rbcL* genskog biljega čiji podaci manjkaju, je neophodno kako bi se metoda visoko-protocnog sekvenciranja (metabarkodiranja) mogla koristiti s još većom razlučivošću i preciznošću pri određivanju *Pseudo-nitzschia* do razine vrsta. Visoko-protocno sekvenciranje proizvodi veliki broj sekvenci, što omogućuje detaljnije određivanje vrsta prisutnih u okolišnom uzorku (Piredda i sur., 2018; Niu i sur., 2024). Određivanje do razine vrste uvelike ovisi o korištenom genskom biljegu, a za rod *Pseudo-nitzschia* najčešće su korišteni ITS1 i *rbcL* genski biljezi (Turk Dermastia i sur., 2020; Niu i sur., 2024).

1.6. Domoična kiselina i amnezijsko trovanje školjkašima (ASP)

Određene vrste *Pseudo-nitzschia* proizvode neurotoksin domoičnu kiselinu (DK). Biosinteza DK zahtijeva visoku razinu energije u stanici *Pseudo-nitzschia* (Pan i sur., 1996). Domoična kiselina je amino kiselina i analog L-glutaminske kiseline, sadrži tri karboksilne skupine te ima devet strukturnih izomera. Vrste *P. australis* i *P. seriata* proizvode izomere DK, a neki su pronađeni u mesu školjkaša te predstavljaju produkt njihove razgradnje (Rhodes i sur., 2006; McCarron i sur., 2011; Hansen i sur., 2011).

DK raspada se u vodi pri temperaturama višim od 50 °C i pri ekstremnim pH vrijednostima (ispod 2 i iznad 12). Fotoosjetljiva je te se upravo fotodegradacija smatra jednim od najvažnijih načina

uklanjanja DK iz morskog okoliša (Bouillon, 2006; Bates, 2018). U živčanom sustavu čovjeka DK se trajno veže na dendrite (živčane nastavke). Neurotoksin DK može se akumulirati u morskim organizmima filtriranjem morske vode (npr. u školjkašima), ali i u drugim morskim organizmima poput morskih ptica, morskih lavova i glavonožaca pri čemu može doći do trovanja koje nazivamo amnezijско trovanje školjkašima (ASP) (Bates i sur., 1998; Trainer i sur., 2012; Tomašević i sur., 2025). Ovaj tip toksičnosti kod ljudi, ali i kod drugih sisavaca i ptica izaziva simptome kao što su: glavobolja, smetenost, gubitak pamćenja, mučnina i povraćanje po čemu je ovaj tip toksičnosti i dobio ime (Teitelbaum i sur., 1991; Lelong i sur., 2012). Od 63 opisane vrste roda *Pseudo-nitzschia*, kod 28 je utvrđena sposobnost proizvodnje DK (Dong i sur., 2020; Lundholm i sur., 2024; Guiry, 2024).

1.7. Kratki pregled dosadašnjih istraživanja

Dosadašnja istraživanja raznolikosti roda *Pseudo-nitzschia* na istočnoj obali Jadranskog mora temelje se uglavnom na morfološkim analizama elektronskom mikroskopijom. U vodama srednjeg Jadrana do danas je temeljem morfoloških analiza zabilježeno devet vrsta: *P. calliantha*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta*, *P. lundholmiae*, *P. manni*, *P. multistriata*, *P. pseudodelicatissima/cuspidata*, *P. subfraudulenta* i *P. pungens* (Burić i sur., 2008; Arapov i sur., 2016, 2017, 2020). Mali broj istraživanja uključivao je molekularnu identifikaciju te su potvrđene vrste *P. mannii* i *P. allochroa* (ranije određena kao *P. cf. arenysensis* (Arapov i sur., 2020; Percopo i sur., 2022)). Sveobuhvatni podaci, uključujući morfološke i molekularne analize nisu dostupni za područje srednjeg Jadrana. Prethodna istraživanja u obalnim vodama istočnog srednjeg Jadrana ukazuju na potrebu za sveobuhvatnim pristupom kako bi se razdvojile kriptične i pseudo-kriptične vrste istraživanih roda.

Najčešće korišteni genetski biljezi za određivanje *Pseudo-nitzschia* su: ITS (unutarnji transkripcijski međuprostor) (ITS1/5.8S/ITS2)), LSU (velika podjedinica ribosomske RNA) (Penna i sur., 2013; Lundholm i sur., 2003; Lim i sur., 2018; Giuliatti i sur., 2021), dok novija istraživanja uključuju *rbcL* biljeg (ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza) (Turk Dermastia i sur., 2020). Većina molekularnih istraživanja se temelji na analizama staničnih kultura (Sanger sekvenciranje) te su isključivo vezana za područje sjevernog dijela Jadrana (Marić Pfannkuchen., 2013; Penna i sur., 2013; Turk Dermastia i sur., 2020; Giuliatti i sur., 2021). Visoko-protočno sekvenciranje nova je metoda procjene bioraznolikosti u morskome okolišu. Ovom metodom generira se veliki broj sekvenci koje se mogu koristiti za identifikaciju fitoplanktonskih vrsta, ali analiza podataka uvelike ovisi o odabranom genskom biljegu i javno dostupnim bazama sekvenci. Filogenetski markeri koji se najčešće koriste u analizi bioraznolikosti fitoplanktona, kao što su različite regije 18S rDNA, često nisu dovoljno informativne za sve rodove fitoplanktonske zajednice budući da ne mogu razlikovati neke vrste unutar roda *Pseudo-nitzschia*. Najčešće se u istraživanjima bioraznolikosti fitoplanktonske zajednice metodom metabarkodiranja koristi 18S-V4 regija (mala podjedinica). Istraživanje visoko protočnim sekvenciranjem provedeno u obalnim Europskim područjima prema Piredda i sur., (2018) zabilježilo je da rod *Pseudo-nitzschia* obuhvaća 3,7% ukupnog broja očitavanja

fitoplanktonske zajednice. Na području Jadrana istraživanja fitoplanktonske zajednice metabarkodiranjem 18S regije su uspješno zabilježila *Pseudo-nitzschia* rod. Međutim, sastav vrsta nije precizno određen navedenim istraživanjima (Grižančić i sur., 2023; Matek i sur., 2023; Baričević i sur., 2024). Novija istraživanja, primjenom metode metabarkodiranja, usmjerena su na rod *Pseudo-nitzschia*, koristeći markere ITS1 i *rbcL* te su omogućila preciznije rezultate u analizi sastava vrsta. Istraživanjem Roche i sur., (2022) određeno je 17 vrsta *Pseudo-nitzschia* korištenjem ITS1 markera. Prema Turk Dermastia i sur., (2023) veći broj vrsta *Pseudo-nitzschia* zabilježen je korištenjem *rbcL* genskog biljega u odnosu na 18S-V9.

Prema dostupnoj literaturi unutar *Pseudo-nitzschia* roda opisane su ukupno 63 vrste, od kojih 28 proizvodi DK (Bates i sur., 1998; Pistocchi i sur., 2012; Dong i sur., 2020; von Dassow i sur., 2023; Lundholm i sur., 2023, 2024; Guiry, 2024; Niu i sur., 2024). Prvi zabilježeni slučaj ASP-a dogodio se krajem studenog 1987. godine na Prince Edward otoku, u Kanadi. Tada je zabilježeno trovanje 153 osobe od kojih je troje starijih umrlo. Vrsta *Pseudo-nitzschia multiseries* potvrđena je kao uzrok toksičnosti školjkaša (Wright i sur., 1989). Ovo je prvi slučaj u kojem je DK potvrđena kao uzrok trovanja ljudi. U Jadranskom moru DK je prvi put zabilježena 2000. godine u tkivu plave dagnje (*Mytilus galloprovincialis*) prikupljenom uz talijansku zapadnu obalu (Ciminiello i sur., 2005). Domoićna kiselina je u Jadranskom moru pronađena u niskim koncentracijama, no od tada je uveden neprekidan monitoring toksina i morske vode zbog osiguravanja zdravstvene ispravnosti školjkaša. Prema Uredbi (EZ) 853/2004 i hrvatskom zakonodavstvu, najveća dopuštena koncentracija DK u jestivom tkivu školjkaša iznosi $20 \mu\text{g g}^{-1}$. Tijekom godina, DK je povremeno zabilježena u školjkašima iz uzgojnih područja, ali koncentracije su ostale ispod propisanog praga (Tomašević i sur., 2025). Prva pojava DK u hrvatskim vodama zabilježena je u siječnju 2006. u plavoj dagnji (*M. galloprovincialis*) (Ujević i sur., 2010). Od tada je DK povremeno zabilježena u dagnjama iz uzgojnih područja, no uvijek u niskim koncentracijama ispod propisanog praga. Prisutnost DK potvrđena je i u sjevernom Jadranu (Ljubešić i sur., 2011; Marić i sur., 2011; Kvrđić i sur., 2022). Proizvodnja DK utvrđena je kod pet vrsta *Pseudo-nitzschia*: *P. delicatissima* (Penna i sur., 2013; Smolaka Tanković i sur., 2022; Turk Dermastia i sur., 2022), *P. calliantha* (Arapov i sur., 2020; Smolaka Tanković i sur., 2022), *P. multistriata* (Turk Dermastia i sur., 2022), *P. galaxiae* (Turk Dermastia i sur., 2022) i *P. pseudodelicatissima* (Smolaka Tanković i sur., 2022), pri čemu je najveći broj istraživanja proveden u sjevernom Jadranu.

1.8. Cilj i temeljne hipoteze istraživanja

Glavni cilj ovog istraživanja jest odrediti sastav vrsta i raznolikost roda *Pseudo-nitzschia* u obalnim vodama srednjeg Jadrana tijekom dvije godine. Jedan od ciljeva je uvođenje molekularnih analiza čime će se nadopuniti dosadašnja istraživanja temeljena na svjetlosnoj i elektronskoj mikroskopiji. Na ovaj način cilj je razviti integriranu morfološku i molekularnu bazu podataka temeljem analize uspostavljenih staničnih kultura vrsta *Pseudo-nitzschia* kako bi se obogatili javno dostupni pretraživači ITS, LSU i *rbcL* sekvenci u svrhu razlikovanja kriptičnih i pseudo-kriptičnih vrsta. Dodatni cilj je usporedba rezultata o sastavu vrsta *Pseudo-nitzschia* morfološkom analizom i metodom metabarkodiranja.

Hipoteza 1. Nema razlike u prostornoj i sezonskoj raspodjeli vrsta roda *Pseudo-nitzschia* određenih morfološkom analizom.

Hipoteza 2. Nema razlike u prostornoj i sezonskoj raspodjeli vrsta roda *Pseudo-nitzschia* određenih molekularnom analizom.

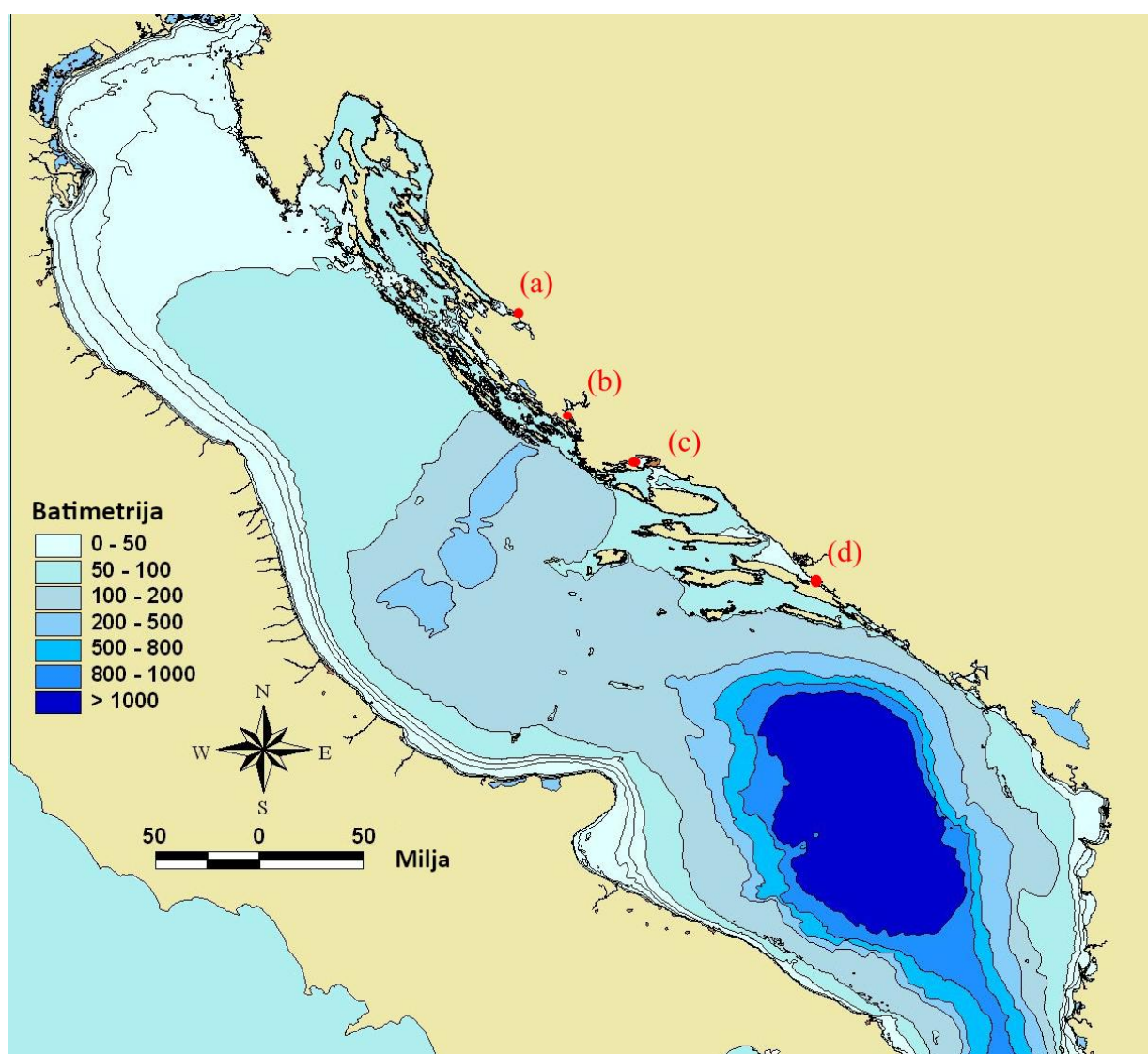
Hipoteza 3. Nema genetske varijacije između izolata određenih vrsta *Pseudo-nitzschia* izoliranih sa istih i različitih područja.

Hipoteza 4. Nema razlike u sastavu vrsta roda *Pseudo-nitzschia* određenih metodom metabarkodiranja regije ITS1 i *rbcL*.

2.MATERIJALI I METODE

2.1. Područje istraživanja

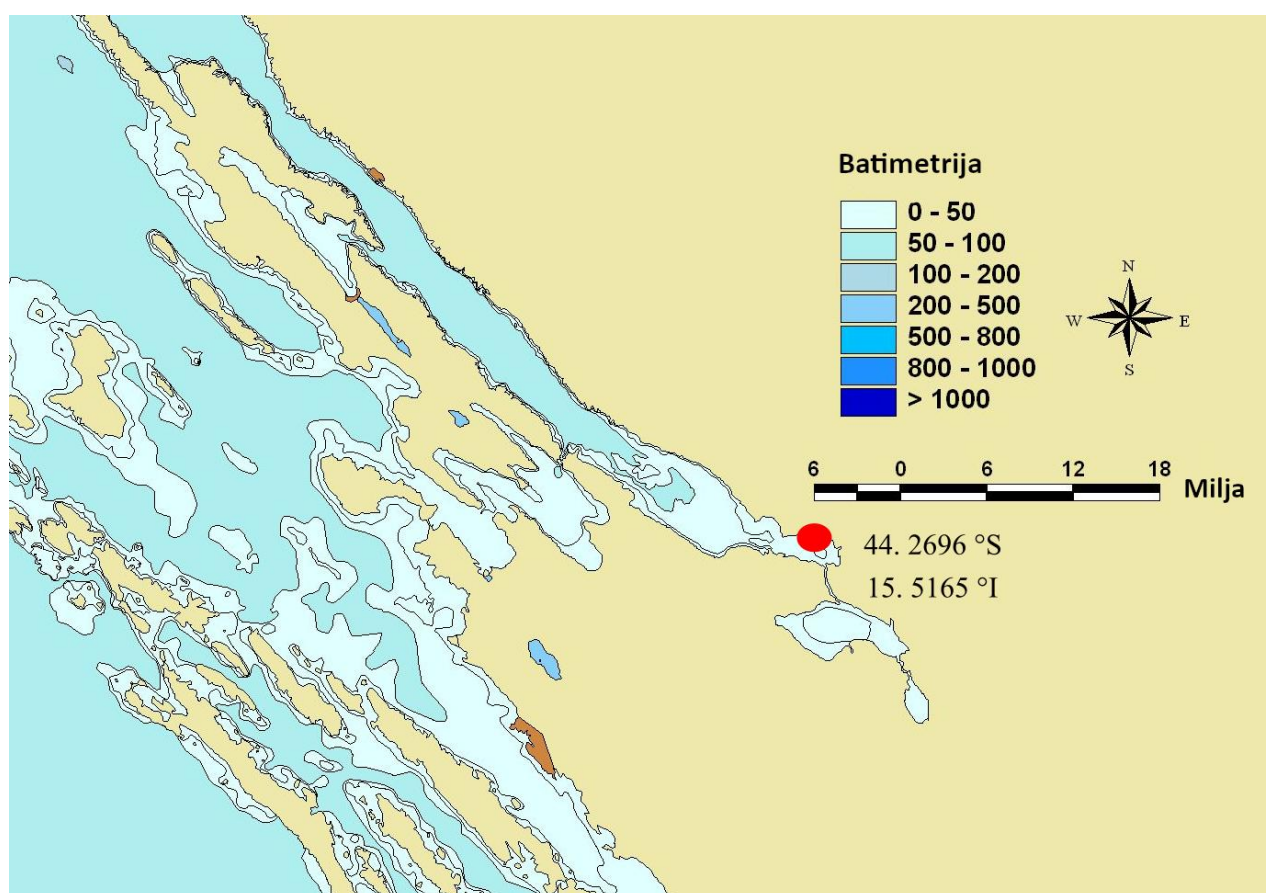
Uzorci su prikupljeni na uzgajilištima školjkaša budući da postoji rizik za ljudsko zdravlje uslijed moguće akumulacije DK u tkivu konzumiranih školjkaša. Istraživačka područja smještena su u obalnim područjima srednjeg Jadrana. Istraživačke postaje uključivale su: Velebitski kanal (V: 44.2696° S, 15.5165° I), Šibenski zaljev (S: 43.7441° S, 15.8712° I), Kaštelanski zaljev (K: 43.5208° S, 16.2717° I) i Malostonski zaljev (M: 42.8676° S, 17.6871° I) (Slika 2.1.).



Slika 2.1. Područje istraživanja i prikaz postaja: (a) V: Velebitski kanal, (b) S: Šibenski zaljev, (c) K: Kaštelanski zaljev, (d) M: Malostonski zaljev.

2.1.1. Velebitski kanal

Velebitski kanal dug je 144 km, a širok 4-14 km. S otvorenim morem povezan je Kvarneričkim vratima između otoka Lošinja i Silbe dok se unutarnji dio kanala proteže u uski estuarij rijeke Zrmanje. Osim rijeke Zrmanje u kanalu se nalazi i niz podzemnih izvora slatke vode (vrulja), koji su posebno aktivni u području istraživane postaje (Benac i sur., 2003; Viličić i sur., 2009). Izvori uz obalu povezani su ponorima vode u zaleđu, koji su aktivni tijekom kišnih mjeseci (ožujak i svibanj) i tijekom razdoblja topljenja snijega (Bonacci i Roje-Bonacci, 2000). Kao posljedica toga salinitet u površinskom sloju uz obalu značajno je smanjen u razdoblju od listopada do svibnja (Viličić i sur., 2009) (Slika 2.2.).

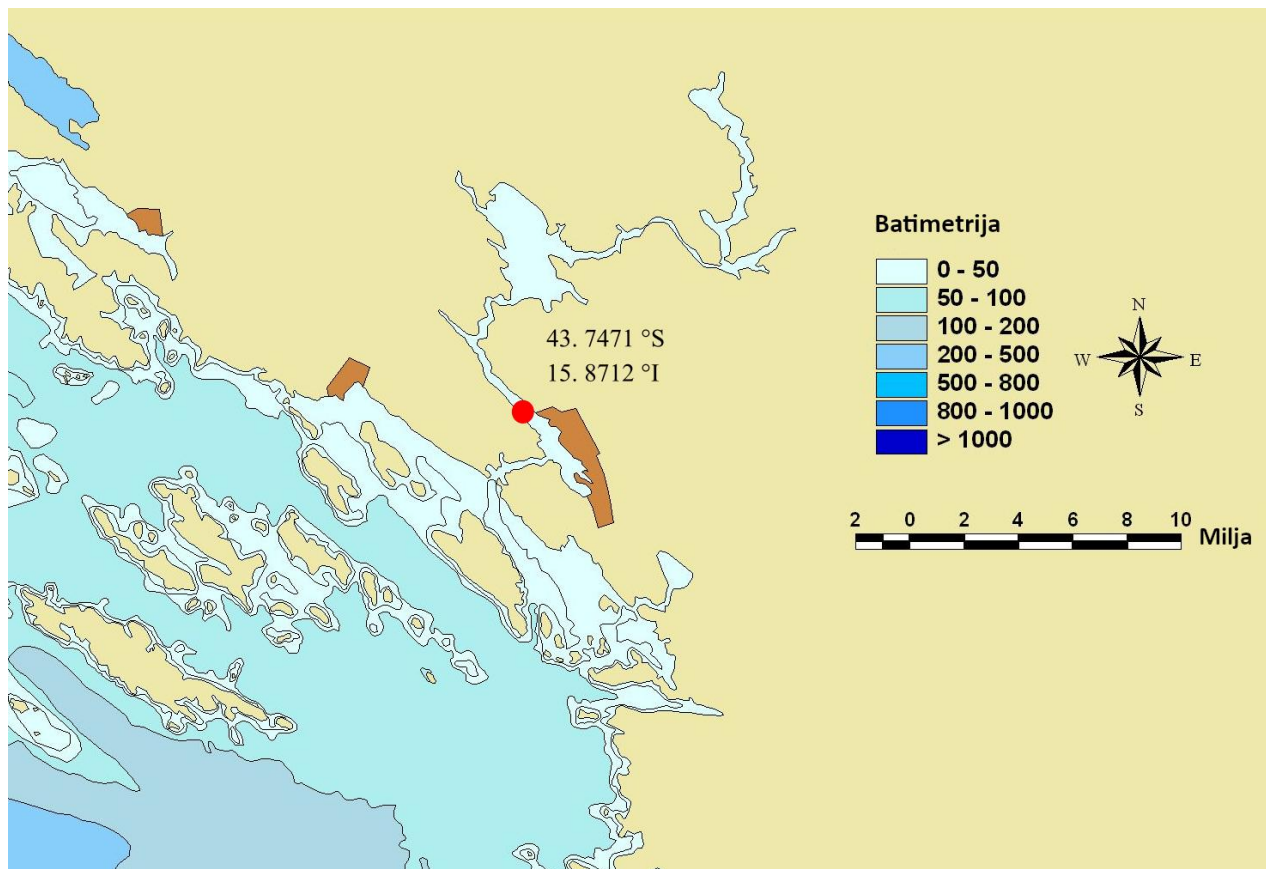


Slika 2.2. Prikaz Velebitskog kanala s pripadajućim koordinatama (V: 44.2696° S, 15.5165° I).

2.1.2. Šibenski zaljev

Estuarij rijeke Krke dio je Šibenskog zaljeva te ulazi u sastav Nacionalnog parka Krka. Dug je 25 km. Područje estuarija obuhvaća Prokljansko jezero te područje Šibenske luke (Viličić, 2003). U površinskom sloju estuarija prevladava slatka voda, a zbog male razlike između plime i oseke

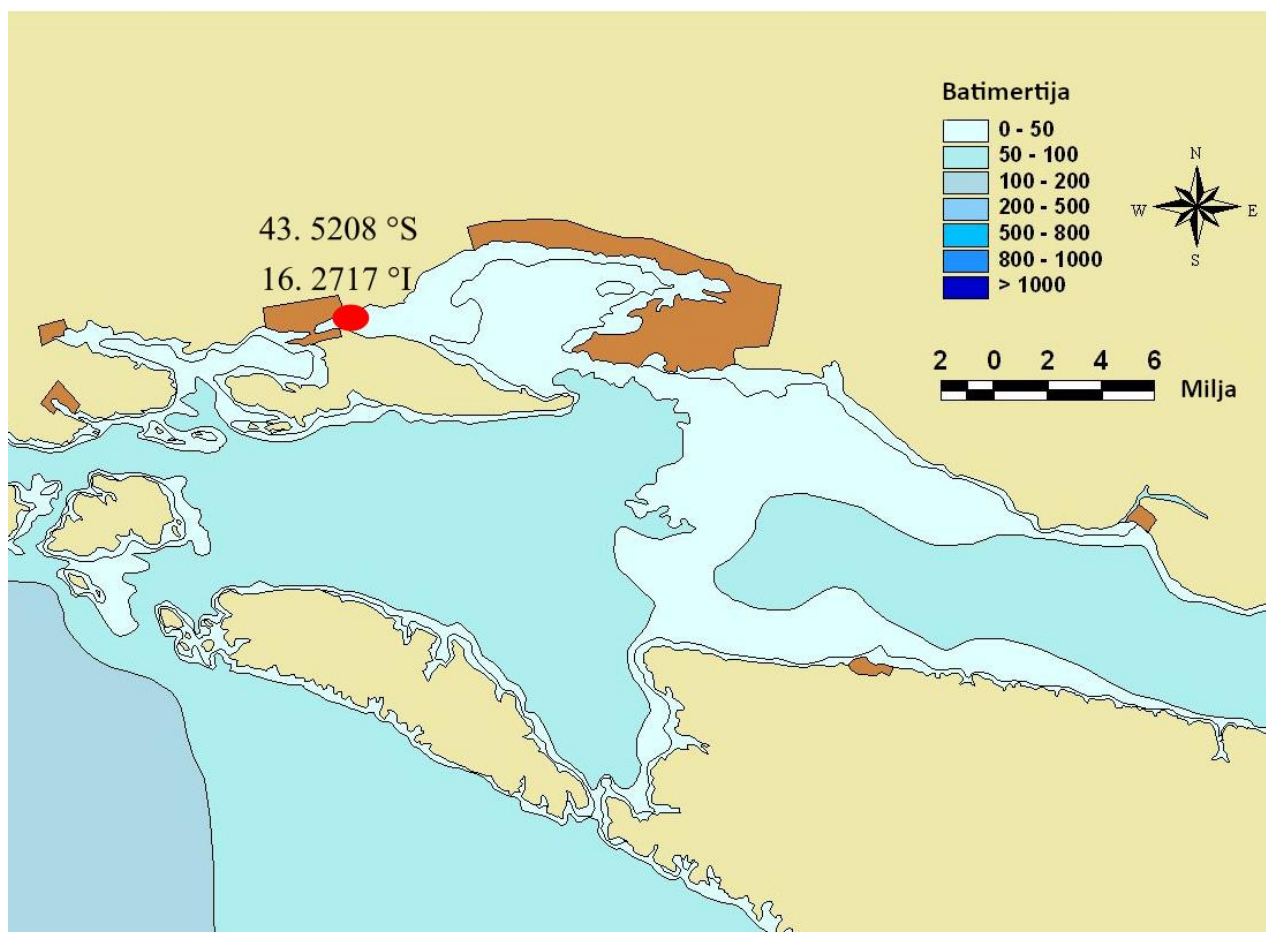
(prosječno 20 cm) te relativno velikom dotoku slatke vode vodeni stupac je stratificiran. Haloklina se najčešće nalazi na dubini 1,8-3 m dok se za vrijeme najvećeg dotoka slatke vode tijekom proljeća i zime nalazi na dubini od oko 5 m (veljača-ožujak i prosinac) (Legović., 1991) (Slika 2.3.).



Slika 2.3. Prikaz Šibenskog zaljeva s pripadajućim koordinatama (S: 43.7441° S, 15.8712° I).

2.1.3. Kaštelanski zaljev

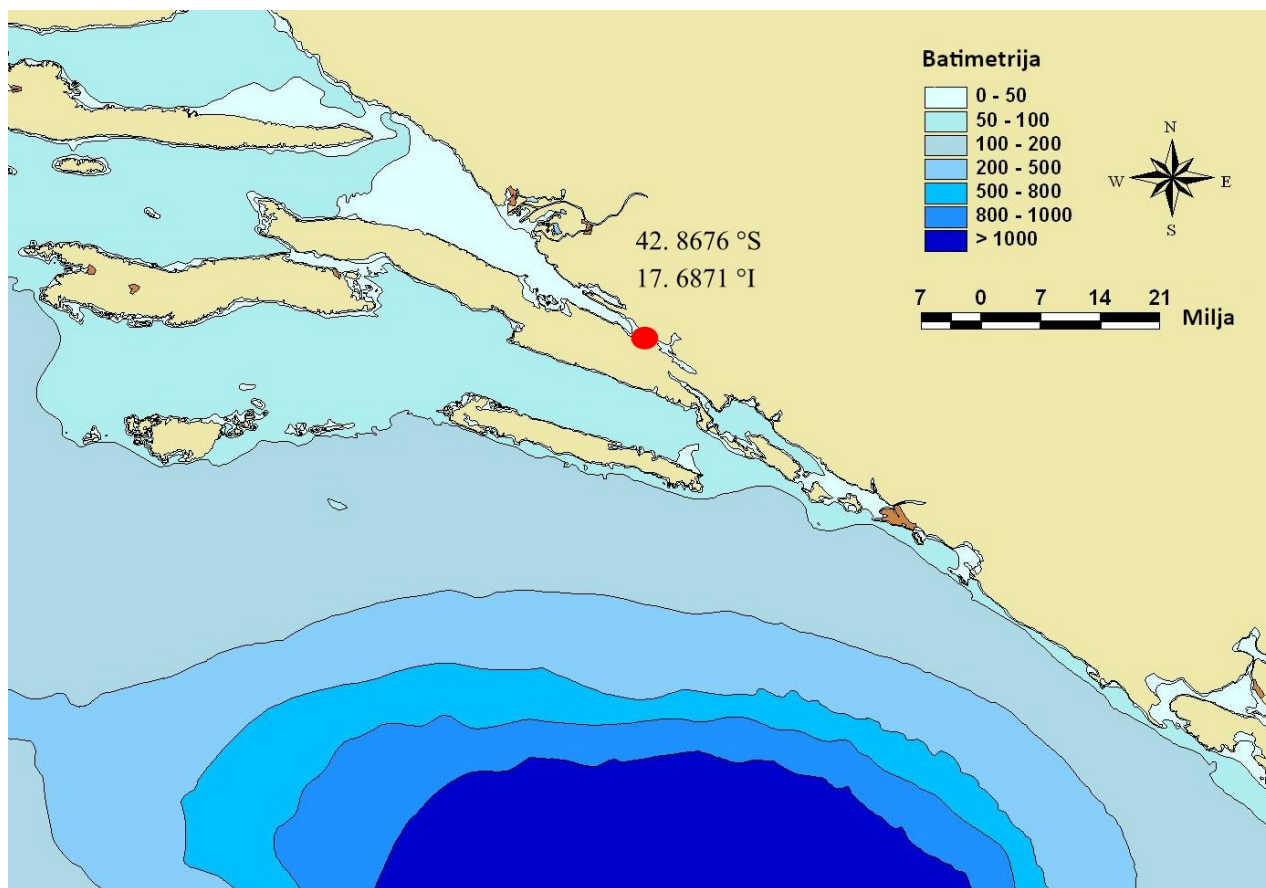
Kaštelanski zaljev je najveći poluzatvoreni obalni zaljev u središnjem dijelu istočne obale Jadranskog mora. Dug je 14,8 km, širok je 6,6 km te prosječne dubine 23 m (Viličić, 2003). Najznačajniji dotok slatke vode u zaljevu je rijeka Jadro, koja se ulijeva u njegov istočni dio (Ljubenković, 2014), uz nekoliko vrulja manjeg kapaciteta. Tijekom 1980-ih zaljev je bio pod snažnim utjecajem nepročišćenih komunalnih i industrijskih otpadnih voda što je uzrokovalo povećanje biomase fitoplanktona i primarne produkcije, a posljedično je dovelo do čestih ljetnih cvatnji fitoplanktona i razvoja toksičnih dinoflagelata (Marasović i sur., 1991). Izgradnjom kolektora 2004. godine antropogeni utjecaj je smanjen, a u zaljevu je zabilježen postupni prijelaz prema oligotrofiji (Skejić i sur., 2015, 2024) (Slika 2.4.).



Slika 2.4. Prikaz Kaštelskog zaljeva s pripadajućim koordinatama (K: 43.5208° S, 16.2717° I).

2.1.4. Malostonski zaljev

Malostonski zaljev se nalazi na završetku Neretvanskog kanala, smješten između poluotoka Pelješca i kopna. Dug je oko 28 km, najširi 6,1 km te je uglavnom dubine 20-29 m (Viličić, 2003). Područje Malostonskog zaljeva najvažnije je područje uzgoja školjkaša u Hrvatskoj još od 16 stoljeća (Skejić, 2004; Čalić i sur., 2013). S ciljem zaštite tradicionalnog načina uzgoja kamenica i dagnji Malostonski zaljev proglašen je 1983. godine rezervatom prirode u moru (Basioli, 1984; Službeni glasnik Dubrovnika i Metkovića, 1983). Najvažniji čimbenici koji oblikuju ekološke uvjete u Malostonskom zaljevu su dotok rijeke Neretve u vanjskom dijelu zaljeva i vrulja, u unutarnjem dijelu zaljeva (Viličić, 1985). Tijekom razdoblja jačih podzemnih aktivnosti, boćata voda izdiže se na površinu i izlazi iz zaljeva što omogućava dotok dublje slanije vode iz otvorenog mora (Zore-Armanda i sur., 1991) (Slika 2.5.).



Slika 2.5. Prikaz Malostonskog zaljeva s pripadajućim koordinatama (M: 42.8676° S, 17.6871° I).

2.2. Izolacija i uspostava staničnih kultura

Na prethodno opisanim područjima, od veljače 2022. do veljače 2024. mjesečno su prikupljani uzorci morske vode fitoplanktonskom mrežicom promjera oka 20 μm . Uzorkovalo se vertikalnim potegom od 5 metara dubine do površine. Iznimno je u Šibenskom zaljevu zbog smanjenog površinskog saliniteta mreža vučena od 7 metara dubine do površine. Istovremeno su na svakoj postaji mjerene vrijednosti temperature i saliniteta sondom YSI Pro 1030 (Xylem Inc., Ohio, SAD) (0, 5, 7 m) (Prilog 1).

Kako bi se uspostavile stanične kulture, pojedinačne stanice ili lanci stanica izolirani su staklenom mikropipetom iz svježih uzoraka fitoplanktonske mreže. Korišteni su invertirni svjetlosni mikroskopi Olympus IX51 (Olympus Corporation, Tokio, Japan) i Leica DMI 4000B (Leica Microsystems CMS, Wetzlar, Njemačka) pri povećanjima od 100x ili 200x. Izolirane stanice isprane su u nekoliko kapi sterilnog f/2 medija uz dodatak silikata, nakon čega su prenesene u ploče s 48 jažica. Za pripremu staničnog medija korištena je morska voda prikupljena na području otvorenog Jadranskog mora (43.0437 S°, 16. 2854 ° I). Prikupljena morska voda profiltrirana je kroz filter veličine pore 1,0 μm (GF 6; Whatman, Maidstone, UK), a nakon filtracije pohranjena je u mrak, na sobnoj temperaturi (20-24 °C) najmanje dva mjeseca prije korištenja. Medij za uzgoj izoliranih stanica vrste *Pseudo-nitzschia* pripremljen je korištenjem autoklavirane morske vode obogaćene hranjivim

tvarima koja je zatim filtrirana kroz membranski filter veličine pore 0,2 μm (Whatman, Maidstone, UK). pH medija za stanične kulture je postavljen između 8,1 i 8,2. Salinitet medija je postavljen između 35-36. Uzgoj kultura se odvijao u svjetlosnoj komori (BIOBASE, Narodna Republika Kina) pri sljedećim uvjetima: rasponu temperature od $14\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ sukladno s okolišnim uvjetima morske vode tijekom prikupljanja uzoraka, uz svjetlosni režim 12:12 h (dan/noć), jačinu svjetlosti od $\sim 108\text{ }\mu\text{mol fotona m}^{-2}\text{ s}^{-1}$. Ploče s izoliranim stanicama redovito su pregledavane zbog praćenja rasta izoliranih stanica, a aktivno rastuće kulture stanica *Pseudo-nitzschia* premještene su u tikvice od 35 mL s medijem. Stakleno posuđe korišteno za rad s kulturama stanica *Pseudo-nitzschia* prethodno je oprano Contrad deterdžentom (Contrad 70, Beckman Coulter, SAD), potom je natopljeno u klorovodičnoj kiselini (HCl) i deioniziranoj vodi po 24 sata. Nakon čišćenja posuđe je sterilizirano autoklaviranjem. Medij je pripremljen prema protokolu Guillard, (1975) i Andersen, (2005). Uspostavljene su 362 stanične kulture vrsta roda *Pseudo-nitzschia* izolirane iz fitoplanktonske zajednice sva četiri istraživana morska područja. Molekularna identifikacija provedena je za najmanje jedan genski biljeg za sve uspostavljene kulture. U daljnju morfološku i molekularnu analizu uvrštene su kulture koje su potvrđene na najmanje 2 genska biljega (ITS, LSU ili *rbcL*).

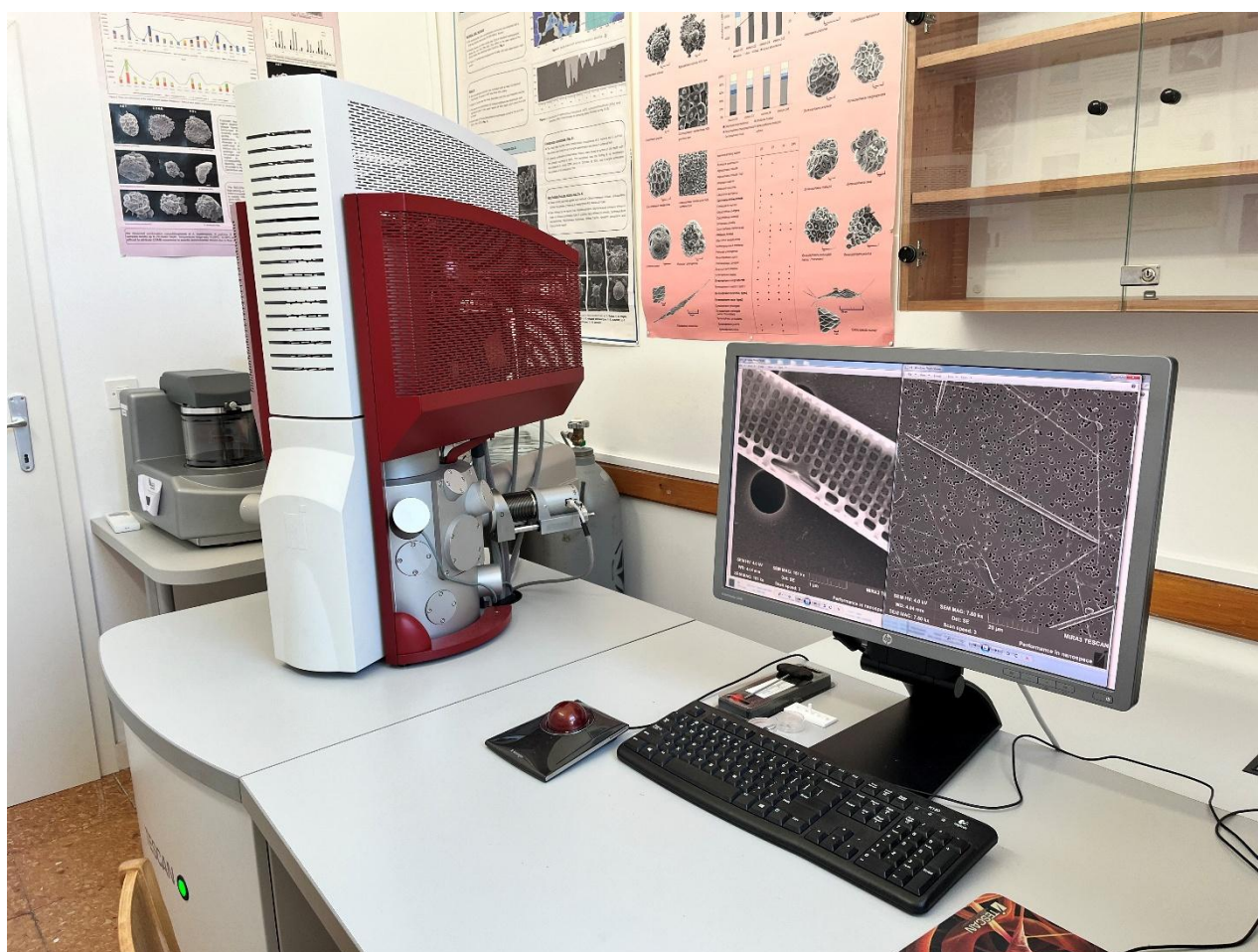
2.2.1. Morfološka analiza

Poduzorci staničnih kultura za morfološko i molekularno određivanje vrsta *Pseudo-nitzschia* prikupljeni su u eksponencijalnoj fazi rasta (unutar razdoblja od 2 do 3 tjedna od izolacije stanica). Za potrebe morfološke analize izolirane stanične kulture su fiksirane kiselom Lugolovom otopinom te su pohranjene na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ u mraku do analize pretražnim elektronskim mikroskopom s emisijom polja (FE-SEM/STEM Mira3tescan, Brno, Češka).

Uzorci staničnih kultura za morfološku analizu pripremljeni su prema metodi Hasle i Fryxell, (1970). Poduzorci staničnih kultura homogenizirani su i preneseni u staklenu Erlenmeyerovu tikvicu. U odvojeni poduzorak stanične kulture *Pseudo-nitzschia* u Erlenmeyerovoj tikvici dodan je jednaki volumen koncentrirane sumporne kiseline (H_2SO_4), u omjeru 1:1. Suspenzija je lagano miješana u digestoru. Potom je u poduzorak dodana zasićena otopina kalijeva permanganata (KMnO_4). Zasićena otopina kalijeva permanganata dodavala se u poduzorak dok otopina ne poprimi ljubičastu boju, što upućuje na oksidaciju organske tvari. Zasićena otopina kalijeva permanganata pripremljena je otapanjem približno 7–8 g kalijeva permanganata u 100 mL destilirane vode. Nakon toga, uzorak je tretiran zasićenom otopinom oksalne kiseline ($(\text{COOH})_2$) koja je pripremljena otapanjem približno 10 g oksalne kiseline u 100 mL destilirane vode. Opisana otopina se u poduzorak dodavala postupno, uz polaganu miješanje nakon svakog dodavanja, dok uzorak nije postao proziran. Pripremljeni poduzorak prebačen je u polipropilenske konusne tubice od 50 mL i ispiran je deioniziranom vodom nakon svakog centrifugiranja (3000 RPM 20 min), sve dok pH vrijednost nije postala približno neutralna (između 6 i 7).

Očišćeni uzorci staničnih kultura filtrirani su kroz polikarbonatne filtere veličine pora 1 μm i promjera 13 mm (Nucleopore, Whatman, Maidstone, UK), a zatim su sušeni u eksikatoru barem 24 sata. Nakon sušenja, filteri su postavljeni na aluminijske nosače te pozlaćeni pomoću napařivača (Quorum Technologies, Q150RES, Lewes, UK) za potrebe analize pretražnim elektronskim mikroskopom (SEM).

Za morfološku analizu korišten je pretražni elektronski mikroskop s emisijom polja dodatno opremljen STEM detektorom (FE-SEM/STEM Mira3tescan, Brno, Češka) (Slika 2.6.). SEM analiza provedena je pri naponu ubrzanja od 4 kV i radnoj udaljenosti od približno 4 mm. Za dodatne analize transmisijским detektorom za STEM analizu, 10–20 μL očišćenog uzorka kulture pažljivo je nanoseno na karbonsku mrežicu presvučenu tankim slojem polimera formvara (FCF200-NI, 200 mrežnih otvora, formvar/karbon presvučena nikal mreža, Electron Microscopy Sciences, Hatfieldpa, SAD). Za analize STEM detektorom, korišćeni su napon ubrzanja u rasponu 7–9 kV i radna udaljenost između 3–6 mm, ovisno o analiziranoj vrsti. Za morfometrijske analize u svakoj kulturi je izmjereno najmanje 10 stanica, a analizirani su sljedeći parametri: dužina i širina valvi (apikalna i transapikalna os), broj fibula i interstrija u 10 μm , broj poroida u 1 μm , broj redova poroida unutar strije, struktura poroida te gustoća strija valvocopule u 10 μm .



Slika 2.6. Pretražni elektronski mikroskop (FE-SEM; Mira3tescan, Brno, Češka).

2.2.2. Molekularna analiza

Za potrebe molekularne analize metodom Sanger sekvenciranja volumen od 6-10 mL kulture je centrifugiran na 4000 RPM 20 minuta. Supernatant je odstranjen sterilnom Pasteurovom pipetom ili dekantiranjem, a talog (pelet stanica) je potom prenesen u 1,5 mL sterilnu mikrocentrifugalnu epruvetu i centrifugiran na 13000 RPM 10 minuta. Uzorci su pohranjeni na -20 °C do daljnje analize (izolacije DNA). Iz sakupljenog taloga uspostavljenih staničnih kultura *Pseudo-nitzschia* izolirana je ukupna genomska DNA korištenjem DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Gilden, Njemačka) u skladu s uputama proizvođača. Koncentracije i čistoće izolirane DNA određene su spektrofotometrom NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, SAD). PCR umnažanje provedeno je korištenjem dvaju različitih enzimskih sustava: Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mixa (New England Biolabs Ipswich, MA, SAD) i Phire Tissue Direct PCR Master Mixa (Thermo Fisher Scientific, SAD), u ukupnom reakcijskom volumenu od 25 µL, prema uputama proizvođača. Reakcijska smjesa pripremljena s Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix enzimom (New England Biolabs Ipswich, MA, SAD), a sadržavala je Master Mix, 0,02 µM početnica u oba smjera, 1 ng/µL uzorka genomske DNA te Ultra Pure DNase/RNase-Free destiliranu vodu (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Za izravne lančane reakcije korišten je enzim Phire Tissue Direct Master Mix (Thermo Fisher Scientific, SAD). Za izravnu lančanu reakciju svježi uzorak stanične kulture *Pseudo-nitzschia* volumena 10-15 mL centrifugiran je na 13000 RPM 20 minuta u mikrocentrifugalnim tubicama volumena 1,5 mL, nakon čega je prikupljeni talog korišten za pripremu lančane reakcije. Reakcijska smjesa sadržavala je 1X Phire Tissue Direct PCR Master Mix, DMSO, DNA Rease, 0,02 µM početnica u oba smjera, 1 µL centrifugiranog taloga staničnog uzorka izolirane stanične kulture *Pseudo-nitzschia* te sterilnu vodu bez nukleaza Ultra Pure DNase/RNase-Free (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, SAD). Tijekom izvođenja lančanih reakcija polimeraze je uključena i negativna kontrola koja je bila pripremljena s istim reagensima, ali bez dodatka DNA. Negativna proba korištena je kao kontrola te je poslužila kao potvrda da tijekom izvođenja PCR reakcije nije došlo do prisutnosti ili unosa kontaminanata.

Za potvrdu vrsta unutar roda *Pseudo-nitzschia*, analizirane su tri različite genske regije: unutarnji transkripcijski međuprostor (ITS: ITS1/5.8S/ITS2), regija velike podjedinice DNA (LSU) te *rbcL* gen (ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza). Uvjeti PCR reakcija optimizirani su u skladu s preporukama proizvođača oligonukleotidnih početnica, pri čemu su temperature taljenja (T_m) korištene kao referentni parametar za određivanje optimalnih uvjeta amplifikacije. PCR produkti vizualizirani su pod UV svjetlom. Za umnažanje ITS regije korištene su kombinacije početnica PSN-F1 (5' GGATCATTACCACACCGATCC 3') i PSN-R1 (5' CCTCTTGCTTGATCTGAGATCC 3') (Noyer i sur., 2015) te ITS-A (5' CCAAGCTTCTAGATCGTAACAAGGTCCGTAGGT 3') i ITS-B (5' CCTGCAGTCGACAATGCTTAATTCAGCGG 3') (Scholin i sur., 1994). Za umnažanje LSU regije korištene su početnice D1R (5' ACCCGCTGAATTTAAGCATA 3') i D3B (5' TCGGAGGGAACCAGCTACTA 3') (Nunn i sur., 1996), kao i kombinacija D1R i D3Ca (5'

ACGAACGATTTGCACGTCAG 3') (Scholin i sur., 1994). Regija *rbcL* gena umnožena je pomoću početnica *rbcL1* (5' AAGGAGAAATHAATGTCT 3') i *rbcL7* (5' AARCAACCTTGTGTAAGTCT 3') (Jones i sur., 2005) (Tablica 2.1.). Uvjeti pri kojima su izvedene PCR reakcije na sva tri genska markera navedeni su u Tablici 2.2.

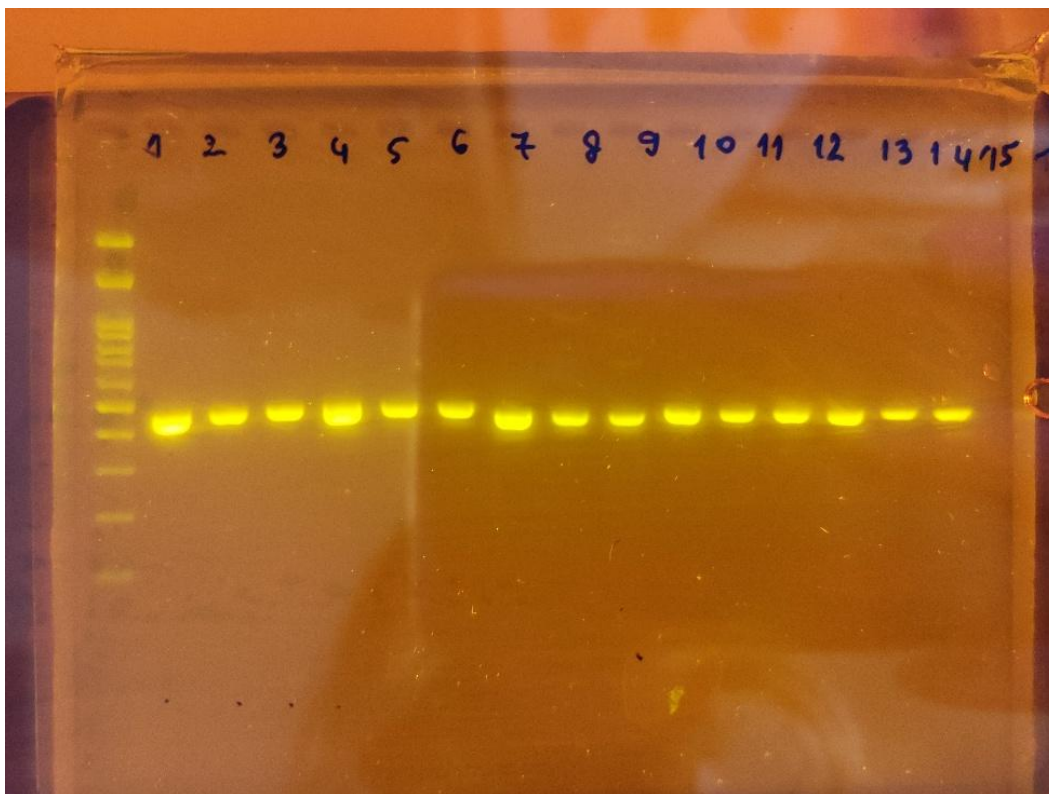
Tablica 2.1. Početnice korištene u PCR reakcijama za različite umnožene regije.

Genska regija	Naziv početnice	Početnica	Referenca
ITS	PSN-F1	5' GGATCATTACCACACCGATCC 3'	Noyer i sur., 2015
ITS	PSN-R1	5' CCTCTTGCTTGATCTGAGATCC 3'	Noyer i sur., 2015
ITS	ITS-A	5' CCAAGCTTCTAGATCGTAACAAGGTCCGTAGGT3'	Scholin i sur., 1994
ITS	ITS-B	5' CCTGCAGTCGACAATGCTTAATTCAGCGG 3'	Scholin i sur., 1994
LSU	D1R	5' ACCCGCTGAATTTAAGCATA 3'	Nunn i sur., 1996
LSU	D3B	5' TCGGAGGGAACCAGCTACTA 3'	Nunn i sur., 1996
LSU	D3Ca	5' ACGAACGATTTGCACGTCAG 3'	Scholin i sur., 1994
<i>rbcL</i>	<i>rbcL1</i>	5' AAGGAGAAATHAATGTCT 3'	Jones i sur., 2005
<i>rbcL</i>	<i>rbcL7</i>	5' AARCAACCTTGTGTAAGTCT 3'	Jones i sur., 2005

Tablica 2.2. Uvjeti PCR reakcija amplifikacije ITS, LSU i *rbcL* regije s pripadajućim setovima početnica i specifičnim protokolima primijenjenim na svaku regiju.

Enzim	Genska regija	Set početnica	Inicijalizacija	Denaturacija	Vezivanje	Produljenje	Završno produljenje	Zadržavanje
Q5 Hot Start	ITS	PSN-F1/PSN-R1	98 °C 3 min	98 °C 10 s	58 °C 30 s	72 °C 30 s [2-4 35x]	72 °C 10 min	4 °C ∞
Q5 Hot Start	ITS	ITSA/ITSB	95 °C 10 min	94 °C 30 s	55 °C 30 s	72 °C 30 s [2-4 35x]	72 °C 10 min	4 °C ∞
Q5 Hot Start	LSU	D1R/D3B	98 °C 30 s	98 °C 10 s	52 °C 30 s	72 °C 30 s [2-4 35x]	72 °C 2 min	4 °C ∞
Q5 Hot Start	LSU	D1R/D3Ca	98 °C 30 s	98 °C 10 s	52 °C 30 s	72 °C 30 s [2-4 35x]	72 °C 2 min	4 °C ∞
Q5 Hot Start	<i>rbcL</i>	<i>rbcL1/rbcL7</i>	98 °C 3 min	98 °C 10 s	52 °C 30 s	72 °C 30 s [2-4 35x]	72 °C 10 min	4 °C ∞

PCR produkti vizualizirani su pod UV svjetlom (runVIEW Mini Blue Light Illuminator, Cleaver SCIENTIFIC, Velika Britanija) pomoću gel elektroforeze u 1% agaroznom gelu obojenim gel bojom SYBR Safe DNA (Thermo Fisher Scientific, SAD) u 1X TBE puferu (Slika 2.7.). Agarozni gel je pripremljen otapanjem 0,5 g agaroze (Sigma-Aldrich, SAD) u 1X TBE puferu. TBE pufer pripremljen je miješanjem 950 mL deionizirane vode s 50 mL TRIS borat – EDTA pufer otopine (Sigma-Aldrich, Švicarska). Pročišćavanje i Sanger sekvenciranje PCR produkata provedeno je u komercijalnom laboratoriju Macrogen Europe (Amsterdamnizozemska). Za sve uzorke provedeno je sekvenciranje u oba smjera „forward“ i „reverse“.



Slika 2.7. Prikaz rezultata gel elektroforeze na agaroznom gelu nakon amplifikacije ITS regije primjenom izravnog PCR-a na uzorcima staničnih kultura.

2.2.3. Bioinformatička analiza

Provjera kvalitete sekvenci i spajanje kromatograma „forward“ i „reverse“ smjera provedeni su pomoću softvera Chromas Pro (verzija 2.1.10.1). Za molekularnu identifikaciju vrsta ITS, LSU i *rbcL* sekvence su uspoređene sa sekvencama dostupnim u bazi podataka Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (NCBI) koristeći alat BLASTn (Altschul i sur., 1990). Sekvenca je potvrđena kao vrsta ako je postotak sličnosti iznosio iznad 99%. Markeri gena (ITS, LSU i *rbcL*) analizirani su odvojeno za dobivanje zasebnih filogenija promatranih genskih regija. Poravnanja su provedena koristeći CLUSTALW (verzija 2.1) unutar softvera MEGA11 (verzija 11.0.13) s postavkama zadanim od proizvođača (Masatoshi i Sudhir, 2000; Tamura i sur., 2021). Sekvence su međusobno uspoređene s ciljem određivanja sličnosti u redoslijedu nukleotida (primarno u strukturi). Razvijen je evolucijski model supstitucije nukleotida, a parametri oblika gama-distribucije izračunati su korištenjem Bayesovih informacijskih kriterija integriranih u softver MEGA 11 (Masatoshi i Sudhir, 2000; Tamura i sur., 2021). Bayesova inferencija (BI) provedena je primjenom generaliziranog vremenski reverzibilnog evolucijskog modela (GTR) s gama-raspodjelom i invarijantnim mjestima (G+I) za sve sekvencirane regije (ITS, LSU i *rbcL*) (Yang, 1994). Za Bayesovu analizu korišten je poravnat FASTA zapis sekvenci, a analiza je provedena u programu MrBayes 3.2.7 (Ronquist i sur., 2012) uz minimalno 4000000 generacija Markovljevog lanca Monte Carlo (MCMC), sa stopom uzorkovanja svakih 1000 generacija i dijagnostičkim

intervalom također od 1000 generacija sve dok prosječna standardna devijacija nije pala u raspon između 0,01 i 0,05. Dodatno je izrađeno kombinirano filogenetsko stablo korištenjem poravnanja ITS, LSU i *rbcL* sekvenci, koje su objedinjene u softverskom okruženju R-Studio (verzija 4.3.0) (Gelfond i sur., 2018), koristeći pakete *magrittr* i *dplyr* dostupne u CRAN repozitoriju (R-Studio). Izrada Bayesove inferencije za kombinirano stablo provedena je modelom GTR+G+I, uz minimalno 10000000 MCMC generacija, sa stopom uzorkovanja svakih 1000 generacija i dijagnostičkim intervalom od 1000 sve dok prosječna standardna devijacija nije pala u raspon između 0,01 i 0,05. Rezultati za ITS, LSU, *rbcL* i kombinirano filogenetsko stablo vizualizirani su pomoću softvera FigTree. Prvih 25% uzoraka iz lanca je odbačeno prema zadanim postavkama. Na filogenetskim stablima su prikazane posteriorne vrijednosti veće od 0,85 (85%). Vrijednosti genetskih parova i ukupne vrijednosti genske različitosti su izračunate u MEGA11 (verzija 11.0.13) (Masatoshi i Sudhir, 2000; Tamura i sur., 2021). Rezultati su prikazani pomoću stabala sličnosti.

2.3. Okolišni uzorci

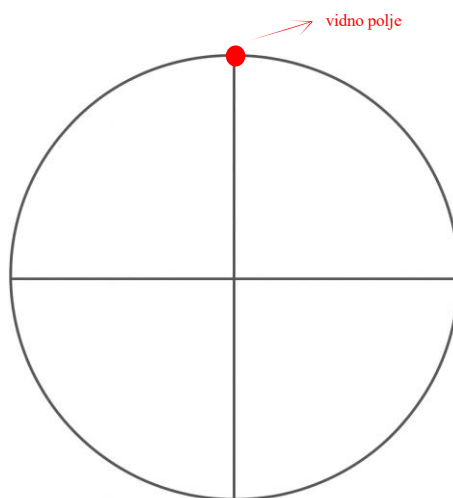
Uzorci fitoplanktona za morfološku i molekularnu analizu okolišnih uzoraka prikupljani su sezonski fitoplanktonskom mrežicom kako je opisano u Podpoglavlju 2.2. Sezonska razdoblja su određena prema Artegiani i sur., (1996) pri čemu je veljača predstavljala razdoblje zime, svibanj/lipanj proljeće, rujan ljeto, dok je prosinac određen kao razdoblje jeseni.

Za analizu okolišne DNA, tri uzastopna vertikalna potega fitoplanktonskom mrežom su pomiješana u jedan uzorak volumena 500 mL. Po dolasku u laboratorij svaki uzorak je homogeniziran i podijeljen na tri poduzorka volumena 150 mL. Svaki od poduzoraka je predstavljao tehničku repliku. Poduzorci su prethodno filtrirani kroz planktonsku mrežicu veličine pora 200 µm kako bi se uklonili veći organizmi (mezoplankton), a potom su vakuumski filtrirani kroz polikarbonatne membranske filtere veličine pora 0,6 µm promjera 47 mm (Whatman, Njemačka). Filteri su odmah pohranjeni na -80 °C do daljnje obrade.

2.3.1. Morfološka analiza

Za određivanje sastava vrsta *Pseudo-nitzschia* iz uzoraka morske vode, poduzorci su fiksirani Lugolovom otopinom i pripremljeni za FE-SEM/STEM analizu prema metodi Lundholm i sur., (2002) a koja je detaljno opisana prema Arapov i sur., (2017). Uzorak morske vode je homogeniziran te je u poduzorak volumena 10 mL dodano: 1 mL 10% klorovodične kiseline (HCl), 2 mL 30% sumporne kiseline (H₂SO₄) i 10 mL zasićene otopine kalijeva permanganata (KMnO₄) kako bi se uklonio organski materijal iz silikatnih ljušturica. Nakon 24 sata, uzorci su tretirani s približno 10 mL zasićene otopine oksalne kiseline ((COOH)₂) uz polagano miješanje, sve dok otopina nije postala prozirna. Uslijedilo je ispiranje deioniziranom vodom kroz više ciklusa

centrifugiranja pri 3000 RPM 20 minuta, sve dok pH vrijednost supernatanta nije izmjerena u rasponu 6-7. Očišćeni uzorci su potom filtrirani kroz polikarbonatne membranske filtere veličine pora 1 μm , promjera 13 mm (Nucleopore, Whatman) te odloženi u eksikator najmanje 24 sata. Nakon sušenja filteri su postavljeni na aluminijske nosače i pozlaćeni u naporivaču (Quorum Technologies, Q150RES, Lewes, UK). Morfološka analiza okolišnih uzoraka provedena je pretražnim elektronskim mikroskopom (FE-SEM; Mira3tescan, Brno, Češka). U svakom analiziranom uzorku određeno je barem 50 stanica *Pseudo-nitzschia* i pregledana su barem dva centralna transekta (Slika 2.8.), od kojih je barem 30 stanica morfometrijski obrađeno.



Slika 2.8. Krug na slici predstavlja površinu filtera na kojem se nalaze profilirane stanice. Unutar kruga su prikazane dvije linije (vertikalni i horizontalni transekt). Svaki transekt označava 30-ak vidnih polja.

2.3.2. Molekularna analiza

Za izolaciju DNA korišten je DNeasy PowerWater Kit-a (QIAGEN, Nizozemska) prema metodi opisanoj od strane proizvođača uz manje izmjene u svrhu poboljšanja prinosa koncentracije DNA. Uzorci su umjesto 5 min miješani 15 min na vorteksu pri maksimalnoj brzini u horizontalnom položaju. DNA je isprana sterilnom vodom s filter kolonica (Sigma-Aldrich, Švicarska), a konačni volumen je iznosio 25 μL . Koncentracija i čistoća DNA u izolatima određene su spektrofotometrom Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema uputama proizvođača. Umnožene su dvije genske regije: ITS1 i *rbcL* u servisu Novogene Europe (Cambridge, UK) gdje je izvršena PCR amplifikacija, priprema knjižnica te sekvenciranje uparenih krajeva (2 x 346 bp za ITS1 genski biljeg, 2 x 312 bp za *rbcL* genski biljeg) na uređaju Illumina NovaSeq 6000. Za umnažanje ITS1 regije korišten je par početnica dostupan iz literature: ITS_F3 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG

3' (White i sur., 1990) i ITS_R3 5' CATCCACCGCTGAAAGTTGTAA 3' (Sterling i sur., 2022) (Slika 2.3.). Za umnažanje *rbcL* regije izrađene su degenerativne početnice modificirane prema Turk Dermastia i sur., (2022), BT-F 5' AGGWGAAGYWAAAGGTTTCWTAYTTAAA 3' i BT-R 5' CCTTCTAAYTTACWACWACWG 3' (Tablica 2.3.)

Tablica 2.3. Početnice korištene za umnažanje genske regije ITS1 i *rbcL* tijekom metabarkodiranja Illumina NovaSeq 6000 uređajem.

Genska regija	Naziv početnice	Početnica	Referenca
ITS1	ITS_F3	5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'	White i sur., 1990
ITS1	ITS_R3	5' CATCCACCGCTGAAAGTTGTAA 3'	Sterling i sur., 2022
<i>rbcL</i> 1	BT-F	5' AGGWGAAGYWAAAGGTTTCWTAYTTAAA 3'	Modificirane Turk i sur., 2022
<i>rbcL</i> 7	BT-R	5' CCTTCTAAYTTACWACWACWG 3'	Modificirane Turk i sur., 2022

2.3.3. Statistička analiza

Za analizu sastava zajednice roda *Pseudo-nitzschia* u različitim sezonama provedena je analiza glavnih koordinata (Analiza glavnih koordinata, PCoA) temeljena na Bray–Curtis matrici sličnosti. Podaci o relativnoj brojnosti pojedinih vrsta transformirani su kvadratnim korijenom kako bi se smanjio utjecaj dominantnih taksona i naglasile razlike među manje zastupljenim vrstama. Analiza je provedena u programu PRIMER v7 (Clarke i Gorley, 2015). Rezultati su prikazani kao dvodimenzionalni PCoA dijagram, gdje udaljenost između točaka odražava stupanj sličnosti u sastavu zajednice između sezonskih i prostornih uzoraka.

Za analizu strukture zajednice provedena je PERMANOVA (Anderson, 2001) analiza temeljem Bray-Curtis indeksa sličnosti. Podaci su transformirani kvadratnim korijenom. PERMANOVA analiza je provedena na dva faktora: područje (po) i sezona (se), a za procjenu značajnosti razlika između pojedinog faktora primijenjen je usporedni test. Uz PERMANOVA analizu, provedena je i SIMPER analiza kako bi se utvrdilo koje vrste *Pseudo-nitzschia* pridonose razlikama između istraživanih područja i sezona. Za svaku vrstu određeni su prosječni doprinosi, standardizirani omjer razlike i kumulativni doprinos ukupnoj razlici između istraživanih faktora.

2.3.4. Bioinformatička analiza

Bioinformatička obrada podataka metabarkodiranja provedena je koristeći APSCALE cjevovod (verzija 1.7.1) (Buchner i sur., 2022), prema preporučenom tijeku analize opisanoj u službenom APSCALE priručniku. Prvotna obrada sirovih sekvenci napravljena je od strane tvrtke Novogene. Provedeno je filtriranje kvalitete korištenjem zadanih postavki, pri čemu su zadržane samo one sekvence koje su se pojavile najmanje četiri puta (minimalna veličina za uključivanje = 4), pri čemu su sekvence koje odstupaju od očekivane duljine amplikona za pojedini marker odbačene. Nakon filtriranja kvalitete, sekvence su dereplicirane te su zadržane samo one koje se u uzorku pojavljuju najmanje četiri puta, čime se reducira utjecaj pogrešaka i rijetkih artefakata. ASV klasteriranje je provedeno pri pragu sličnosti od 97% a uklanjanje kimera je odrađeno tijekom istog koraka (engl. Amplicon Sequence Variant). Taksonomska anotacija je provedena korištenjem Unite (ITS1) i Diatom barcode (*rbcL*) referentne baze podataka. Sekvence su zatim objedinjene između ponovljenih uzoraka, pri čemu su zadržane samo one koje su konzistentno detektirane među replikatima. Za oba genska markera izrađena je i završna tablica očitavanja. Taksonomska anotacija ASV-ova provedena je koristeći APScale BLAST taksonomsko određivanje, uz usporedbe s javno dostupnim referentnim bazama podataka za ITS1 i *rbcL* te odgovarajuće pragove sličnosti za taksonomske razine. Dodatnom kuracijom uklonjeni su neciljani taksoni i sekvence koje nisu relevantne za ovo istraživanje. Javno dostupna NCBI baza podataka i native sekvence generirane tijekom ovog istraživanja su korištene za dodatnu provjeru točnosti sekvenci. Paket phyloseq (verzija 3.19) (McMurdie i Holmes, 2013) je korišten za filogenetski prikaz roda *Pseudo-nitzschia* iz okolišnih uzoraka. Kružni dijagram koji prikazuje raspodjelu i relativnu brojnost sekvenci roda *Pseudo-nitzschia* je vizualiziran koristeći paket MiscMetabar (verzija 0.14.4) (Taudière, 2023).

2.4. Dostupnost podataka

Sanger sekvence generirane tijekom ovog istraživanja pohranjene su u NCBI bazi podataka zajedno s pripadajućim metapodacima (područje, datum i godina izolacije). Pristupni GenBank brojevi Sanger sekvenci dostupni su u NCBI bazi podataka (Altschul i sur., 1990) te su prikazani u Tablici 3.3. (Poglavlje 3.: Rezultati). Sekvence dobivene metabarkodiranjem ITS1 regije pohranjene su u NCBI bazi podataka u okviru BioProjecta s identifikacijskim brojem PRJNA1416652, dok su sekvence metabarkodiranja *rbcL* regije pohranjene u okviru BioProjecta s identifikacijskim brojem PRJNA1410737 s pripadajućim metapodacima. Pojedinačni pristupni brojevi za svaku sekvencu su dodijeljeni unutar navedenih BioProject zapisa.

3. REZULTATI

Od početno uspostavljenih kultura 178 je određeno morfološki (FE-SEM/STEM) i molekularno korištenjem tri genska biljega (ITS, LSU i *rbcL*) (Tablica 3.1.).

Tablica 3.1. Popis izoliranih vrsta *Pseudo-nitzschia*, broj kultura, postaja uzorkovanja, sezona izolacije i metode korištene prilikom analize.

Vrsta	Broj kultura	Postaja	Sezona izolacije	Metoda analize
<i>P. allochirona</i>	14	K,M,S	jesen, ljeto	ITS, LSU, <i>rbcL</i> , SEM
<i>P. calliantha</i>	24	sve postaje	sve sezone	ITS, LSU, <i>rbcL</i> , SEM
<i>P. delicatissima</i>	47	K,M,V	sve sezone	ITS, LSU, <i>rbcL</i> , SEM
<i>P. fraudulenta</i>	6	K	jesen, zima	ITS, LSU, <i>rbcL</i> , SEM
<i>P. galaxiae</i>	2	K,M	jesen, proljeće	ITS, LSU, <i>rbcL</i> , SEM
<i>P. hasleana</i>	5	K	jesen, zima	ITS, LSU, <i>rbcL</i> , SEM
<i>P. mannii</i>	51	sve postaje	sve sezone	ITS, LSU, <i>rbcL</i> , SEM
<i>P. multistriata</i>	7	S	jesen	ITS, LSU, <i>rbcL</i> , SEM
<i>P. pseudodelicatissima</i>	16	K	jesen, zima	ITS, LSU, <i>rbcL</i> , SEM
<i>P. subfraudulenta</i>	6	S, V	jesen	ITS, LSU, <i>rbcL</i> , SEM

3.1. Morfološka obilježja kultura

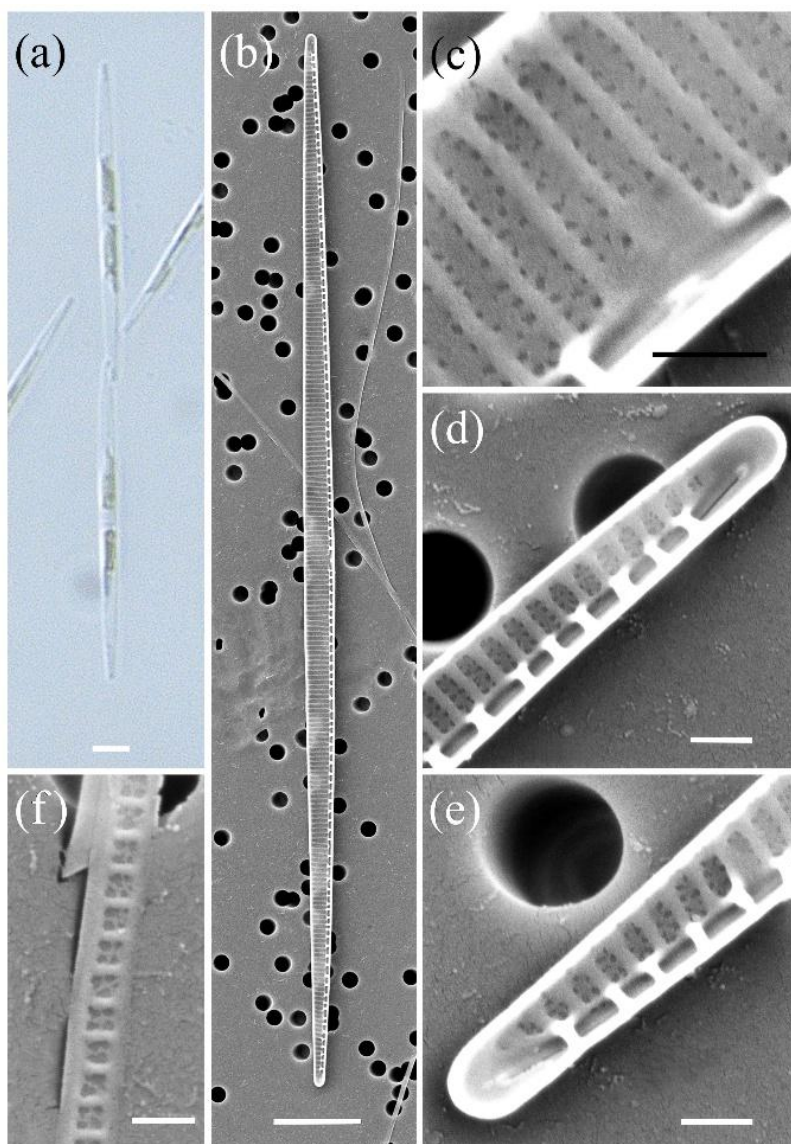
Pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa (SEM) morfološki je analizirano deset vrsta roda *Pseudo-nitzschia* iz uspostavljenih kultura. Ukupno je analizirano pet kultura vrste *P. allochrona* (S223al, S280al, K273al, K341al, M326al), devet kultura *P. calliantha* (V014ca V227ca, V299ca, V079ca, S354ca, K274ca, K367ca, M074ca, M091ca), 12 kultura *P. delicatissima* (V042de, K129de, K159de, K376de, K452de, K465de, K459de, M138de, M364de, M375de, M415de, M461de), pet kultura *P. fraudulenta* (K450fr, K455fr, K456fr K458fr, K468fr), dvije kulture *P. galaxiae* (M136ga, M232ga), četiri kulture *P. hasleana* (K056ha, K082ha, K101ha, K115ha), 14 kultura *P. mannii* (V296ma, V439ma, S155ma, S157ma, S385ma, K103ma, K231ma, K237ma, K321ma, M153ma, M219ma, M233ma, M240ma, M463ma,), šest kultura *P. multistriata* (S004mu, S005mu, S290mu, S294mu, S302mu, S442mu), osam kultura *P. pseudodelicatissima* (K028ps, K328ps, K339ps, K352ps, K356ps, K357ps, K358ps, K359ps)te pet kultura *P. subfraudulenta* (S287su, S288su, S297su, V253su, V284su). Morfološke karakteristike analiziranih staničnih kultura *Pseudo-nitzschia* su prikazane u Tablici 3.2.

Tablica 3.2. Morfometrijska obilježja uspostavljenih kultura vrsta *Pseudo-nitzschia*. Podaci koji su označeni podebljano prikazuju najmanje i najveće vrijednosti (raspon), dok su srednje vrijednosti navedene ispod. Broj mjerenja (n) naveden je u zagradama ispod svake vrste.

Vrsta	Širina (μm)	Dužina (μm)	Središnja pora	Fibule u 10 μm	Interstrije u 10 μm	Poroidi u 1 μm	Redovi poroida	Sektori poroida	Band strije u 10 μm
<i>P. allochroa</i> (n=50)	1,44-2,15 1,72	51,06-63,01 58,12	+	20-24 21,6	36-39 37,1	7-13	(1)-2	-	43-45 43,9
<i>P. calliantha</i> (n=97)	1,38-2,12 1,75	64,08-107,14 83,53	+	17-22 19,6	34-38 36,2	4-6	1	2-11* 6	43-46 44,5
<i>P. delicatissima</i> (n=126)	1,31-2,00 1,64	31,05-94,21 57,43	+	20-26 23,3	37-42 40,4	7-13	(1) - 2	-	48-51 49,6
<i>P. fraudulenta</i> (n=56)	5,09-6,54 5,79	60,22-67,42 65,04	+	19-24 22,7	23-25 23,8	5-7	(1)-2-(3)	2-7* 5	38-41 39,5
<i>P. galaxiae</i> (n=25)	1,04-1,85 1,42	47,52-56,00 52,95	+	19-26 23	59-63 60,92	-	-	-	-
<i>P. hasleana</i> (n=50)	2,16-2,84 2,46	59,97-60,24 56,95	+	14-19 16	32-35 33,34	4-6	1 (2)	1-7	38-44 40,23
<i>P. mannii</i> (n=148)	1,71-2,48 2,05	69,08-123,56 93,37	+	16-23 19,7	33-37 35,3	4-6	1	1-8* 4	42-44 43,2
<i>P. multistriata</i> (n=62)	2,33-3,51 2,91	55,85-84,85 68,07	-	23-26 24,3	36-40 38,4	9-12	(1) - 2	-	47-51 49,9
<i>P. pseudodelicatissima</i> (n=84)	1,22-1,75 1,48	59,14-90,99 72,76	+	19-26 22,3	38-41 39,3	5-7	1	1-4* 2	47-52 49,6
<i>P. subfraudulenta</i> (n=60)	4,15-5,25 4,69	96,19-140,33 118,42	+	13-17 14,8	23-25 24,6	5-6	(1)-2	2-10* 5	39-41 40,1

3.1.1. *Pseudo-nitzschia allochirona* Zingone, Percopo i Sarno

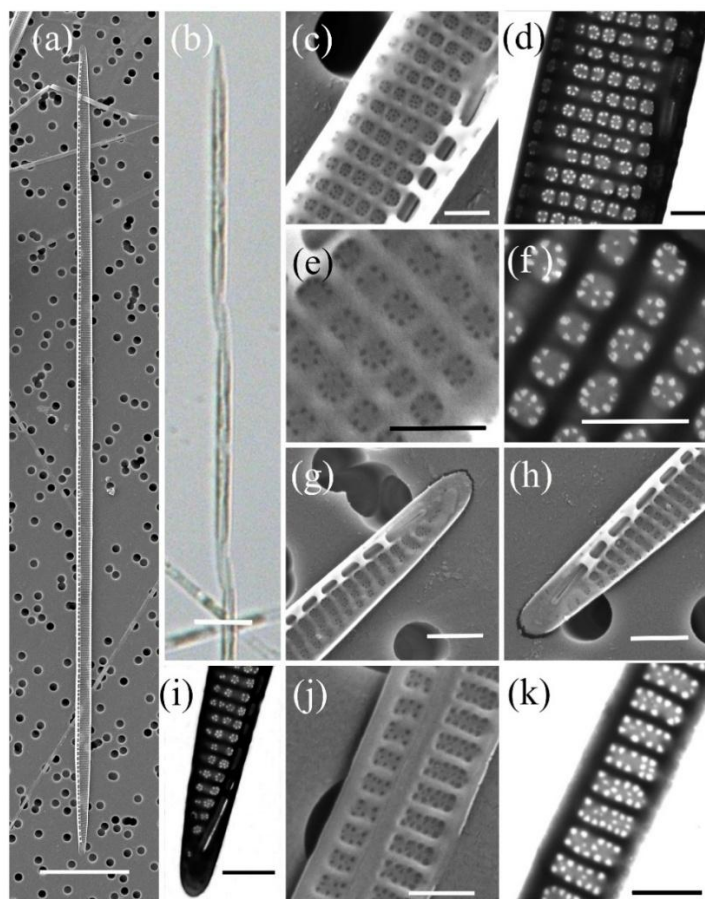
U valvalnom položaju utvrđeno je da su stanice *P. allochirona* kopljastog oblika sa šiljastim krajevima (Slika 3.1.(a)). Zabilježena dužina stanice bila je u rasponu od 51,06 do 63,01 μm , dok je širina iznosila od 1,44 do 2,15 μm . U svim stanicama potvrđena je središnja pora širine 2 do 4 strije (Slika 3.1. (c)). Broj fibula iznosio je od 20 do 24 u 10 μm , a broj interstrija bio je od 36 do 39 u 10 μm . Strije su bile perforirane s 2 reda poroida, osim u jednoj valvi gdje je u blizini središnje pore zabilježen samo 1 red poroida. Broj poroida u 1 μm bio je između 7-13. Valvocopula je sadržavala od 43 do 45 strija u 10 μm , pri čemu su strije bile visoke 1 do 2 poroida i široke 2 poroida.



Slika 3.1. *Pseudo-nitzschia allochirona*: (a) 2 stanice u bočnom položaju na svjetlosnom mikroskopu; (b) cijela valva, SEM; (c) središnji dio površine valve sa središnjom porom, SEM; (d,e) krajevi valve, SEM; (f) valvocopula sa redovima perforacija, SEM. Mjerne skale: (a,b) 5 μm ; (c–f) 500 nm.

3.1.2. *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup i Hasle

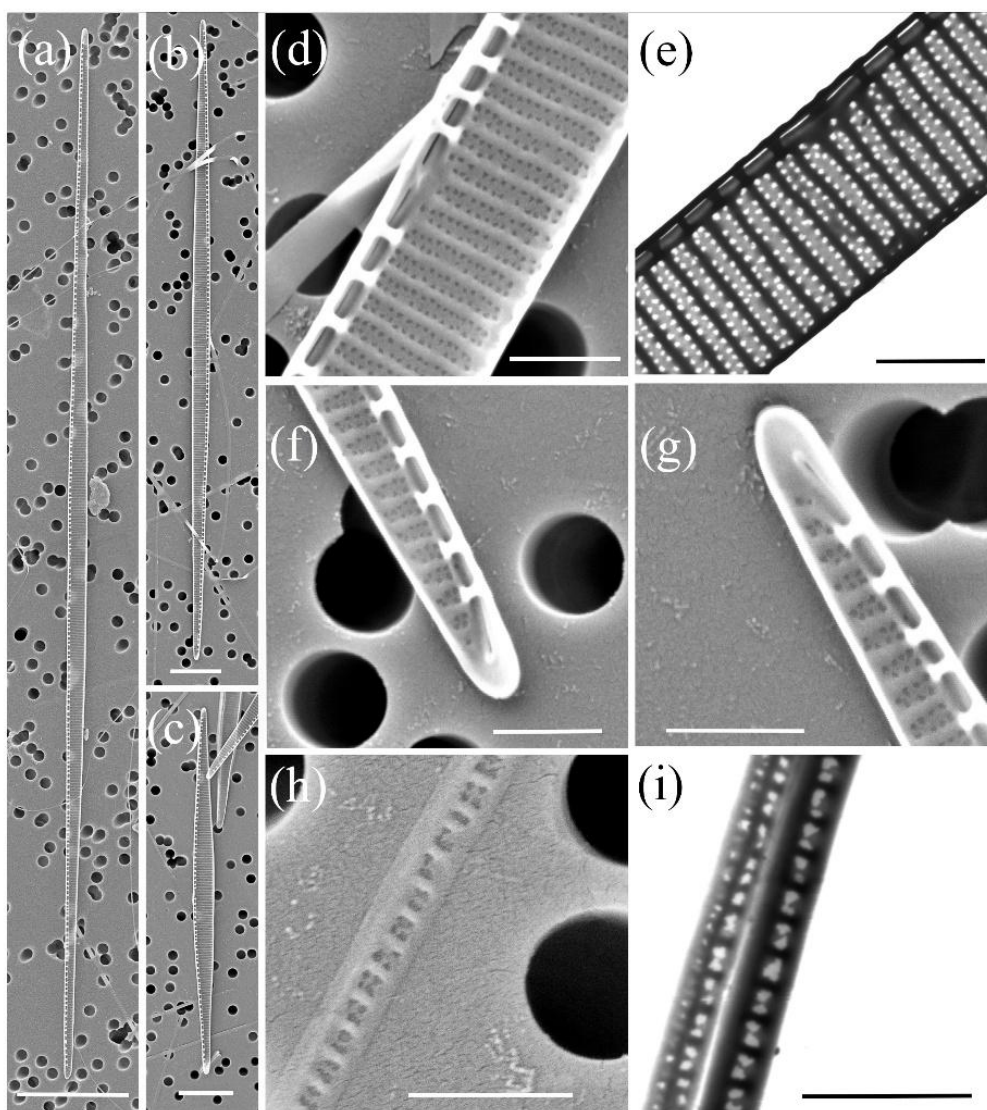
Stanice *P. calliantha* su u valvalnom položaju imale linearni oblik (Slika 3.2.(a)). Duljina stanice bila je od 64,08 μm do 107,14 μm , a širina od 1,38 μm do 2,12 μm . U svim stanicama bila je prisutna središnja pora 3 do 5 strija (Slika 3.2.(c)). Broj fibula bio je od 17 do 22 u 10 μm , dok je gustoća interstrija bila od 34 do 38 u 10 μm . Strije su bile uniserijatne sa 4 do 6 okruglih ili kvadratnih poroida u 1 μm . Svaki poroid bio je podijeljen na 2 do 11 sektora. Većina poroida bila je podijeljena na šest sektora (26 %), zatim na pet (24 %), sedam (17 %), četiri (16 %) te osam sektora (8 %). Valvocopula je sadržavala od 43 do 46 pojasnih strija u 10 μm . Strije su bile širine 2 do 3 poroida, a visine 3-6 poroida (a rijetko 7).



Slika 3.2. *Pseudo-nitzschia calliantha*: (a) cijela valva, SEM; (b) lanac u bočnom položaju na svjetlosnom mikroskopu; (c) središnji dio površine valve sa središnjom porom, SEM; (d) središnji dio površine valve s središnjom porom STEM; (e) struktura poroida sa prikazom sektora, SEM i (f) STEM; (g,h) krajevi valve, SEM i (i) STEM; (j) valvocopula sa redovima perforacija, SEM i (k) STEM. Mjerne skale: (a,b) 10 μm ; (g-i) 1 μm ; (c-f,j,k) 500 nm.

3.1.3. *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Cleve) Heiden

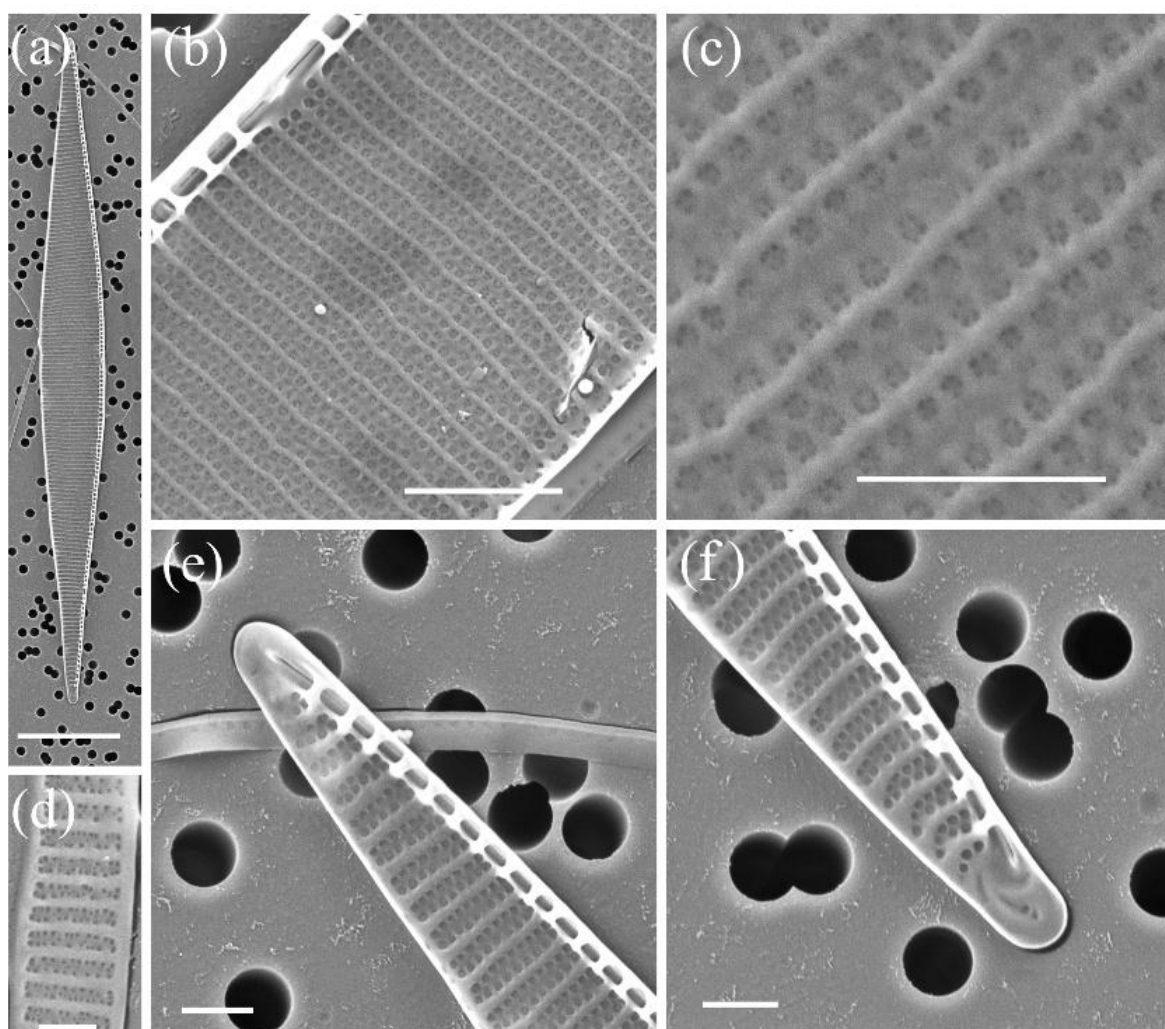
Stanice vrste *P. delicatissima* bile su kopljastog oblika sa šiljastim krajevima. Dužina stanice bila je od 31,05 do 94,21 μm , a širina od 1,31 do 2,00 μm . Izraženiji kopljasti oblik zabilježen je kod kraćih stanica (Slika 3.3.(c)), dok je širina bila slična kod svih stanica neovisno o duljini apikalne osi. Središnja pora širine od 2 do 6 strija bila je prisutna u svim stanicama. Broj fibula bio je od 20 do 26 u 10 μm , dok je gustoća interstrija bila od 37 do 42 u 10 μm . Strije su uglavnom bile biserijatne, sa 7 do 13 poroida u 1 μm iako su rijetko zabilježene i uniserijatne strije. Valvocopula je sadržavala od 48 do 51 pojasnu striju u 10 μm , širine od 1 do 2 poroida.



Slika 3.3. *Pseudo-nitzschia delicatissima*: (a–c) cijela valva, SEM; (d) središnji dio stanice s središnjom porom, SEM; (e) središnji dio stanice s središnjom porom, SEM STEM; (f,g) krajevi valve, SEM; (h) valvocopula sa redovima perforacija, SEM i (i) STEM. Mjerne skale: (a) 10 μm ; (b,c) 5 μm ; (d–i) 1 μm .

3.1.4. *Pseudo-nitzschia fraudulenta* (Cleve) Hasle

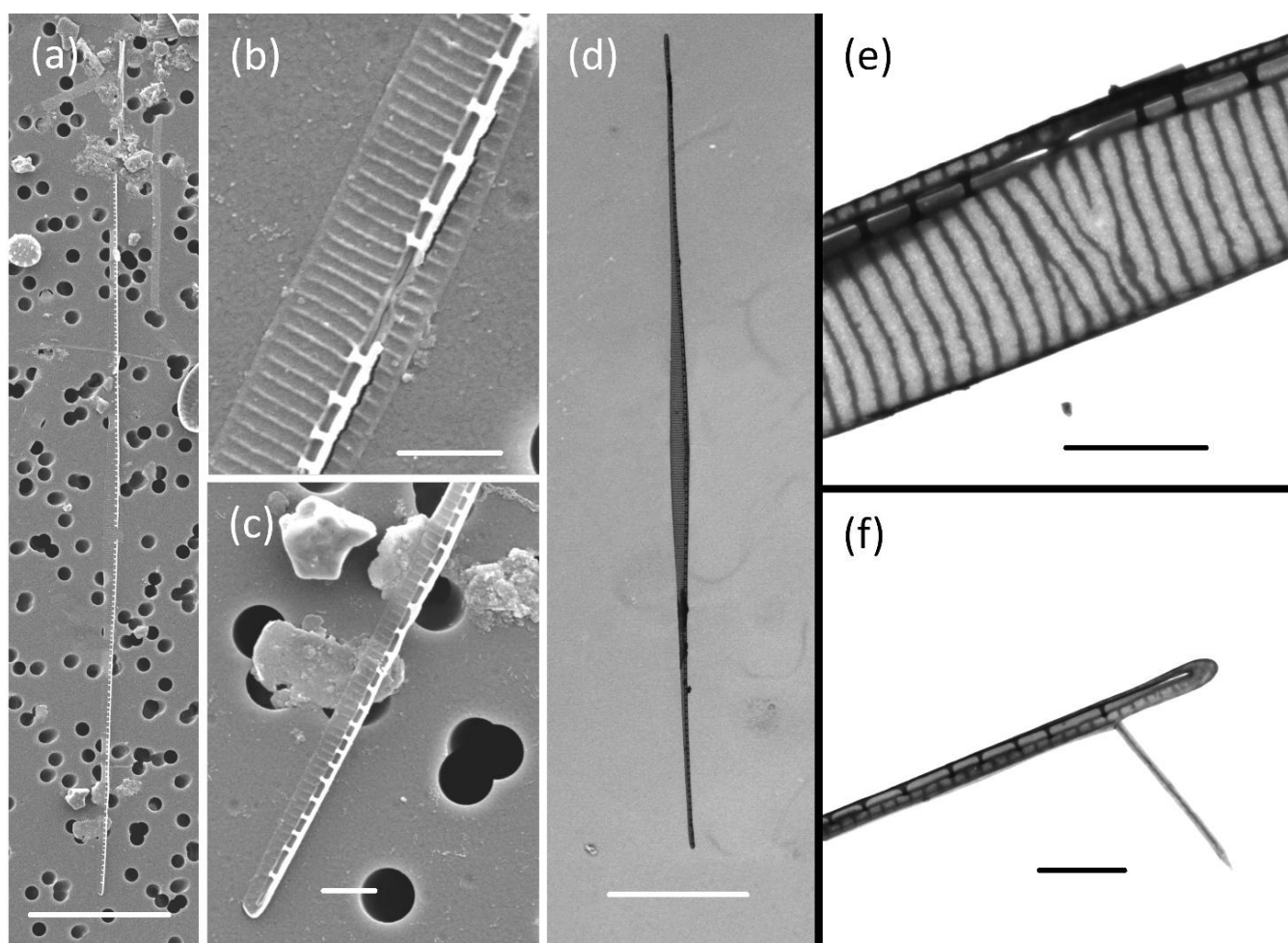
Dužina stanica *P. fraudulenta* bila je od 60,22 do 67,42 μm , a širina od 5,09 do 6,54 μm . U valvalnom položaju stanice su bile kopljastog oblika sa šiljastim krajevima i velikom središnjom porom veličine od 3 do 5 strija (Slika 3.4.(b)). Broj fibula u 10 μm bio je od 19 do 24, što je bilo jednako ili neznatno manje u odnosu na gustoću interstrija (23 do 25 u 10 μm). Strije su se uglavnom sastojale od 2 reda poroida iako su povremeno zabilježene i varijacije s 1 ili 3 reda poroida. U 1 μm broj poroida bio je od 5 do 7. Valve stanica su bile blago silificirane, što je otežavalo precizno određivanje broja sektora. Najveći udio poroida (40 %) bio je podijeljen u 4 sektora. Podjela na pet sektora zabilježena je u 32 % poroida, na šest u 14 %, a na četiri sektora u 12 % poroida. Broj strija u valvocopuli u 10 μm bio je od 38 do 41. Strije su bile širine od 2 do 3 reda poroida i visine do 13 poroida.



Slika 3.4. *Pseudo-nitzschia fraudulenta*: (a) cijela valva, SEM; (b) središnji dio valve sa središnjom porom, SEM; (c) struktura poroida sa detaljem sektora, SEM; (d) valvocopula sa redovima perforacija, SEM; (e,f) krajevi valve, SEM. Mjerne skale: (a) 10 μm ; (b) 2 μm ; (c,e,f) 1 μm ; (d) 500 nm.

3.1.5. *Pseudo-nitzschia galaxiae* Lundholm i Moestrup

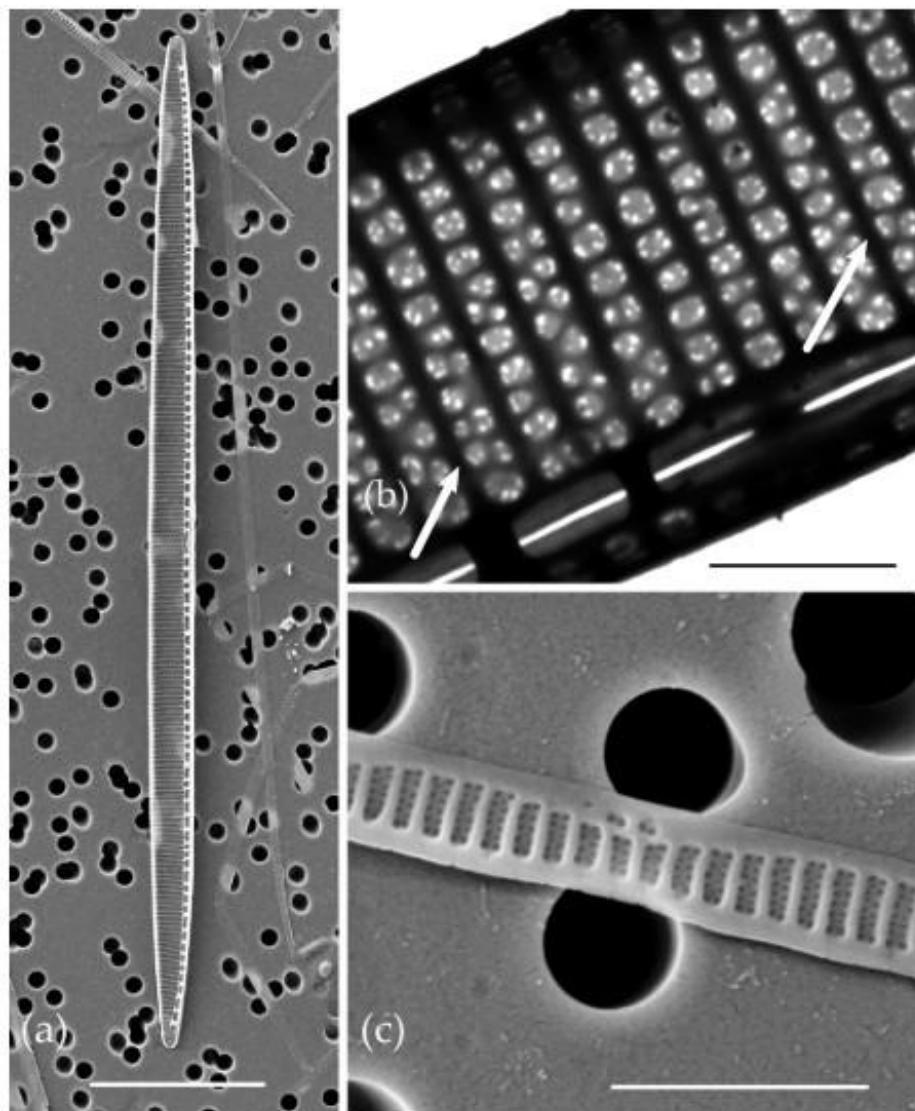
Stanice *P. galaxiae* su bile kopljastog oblika s rostratnim vrhovima. Dužina apikalne osi bila je od 47,52 do 56,00 μm , a širina transapikalne osi bila je od 1,04 do 1,85 μm . Duže morfotipove su karakterizirali dugi i šiljasti rostratni vrhovi. Frustule su bile slabo silicificirane s prisutnom središnjom porom. Gustoća interstrija bila je znatno veća od gustoće fibulaiznosila je od 59 do 63 interstrija u 10 μm , u usporedbi s 19 do 26 fibula u istom rasponu. Analizirani uzorci STEM detektorom pokazali su prisutnost sitnih perforacija koje su nepravilno raspoređene duž strija.



Slika 3.5. *Pseudo-nitzschia galaxiae*: (a) cijela valva, SEM; (b) središnji dio valve sa središnjom porom, SEM (c) kraj valve; (d) cijela valva, STEM; (e) središnji dio valve sa središnjom porom, STEM; (f) kraj valve, STEM. Mjerne skale: (a, d) 10 μm ; (b, c, e, f) 1 μm .

3.1.6. *Pseudo-nitzschia hasleana* Lundholm

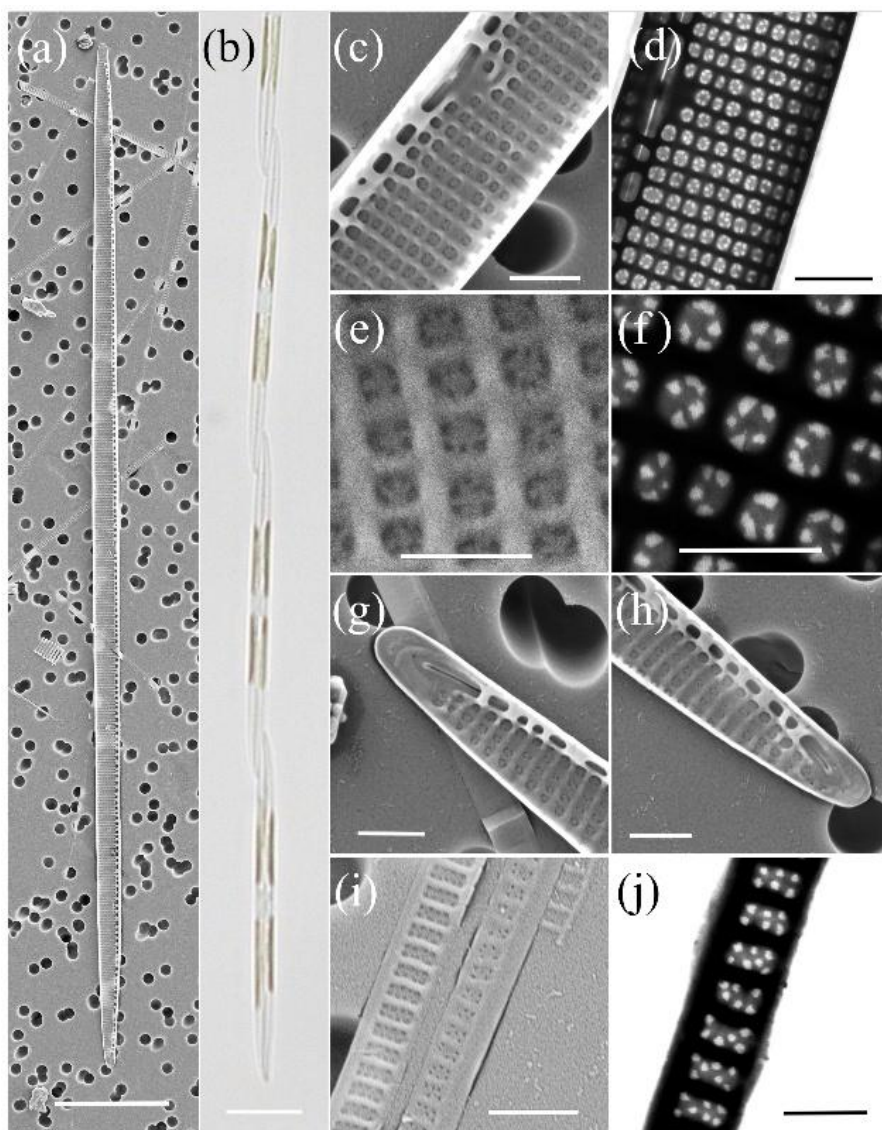
Stanice *P. hasleana* su imale kopljasti oblik s duljinom apikalne osi od 53,97 μm do 60,24 μm i širinom od 2,16 μm do 2,84 μm . Sve stanice imale su središnju poru. Gustoća fibula iznosila je od 14 do 19 u 10 μm , a gustoća interstrija iznosila je od 32 do 35 u 10 μm . Strije su bile uniserijatne, s nizom okruglih do četvrtastih pora, a povremeno su sadržavale 2 manja poroida. U 1 μm nalazilo se 4 do 6 pora. Poroidi su se sastojali od 1 do 7 sektora različitih veličina. Valvocopula je sadržavala od 38 do 44 interstrije u 10 μm . Struktura strija na bočnom pojasu bila je širine od 2-3 pore i visine od 3-7 pora (Slika 3.6. (c)).



Slika 3.6. *Pseudo-nitzschia hasleana*: (a) cijela valva, SEM (b) središnji dio valve sa središnjom porom; strelice označavaju 2 poroida koja se povremeno pojavljuju unutar iste strije, (c) struktura valvocopule. Mjerne skale: a = 10 μm ; b, c = 1 μm .

3.1.7. *Pseudo-nitzschia mannii* Amato i Montresor

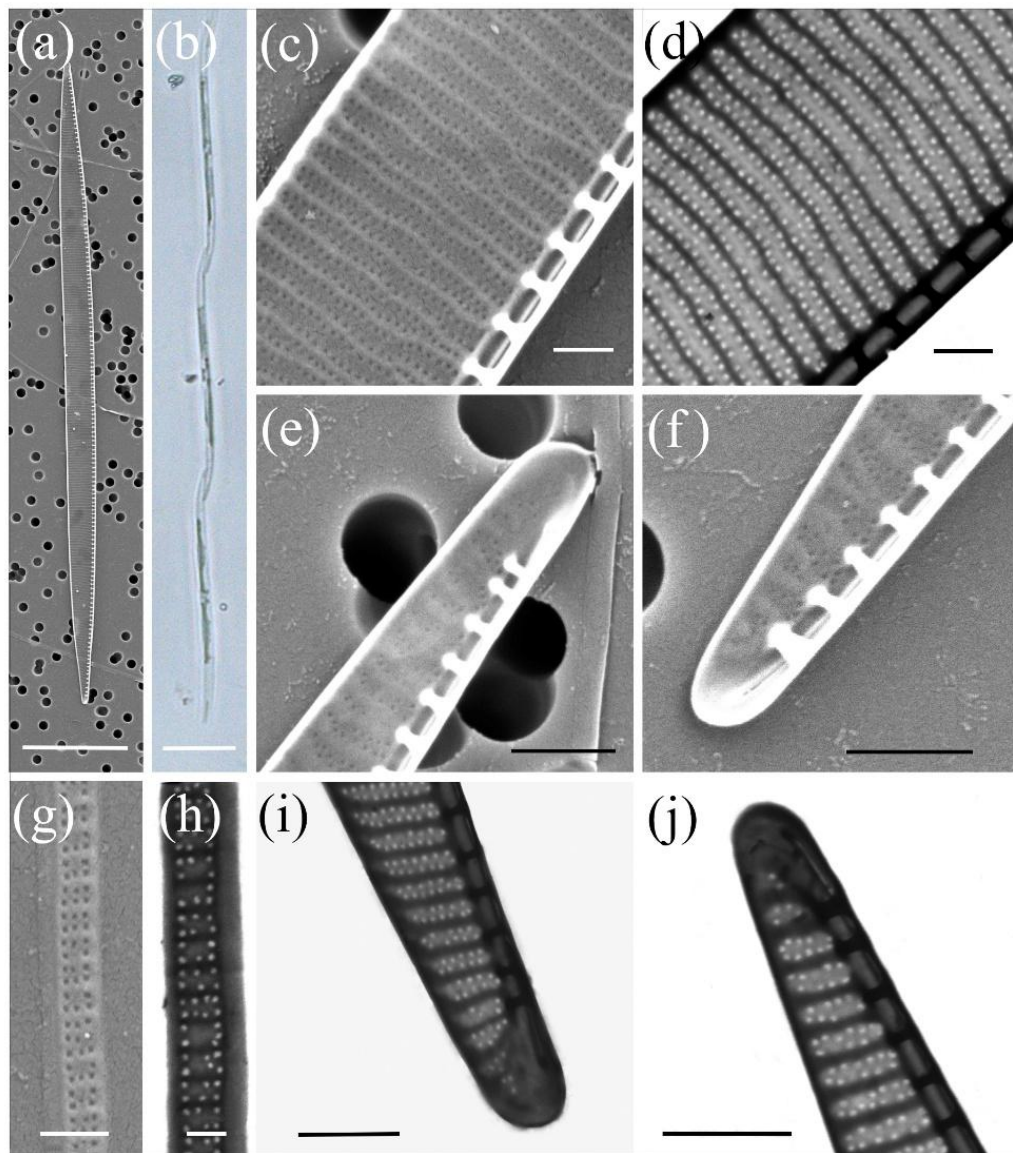
Dužina valve bila je od 69,08 do 123,56 μm , a širina od 1,71 do 2,48 μm . U svim stanicama zabilježena je velika središnja pora širine 2 do 6 strija (Slika 3.7. (a)). Broj fibula bio je od 16 do 23 u 10 μm , dok je gustoća interstrija bila od 33 do 37 u 10 μm . Strije su bile uniserijatne sa 4 do 6 poroida u 1 μm . Poroidi su bili građeni od 1 do 8 sektora, pri čemu su najčešće bili podijeljeni na četiri sektora (35 %), zatim tri (28 %), pet (17 %) te dva sektora (13 %). Valvocopula je sadržavala od 42 do 44 strije u 10 μm . Strije valvocopule su bile široke 2 poroida i visoke do 5 poroida.



Slika 3.7. *Pseudo-nitzschia mannii*: (a) cijela valva, SEM; (b) prikaz lanca u bočnom položaju na svjetlosnom mikroskopu; (c) središnji dio sa središnjom porom, SEM i (d) STEM; (e) struktura poroida sa prikazom sektora, SEM i (f) STEM; (g,h) krajevi valve, SEM; (i) valvocopula sa redovima perforacija, SEM ; (j) valvocopula s redovima perforacija STEM. Mjerne skale: (a,b) 10 μm ; (c,d) 1 μm ; (g-i) 1 μm ; (e,f,j) 500 nm.

3.1.8. *Pseudo-nitzschia multistriata* H. Takano

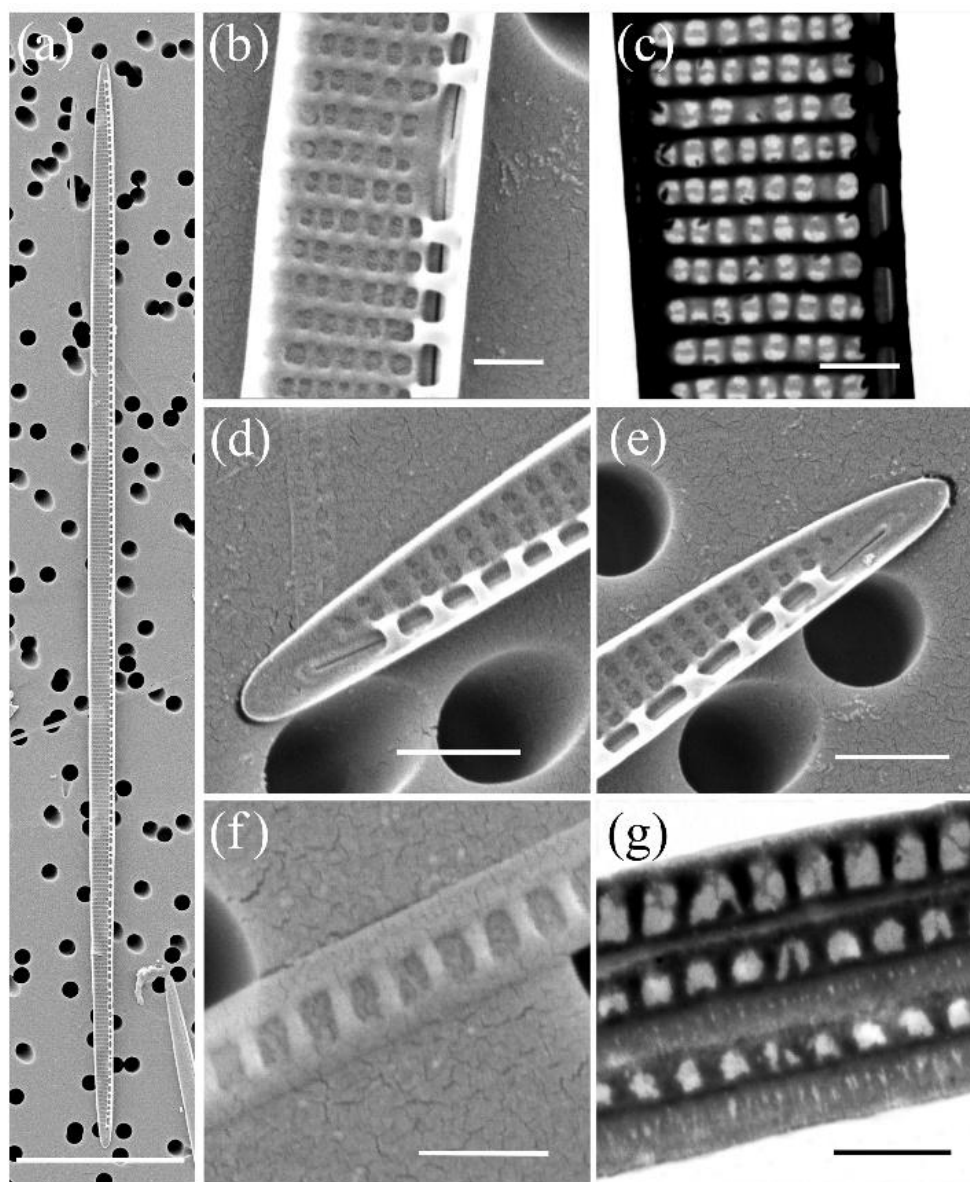
Stanice su u valvalnom položaju bile kopljastog, a u bočnom položaju sigmoidnog oblika (Slika 3.8. (b)). Dužina valve bila je od 55,85 do 84,85 μm , a širina od 2,33 do 3,51 μm . Središnju pora nije bila prisutna. Strije su bile biserijatne, a rijetko uniserijatne. Gustoća poroida iznosila je od 9 do 12 u 1 μm . Broj fibula iznosio je od 23 do 26, a interstrija od 36 do 40 u 10 μm . Valvocopula je sadržavala od 47 do 51 pojasnu striju u 10 μm , pri čemu su one bile široke 2 poroida i visoke 2-4 poroida.



Slika 3.8. *Pseudo-nitzschia multistriata*: (a) cijela valva, SEM; (b) lanac u bočnom položaju na svjetlosnom mikroskopu; (c) središnji dio stanice bez središnje pore, SEM i (d) STEM; (e,f) krajevi valve, SEM; (g) valvocopula s redovima perforacija, SEM; (h) valvocopula s redovima perforacija STEM; (i,j) krajevi valve, STEM. Mjerne skale: (a,b) 10 μm ; (e,f,i,j) 1 μm ; (c,d,g,h) 500 nm.

3.1.9. *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* (Hasle) Hasle

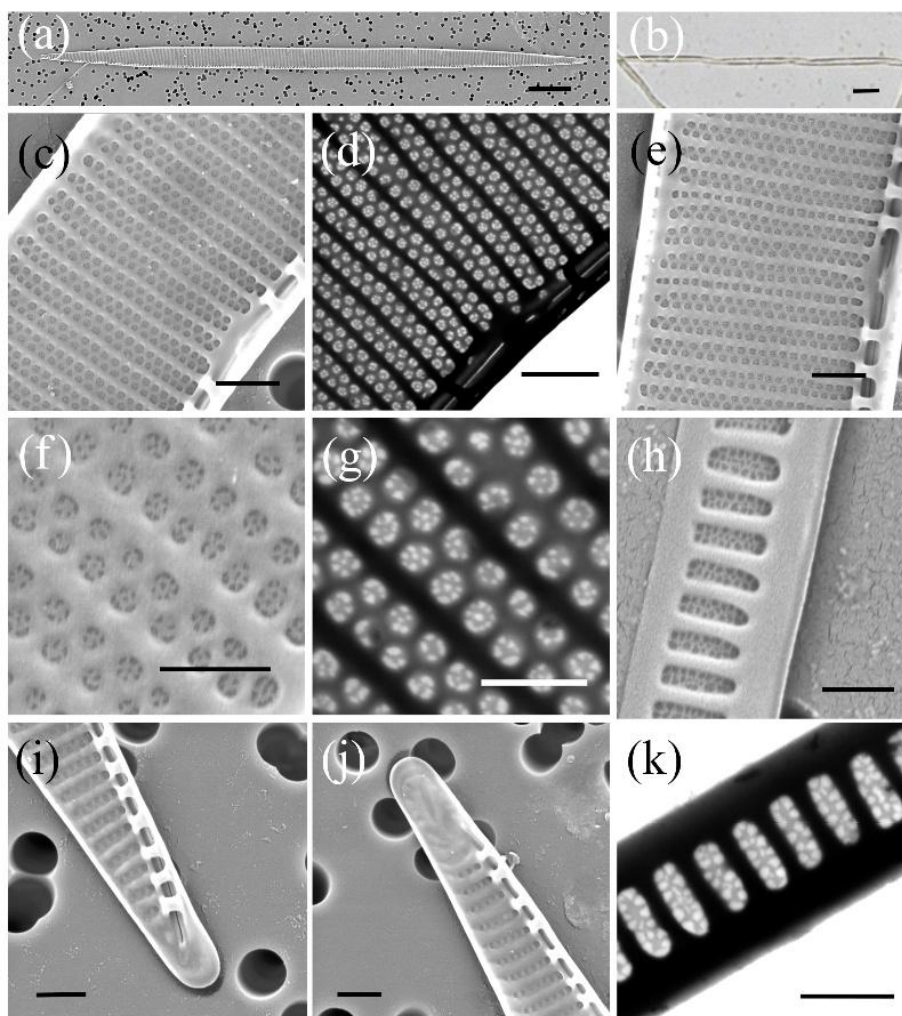
Dužina valve iznosila je od 59,14 do 90,99 μm , a širina od 1,22 do 1,75 μm . Središnja pora bila je širine od 3-7 strija (Slika 3.9. (b)). Broj fibula i interstrija u 10 μm iznosio je od 19 do 26, odnosno od 38 do 41. Strije su bile uniserijatne, s gustoćom od 5-7 ovalnih ili kvadratnih poroida u 1 μm . Poroidi su obično podijeljeni na dva velika sektora (80 %), no zabilježeni su i slučajevi s tri (12 %), jednim (4 %) i četiri (3 %) sektora. Broj strija u valvocopuli iznosio je od 47 do 52.



Slika 3.9. *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*: (a) cijela valva, SEM; (b) središnji dio valve sa središnjom porom, SEM i (c) središnji dio valve sa središnjom porom, STEM; (d,e) krajevi valve, SEM; (f) valvocopula sa redovima perforacija, SEM; (g) valvocopula sa redovima perforacija, STEM. Mjerne skale: (a) 10 μm ; (d,e) 1 μm ; (b,c,f,g) 500 nm.

3.1.10. *Pseudo-nitzschia subfraudulenta* (Hasle) Hasle

Dužina valve iznosila je od 96,19 do 140,33 μm , a širina od 4,15 do 5,25 μm . U svim stanicama bila je prisutna središnja pora širine od 5-6 strija (Slika 3.10. (c)). Broj fibula i interstrija u 10 μm iznosio je od 13 do 17, odnosno od 23 do 25. Strije su uglavnom bile biserijatne iako su se zabilježene i uniserijatne strije. U 1 μm zabilježeno je 5-6 poroida. Poroidi su bili podijeljeni na 2 do 10 sektora, pri čemu su najčešće opaženi poroidi s četiri (33 %) i pet (26 %) sektora, zatim sa šest (16 %), tri (14 %) i sedam (7 %) sektora. Valvocopula je sadržavala od 39 do 41 pojasnu striju u 10 μm . Strije bile su široke 2 poroida (rjeđe 1, 3 ili 4) i visoke do 10 poroida.



Slika 3.10. *Pseudo-nitzschia subfraudulenta*: (a) cijela valva, SEM; (b) lanac u bočnom položaju a na svjetlosnom mikroskopu; (c) središnji dio valve sa središnjom porom, SEM i (d) STEM; (e) detalj strija valve sa jednim redom poroida, SEM; (f) struktura poroida sa prikazom sektora, SEM; (g) struktura poroida sa prikazom sektora, STEM; (h) valvocopula sa redovima perforacija, SEM; (i,j) krajevi valve, SEM; (k) valvocopula sa redovima perforacija, STEM. Mjerne skale: (a,b) 10 μm ; (c–e,i,j) 1 μm ; (f–h,k) 500 nm.

3.2. Molekularna obilježja kultura

Tijekom istraživanja uspostavljene su 362 stanične kulture roda *Pseudo-nitzschia*. Taksonomska pripadnost 178 izolata potvrđena je pomoću tri genska biljega (ITS, LSU i *rbcL*) te morfološkom analizom (FE-SEM/STEM). Dodatnih 46 izolata potvrđeno je temeljem najmanje dva genska biljega i uključeno u daljnju taksonomsku i filogenetsku analizu. Preostalih 138 izolata analizirano je pomoću jednog genskog biljega te nisu uključeni u filogenetske analize a njihov popis nalazi se u Prilogu 2. Kombinacijom morfoloških i molekularnih podataka iz uspostavljenih kultura potvrđeno je deset vrsta: *P. allochrysa*, *P. calliantha*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta*, *P. galaxiae*, *P. hasleana*, *P. mannii*, *P. multistriata*, *P. pseudodelicatissima* i *P. subfraudulenta*. Vrste *P. calliantha*, *P. delicatissima* i *P. mannii* pokazale su stalnu prisutnost tijekom cijele godine te su zabilježene u svim istraživanim sezonama, dok su *P. calliantha* i *P. mannii* potvrđene i na svim istraživanim postajama. Tijekom hladnijeg dijela godine, odnosno u jesensko-zimskom razdoblju izolirane su vrste *P. fraudulenta*, *P. hasleana* i *P. pseudodelicatissima*, dok su *P. multistriata* i *P. subfraudulenta* zabilježene isključivo u jesenskim uzorcima. Vrsta *P. allochrysa* potvrđena je u jesenskom i ljetnom razdoblju, a *P. galaxiae* tijekom proljeća i jeseni. Analiza prostorne raspodjele pokazala je da su *P. fraudulenta*, *P. hasleana* i *P. pseudodelicatissima* izolirane isključivo iz uzoraka prikupljenih u Kaštelanskom zaljevu, dok je *P. multistriata* potvrđena samo u Šibenskom zaljevu. Vrste *P. allochrysa*, *P. galaxiae* i *P. subfraudulenta* imale su širu prostornu rasprostranjenost te su zabilježene na više istraživačkih lokacija.

Sekvence vrsta *Pseudo-nitzschia* korištene u filogenetskoj analizi, preuzete iz baze podataka Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (NCBI), prikazane su u Prilogu 3 zajedno s pripadajućim GenBank pristupnim brojevima. Vrsta *Nitzschia navis-varingica* (GenBank pristupni broj: KX353643.1) je korištena kao vanjska skupina za izradu ITS filogenije, dok su za LSU i *rbcL* korišteni predstavnici roda *Cylindrotheca* (GenBank pristupni brojevi: OM9360007.1 i M59080.1). Za filogenetsku analizu kombiniranog stabla, korištena je *Cylindrotheca closterium* kao vanjska skupina (GenBank pristupni broj: NC_037986.1). Odabrane sekvence korištene u izradi kombiniranog stabla preuzete su iz istraživanja provedenih na istoj lokaciji i u istom vremenskom razdoblju.

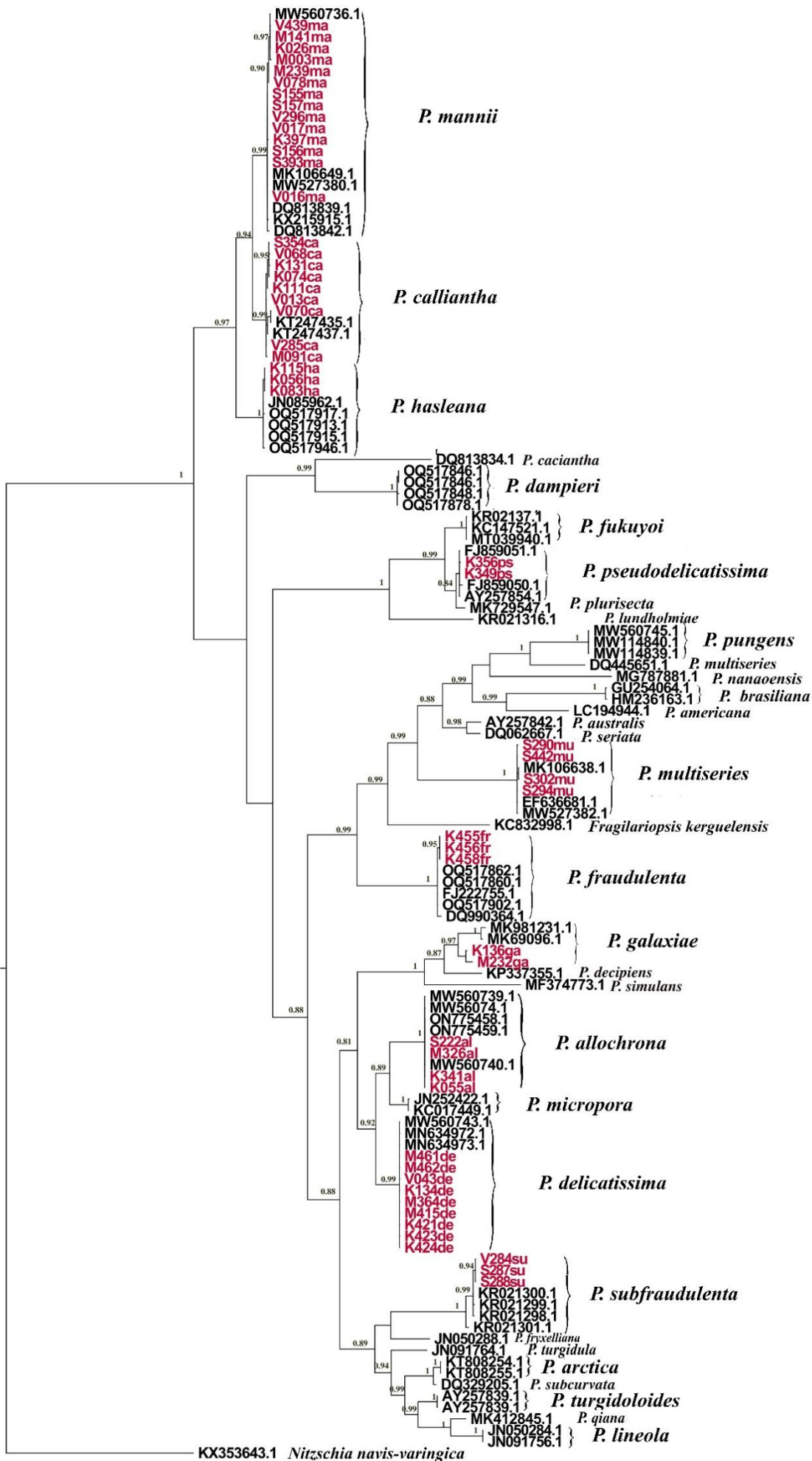
Filogenetska stabla su izrađena korištenjem triju molekularnih biljega: ITS, LSU i *rbcL*. Skupovi podataka sadržavali su ukupno 127 sekvenci za ITS, 137 za LSU i 114 sekvenci za *rbcL*. Poravnanja sekvenci pri izradi filogenetskih stabala obuhvaćala su 738 parova baza (pb) za ITS, 712 pb za LSU i 1365 pb za *rbcL* biljeg. Detaljne informacije o izoliranim kulturama *Pseudo-nitzschia*, uključujući područje izolacije (V: Velebitski kanal, S: Šibenski zaljev, K: Kaštelanski zaljev, M: Malostonski zaljev), godinu izolacije, GenBank pristupne brojeve (ITS, LSU i *rbcL*) i pripadajuće oznake kultura nalaze se u Prilogu 5, 6 i 7.

Za svaki promatrani biljeg izračunate su prosječne p-udaljenosti (proporcionalne razlike u nukleotidnim mjestima između dvije sekvence), koje predstavljaju mjeru genetske udaljenosti. Dobivene p-udaljenosti iznosile su: ITS: 0,212; LSU: 0,029 i *rbcL*: 0,041. Najveća varijabilnost zabilježena je kod ITS biljega, čime je potvrđena njegova visoka razlučivost u razlikovanju vrsta.

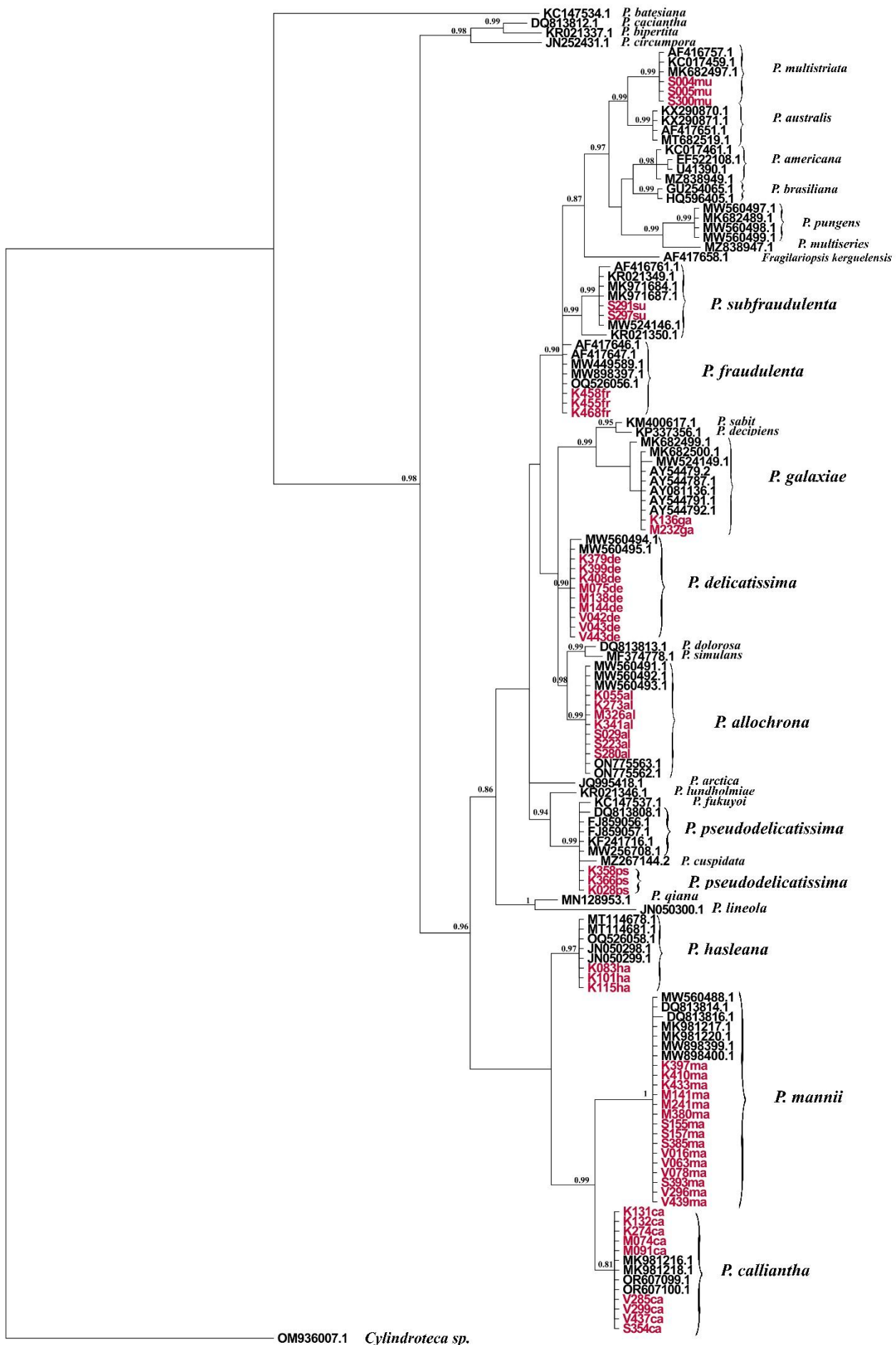
Genetski srodne vrste, *P. mannii* i *P. calliantha*, jasno su razlučene u svim filogenetskim stablima uz visoku čvornu potporu veću od 0,94 (94%). Unutarspecifična varijabilnost *P. mannii* i *P. calliantha* uočena je u ITS i *rbcL* filogenetskim stablima. Navedena varijabilnost je prisutna kod izolata s istog područja istraživanja i između različitih područja istraživanja.

Genetski srodna i evolucijski bliska spomenutim vrstama, *P. haslena*, prisutna je u svim filogenetskim analizama s posteriornom vjerojatnošću iznad 0,95 (95%). Unatoč genetskoj bliskosti među spomenutim vrstama postoje jasno izražene razlike. Uočena je unutarspecifična razlika samo u ITS filogenetskom stablu između nativnih izolata *P. hasleana* i sekvenci *P. hasleana* uvedenih iz javno dostupnih pretraživača (Slika 3.11.). U Prilozima 5, 6 i 7 prikazani su GenBank pristupni brojevi, uz pripadajuće vrste i autore sekvenci *Pseudo-nitzschia* korištenih u izradi filogenetskih stabala ITS, LSU i *rbcL*, genske regije.

Filogenetska stabla temeljena na ITS i LSU biljezima pokazala su visoku razlučivost između *P. pseudelaticissima*, *P. plurisecta* (prisutna samo u ITS stablu), *P. lundholmiae* i *P. fukuyoi* (Slika 3.12 i Slika 3.13). Najviše unutarspecifičnih razlika uočeno je u *rbcL* filogenetskom stablu za vrste *P. multistriata*, *P. fraudulenta*, *P. allochroa*, *P. delicatissima* i *P. galaxiae*.



Slika 3.11. Filogenetsko stablo dobiveno Bayesovom analizom ITS biljega. Prikazane su posteriorne vjerojatnosti $> 0,90$ (90%). Bayesova inferencija (BI) provedena je primjenom GTR+G+I modela uz minimalno 4000000 generacija Markovljevog lanca Monte Carlo (MCMC), sa stopom uzorkovanja svakih 1000 generacija i dijagnostičkim intervalom također od 1000 generacija. Izolati sekvencirani u ovom istraživanju prikazani su crvenom bojom. Mjerna skala predstavlja 0,2 zamjene nukleotida po mjestu.



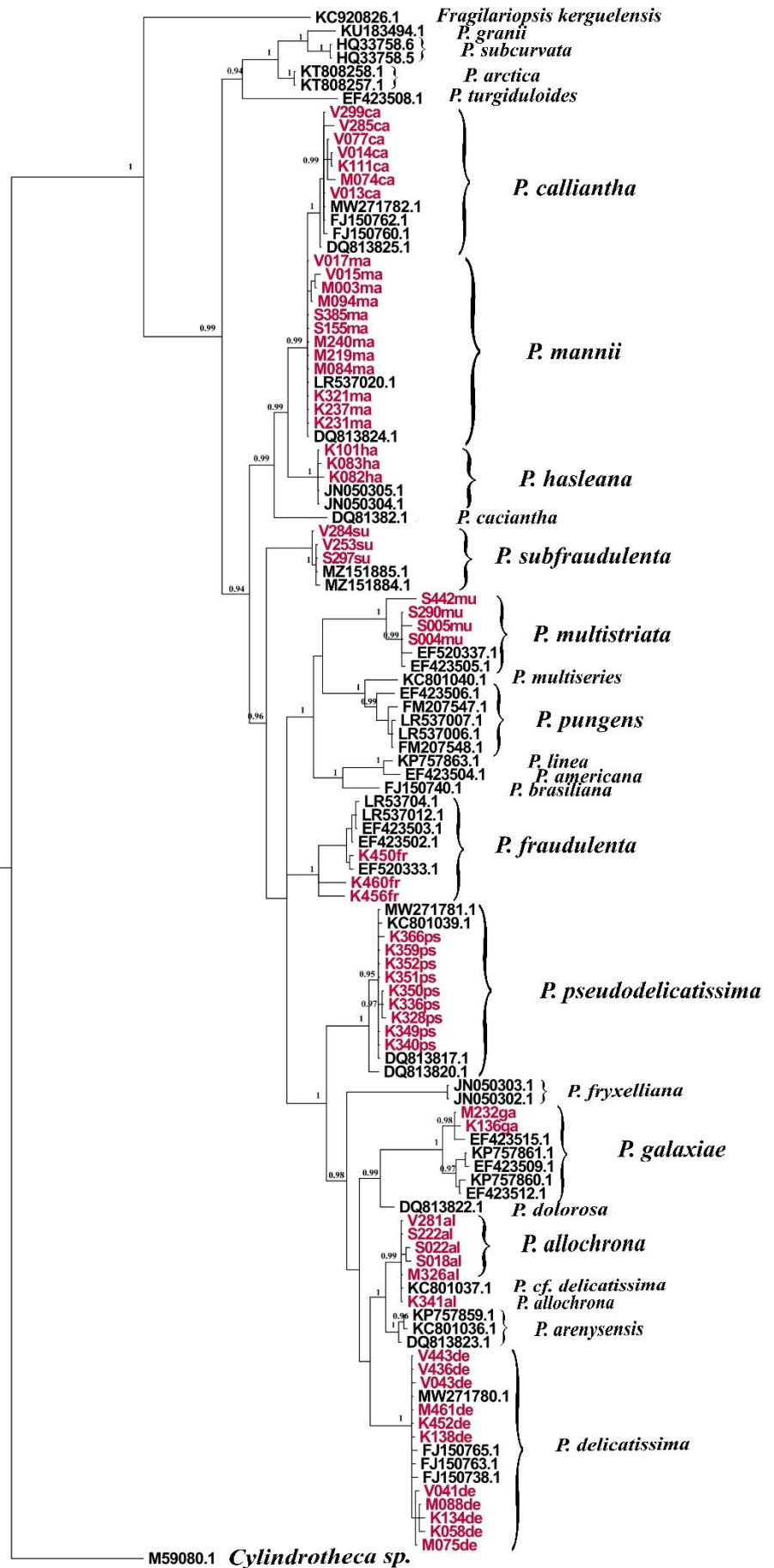
Slika 3.12. Filogenetsko stablo dobiveno Bayesovom analizom LSU biljega. Prikazane su posteriorne vjerojatnosti $> 0,90$ (90%). Bayesova inferencija (BI) provedena je primjenom GTR+G+I modela uz minimalno 4000000 generacija Markovljevog lanca Monte Carlo (MCMC), sa stopom uzorkovanja svakih 1000 generacija i dijagnostičkim intervalom također od 1000 generacija. Izolati sekvencirani u ovom istraživanju prikazani su crvenom bojom. Mjerna skala predstavlja 0,2 zamjene nukleotida po mjestu.

Među vrstama *P. allochrysa* i *P. delicatissima* uočene su značajne filogenetske sličnosti na svim testiranim genetskim biljezima, pri čemu su filogenetske rekonstrukcije pokazale jake posteriorne vjerojatnosti. Sve filogenetske analize uspješno su razlučile kriptične vrste unutar *P. delicatissima* kompleksa uz visoku čvornu potporu. Unutarspecifična varijacija između izolata *P. allochrysa* zabilježena je u *rbcL* filogenetskom stablu između izolata s istog područja (Šibenski zaljev) izoliranih u istom razdoblju (listopad 2021 god.). Prosječna p-udaljenost između vrsta *P. allochrysa* i *P. delicatissima* iznosi 0,019. S obzirom na to da su morfološki identične, ova p-udaljenost upućuje na genetsku različitost *P. allochrysa* i *P. delicatissima* vrste unutar kriptičnog *P. delicatissima* kompleksa.

Unutarspecifične razlike među izolatima su zabilježene u svim filogenetskim analizama, no izraženije su u ITS i *rbcL* filogenetskim stablima gdje su razlike između nativnih izolata očitije. Spomenuti izolati potječu s dvije različite lokacije uzorkovanja tijekom različitih sezona: K136ga izolirana je iz Kaštelanskog zaljeva u travnju 2022 godine, dok je M232ga izolirana iz Malostonskog zaljeva u listopadu iste godine. Vrsta *P. galaxiae* genetski je srodna vrstama iz *P. delicatissima* kompleksa što pokazuju sva tri filogenetska stabla.

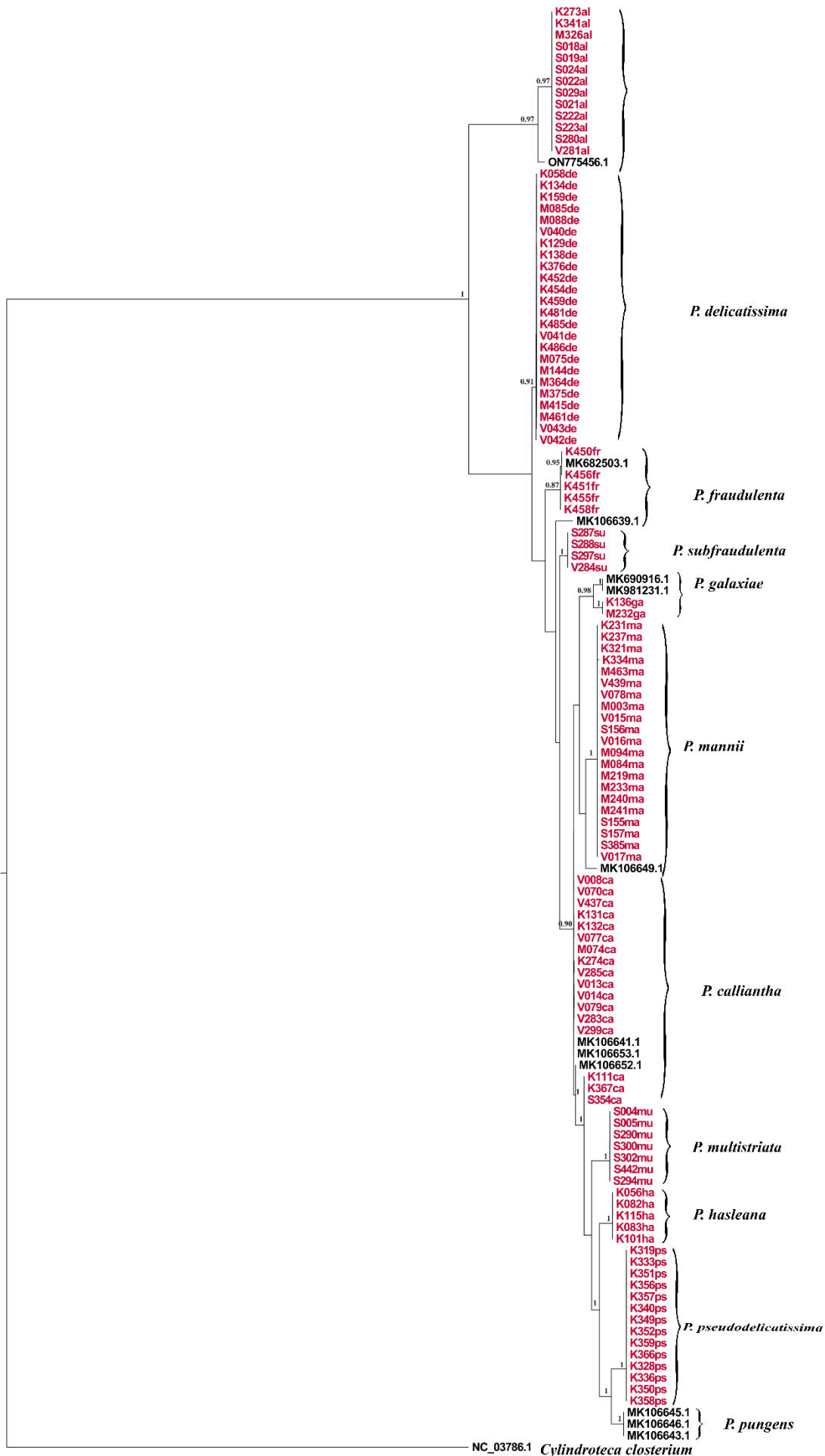
U ovom istraživanju, vrste *P. fraudulenta* i *P. subfraudulenta*, potvrđene su kao sestrinske samo u LSU filogenetskom stablu. Unutarspecifične razlike nativnih *P. subfraudulenta* sekvenci te onih javnodostupnih prisutne su u ITS i *rbcL* filogeniji. Varijacije su prisutne između nativnih i uvezenih sekvenci *P. fraudulenta* i *P. subfraudulenta* na ITS biljegu, dok je *rbcL* biljeg uspio razlučiti razlike između svih promatranih vrsta.

Vrsta *P. multistriata* zabilježena je kao dio *P. seriata* skupine u svim filogenetskim analizama. U navedenoj skupini također se nalaze vrste: *P. australis*, *P. americana*, *P. brasiliensis*, *P. nanaensis*, *P. pungens*, *P. multiseries* i *P. seriata*. Sve provedene filogenetske analize jasno su razlučile vrste unutar pseudo-kriptičnog kompleksa *P. pseudodelicatissima*. Međutim, javno dostupni molekularni podaci *rbcL* gena manjkaju, što utječe na rezoluciju filogenetskog stabla.



Slika 3.13. Filogenetsko stablo dobiveno Bayesovom analizom *rbcL* biljega. Prikazane su posteriorne vjerojatnosti > 0,90 (90%). Bayesova inferencija (BI) provedena je primjenom GTR+G+I modela uz minimalno 4000000 generacija Markovljevog lanca Monte Carlo (MCMC), sa stopom uzorkovanja svakih 1000 generacija i dijagnostičkim intervalom također od 1000 generacija. Izolati sekvencirani u ovom istraživanju prikazani su crvenom bojom. Mjerna skala predstavlja 0,2 zamjene nukleotida po mjestu.

Kombinirano filogenetsko stablo izrađeno je primjenom Bayesovih (BI) analiza koristeći ITS, LSU i *rbcL* regiju, čime je osigurana visoka razlučivost filogenetskih odnosa. Kombinirano stablo predstavlja jasno razgranatu filogeniju s visokim posteriornim vjerojatnostima na svim glavnim čvorovima. Ova filogenetska rekonstrukcija odražava evolucijsku raznolikost unutar roda *Pseudonitzschia*, pri čemu su monofiletske skupine dobro odvojene i filogenetski definirane (*P. allochroa*, *P. delicatissima*, *P. galaxiae*, *P. mannii*, *P. calliantha*, *P. multistriata*, *P. hasleana* i *P. pseudodelicatissima*) (Slika 3.14.).



Slika 3.14. Kombinirano filogenetsko stablo dobiveno Bayesovom analizom ITS, LSU i *rbcL* biljega. Prikazane su posteriorne vjerojatnosti > 0,90 (90%). Bayesova inferencija (BI) provedena je primjenom GTR+G+I modela uz minimalno 10000000 generacija Markovljevog lanca Monte Carlo (MCMC), sa stopom uzorkovanja svakih 1000 generacija i dijagnostičkim intervalom također od 1000 generacija. Izolati sekvencirani u ovom istraživanju prikazani su crvenom bojom. Mjerna skala predstavlja 0,1 zamjene nukleotida po mjestu.

Objedinjenjem morfoloških i molekularnih podataka potvrđena je prisutnost deset vrsta: *P. allochroa*, *P. calliantha*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta*, *P. galaxiae*, *P. hasleana*, *P. mannii*, *P. multistriata*, *P. pseudodelicatissima* i *P. subfraudulenta*. Vrste *P. calliantha*, *P. delicatissima* i *P. mannii* izolirane su tijekom svih sezona, pri čemu su *P. calliantha* i *P. mannii* zabilježene i na svim istraživanim postajama. Tijekom jeseni i zime izolirane su vrste *P. fraudulenta*, *P. hasleana* i *P. pseudodelicatissima*, dok su *P. multistriata* i *P. subfraudulenta* zabilježene isključivo tijekom jeseni. Vrsta *P. allochroa* izolirana je u jesenskom i ljetnom razdoblju, dok je *P. galaxiae* zabilježena tijekom jeseni i proljeća. Vrste *P. fraudulenta*, *P. hasleana* i *P. pseudodelicatissima* uspostavljene su isključivo iz uzoraka prikupljenih u Kaštelanskom zaljevu, dok je *P. multistriata* izolirana jedino iz Šibenskog kanala. Vrste koje se pojavljuju na više lokacija su *P. allochroa*, *P. galaxiae* i *P. subfraudulenta*.

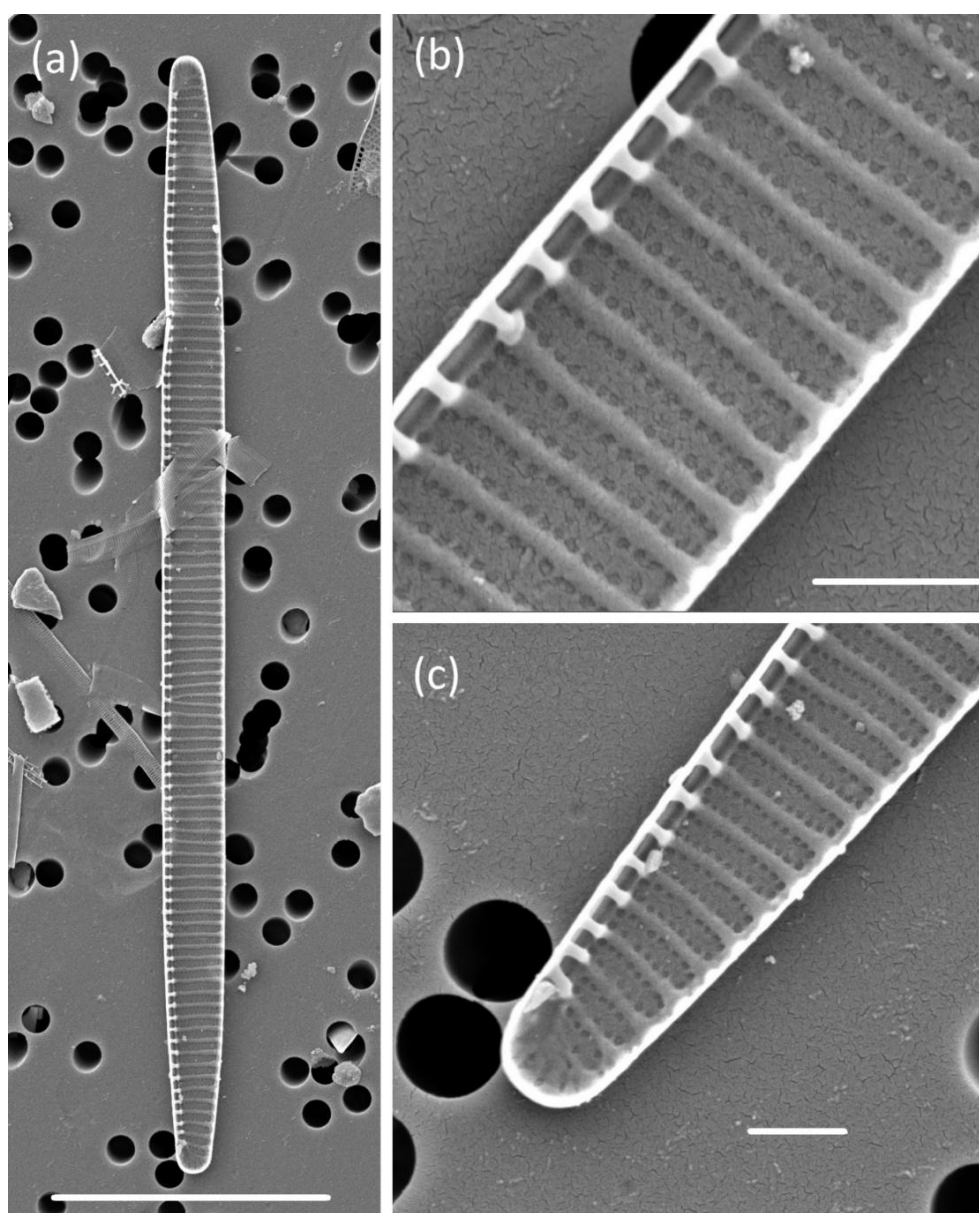
3.3. Morfološka obilježja okolišnih uzoraka

Tablica 3.3. Morfometrijska obilježja *Pseudo-nitzschia* vrsta iz okolišnih uzoraka. Podaci koji su označeni podebljano prikazuju najmanje i najveće vrijednosti (raspon), dok su srednje vrijednosti i standardne devijacije navedene ispod. Broj mjerenja (n) naveden je u zagradama ispod svake vrste.

Vrsta	Širina (μm)	Dužina (μm)	Središnja pora	Fibule u 10 μm	Interstrije u 10 μm	Poroidi u 1 μm	Redovi poroida	Band strije u 10 μm
<i>P. brasiliana</i> (n=17)	1,97-2,56 2,24 ± 0,17	30,87-38,96 35,69±2,40	0/1	22-25 23,82±0,81	22-28 24,71±1,25	8-9	2	/
<i>P. calliantha</i> (n=300)	1,08-1,99 1,47±0,18	48,74-116,24 92,00±9,30	0/1	16-23 18,74±1,38	30-40 35,55±2,00	4-6	1	3-6 4,20±0,54
<i>P. delicatissima kompleks</i> (n=617)	0,89-1,84 1,20±0,19	37,72-102,63 63,98±11,10	1	19-26 23,23±1,40	36-43 39,98± 1,64	8-14 11,27±1,06	1-2	0,35-5 3,43± 0,52
<i>P. fraudulenta</i> (n=12)	4,32-6,06 5,14±0,46	66,02-109,49 87,43±17,28	1	19-23 20,91±1,04	22-24 23,22±0,83	6 6±0	2	3-4,50 3,64±0,56
<i>P. galaxiae</i> (n=204)	0,79-60,15 1,74±50,00	7,61-74,84 29,00±47,54	1	17-58 22,60±29,00	50-66	59,79±11,31		0-19 7,44±13,43
<i>P. linea</i> (n=88)	1,74-2,55 2,12±0,16	13,69-32,78 21,28±3,80	0	19-23 20,95±0,93	37-46 41,23±1,52	8-11 9,46±0,65	2	/
<i>P. lundholmiae</i> (n=24)	1,86-2,62 2,11±0,21	37,15-60,81 47,89±8,57	1	15-21 17,36±1,29	32-34 32,76±0,66	5-6 5,30±0,47	1-2	2-5 3,71±0,61
<i>P. mannii</i> (n=220)	1,08-1,94 1,51±0,17	52,99-131,06 88,94±13,00	1	16-23 19,53±1,28	31-41 39,94±1,25	4-6 5,01±0,31	1-2-3-4	3-6 4,13±0,54
<i>P. multistriata</i> (n=14)	1,88-2,84 2,32±0,24	43,64-72,73 63,93±8,17	0	23-26 24,38±0,89	35-40 38,31±1,20	10-12 11,38±0,62		/
<i>P. pseudodelicatissima/cuspidata</i> (n=1031)	1,02-1,98 1,43±0,14	49,81-161,28 93,15±14,25	1	16-25 19,73±1,38	31-41 35,56±1,59	4-7 5,09±0,43	1-2-3-4	2,5-6 4,07±0,54
<i>P. subfraudulenta</i> (n=170)	2,87-5,37 4,01±0,40	85,52-156,48 117,7±14,22	1	12-18, 14,37±1,00	23-26 24,21±0,64	5-6 5,51±0,50	1-2-3	3-6 4,10±0,48
<i>P. spp.</i> (n=134)	1,14-2,34 1,58±0,23	69,3-131,94 88,51±13,57	1	16-36 19,74±1,87	32-46 35,36±1,62	1-6 4,88±0,46	1	3-19 4,33±1,41
<i>P. sp. 1</i> (n=7)	1,38-1,68 1,54±0,10	84,22-94,03 89,16±3,66	1	16-18 17,14±0,90	35-37 36,14±0,69	5 5±0	1	4-5 4,14±0,38

3.3.2. *Pseudo-nitzschia brasiliiana* Lundholm, Hasle i Fryxell

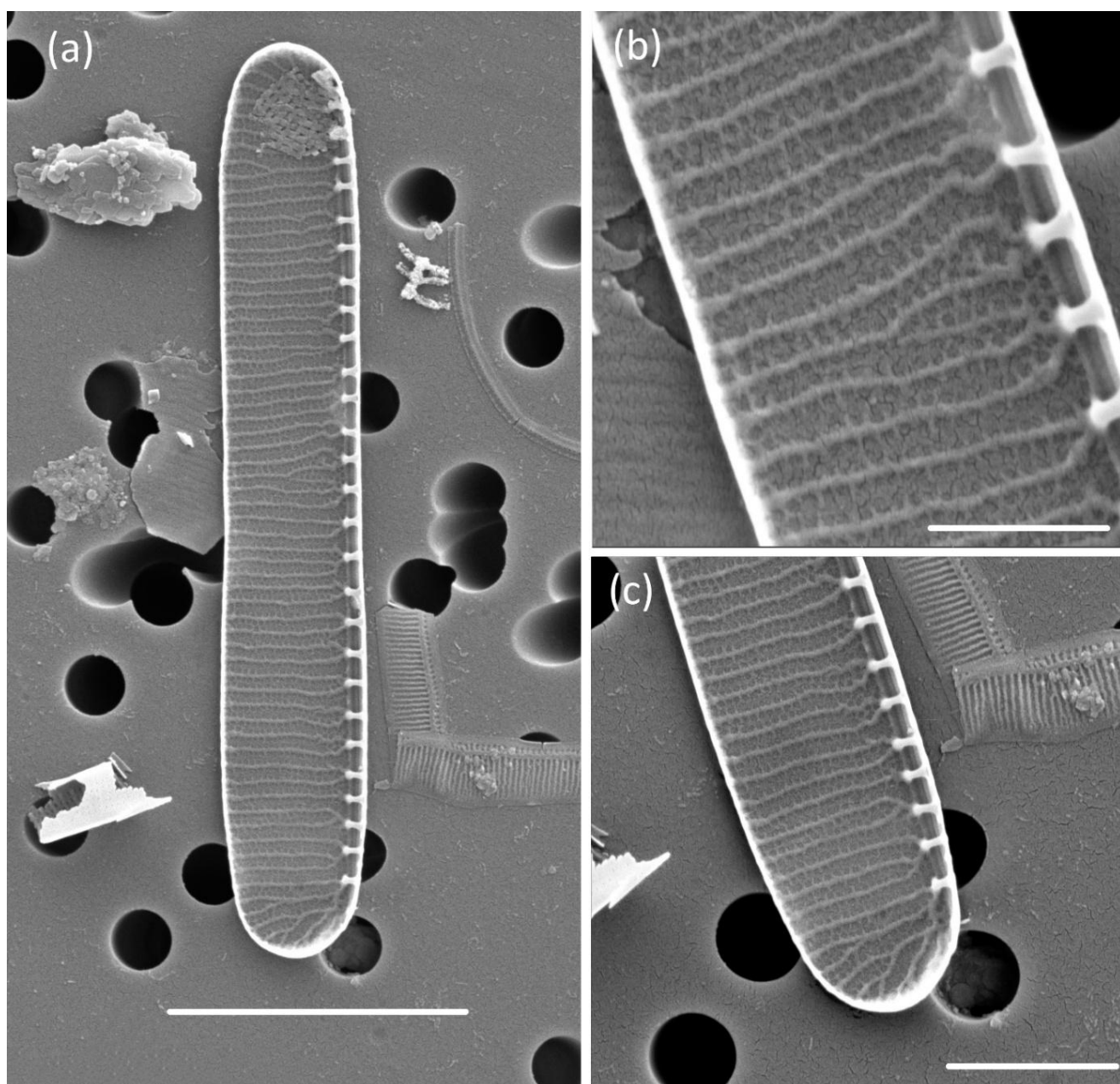
Utvrđeno je da su stanice *P. brasiliiana* u valvalnom položaju bile gotovo linearnog oblika s zaobljenim krajevima (Slika 3.15.). Zabilježena je duljina stanice od 30,87 do 38,96 μm . Širina je iznosila od 1,97 do 2,56 μm . Rafa je bila kontinuirana bez središnje pore, dok je u jednoj stanici središnja pora bila prisutna. Fibule i interstrije bile su pravilno raspoređene, skoro jednake po broju i poravnate. Broj fibula iznosio je 22-25 u 10 μm , a broj interstrija 22-28 u 10 μm . Strije su bile perforirane u 2 reda poroida. Broj poroida u 1 μm bio je 8-9.



Slika 3.15. *Pseudo-nitzschia brasiliiana*: (a) cijela valva, SEM; (b) središnji dio valve bez središnje pore; (c) zaobljeni kraj stanice. Mjerne skale: (a) 10 μm ; (b) 1 μm ; (c) 500 nm.

3.3.3. *Pseudo-nitzschia linea* Lundholm, Hasle i Fryxell

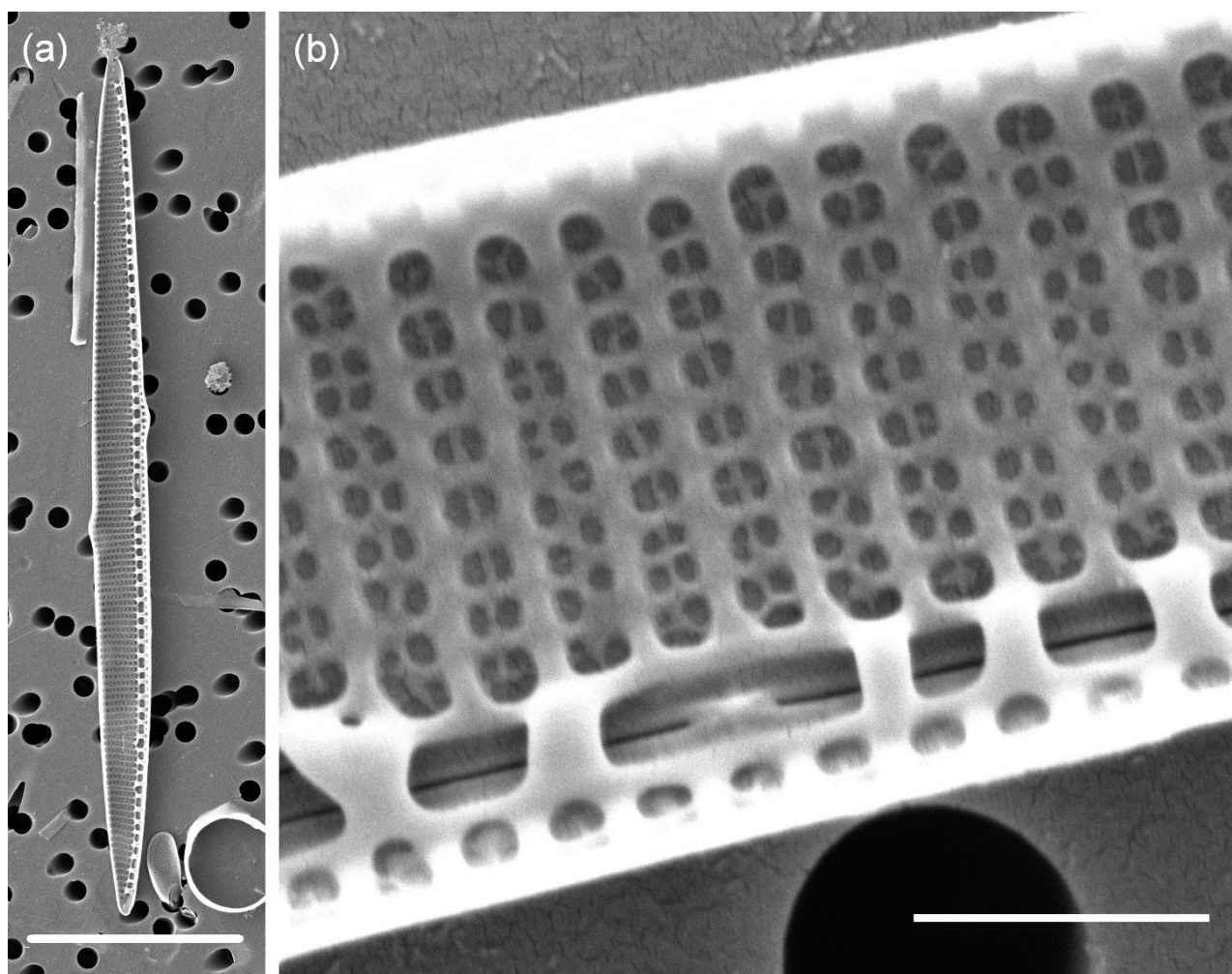
Stanice su bile blago silificirane i linearne u valvalnom položaju sa široko zaobljenim vrhovima (Slika 3.16.). Apikalne i transapikalne osi bile su 13,69-32,78 μm dužine i 1,74-2,55 μm širine. Gustoća interstrija bila je dvostruko veća od gustoće fibula. Broj fibula bio je 19-23, a broj interstrija bio je 37-46 u 10 μm . Strije su sadržavale 8-11 pora u 1 μm , a bile su perforirane u 2 reda poroida. Zabilježena je nepravilna raspodjela interstrija, pri čemu su se dvije interstrije spojile.



Slika 3.16. *Pseudo-nitzschia linea*: (a) cijela valva, SEM; (b) središnji dio valve bez središnje pore; (c) široko zaobljeni vrhovi stanice. Mjerne skale: (a) 10 μm ; (b) 1 μm ; (c) 500 nm.

3.3.4. *Pseudo-nitzschia lundholmiae* Limteng, Leaw, Lim

Dužina stanice *P. lundholmiae* bila je 37,15-60,18 μm , a širina 1,86-2,62 μm . U svim stanicama je zabilježena središnja pora. Stanice su bile lanceolatne i simetrične u valvalnom položaju (Slika 3.17.). U bočnom položaju stanice su bile sigmoidnog oblika. Broj fibula u 10 μm bio je 15-21, a broj interstrija u 10 μm bio je 32-34. Strije su bile perforirane u 1-2 redova poroida, a sadržavale su 5-6 poroida u 1 μm . Krajevi stanice bili su zaobljeni. Pore su podjeljene na 1 do 2 sektora, rijetko na 3, dok neke pore nisu bile podjeljene na sektore. Strije u valvocopuli su bile heksagonalne.



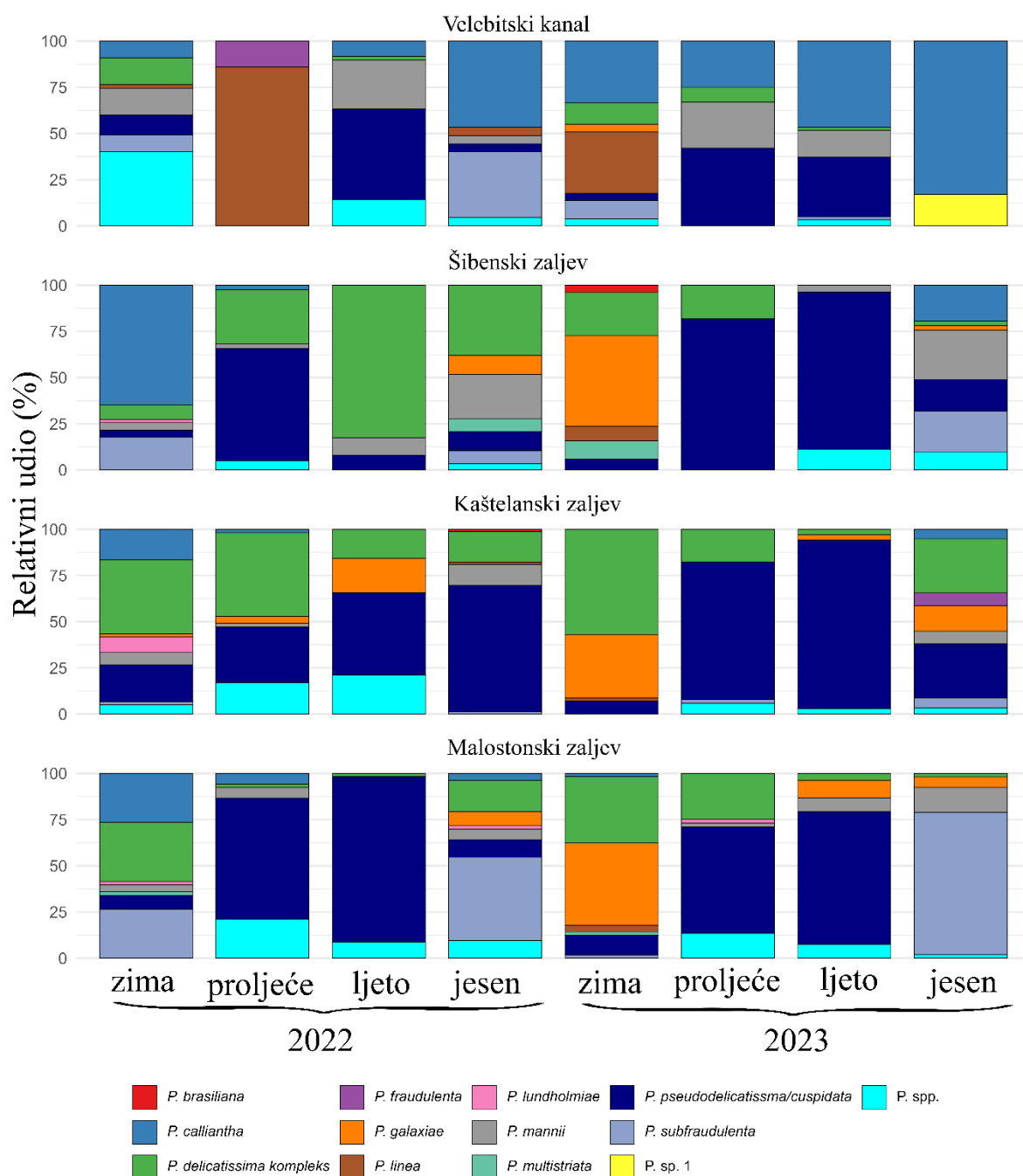
Slika 3.17. *Pseudo-nitzschia lundholmiae*: (a) cijela valva, SEM; (b) središnji dio valve sa središnjom porom. Mjerne skale: (a) 10 μm ; (b) 500 nm.

3.4. Prostorna raspodjela okolišnih uzoraka

Na promatranim postajama iz okolišnih uzoraka morfološki su određene: *P. brasiliana*, *P. calliantha*, *P. delicatissima* kompleks, *P. fraudulenta*, *P. galaxiae*, *P. lineae*, *P. lundholmiae*, *P. mannii*, *P. multistriata*, *P. pseudodelicatissima/cuspidata*, *P. spp.*, *P. sp. 1*, *P. subfraudulenta*. Utvrđeno je da kompleks *P. delicatissima* uključuje kriptične vrste: *P. allochroa*, *P. arenysensis* i *P. delicatissima*, koje nije moguće pouzdano odrediti temeljem morfoloških karakteristika.

Analizom područja uočeno je da nisu sve morfološki određene vrste *Pseudo-nitzschia* zabilježene na svim promatranim područjima. Vrste *P. brasiliana* i *P. multistriata* zabilježene su u Šibenskom i Kaštelanskom zaljevu, odnosno u Šibenskom i Malostonskom zaljevu. Vrsta *P. fraudulenta* zabilježena je u Velebitskom kanalu i Kaštelanskom zaljevu. Isključivo u Velebitskom kanalu zabilježena je *P. sp. 1*. Vrsta *P. lineae* zabilježena je na svim područjima, ali u malim relativnim brojnostima, dok je *P. lundholmiae* uglavnom zabilježena na svim istraživanim područjima, osim u Velebitskom kanalu. Vrste pronađene na svim istraživanim postajama uključuju: *P. calliantha*, kompleks *P. delicatissima*, *P. galaxiae*, *P. mannii*, *P. pseudodelicatissima/cuspidata*, *P. subfraudulenta* i *P. spp.*

Tijekom hladnih sezona, u jesen i zimu, zabilježena je najveća raznolikost *Pseudo-nitzschia* vrsta. U jesenskom razdoblju zabilježene su sve određene vrste iz okolišnih uzoraka temeljem morfoloških karakteristika, a u zimu je zabilježeno 12 određenih *Pseudo-nitzschia* vrsta. Tijekom toplijih mjeseci (proljeće i ljeto) raznolikost vrsta smanjena je u odnosu na hladniji period godine (jesen i zima). U proljeće je zabilježeno 10 vrsta *Pseudo-nitzschia*, a tijekom ljeta je zabilježeno 8 *Pseudo-nitzschia* vrsta. Slika 3.15. prikazuje promjene relativne brojnosti vrsta *Pseudo-nitzschia* na promatranim postajama tijekom 2022. i 2023. godine.



Slika 3.18. Relativni udio vrsta *Pseudo-nitzschia* na istraživanim područjima tijekom 2022. i 2023. godine.

PERMANOVA analiza je pokazala da se sastav zajednice *Pseudo-nitzschia* značajno razlikovao među područjima (po: Pseudo-F = 2,73; P(permanova) = 0,007; $R^2 \approx 18,9\%$) i među sezonama (se: Pseudo-F = 3,73; P(permanova) = 0,0006; $R^2 \approx 25,8\%$). Time je potvrđeno da je sezonska dinamika imala

nešto jači utjecaj na varijabilnost zajednice *Pseudo-nitzschia*. Interakcija područja i sezone (poxse) nije bila statistički značajna (Tablica 3.4.).

Tablica 3.4. Rezultati PERMANOVA analize sastava zajednice *Pseudo-nitzschia* obzirom na prostorni i sezonski faktor.

Faktor	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)	Jedinstvene permutacije
po	3	10012	3337,4	2,7319	0,007	9931
se	3	13657	4552,4	3,7265	0,0006	9937
poxse	9	9744,7	1082,7	0,88629	0,6822	9868
Res	16	19546	1221,6			
Ukupno	31	52961				

Usporedni test između faktora sezone upućuje da razlike između godišnjih doba: zima-jesen i proljeće-ljeto nisu bile značajne. Sezonske razlike bile su najizraženije između parova sezona: zima-ljeto, ljeto-jesen, proljeće-jesen, a nešto slabije između zime-proljeće no još uvijek značajne (Tablica 3.5.). Usporedni test koristeći faktor područje sugerira kako je Velebitski kanal značajan te se razlikuje od Kaštelanskog i Malostonskog zaljeva (a od Šibenskog zaljeva je na granici značajnosti). Navedeni rezultati upućuju da su Kaštelanski, Malostonski i Šibenski zaljev bili međusobno sličniji.

Tablica 3.5. Usporedni test za procjenu značajnosti razlika između razina pojedinog faktora (sezone i područja).

Grupe	t	P(perm)	Grupe	t	P(perm)
zima - proljeće	1,8243	0,0284	Šibenski kanal, Velebitski kanal	1,6404	0,045
zima - ljeto	2,6485	0,0047	Šibenski kanal, Kaštelanski zaljev	0,87831	0,5202
zima - jesen	1,3664	0,1584	Šibenski kanal, Malostonski zaljev	0,74413	0,6489
proljeće - ljeto	0,79516	0,6539	Velebitski kanal, Kaštelanski zaljev	2,3633	0,0046
proljeće - jesen	2,062	0,0056	Velebitski kanal, Malostonski zaljev	1,9785	0,0141
ljeto - jesen	2,4619	0,004	Kaštelanski zaljev, Malostonski zaljev	1,2662	0,2171

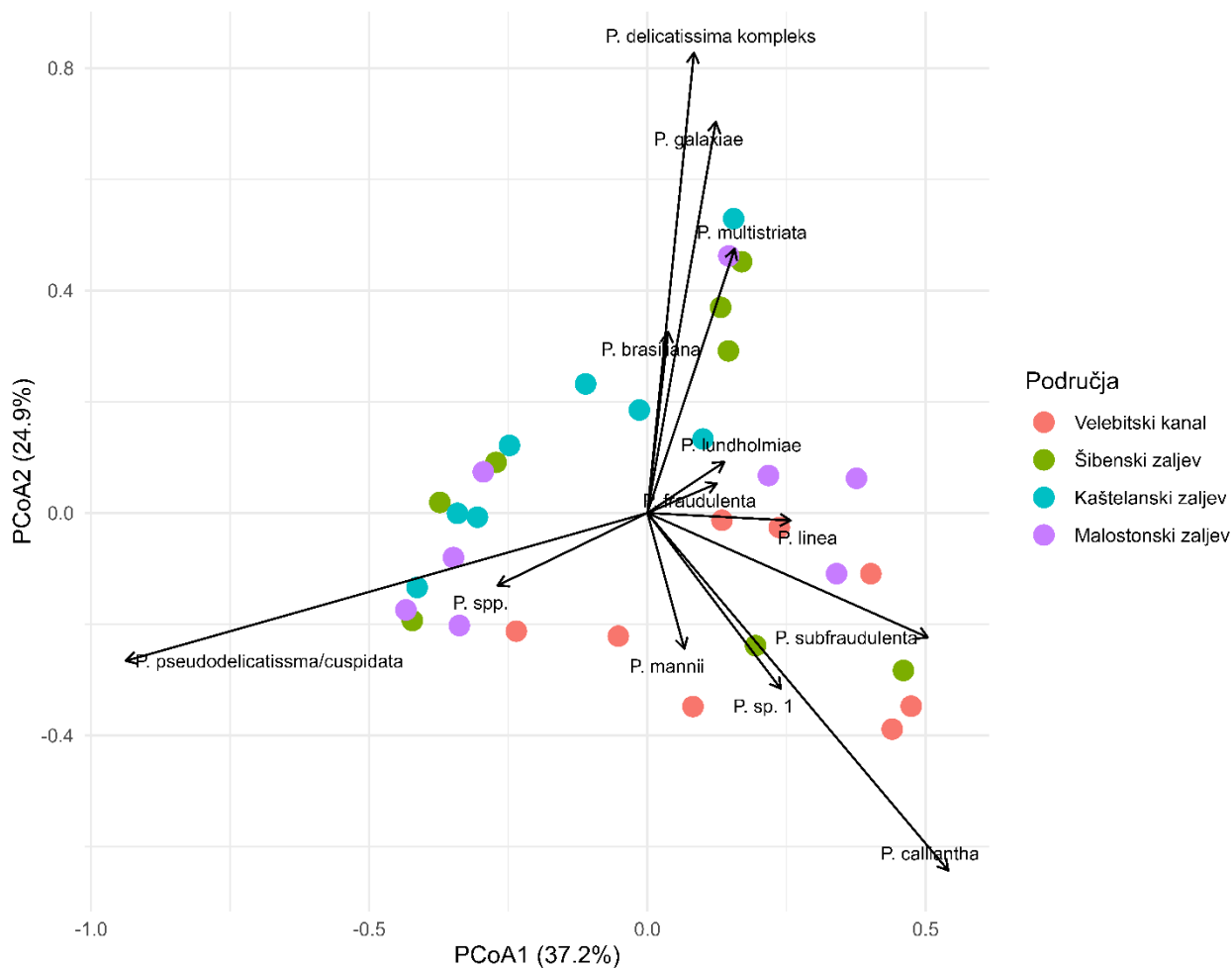
SIMPER analizom utvrđeno je koje vrste najviše doprinose razlikama u sastavu zajednica između istraživanih područja. Relativno mali broj vrsta nosi najveći udio u ukupnoj različitosti između područja. U usporedbi Šibenskog zaljeva i Velebitskog kanala četiri vrste (*P. calliantha*, *P. pseudodelicatissima/cuspidata*, *P. delicatissima* kompleks i *P. linea*) sudjeluju s približno 60% kumulativnog doprinosa različitosti. Slični omjeri su i u ostalim usporedbama, gdje nekoliko istih dominantnih vrsta objašnjava većinu razlika između područja. Vrsta *P. sp. 1* zabilježena je isključivo u Velebitskom kanalu te je na tom području utvrđena najveća brojnost *P. linea*.

Tablica 3.6. SIMPER analiza područja vrsta *Pseudo-nitzschia*.

Vrste (Šibenski zaljev i Velebitski kanal)	Prosječna brojnost	Prosječna sličnost	Sličnost/SD	Različitost/SD	Doprinos (%)	Kum.doprinos (%)
<i>P. calliantha</i>	1,75	4,93	11,49	1,39	18,34	18,34
<i>P. pseudodelicatissima/cuspidata</i>	5,08	3,32	9,86	1,16	15,74	34,07
<i>P. delicatissima complex</i>	4,27	1,6	9,01	1,22	14,38	48,45
<i>P. linea</i>	0,35	2,31	6,57	0,69	10,49	58,95
<i>P. mannii</i>	2,33	2,49	5,99	1,37	9,56	68,51
<i>P. subfraudulenta</i>	1,44	1,67	5,23	1,04	8,35	76,86
<i>P. spp.</i>	1,32	2	4,96	1,13	7,91	84,77
<i>P. galaxiae</i>	1,47	0,25	3,7	0,67	5,91	90,68
<i>P. multistriata</i>	0,72	0	1,7	0,56	2,71	93,39
<i>P. sp. 1</i>	0	0,52	1,62	0,37	2,58	95,97
Vrste (Šibenski zaljev i Kaštelanski zaljev)	Prosječna brojnost	Prosječna sličnost	Sličnost/SD	Različitost/SD	Doprinos (%)	Kum.doprinos (%)
<i>P. pseudodelicatissima/cuspidata</i>	5,08	6,39	8,46	1,4	18,08	18,08
<i>P. delicatissima kompleks</i>	4,27	5	7,07	1,27	15,1	33,18
<i>P. galaxiae</i>	1,47	2,45	6,57	1,25	14,04	47,23
<i>P. calliantha</i>	1,75	0,97	5,14	0,82	10,97	58,2
<i>P. mannii</i>	2,33	1,24	5,1	1,33	10,9	69,09
<i>P. spp.</i>	1,32	2,12	4,68	1,26	10	79,09
<i>P. subfraudulenta</i>	1,44	0,76	3,97	1,09	8,48	87,58
<i>P. multistriata</i>	0,72	0	1,68	0,57	3,58	91,16
<i>P. lundholmiae</i>	0,18	0,46	1,36	0,61	2,89	94,05
<i>P. linea</i>	0,35	0,16	1,19	0,52	2,54	96,59
Vrste (Velebitski kanal i Kaštelanski zaljev)	Prosječna brojnost	Prosječna sličnost	Sličnost/SD	Različitost/SD	Doprinos (%)	Kum.doprinos (%)
<i>P. calliantha</i>	4,93	0,97	11,26	1,41	17,8	17,8
<i>P. pseudodelicatissima/cuspidata</i>	3,32	6,39	10,42	1,25	16,48	34,28
<i>P. delicatissima kompleks</i>	1,6	5	9,28	1,58	14,67	48,95
<i>P. linea</i>	2,31	0,16	6,24	0,67	9,87	58,82
<i>P. galaxiae</i>	0,25	2,45	6,02	1,2	9,52	68,35
<i>P. mannii</i>	2,49	1,24	5,71	1,26	9,03	77,37
<i>P. spp.</i>	2	2,12	5,19	1,24	8,21	85,58
<i>P. subfraudulenta</i>	1,67	0,76	4,18	1	6,61	92,2
<i>P. fraudulenta</i>	0,47	0,33	1,95	0,5	3,08	95,28
Vrste (Šibenski zaljev i Malostonski zaljev)	Prosječna brojnost	Prosječna sličnost	Sličnost/SD	Različitost/SD	Doprinos (%)	Kum.doprinos (%)
<i>P. pseudodelicatissima/cuspidata</i>	5,08	5,34	9,21	1,21	18,2	18,2
<i>P. subfraudulenta</i>	1,44	2,75	7,56	0,98	14,94	33,14
<i>P. delicatissima kompleks</i>	4,27	3,35	7,37	1,23	14,57	47,71
<i>P. galaxiae</i>	1,47	1,86	5,84	0,99	11,54	59,25
<i>P. calliantha</i>	1,75	1,35	5,64	0,92	11,15	70,4
<i>P. spp.</i>	1,32	2,3	4,93	1,27	9,75	80,15
<i>P. mannii</i>	2,33	1,82	4,64	1,36	9,17	89,32
<i>P. multistriata</i>	0,72	0,34	2,13	0,78	4,21	93,53
<i>P. lundholmiae</i>	0,18	0,52	1,39	0,81	2,75	96,29

Vrste (Velebitski kanal i Malostonski zaljev)	Prosječna brojnost	Prosječna sličnost	Sličnost/SD	Različitost/SD	Doprinos (%)	Kum.doprinos (%)
<i>P. calliantha</i>	4,93	1,35	10,72	1,38	17,28	17,28
<i>P. pseudodelicatissima/cuspidata</i>	3,32	5,34	10,39	1,23	16,75	34,03
<i>P. subfraudulenta</i>	1,67	2,75	7,63	1,02	12,3	46,33
<i>P. linea</i>	2,31	0,24	6,3	0,68	10,15	56,47
<i>P. delicatissima kompleks</i>	1,6	3,35	6,29	1,38	10,14	66,61
<i>P. spp.</i>	2	2,3	5,51	1,37	8,89	75,5
<i>P. mannii</i>	2,49	1,82	5,48	1,44	8,83	84,33
<i>P. galaxiae</i>	0,25	1,86	4,65	0,86	7,5	91,83
<i>P. sp. 1</i>	0,52	0	1,57	0,37	2,54	94,37
<i>P. fraudulenta</i>	0,47	0	1,44	0,37	2,32	96,69
Vrste (Kaštelanski zaljev i Malostonski zaljev)	Prosječna brojnost	Prosječna sličnost	Sličnost/SD	Različitost/SD	Doprinos (%)	Kum.doprinos (%)
<i>P. pseudodelicatissima/cuspidata</i>	6,39	5,34	8,53	1,31	18,91	18,91
<i>P. subfraudulenta</i>	0,76	2,75	6,86	0,92	15,2	34,11
<i>P. delicatissima kompleks</i>	5	3,35	6,57	1,36	14,56	48,68
<i>P. galaxiae</i>	2,45	1,86	6,1	1,31	13,51	62,18
<i>P. spp.</i>	2,12	2,3	4,65	1,41	10,3	72,48
<i>P. mannii</i>	1,24	1,82	3,95	1,25	8,76	81,24
<i>P. calliantha</i>	0,97	1,35	3,85	0,99	8,54	89,78
<i>P. lundholmiae</i>	0,46	0,52	1,84	0,89	4,07	93,85
<i>P. linea</i>	0,16	0,24	0,91	0,53	2,01	95,86

Vrste *P. calliantha*, *P. delicatissima* i *P. pseudodelicatissima* bile visoko učestale na svim postajama. Suprotno tome vrste poput *P. brasiliانا*, *P. fraudulenta* i *P. multistriata* su zabilježene samo na dvije postaje, dok je *P. sp. 1* pronađena samo u Kaštelanskom zaljevu. Vrste *P. galaxiae*, *P. linea* i *P. mannii* zabilježene su na svim područjima sa manjom učestalošću. Slika 3.15. prikazuje dvodimenzionalnu ordinaciju glavnih koordinata (PCoA) i raspored uzoraka *Pseudo-nitzschia*. Uočeno je grupiranje zimskih i proljetnih, odnosno ljetnih i jesenskih uzoraka koji zauzimaju položaj u suprotnom dijelu dijagrama. Vrste *P. pseudodelicatissima/cuspidata*, *P. delicatissima* kompleks, *P. calliantha*, *P. mannii*, *P. galaxiae*, *P. subfraudulenta* i *P. spp.* su bile zastupljene u svim sezonama, pri čemu *P. pseudodelicatissima/cuspidata* dominira. Vrste *P. brasiliانا*, *P. fraudulenta*, *P. multistriata* i *P. sp. 1* javljale su se povremeno, najčešće u jesen ili zimu, s vrlo niskom brojnošću (Slika 3.19.). Rezultati analize glavnih koordinata prikazani su ordinacijskim dijagramom u kojem x-os prikazuje 37,2% ukupne varijabilnosti, dok druga y-os prikazuje 24,9% varijabilnosti podataka. Obojene točke predstavljaju područja prikupljanja uzoraka, pri čemu njihova udaljenost odražava sličnost u sastavu vrsta.



Slika 3.19. Dvodimenzionalna PCoA ordinacija glavnih koordinata prikazuje raspodjelu roda *Pseudo-nitzschia* prema područjima.

3.5. Sezonska raspodjela okolišnih uzoraka

SIMPER analizom utvrđeno je koje vrste najviše doprinose razlikama u sastavu zajednica roda *Pseudo-nitzschia* između sezona. Rezultati pokazuju da većinu sezonske različitosti objašnjava relativno mali broj istih dominantnih vrsta. U usporedbi zime i proljeća pet vrsta (*P. pseudodelicatissima/cuspidata*, *P. callantha*, *P. galaxiae*, *P. lineata* i *P. delicatissima* kompleks) čini 65,2 % kumulativnog doprinosa (19,3 %, 12,9 %, 12,4 %, 10,5 % i 10,1 %). Slično tome, u usporedbi zime i ljeta prve četiri vrste (*P. pseudodelicatissima/cuspidata*, *P. delicatissima* kompleks, *P. callantha* i *P. galaxiae*) objašnjavaju 59,8% ukupne različitosti. Usporedba proljeća i ljeta pokazuje da četiri vrste (*P. delicatissima* kompleks, *P. pseudodelicatissima/cuspidata*, *P. mannii* i *P. spp.*) doprinose 64,6% disimilarosti. U ostalim sezonskim parovima zabilježen je sličan obrazac: zima–

jesen 63,2 %, proljeće–jesen 60,0% te ljeto–jesen 66,7% kumulativnog doprinosa prvih nekoliko dominantnih vrsta.

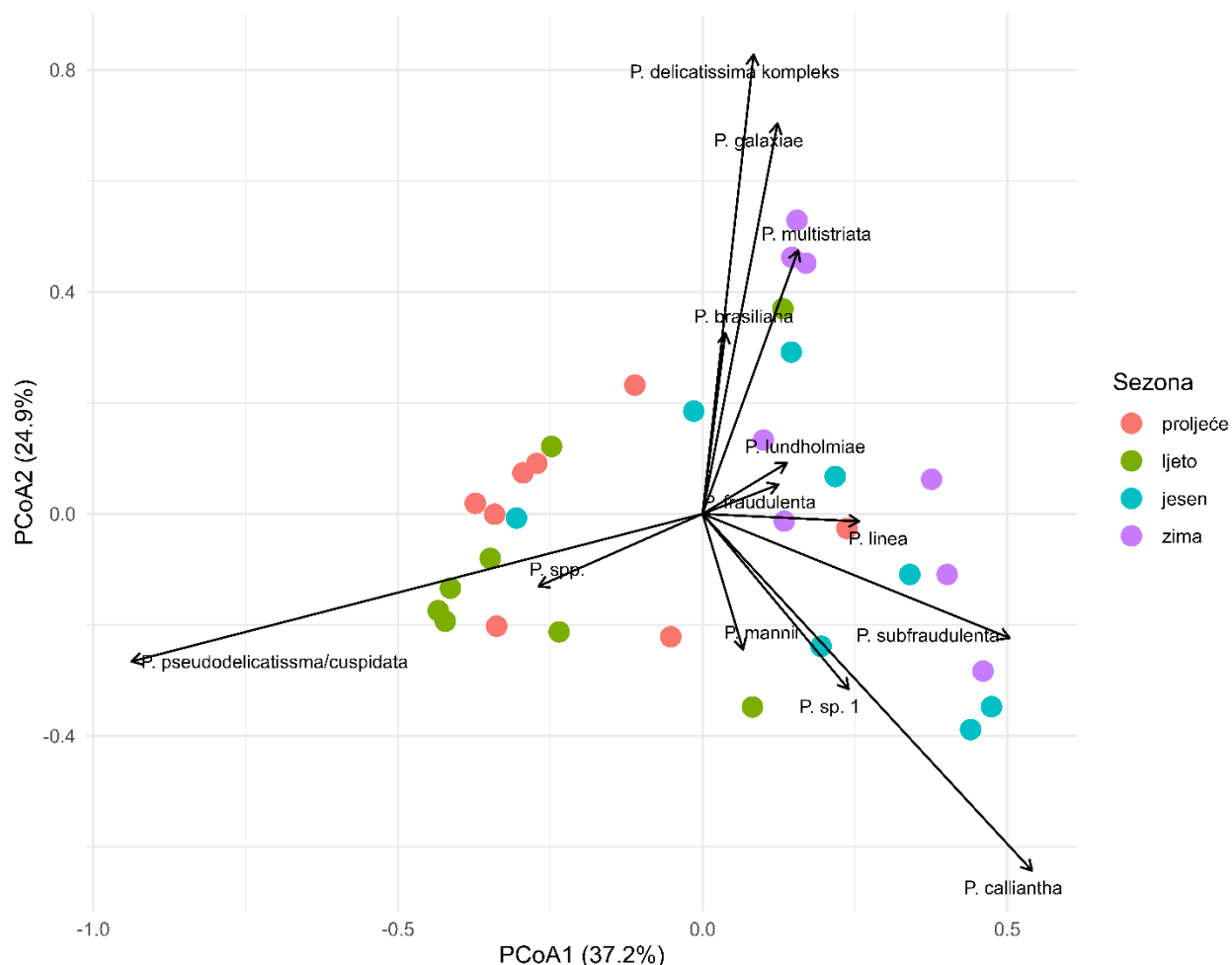
Tablica 3.6. SIMPER analiza sezona zajednice *Pseudo-nitzschia*.

Vrste (Zima i proljeće)	Prosječna brojnost	Prosječna sličnost	Sličnost/SD	Različitost/SD	Doprinos (%)	Kum.doprinos (%)
<i>P. pseudodelicatissima/cuspidata</i>	2,9	6,6	11,5	2,7	19,3	19,3
<i>P. calliantha</i>	3,4	1,3	7,7	1,2	12,9	32,2
<i>P. galaxiae</i>	2,9	0,2	7,4	1,0	12,4	44,6
<i>P. linea</i>	1,6	1,2	6,3	0,8	10,5	55,1
<i>P. delicatissima kompleks</i>	5,1	3,7	6,0	1,2	10,1	65,2
<i>P. spp.</i>	1,3	2,1	5,6	1,2	9,4	74,6
<i>P. subfraudulenta</i>	2,3	0,2	5,4	1,2	9,1	83,7
<i>P. mannii</i>	1,3	1,5	4,0	1,2	6,8	90,5
<i>P. lundholmiae</i>	0,7	0,2	1,9	0,8	3,1	93,6
<i>P. multistriata</i>	0,7	0,0	1,8	0,7	3,1	96,7
Vrste (Zima i ljeto)	Prosječna brojnost	Prosječna sličnost	Sličnost/SD	Različitost/SD	Doprinos (%)	Kum.doprinos (%)
<i>P. pseudodelicatissima/cuspidata</i>	2,9	7,4	11,9	1,9	19,3	19,3
<i>P. delicatissima kompleks</i>	5,1	2,6	9,1	1,8	14,8	34,1
<i>P. calliantha</i>	3,4	1,2	8,4	1,2	13,7	47,8
<i>P. galaxiae</i>	2,9	1,1	7,4	1,1	12,0	59,8
<i>P. spp.</i>	1,3	2,6	6,1	1,6	9,9	69,7
<i>P. subfraudulenta</i>	2,3	0,2	5,5	1,2	8,9	78,7
<i>P. mannii</i>	1,3	2,1	4,8	1,3	7,7	86,4
<i>P. linea</i>	1,6	0,0	4,2	0,9	6,7	93,1
<i>P. multistriata</i>	0,7	0,0	1,9	0,7	3,0	96,1
Vrste (Proljeće i ljeto)	Prosječna brojnost	Prosječna sličnost	Sličnost/SD	Različitost/SD	Doprinos (%)	Kum.doprinos (%)
<i>P. delicatissima kompleks</i>	3,7	2,6	8,8	1,5	20,1	20,1
<i>P. pseudodelicatissima/cuspidata</i>	6,6	7,4	8,1	1,0	18,6	38,7
<i>P. mannii</i>	1,5	2,1	5,7	1,3	13,2	51,9
<i>P. spp.</i>	2,1	2,6	5,6	1,4	12,8	64,6
<i>P. calliantha</i>	1,3	1,2	5,3	0,9	12,2	76,8
<i>P. linea</i>	1,2	0,0	3,9	0,4	8,9	85,7
<i>P. galaxiae</i>	0,2	1,1	3,4	0,8	7,7	93,4
<i>P. fraudulenta</i>	0,5	0,0	1,6	0,4	3,6	97,0
Vrste (Zima i jesen)	Prosječna brojnost	Prosječna sličnost	Sličnost/SD	Različitost/SD	Doprinos (%)	Kum.doprinos (%)
<i>P. calliantha</i>	3,4	3,1	8,1	1,2	15,1	15,1
<i>P. subfraudulenta</i>	2,3	4,0	7,1	1,3	13,3	28,4
<i>P. delicatissima kompleks</i>	5,1	2,8	7,0	1,3	13,0	41,5
<i>P. galaxiae</i>	2,9	1,8	6,5	1,3	12,1	53,6
<i>P. pseudodelicatissima/cuspidata</i>	2,9	3,3	5,1	1,2	9,6	63,2
<i>P. mannii</i>	1,3	3,0	5,1	1,4	9,6	72,7
<i>P. spp.</i>	1,3	1,7	4,2	1,2	7,8	80,5
<i>P. linea</i>	1,6	0,3	3,7	0,9	7,0	87,5
<i>P. multistriata</i>	0,7	0,3	2,0	0,8	3,8	91,3

<i>P. lundholmiae</i>	0,7	0,3	1,7	0,8	3,3	94,5
<i>P. sp. 1</i>	0,0	0,5	1,5	0,4	2,7	97,2
Vrste (Proljeće i jesen)	Prosječna brojnost	Prosječna sličnost	Sličnost/SD	Različitost/SD	Doprinos (%)	Kum.doprinos (%)
<i>P. pseudodelicatissima/cuspidata</i>	6,6	3,3	11,8	1,5	19,2	19,2
<i>P. subfraudulenta</i>	0,2	4,0	10,0	1,3	16,3	35,4
<i>P. calliantha</i>	1,3	3,1	8,2	0,9	13,4	48,9
<i>P. delicatissima</i> kompleks	3,7	2,8	6,8	1,3	11,1	60,0
<i>P. mannii</i>	1,5	3,0	5,9	1,5	9,7	69,7
<i>P. spp.</i>	2,1	1,7	4,7	1,4	7,7	77,3
<i>P. galaxiae</i>	0,2	1,8	4,3	1,4	7,0	84,3
<i>P. linea</i>	1,2	0,3	3,9	0,4	6,4	90,7
<i>P. fraudulenta</i>	0,5	0,3	1,9	0,5	3,1	93,8
<i>P. sp. 1</i>	0,0	0,5	1,7	0,4	2,8	96,6
Vrste (Ljeto i jesen)	Prosječna brojnost	Prosječna sličnost	Sličnost/SD	Različitost/SD	Doprinos (%)	Kum.doprinos (%)
<i>P. pseudodelicatissima/cuspidata</i>	7,4	3,3	12,6	1,4	21,7	21,7
<i>P. subfraudulenta</i>	0,2	4,0	10,1	1,3	17,4	39,1
<i>P. calliantha</i>	1,2	3,1	8,8	0,9	15,2	54,3
<i>P. delicatissima</i> kompleks	2,6	2,8	7,2	1,2	12,4	66,7
<i>P. mannii</i>	2,1	3,0	5,5	1,3	9,5	76,2
<i>P. galaxiae</i>	1,1	1,8	4,5	1,4	7,8	84,0
<i>P. spp.</i>	2,6	1,7	4,3	1,2	7,4	91,4
<i>P. sp. 1</i>	0,0	0,5	1,7	0,4	3,0	94,3
<i>P. multistriata</i>	0,0	0,3	0,8	0,4	1,4	95,0

Tijekom zime dominirala su vrste *P. delicatissima* kompleksa (27,8%), *P. calliantha* (19,0%) i *P. galaxiae* (16,7%). Vrste *P. pseudodelicatissima/cuspidata* (8,7%) i *P. subfraudulenta* (8,3%) su umjereno zastupljene, dok su *P. linea* i *P. spp.* zabilježene s udjelima do 6%. Manje brojnosti bilježe *P. mannii*, *P. multistriata* i *P. lundholmiae* (3,6%, 1,7% i 1,5%), dok *P. fraudulenta* i *P. sp. circumpora* nisu zabilježene. Tijekom jeseni, zajednicom su dominirale vrste *P. subfraudulenta* (24,1%), *P. calliantha* (19,8%), *P. pseudodelicatissima/cuspidata* (17,4%) i kompleks *P. delicatissima* (13,2%), koje su zajedno činile više od 70% ukupne brojnosti. Uz njih su bile prisutne vrste *P. mannii* (11,6%) i *P. galaxiae* (5,1%), dok su ostale vrste, poput *P. fraudulenta*, *P. multistriata*, *P. linea*, *P. lundholmiae* i *P. brasiliiana* bile rijetke (<1%). U proljeće, *P. pseudodelicatissima/cuspidata* je zadržala visoku brojnost (51,6%) te ostala dominantna vrsta, dok su vrste kompleksa *P. delicatissima* (18,2%) i *P. linea* (10,8%) bile zastupljene od 18,2% i 10,8%. Manje zastupljene su bile *P. spp.* (7,8%), *P. mannii* (4,6%) i *P. calliantha* (4,4%), dok *P. brasiliiana* i *P. multistriata* nisu bile zabilježene. U ljetnom razdoblju zajednica je pokazala smanjenu raznolikost, uz izrazitu dominaciju vrste *P. pseudodelicatissima/cuspidata*, koja je činila 58,9% ukupne brojnosti. Vrste kompleksa *P. delicatissima* (13,8%), *P. spp.* (8,6%), *P. mannii* (7,7%) i *P. calliantha* (6,9%) bile su prisutne u manjim udjelima tijekom ljetnog razdoblja. Sve ostale vrste, uključujući *P. brasiliiana*, *P. fraudulenta*, *P. linea*, *P. lundholmiae*, *P. multistriata* i *P. sp. circumpora*, su potpuno izostale (Slika 3.20.). Rezultati analize glavnih koordinata (PCoA) prikazani su ordinacijskim dijagramom na Slici 3.19. X-os objašnjava 37,2% ukupne varijabilnosti, dok Y-os objašnjava 24,9% ukupne varijabilnosti. Obojene točke predstavljaju uzorke prikupljene u različitim

sezonomama pri čemu njihovu međusobna udaljenost u dijagrama odražava sličnost u sastavu vrsta. Bliže točke ukazuju na sličniji sastav zajednica a veća udaljenost označava izraženije razlike. Vrste usmjerene strijelicama prema određenim skupinama točaka karakteristične su za te sezone.



Slika 3.20. Dvodimenzionalna PCoA ordinacija glavnih koordinata prikazuje raspodjelu roda *Pseudo-nitzschia* prema godišnjim dobima.

3.6. Bioinformatička analiza okolišnih podataka

Za analizu metabarkodiranjem odabrane su ITS1 i *rbcL* genska regije koje su pokazale visoku razinu intraspecijske i interspecijske varijabilnosti, što ih čini prikladnima za taksonomsko razlučivanje do razine vrste. U analizu je uključeno ukupno 96 uzoraka. Nakon izolacije svim uzorcima je izmjerena DNA koncentracija Qubit fluorometrom. Detaljni podaci o izmjerenim koncentracijama prikazani su u Prilogu 8. Prilikom izolacije nisu uočena odstupanja koja bi upućivala na tehničke poteškoće u

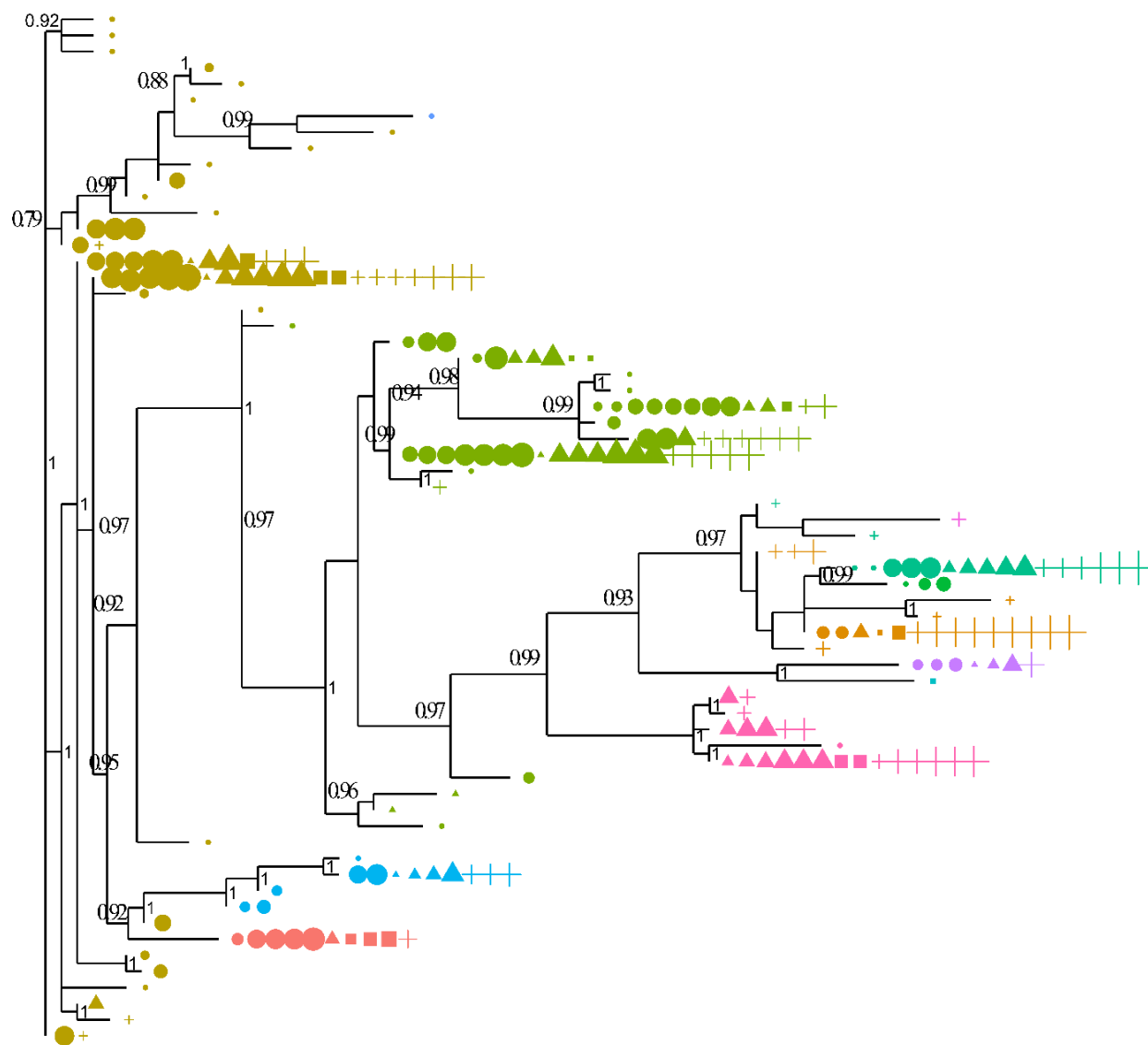
pripremi uzoraka. Tijekom PCR umnažanja i sekvenciranja došlo je do gubitka dijela uzoraka, što je rezultiralo neujednačenim brojem uspješnih tehničkih replika među područjima. Zbog toga nije bilo moguće zadržati jednak broj replika za sve uzorke. Od ukupno 96 prikupljenih uzoraka, PCR umnažanje ITS1 genske regije nije bilo uspješno za 24 uzoraka, koji su isključeni iz daljnje obrade. Preostala 72 uzorka uključena su u bioinformatičku obradu i provjeru kvalitete sekvenci. Nakon obrezivanja i filtriranja sekvenci prema kriterijima kvalitete, zadržano je ukupno 39 uzoraka koji su sadržavali dovoljan broj visokokvalitetnih sekvenci za daljnje analize, odnosno u 39 uzoraka je zabilježen rod *Pseudo-nitzschia*. Nakon denoisinga i završne obrade sekvenci ITS1 regije identificirano je ukupno 54 ASV-a roda *Pseudo-nitzschia*. Svaki ASV predstavlja jedinstvenu ITS1 sekvencu, a njegova brojnost određena je po pojedinom uzorku, što omogućuje uvid u genetsku raznolikost i raspodjelu unutar roda. ASV-ovi ITS1 regije pokazali su izraženu heterogenost u pojavnosti i abundanciji. Pojedini ASV-ovi bili su detektirani u samo jednom uzorku, dok je najrasprostranjeniji ASV zabilježen u 12 uzoraka. Ukupna brojnost ASV-ova značajno je varirala, s vrijednostima od niskih abundancija pa do 4394 očitavanja za najbrojniji ASV. Taksonomska identifikacija ITS1 ASV-ova obuhvatila je više vrsta *Pseudo-nitzschia*, uključujući *P. allochroa*, *P. brasiliiana*, *P. calliantha*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta*, *P. galaxiae*, *P. linea*, *P. lundholmiae*, *P. mannii*, *P. multistriata*, *P. pseudodelicatissima*, *P. subfraudulenta*, kao i veći broj ASV-ova identificiranih na razini roda (*P. sp.*) zbog visoke sličnosti ITS1 sekvenci među blisko srodnim vrstama. Dominantni ASV-ovi, osobito oni povezani s kompleksom *P. delicatissima*, činili su znatan udio ukupne ITS1 brojnosti te su bili prisutni u većem broju uzoraka, što ukazuje na njihovu široku prostorno-vremensku rasprostranjenost. Velik broj ITS1 ASV-ova imao je nisku ukupnu abundanciju i ograničenu pojavnost, što upućuje na postojanje rijetkih ili lokalno specifičnih genotipova. Ovakav obrazac raspodjele ASV-ova potvrđuje visoku razlučivost ITS1 regije za detekciju fine genetske varijabilnosti unutar roda *Pseudo-nitzschia*. Za *rbcL* genski biljeg nakon obrezivanja i filtriranja sekvenci, u daljnu analizu uključena su 44 uzorka koja su zadovoljila definirane kriterije kvalitete i u kojima je zabilježen rod *Pseudo-nitzschia*. Nakon završne obrade podataka metabarkodiranja i denoisinga sekvenci *rbcL* regije identificirano je ukupno 65 ASV-ova roda *Pseudo-nitzschia*. Svaki ASV predstavlja jedinstvenu *rbcL* sekvencu, a njegova brojnost je kvantificirana po pojedinom uzorku. ASV-ovi su pokazali izrazito heterogenu raspodjelu među uzorcima. Pojedini ASV-ovi bili su prisutni u samo jednom uzorku, dok je najrasprostranjeniji ASV zabilježen u ukupno 20 uzoraka. Ukupna brojnost pojedinih ASV-ova također je značajno varirala, pri čemu se kretala od nekoliko pojedinačnih sekvenci do 7005 očitavanja za najbrojniji ASV. Taksonomska pripadnost ASV-ova obuhvaćala je više vrsta uključujući *P. allochroa*, *P. americana/linea*, *P. calliantha*, *P. delicatissima*, *P. galaxiae*, *P. hasleana*, *P. manni*, *P. multistriata*, *P. pseudodelicatissima* i *P. subfraudulenta* te ASV-ove identificirane isključivo na razini roda. Dominantni ASV-ovi, uglavnom povezani s vrstama iz kompleksa *Pseudo-nitzschia delicatissima*, činili su značajan udio ukupne *rbcL* sekvencijske abundancije te su bili prisutni u većem broju uzoraka, što upućuje na njihovu široku prostorno-vremensku rasprostranjenost i potencijalnu ekološku važnost. Suprotno tome, velik broj ASV-ova imao je nisku abundanciju i ograničenu pojavnost, što ukazuje na postojanje rijetkih ili lokalno specifičnih genotipova unutar analiziranih zajednica.

3.7. Molekularna obilježja okolišnih uzoraka

3.7.1. *rbcL* genski biljeg

Od ukupno 96 okolišnih uzoraka, PCR umnažanje *rbcL* genske regije nije bilo uspješno za 24 uzorka, koji su isključeni iz daljnje obrade. Preostala 72 uzorka uključena su u bioinformatičku obradu i provjeru kvalitete sekvenci. Nakon obrezivanja i filtriranja sekvenci prema kriterijima kvalitete, zadržano je ukupno 44 uzoraka koji su sadržavali dovoljan broj visokokvalitetnih sekvenci za daljnje analize, odnosno u 44 uzoraka je zabilježen rod *Pseudo-nitzschia*. Nakon denoisinga i završne obrade sekvenci *rbcL* regije identificirano je ukupno 65 ASV-a roda *Pseudo-nitzschia*. Filogenetska analiza temeljena na *rbcL* sekvencama metabarkodiranja pokazala je jasno razdvajanje unutar roda *Pseudo-nitzschia*, pri čemu su određene sekvence grupirane u više dobro podržanih filogenetskih grupa koje odgovaraju pojedinim vrstama (Slika 3.21.). Većina glavnih čvorova pokazuje visoke vrijednosti statističke potpore, što upućuje na stabilne filogenetske odnose među analiziranim taksonima. Sekvence dodijeljene vrstama *P. delicatissima*, *P. calliantha*, *P. galaxiae*, *P. multistriata*, *P. hasleana*, *P. mannii*, *P. pseudodelicatissima*, *P. subfraudulenta* i *P. allochirona* tvore uglavnom monofiletske skupine s jasnim razdvajanjem između pojedinih linija. Unutar pojedinih grupa uočava se određeni stupanj unutarnje filogenetske raznolikosti, vidljiv kroz grananje sekvenci unutar istih vrsta. Pojedine sekvence grupirane su u nedefinirane ili prijelazne skupine označene kao *Pseudo-nitzschia* sp., *Pseudo-nitzschia* sp. (*americana/linea*) i *Pseudo-nitzschia* sp. (*mannii/calliantha*), što upućuje na to da je analizirani dio *rbcL* genskog biljega identičan ili vrlo sličan između navedenih vrsta. Skupina *Pseudo-nitzschia* sp. (*americana/linea*) tvori zasebnu, jasno izdvojenu grupu s vrlo visokom čvornom potporom (100%) te je određena u Malostonskom i Šibenskom zaljevu, dok nije određena u Kaštelanskom zaljevu ni u Velebitskom kanalu. Relativna abundancija sekvenci ove skupine je niska do umjerena. Skupina *Pseudo-nitzschia* sp. (*mannii/calliantha*) također tvori jasno izdvojenu grupu s čvornom potporom od 100%. Sekvence ove skupine određene su u Kaštelanskom i Malostonskom zaljevu te u Velebitskom kanalu, a njihova relativna abundancija je niska. Analiza prostorne raspodjele pokazuje da se sekvence iz svih istraživanih područja pojavljuju unutar istih filogenetskih grupa, bez jasnog geografskog strukturiranja unutar stabla. Veličina simbola, koja odražava relativnu abundanciju sekvenci, ukazuje na dominaciju određenih vrsta, osobito unutar kompleksa *P. delicatissima*, *P. calliantha* i *P. multistriata*. Prema podacima metabarkodiranja *rbcL* gena, najveća raznolikost vrsta *Pseudo-nitzschia* zabilježena je u Kaštelanskom zaljevu, gdje je određen najveći broj različitih taksonomskih linija, uključujući jasno razdvojene grupe *P. delicatissima* i *P. calliantha*, kao i prisutnost vrsta *P. multistriata*, *P. galaxiae* i *P. pseudodelicatissima*. Ovo područje također pokazuje visoku brojnost dominantnih vrsta. U Malostonskom zaljevu zabilježena je umjerena raznolikost, pri čemu su sekvence dominantno grupirane unutar nekoliko filogenetskih grupa, s izraženom brojnošću pojedinih vrsta, osobito unutar kompleksa *P. delicatissima*. Šibenski zaljev karakterizira manji broj zabilježenih vrsta *Pseudo-nitzschia* te niža ukupna brojnost u usporedbi s Kaštelanskim i Malostonskim zaljevom, pri čemu su sekvence uglavnom bez izraženog unutarnjeg grananja. U Velebitskom kanalu zabilježena je najniža raznolikost i brojnost sekvenci, a određene sekvence

pripadaju manjem broju vrsta. Na razini pojedinih vrsta, ASV-ovi vrste *P. galaxiae* grupiraju se u jasno izdvojenu grupu s visokom čvornom potporom ($\approx 0,99$) te su određeni u svim istraživanim područjima, uz umjerenu do visoku abundanciju. Vrsta *P. hasleana* pokazuje jasno grupiranje s čvornim potporama u rasponu od približno 0.98 do 1, a sekvence ove vrste određene su u više područja, s najvećim brojem zapisa u Kaštelanskom i Šibenskom zaljevu. ASV-ovi vrste *P. mannii* tvore stabilnu grupu s visokom čvornom potporom ($\approx 0,99$) te su određeni u Kaštelanskom, Malostonskom i Šibenskom zaljevu, dok su u Velebitskom kanalu rjeđi. Vrsta *P. multistriata* formira dobro podržanu grupu s čvornom potporom približno 1 (100%) te je određena u svim područjima, s većim relativnim abundancijama zabilježenima u Šibenskom zaljevu i Velebitskom kanalu. Vrsta *P. pseudodelicatissima* jasno je izdvojena s visokom čvornom potporom (100%), a sekvence ove vrste određene su u Kaštelanskom i Šibenskom zaljevu te u Velebitskom kanalu, dok su u Malostonskom zaljevu slabije zastupljene. ASV-ovi vrste *P. allochroa* grupiraju se zasebno s vrlo visokom čvornom potporom (100%) te su određeni u Kaštelanskom i Malostonskom zaljevu te u manjem broju zapisa u Šibenskom zaljevu. Vrsta *P. calliantha* tvori manju, ali jasno definiranu grupu s čvornom potporom oko 0,99 te je određena u Kaštelanskom i Malostonskom zaljevu. *P. subfraudulenta* pokazuje jasno grupiranje s visokom čvornom potporom, a sekvence ove vrste određene su u ograničenom broju područja, ponajprije u Kaštelanskom i Šibenskom zaljevu, uz niže relativne abundancije.



Brojnost

- 5
- 25
- 125
- 625
- 3125

Područje

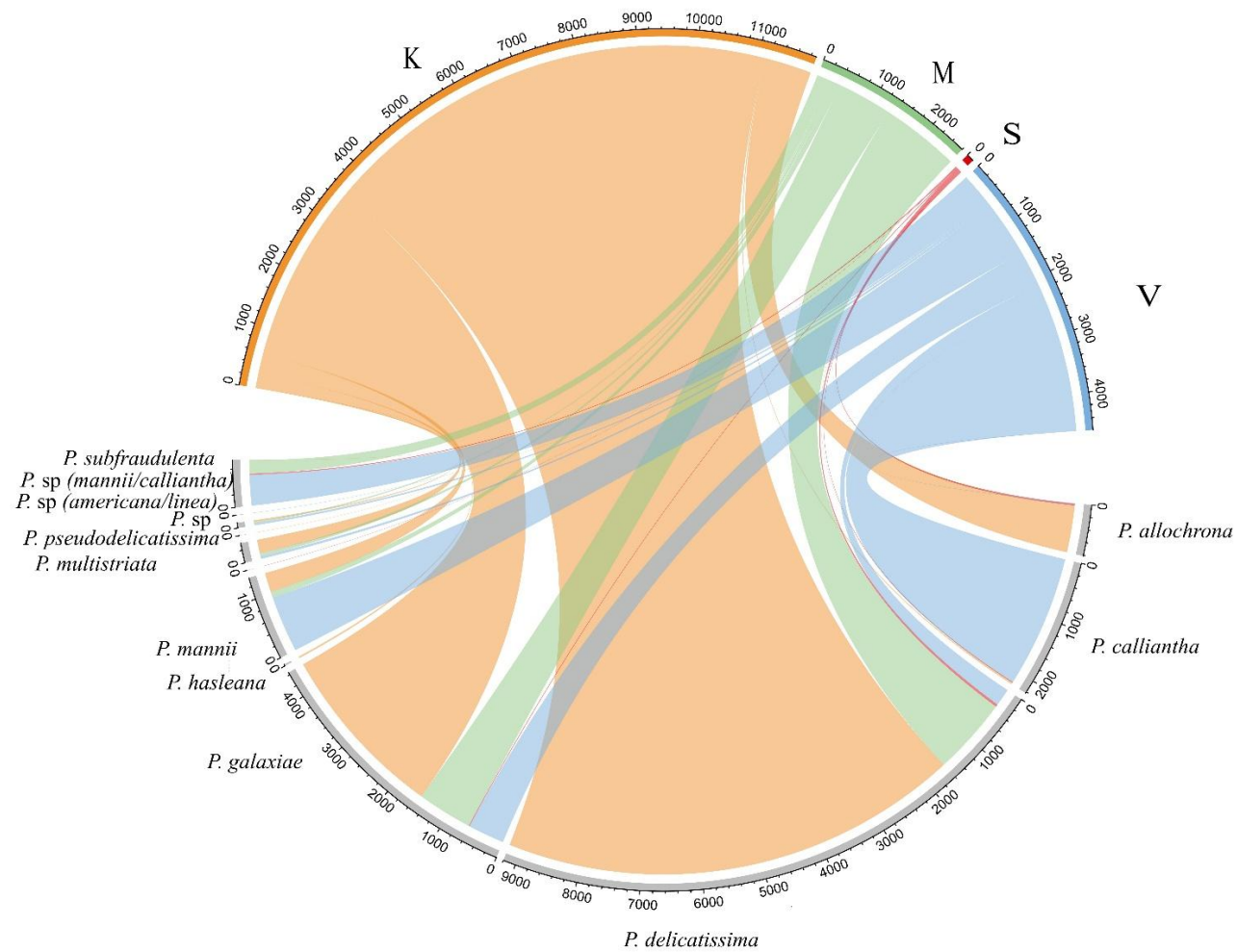
- K-Kaštelanski
- ▲ M-Malostonski zaljev
- S-Šibenski zaljev
- + V-Velebitski kanal

Vrste

- *P. allochirona*
- *P. calliantha*
- *P. delicatissima*
- *P. galaxiae*
- *P. hasleana*
- *P. mannii*
- *P. multistriata*
- *P. pseudodelicatissima*
- *P. sp*
- *P. sp (americana/linea)*
- *P. sp (manii/calliantha)*
- *P. subfraudulenta*

Slika 3.21. Prikaz raspodjele sekvenci metabarkodiranja okolišnih uzoraka roda *Pseudo-nitzschia* između četiri istraživana područja (Kaštelanski zaljev, Malostonski zaljev, Šibenski zaljev i Velebitski kanal) temeljen na *rbcL* markeru. Slika omogućuje usporedbu relativne brojnosti sekvenci pojedinih vrsta među područjima te ukazuje na razlike u zastupljenosti.

Kružni dijagram *rbcL* genskog biljega prikazuje raspodjelu i relativnu brojnost sekvenci roda *Pseudo-nitzschia* po istraživanim područjima. Vanjski dijelovi dijagrama predstavljaju pojedina područja i vrste, dok debljina povezujućih traka odražava relativnu brojnost sekvenci pojedine vrste unutar određenog promatranog područja (Slika 3.22.). Kaštelanski zaljev pokazuje najvišu ukupnu brojnost i najveći doprinos većine određenih vrsta roda *Pseudo-nitzschia*. Posebno se ističe visoka brojnost vrsta *P. delicatissima* i *P. calliantha*, koje su dominantne na ovom području. Uz navedene vrste, u Kaštelanskom zaljevu prisutne su i *P. multistriata*, *P. galaxiae*, *P. pseudodelicatissima* te manji udio sekvenci označenih kao *Pseudo-nitzschia* sp., što upućuje na visoku i izraženu raznolikost. U Malostonskom zaljevu zabilježena je umjerena ukupna raznolikost pri čemu dijagram pokazuje izražene veze s vrstama *P. delicatissima* i *P. multistriata*, dok su ostale vrste zastupljene u manjem udjelu. Raspodjela sekvenci upućuje na dominaciju ograničenog broja vrsta, uz manju ukupnu raznolikost u usporedbi s Kaštelanskim zaljevom. Šibenski zaljev karakterizira niža brojnost i manji broj određenih vrsta. Povezujuće trake upućuju na prisutnost nekoliko dominantnih vrsta, prvenstveno unutar kompleksa *P. delicatissima*, dok su ostale vrste slabo zastupljene ili odsutne. Velebitski kanal pokazuje najnižu brojnost i najuži raspon detektiranih vrsta. Dijagram ukazuje na ograničenu prisutnost roda *Pseudo-nitzschia*, s malim brojem sekvenci povezanih s pojedinim vrstama, bez izraženog doprinosa ijedne dominantne linije. Kružni dijagram potvrđuje izražene razlike u brojnosti i sastavu roda *Pseudo-nitzschia* između istraživanih područja. Kaštelanski zaljev ističe se kao područje s najvišom ukupnom brojnosti i najvećom raznolikošću vrsta, dok Velebitski kanal pokazuje najnižu ukupnu brojnost. Ovi rezultati u skladu su s filogenetskom analizom *rbcL* markera.



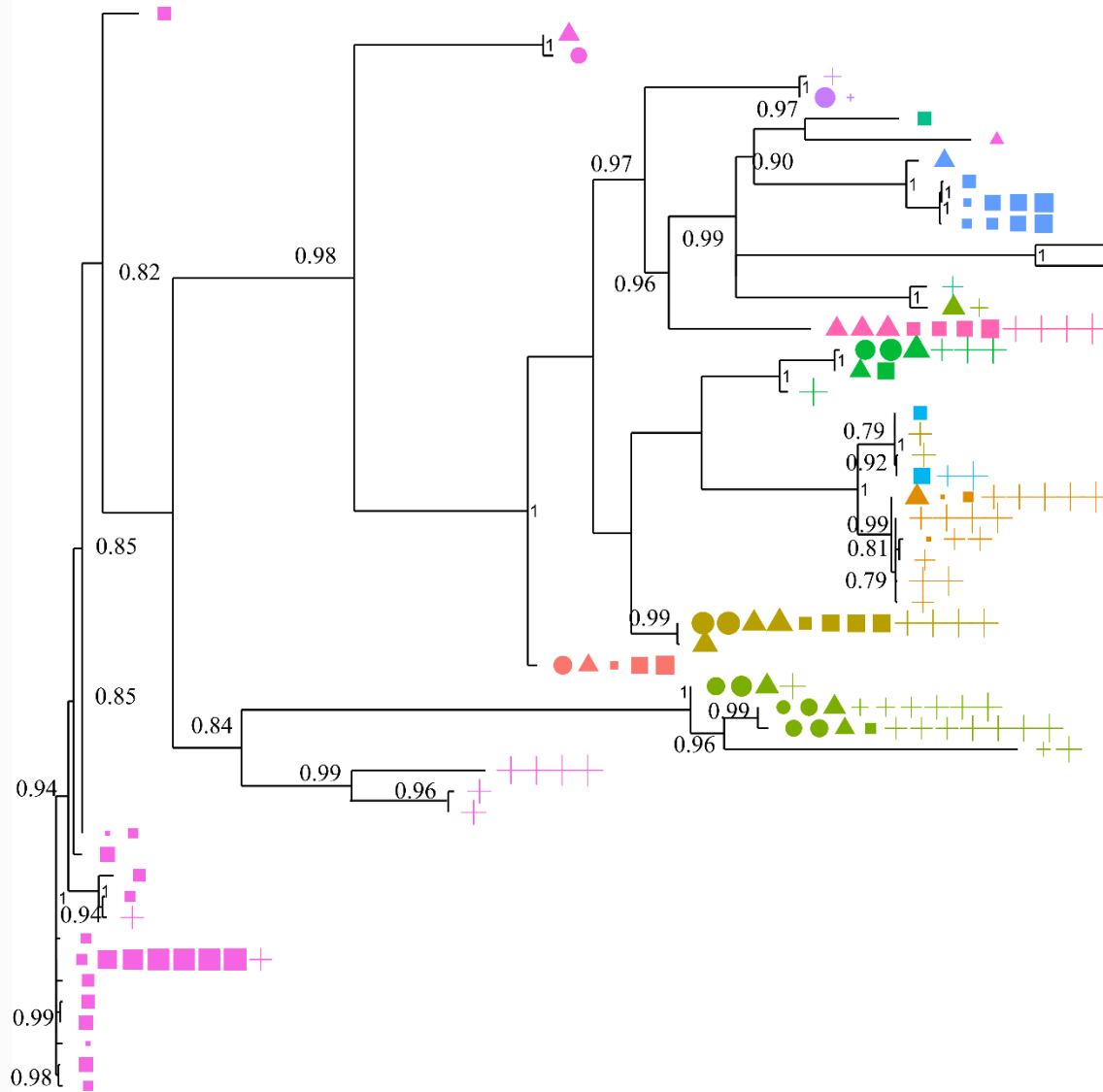
Slika 3.22. Kružni dijagram prikazuje raspodjelu i relativnu brojnost sekvenci roda *Pseudo-nitzschia* temeljeno na *rbcL* markeru. Debljina povezujućih linija odražava udio pojedinih vrsta unutar svakog područja.

3.7.2. ITS1 genski biljeg

Filogenetsko stablo temeljeno na okolišnim uzorcima ITS1 gena prikazuje jasnu filogenetsku strukturu unutar analiziranog skupa podataka (Slika 3.23.). Sekvence se grupiraju u nekoliko jasno odvojenih grupa uključujući *P. delicatissima*, *P. calliantha*, *P. fraudulenta*, *P. galaxiae*, *P. multistriata*, *P. pseudodelicatissima* i druge. Većina unutarnjih čvorova pokazuje visoke vrijednosti potpore, što upućuje na stabilne i pouzdane filogenetske odnose među analiziranim ASV-ovima. Unutar pojedinih vrsta prisutno je više ASV-ova, što ukazuje na unutar-specifičnu genetsku raznolikost ili koegzistenciju više sojeva iste vrste u okolišu. Analiza pokazuje da su mnoge vrste roda *Pseudo-nitzschia* prisutne na više istraživanih područja, ali s izraženim razlikama u abundanciji, što upućuje na prostorne varijacije u strukturi zajednice. Pojedine grupe dominirale su ASV-ovima iz određenih područja, što može odražavati lokalne okolišne uvjete i ekološku prilagodbu populacija. Vrste poput *P. delicatissima* i *P. allochrysa* pokazuju visoku abundanciju i široku prostornu rasprostranjenost, s ASV-ovima prisutnima u svim ili većini istraživanih područja. ASV-ovi s većom abundancijom su u Kaštelanskom i Šibenskom zaljevu, što upućuje na to da ova područja predstavljaju povoljne uvjete za razvoj populacija iz *P. delicatissima* kompleksa. Suprotno tome, neke vrste, poput *P. subfraudulenta* i *P. pseudodelicatissima*, pokazuju ograničeniju prostornu rasprostranjenost i nižu abundanciju ASV-ova. Njihova pojava je češće vezana uz jedno ili dva područja, što može upućivati na užu ekološku nišu ili specifične okolišne zahtjeve. Takav obrazac posebno dolazi do izražaja u Malostonskom zaljevu, gdje se pojedine vrste pojavljuju s umjerenom, ali stabilnom abundancijom. Vrste *P. multistriata* i *P. fraudulenta* formiraju jasno prepoznatljive grupe, ali s izraženim razlikama u abundanciji među područjima. ASV-ovi visoke abundancije češće su zabilježeni u Šibenskom i Kaštelanskom zaljevu, dok su u Velebitskom kanalu prisutni u manjem broju i s nižom relativnom zastupljenošću. Većina grupa ima visoke čvorne potpore, pri čemu su vrijednosti potpore za glavne čvorove uglavnom $\geq 0,96$, a u više slučajeva iznose 0,99 ili 1. To ukazuje na stabilno grupiranje ASV-ova unutar pojedinih vrsta. Grupa *P. delicatissima* obuhvaća najveći broj ASV-ova te pokazuje široku prostornu rasprostranjenost, s prisutnošću u svim istraživanim područjima. ASV-ovi ove vrste prikazani su u širokom rasponu abundancija, uključujući i najviše vrijednosti. Glavni čvor koji povezuje ASV-ove *P. delicatissima* ima visoku čvornu potporu ($\approx 0,99$), dok su unutarnji čvorovi također visoko podržani ($\approx 0,96$ – $0,99$). ASV-ovi pripisani vrsti *P. allochrysa* formiraju jasno izdvojenu grupu s visokom čvornom potporom ($\approx 0,99$). Ova vrsta prisutna je u više područja, a abundancija ASV-ova varira, s većim simbolima zabilježenima u Kaštelanskom i Šibenskom zaljevu. Vrsta *P. fraudulenta* tvori kompaktnu grupu s visokom čvornom potporom ($\approx 0,99$). ASV-ovi ove vrste zabilježeni su u svim područjima, ali s različitim abundancijama, pri čemu su veće abundancije vidljive u Kaštelanskom i Šibenskom zaljevu. ASV-ovi *P. galaxiae* grupiraju se u jasno definiranu grupu s čvornom potporom oko 0,99. Ova vrsta prisutna je u više područja, a abundancija ASV-ova uglavnom je niska. Vrsta *P. calliantha* pokazuje visoku čvornu potporu ($\approx 0,99$) te obuhvaća ASV-ove prisutne u više područja. ASV-ovi vrste *P. multistriata* grupiraju se s visokom čvornom potporom ($\approx 0,99$). Ova vrsta prisutna je u više područja, a abundancija ASV-ova varira, s većim vrijednostima zabilježenima u zaljevima u odnosu na Velebitski kanal. Vrste *P. mannii*, *P. linea* i *P. lundholmiae* formiraju manje grupe s manjim brojem ASV-ova, ali s vrlo visokim čvornim potporama (≈ 1). ASV-ovi ovih vrsta pokazuju ograničeniju prostornu rasprostranjenost i uglavnom niže abundancije.

Grupa *P. pseudodelicatissima* pokazuje jasno grupiranje ASV-ova s čvornim potporama u rasponu od približno 0,97 do 1. Ova vrsta prisutna je u više područja, s umjerenim abundancijama. ASV-ovi *P. subfraudulenta* tvore zasebnu grupu s visokom čvornom potporom ($\approx 0,99$). Ova vrsta prisutna je u manjem broju područja, a abundancija ASV-ova je uglavnom niska.

ASV-ovi označeni kao *P. sp.* ne grupiraju se u jedinstvenu, visoko podržanu grupu, već se nalaze u blizini drugih vrsta, s čvornim potporama pojedinih unutarnjih čvorova nižim u odnosu na ostale grupe ($\approx 0,90$ – $0,96$).



Brojnost

- 5
- 25
- 125
- 625

Područje

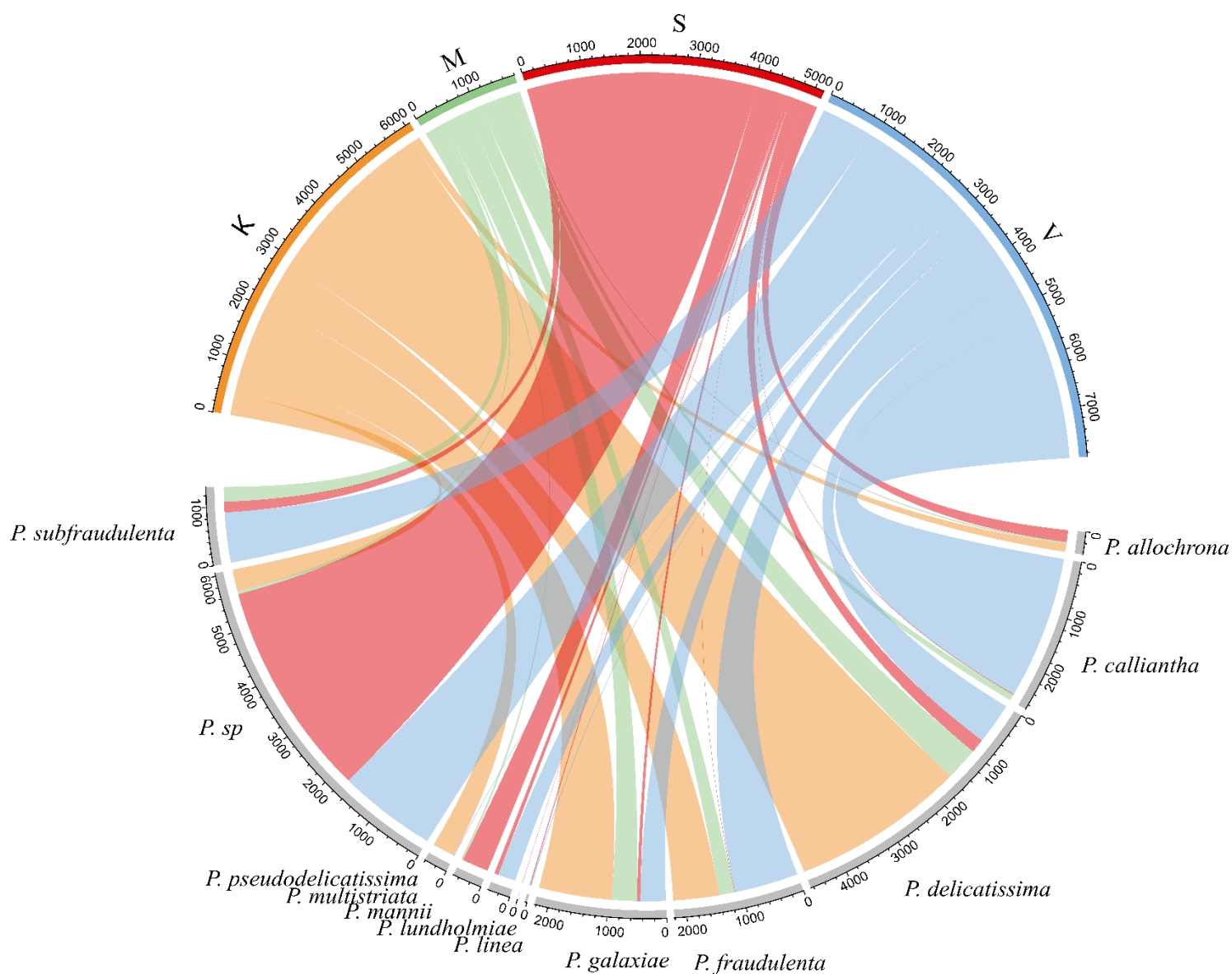
- K-Kaštelanski zaljev
- ▲ M-Malostonski zaljev
- S-Šibenski zaljev
- ✚ V-Velebitski kanal

Vrste

- *P. allochirona*
- *P. calliantha*
- *P. delicatissima*
- *P. fraudulentissima*
- *P. lundholmiae*
- *P. linea*
- *P. galaxiae*
- *P. mannii*
- *P. multistriata*
- *P. pseudodelicatissima*
- *P. sp*
- *P. subfraudulenta*

Slika 3.23. Prikaz raspodjele sekvenci metabarkodiranja okolišnih uzoraka roda *Pseudo-nitzschia* između četiri istraživana područja (Kaštelanski zaljev, Malostonski zaljev, Šibenski zaljev i Velebitski kanal) temeljen na ITS1 markeru. Slika omogućuje usporedbu relativne brojnosti sekvenci pojedinih vrsta među područjima te ukazuje na razlike u zastupljenosti.

Kružni dijagram prikazuje raspodjelu ITS1 sekvenci roda *Pseudo-nitzschia* između četiri istraživana područja. Debljina povezujućih linija između pojedinih područja i vrsta proporcionalna je relativnoj abundanciji pripadajućih ASV-ova, čime je prikazan doprinos pojedine vrste ukupnoj abundanciji u određenom području (Slika 3.24.) Najizraženije povezujuće linije zabilježene su između Velebitskog kanala i Šibenskog zaljeva što odražava najveće vrijednosti relativne abundancije ITS1 sekvenci u tim područjima. Vrsta *P. delicatissima* povezana je s najvećim brojem područja, pri čemu su debljine povezujućih linija prema svim područjima među najvećima u prikazu. Izražene povezujuće linije također su uočene kod vrsta *P. fraudulenta* i *P. galaxiae*, koje pokazuju snažnu povezanost s više područja. *P. allochirona* i *P. calliantha* pokazuju umjerene debljine povezujućih linija prema svim područjima, dok su povezujuće linije kod vrsta *P. multistriata*, *P. mannii*, *P. linea* i *P. lundholmiae* tanje i često ograničene na jedno ili dva područja. Vrsta *P. pseudodelicatissima* pokazuje povezujuće linije srednje debljine prema svim područjima, dok *P. subfraudulenta* ima tanke povezujuće linije, što odražava nižu relativnu abundanciju u ukupnom skupu podataka. Skupina ASV-ova označena kao *P. sp.* pokazuje izrazite povezujuće linije prema svim područjima, osobito prema Šibenskom zaljevu i Velebitskom kanalu, što odražava značajan udio sekvenci koje nisu prepoznate do razine vrste.



Slika 3.24. Kružni dijagram prikazuje raspodjelu i relativnu brojnost sekvenci roda *Pseudonitzschia* temeljeno na ITS1 markeru. Debljina povezujućih linija odražava udio pojedinih vrsta unutar svakog područja.

4. RASPRAVA

4.1. Morfološka i molekularna analiza kultura

U ovom je istraživanju po prvi put na području srednjeg Jadrana primijenjena sveobuhvatna kombinacija morfoloških analiza pretražnim elektronskim mikroskopom te molekularnih metoda, uključujući Sanger sekvenciranje i visoko-protočno sekvenciranje: metabarkodiranje. Takav integrirani pristup pokazao je da se najveća taksonomska preciznost postiže upravo kombiniranjem morfoloških i molekularnih podataka (Orsini i sur., 2004; Lundholm i sur., 2012). Sveobuhvatnom primjenom različitih pristupa omogućena je pouzdana identifikacija taksonomske strukture istraživane zajednice *Pseudo-nitzschia*. Morfološki detalji prikazani SEM-om usklađeni su s molekularnim sekvencama, čime je postignuta razlučivost vrsta koja se u ovom rodu rijetko može postići samo korištenjem jedne metode, zbog učestale pojave kriptičkih i pseudokriptičkih vrsta (Hasle, 1994; Amato i sur., 2007). Integrirana taksonomska slika zajednice, omogućila je interpretaciju obrazaca sezonalnosti i prostorne distribucije te njihovo uspoređivanje s dosadašnjim istraživanjima u Jadranu i širem Mediteranu (Caroppo i sur., 2005; Marić Pfannkuchen i sur., 2011; Godrijan i sur., 2020).

Ovaj se rod već desetljećima bilježi kao redoviti i važni sastavni dio jadranskog fitoplanktona, a njegovo sudjelovanje u sezonskim maksimumima biomase je više puta dokumentirano (Marić Pfannkuchen i sur., 2018). Prvi detaljniji morfološki opisi pripadnika roda u Jadranu omogućeni su sredinom 20. stoljeća razvojem svjetlosne, a zatim i elektronske mikroskopije (Hasle, 1965). Kako su se instrumenti usavršavali, utvrđena je velika raznolikost ovoga roda kao i ovisnost o hidrografskim uvjetima, osobito u obalnim područjima i poluzatvorenim uvalama (Totti i sur., 2000; Cerino i sur., 2005). Sve potvrđene vrste prethodno su već zabilježene u različitim dijelovima Jadranskoga mora (Marić Pfannkuchen, 2013; Turk Dermastia i sur., 2020; Giuliatti i sur., 2021). Primjenom kombiniranih metoda omogućeno je razlučivanje kriptičnih i pseudo-kriptičnih vrsta. Općenito je uočen visok stupanj morfološke i genetske stabilnosti unutar većine vrsta, uz manja odstupanja koja se mogu pripisati utjecaju okolišnih čimbenika poput temperature, saliniteta i dostupnosti nutrijenata (Hansen i sur., 2011; Marchetti i Harrison, 2007), čime je potvrđeno da se populacije srednjeg Jadrana uklapaju u mediteranski i globalni raspon varijabilnosti.

Molekularno određivanje uspostavljenih kultura provedeno je s ciljem izgradnje i obogaćivanja referentne baze podataka sekvenci roda *Pseudo-nitzschia*. Dobivene Sanger sekvence omogućile su preciznije razlučivanje vrsta prilikom analize podataka visoko-protočnog sekvenciranja. U ovom istraživanju uspješno je uspostavljeno 10 vrsta *Pseudo-nitzschia*: *P. allochroa*, *P. calliantha*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta*, *P. galaxiae*, *P. hasleana*, *P. mannii*, *P. multistriata*, *P. pseudodelicatissima* i *P. subfraudulenta*. Time je potvrđeno da su u srednjem Jadranu prisutni oblici raznolikosti unutar roda *Pseudo-nitzschia* - od morfološki jasno prepoznatljivih vrsta do kriptičnih i pseudo-kriptičnih kompleksa za koje je potrebna molekularna potvrda. Vrste *P. subfraudulenta*, *P. fraudulenta* i *P. multistriata* određene su morfološkom analizom (SEM) a potom potvrđene trima genskim biljezima (Arapov i sur., 2020). Vrste *P. hasleana* i *P. galaxiae* potvrđene su

sekvenciranjem *rbcL* gena, nakon što su ranije zabilježene na temelju ITS i LSU genskih biljega (Arapov i sur., 2017, 2020). Sve vrste *Pseudo-nitzschia* utvrđene u ovom istraživanju ranije su već zabilježene i određene u drugim dijelovima Jadranskog mora (Marić Pfannkuchen, 2013; Turk Dermastia i sur., 2020; Giuliatti i sur., 2021).

Analiza kultura metodama morfoloških i molekularnih obilježja pruža vrijedan uvid u raznolikost prirodnih populacija te omogućuje bolju spoznaju o prostornoj i sezonskoj raspodjeli vrsta *Pseudo-nitzschia*. Izolati kultura omogućuje istodobno promatranje morfoloških obilježja dok molekularni podaci daju uvid u genetička obilježja pojedinih vrsta čime se poboljšava razlučivanje kirptičnih i pseudo-kriptičnih vrsta unutar roda *Pseudo-nitzschia*. U okviru ovog istraživanja, vrste *P. calliantha* i *P. mannii* zabilježene su na svim istraživanim područjima, pri čemu je *P. mannii* izolirana i u svim godišnjim dobima (Bonačić i sur., 2025). Uz *P. mannii*, vrste: *P. calliantha*, *P. delicatissima* te *P. pseudodelicatissima* izolirane su tijekom većeg dijela godine. Više vrsta roda *Pseudo-nitzschia* pokazuje eurivalentno ponašanje, budući da se javljaju u širokom rasponu okolišnih uvjeta i tijekom većeg dijela godine, što je ranije dokumentirano u Sredozemlju (Bates i sur., 1998; Spatharis i sur., 2007; Moschandreu i Nikolaidis, 2010; Quijano-Scheggia i sur., 2010) i u Jadranskome moru (Marić Pfannkuchen, 2013; Arapov i sur., 2017, 2020; Turk Dermastia i sur., 2020; Giuliatti i sur., 2021; Bonačić i sur., 2025). Dobiveni rezultati potvrđuju prethodna istraživanja u sjevernom Jadranu, koja pokazuju da je *P. calliantha* prisutna tijekom cijele godine (Turk Dermastia i sur., 2020), dok je *P. mannii* prisutna u svim godišnjim dobima osim ljeti (Giuliatti i sur., 2021). Vrsta *P. fraudulenta* zabilježena je i potvrđena sekvenciranjem isključivo u Kaštelanskom zaljevu tijekom zimskih mjeseci (Bonačić i sur., 2025). Njezina prisutnost na ovom području ranije je dokumentirana temeljem morfoloških karakteristika tijekom zime (Arapov i sur., 2017). U sjevernom Jadranu također je zabilježena i potvrđena pojava vrste *P. fraudulenta* tijekom zimskih mjeseci (Marić Pfannkuchen, 2013; Turk Dermastia i sur., 2020; Giuliatti i sur., 2021). U Jadranskome moru *P. fraudulenta* pokazuje izrazito jesensko–zimski obrazac pojavnosti, pri čemu je u sjevernom Jadranu zabilježena isključivo u veljači (Turk Dermastia i sur., 2020; Giuliatti i sur., 2021), dok je u srednjem Jadranu prisutna u hladnije dijelu godine u Kaštelanskom zaljevu (Arapov i sur., 2017; Bonačić i sur., 2025). Prema našem istraživanju *P. multistriata* pronađena je isključivo u Šibenskom zaljevu, premda je ranijim istraživanjima njezina prisutnost u tom području potvrđena tijekom svih godišnjih doba (Arapov i sur., 2020), u ovom je istraživanju izolirana samo tijekom jeseni i zime (Bonačić i sur., 2025), što je u skladu s opažanjima za sjeverni Jadran (Turk Dermastia i sur., 2020).

Temeljem molekularnih podataka Sanger sekvenciranja, unutar kompleksa *Pseudo-nitzschia delicatissima* razlikovane su dvije pseudo-kriptične vrste: *P. delicatissima* i *P. allochryna*, koje su jasno razaznate u svim analiziranim filogenetskim stablima. Jedina morfološka razlika između spomenutih vrsta odnosila se na broj strija u valvocopuli, pri čemu je kod vrste *P. allochryna* zabilježeno od 43 do 45 strija u 10 µm, dok je kod vrste *P. delicatissima* broj traka iznosio od 48 do 51 striju. Ovi rezultati u skladu su s prethodnim istraživanjima u kojima je *P. allochryna*, ranije određena kao *P. cf. arenysensis* imala od 43 do 46 strija (Arapov i sur., 2020). Shodno tome, Percopo i sur., (2022) navode od 46 do 50 strija u 10 µm u valvocopuli, dok je prema Giuliatti i sur., (2021) opisana *P. cf. arenysensis* sa širim rasponom od 42 do 52 strije. Lundholm i sur., (2002) zabilježili su manji broj strija kod vrste *P. delicatissima* (od 43 do 48 u 10 µm). Tijekom istraživanja uočena

je i različita sezonska distribucija između kriptičnih vrsta: *P. delicatissima* izolirana je tijekom svih godišnjih doba osim ljeta, dok je *P. allochroa* bila prisutna isključivo tijekom ljeta i jeseni. Takva sezonska pojavnost u skladu je s ranijim istraživanjima koja ukazuju na prisutnost *P. allochroa* u Sredozemnom moru tijekom ljeta i jeseni (Arapov i sur., 2020; Giulietti i sur., 2021; Percopo i sur., 2022).

Pseudo-kriptične vrste unutar kompleksa *P. pseudodelicatissima* razlikovane su isključivo na temelju molekularnih podataka, a unutar ovoga istraživanja u kompleksu su zabilježene vrste: *P. calliantha*, *P. mannii*, *P. hasleana* i *P. pseudodelicatissima*. U skladu s istraživanjem Smoldaka Tanković i sur., (2022), native kulture vrste *P. pseudodelicatissima* nisu pokazale nukleotidne razlike u *rbcL* genskoj regiji u usporedbi sa izolatima navedene vrste iz sjevernog Jadrana (GenBank broj: MW271781.1). Iako Lim i sur., (2018) ističu da razdvajanje pseudo-kriptičnih vrsta *P. cuspidata* i *P. pseudodelicatissima* još nije konačno razjašnjeno, u ovom istraživanju filogenetsko stablo temeljeno na *rbcL* biljegu pokazalo je nukleotidne razlike među *P. cuspidata* i *P. pseudodelicatissima*, s usporednom genetskom udaljenošću od 0,0051, što ukazuje na prosječnu razliku od 0.51 % u genetskom materijalu između uspoređenih vrsta. Mala usporedna genska udaljenost (0,0051) ukazuje na blisku srodnost i relativno nedavnu divergenciju vrsta unutar pseudo-kriptičnog kompleksa *P. pseudodelicatissima*. Morfološki, vrste unutar *P. pseudodelicatissima* kompleksa najviše su se razlikovale po broju sektora unutar poroida i broju band strija. Najveći broj sektora unutar poroida zabilježen je u *P. calliantha* (2-11), zatim *P. mannii* (jedan do osam), dok je *P. pseudodelicatissima* imala najmanji broj sektora (1-4). *P. calliantha* i *P. mannii* međusobno su se preklapale u svim ostalim morfološkim značajkama, dok se *P. pseudodelicatissima* izdvajala većim brojem interstrija u 10 µm. U usporedbi s navedenim vrstama, *P. hasleana*, ranije opisana prema Arapov i sur., (2023), pokazivala je nešto manji broj fibula i interstrija, dok se broj sektora nalazio između vrijednosti za *P. calliantha* i *P. mannii*. Vrste *P. pseudodelicatissima*, *P. calliantha* i *P. mannii* odgovarale su svojim izvornim morfološkim opisima (Lundholm i sur., 2003; Amato i sur., 2005).

Filogenetska stabla dobivena Bayesovom inferencijom (BI) temeljem ITS, LSU i *rbcL* biljega pokazala su da su izolati iz ovog istraživanja grupirani u deset dobro potkrijepljenih skupina s posteriornom vjerojatnošću većom od 0,90 (*P. allochroa*, *P. calliantha*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta*, *P. galaxiae*, *P. hasleana*, *P. mannii*, *P. multistriata*, *P. pseudodelicatissima* i *P. subfraudulenta*). Topologija filogenetskih stabala bila je u velikoj mjeri sljediva neovisno o korištenom biljegu, pri čemu je ITS pokazao najveću razinu raznolikosti i varijabilnosti, što je u skladu s nalazima Turk Dermastia i sur., (2020) za ITS2 gensku regiju. Prema Amato i sur., (2005) ITS regija tehnički je problematična zbog višestrukih kopija u genomu koje mogu biti heterogene.

Izrađena filogenetska stabla bila su usporediva s grupama I–IV definiranim od strane Lima i sur., (2018). Grupa I, vidljiva na ITS stablu, uključivala je vrste kompleksa *P. pseudodelicatissima* kao i *P. fukuyoi*, *P. lundholmiae* i *P. plurisecta*. LSU stablo rekonstruiralo je grupu I uz dodatak *P. cuspidata*, ali bez prisutnosti *P. plurisecta*. Stablo *rbcL* gena nije uključivalo navedene vrste zbog nedostatka njihovih sekvenci u NCBI bazi podataka. Grupa III bila je dobro zastupljena u svim filogenetskim stablima te je uključivala *P. mannii*, *P. calliantha* i *P. hasleana*. Grupa IV također je

bila prisutna u svim analiziranim biljezima, uključujući vrste *P. galaxiae*, *P. decipiens*, *P. simulans*, *P. allochroa*, *P. micropora* i *P. delicatissima*. Intraspecijska diferencijacija između izolata *P. galaxiae* izoliranih s različitih područja uočena je u ITS i *rbcL* filogenijama, što je moguće povezano s okolišnim čimbenicima. Slično je u sjevernom Jadranu zabilježeno prema Turka Dermastija i sur., (2020), gdje su genetske varijacije zabilježene čak i među sojevima prikupljenima u istom mrežnom potegu. Središnja struktura ITS stabla obuhvaćala je skupinu *P. seriata*, uključujući vrste *P. pungens*, *P. brasiliiana*, *P. nanaoensis*, *P. americana*, *P. multiseriata*, *P. australis*, *P. seriata* i *P. multistriata*. Sve navedene vrste nemaju središnju poru te su se grupirale zajedno, što je u skladu s rezultatima Lima i sur., (2018). Vrsta *P. simulans* pronađena je unutar *P. delicatissima* kompleksa u ITS i LSU filogenijama iako posjeduje jedan red pora (sinapomorfiju), za razliku od ostalih vrsta iz *P. delicatissima* kompleksa koje imaju dva reda. Taj nalaz također se podudara s rezultatima istraživanja koje su proveli Lim i sur., (2018). Članovi *P. pseudodelicatissima* kompleksa bili su najjasnije razlučeni unutar ITS stabla, što je u skladu s prethodnim istraživanjima (Lim i sur., 2018), a obuhvaćali su sljedeće vrste: *P. cuspidata*, *P. fukuyoi*, *P. pseudodelicatissima*, *P. plurisecta* i *P. lundholmiae*.

4.2. Morfološka analiza okolišnih uzoraka

U uzorcima prikupljenim na sva četiri istraživana područja morfološki su određene: *P. allochroa*, *P. brasiliiana*, *P. calliantha*, *P. delicatissima* kompleks, *P. fraudulenta*, *P. galaxiae*, *P. linea*, *P. lundholmiae*, *P. mannii*, *P. multistriata*, *P. pseudodelicatissima/cuspidata*, *P. subfraudulenta*, *P. spp.*, *P. sp. 1*. Općenito morfometrijska obilježja stanica *Pseudo-nitzschia* - bilo iz uspostavljenih kultura ili iz okolišnih uzoraka – u skladu su sa morfološkim opisima. Populacija *Pseudo-nitzschia* srednjeg Jadrana pokazuje očekivanu razinu morfološke sličnosti u odnosu na globalnu populaciju. Prema Parsons i sur., (2012.) u Nacionalnom parku Sistema Arrecifal Veracruzano u Meksičkom zaljevu određeno je sedam vrsta *Pseudo-nitzschia*. Vrsta *P. brasiliiana* zabilježena u Kaštelanskom i Šibenskom zaljevu pokazuju da se duljina i širina stanica podudara sa morfometrijskim vrijednostima zabilježenima prema Parsons i sur., (2012). Morfometrijska obilježja vrste *P. calliantha* vrlo su slična u odnosu na obilježja populacije prema Parsons i sur., (2012) iako su u okolišnim uzorcima srednjeg Jadrana zabilježene veće duljine i širine stanica. Vrste kompleksa *P. delicatissima* srednjeg Jadrana u odnosu na opisanu populaciju prema Parsons i sur., (2012) pokazuju veću duljinu, širinu i gustoća poroida, što upućuje na prirodnu varijabilnost ovog kriptičnog kompleksa. Usporedba morfometrijskih obilježja srednjo-jadranske populacije *Pseudo-nitzschia* s onom sjeverozapadnog Mediterana (Quijano-Scheggia i sur., 2008) pokazuje visoku podudarnost. Vrste *P. brasiliiana*, *P. callianta*, *P. delicatissima* kompleks i *P. fraudulenta* pokazuju gotovo identične vrijednosti broja strija, fibula te duljina izmjerenih stanica. Odstupanje je zabilježeno za vrstu *P. multistriata* koja u okolišnim uzorcima srednjeg Jadrana pokazuje manji broj zabilježenih strija i veći broj fibula, a što se može odražavati na lokalno specifičan morfotip (Quijano-Scheggia i sur., 2008). Morfometrijska obilježja *P. pseudodelicatissima* i *P. subfraudulentate* *P. multistriata*, *P. lundholmiae* i *P. fraudulenta* iz ovog istraživanja podudaraju se s obilježjima prijašnjeg istraživanja u estuariju rijeke Krke (Arapov i sur., 2016; 2020). Vrsta *P. sp.*, zabilježena tijekom 2017 godine u Kaštelanskom zaljevu (Arapov i sur., 2017) morfološki odgovara

opisu *P. lundholmiae* prema Lim i sur., (2013). Nadalje, vrste kriptičnog *P. delicatissima* kompleksa nije moguće razlikovati isključivo morfološkim značajkama, budući da je širina transapikalne osi jedina dosljedno razlikovna značajka. Širina kompleksa *P. delicatissima* zabilježena u ovom istraživanju (0,89-1,84 μm) u skladu je s zabilježenim morfološkim vrijednostima kompleksa *P. delicatissima* u Jadranskom moru (Marić Pfannkuchen, 2013; Arapov i sur., 2017). Morfološka varijabilnost *Pseudo-nitzschia* kultura ili stanica iz okolišnih uzoraka može biti posljedica utjecaja različitih okolišnih čimbenika. Prema Su i sur., (2018), na morfološke karakteristike iste vrste *Pseudo-nitzschia* mogu utjecati brojni okolišni uvjeti, uključujući temperaturu, salinitet, svjetlo, pH, prisutnost teških metala te druge biotičke čimbenike. Primjerice, kod *P. seriata* povećanje temperature rezultiralo je smanjenjem broja redova poroida (Hansen i sur., 2011). Prema Montagnes i Franklin, (2001) duljina je obrnuto proporcionalna sa temperaturom (duljina se smanjuje povećanjem temperature), dok Marchetti i Harrison, (2007) objavljuju da nedostatak željeza dovodi do smanjena transapikalne osi kod više vrsta *Pseudo-nitzschia*.

Morfološka obilježja vrsta *P. pseudodelicatissima/cuspidata*, *P. subfraudulenta* i *P. fraudulenta* u skladu su s opisima populacija Jadranskog mora i u ostatku svijeta (Ljubešić i sur., 2011; Moschandreou i sur., 2012; Marić Pfannkuchen, 2013; Teng i sur., 2013; Arapov i sur., 2016, 2017; Turk Dermastia i sur., 2020). Vrsta *P. multistriata* zabilježena u ovom istraživanju odstupa od ranije opisanih populacija. Morfološke razlike su prisutne u duljini i širini stanice. Širina je bila od 1,88 do 2,84 μm , a većina drugih autora zabilježila je šire stanice vrste *P. multistriata*, od 2,2 do 4,6 μm (Orsini i sur., 2002; Orlova i sur., 2008; Quijano-Scheggia i sur., 2008; Stonik i sur., 2011; Ajani i sur., 2013; Rivera-Vilarelle i sur., 2013; Turk Dermastia i sur., 2020). Prema morfološkim karakteristikama nije bilo moguće odrediti *P. sp. 1*. Kao i prema Arapov i sur., (2025) stanice su imale specifične strukture poroida s brojnim sitnim sektorima. Pojedini poroidi su bili okrugli, sa četiri do pet poroida u 1 μm . Strije su bile perforirane sa puno nepravilno raspoređenih sektora bez jasno definiranih poroida. Takav tip strija je karakterističan za *P. circumpora* ali prema Arapov i sur., (2025) i prema našim morfometrijskim obilježjima širina je bila manja od prvotno opisane (Lim i sur., 2012), stoga se ove stanice nisu mogle sa sigurnošću odrediti kao *P. circumpora*. Neobična struktura strija i poroida može biti i varijacija vrste *P. calliantha* na okolišne uvjete (Hansen i sur., 2011) kao što je zabilježen manjak redova poroida kod vrste *P. seriata* promjenom temperature. Morfološke karakteristike *P. calliantha* u potpunosti su u skladu s nalazima iz Kaštelanskog zaljeva (Arapov i sur., 2017), kao i drugim opisima duž Jadranske obale (Lundholm i sur., 2003; Caroppo i sur., 2005; Burić i sur., 2008; Ljubešić i sur., 2011; Marić i sur., 2011; Arapov i sur., 2016), diljem Mediterana (Spatharis i sur., 2007; Quijano-Scheggia i sur., 2008; Moschandreou i Nikolaidis, 2010) te u većim morima (Orlova i sur., 2008; Álvarez i sur., 2009; Ajani i sur., 2013; Teng i sur., 2013).

Stanicama unutar kompleksa *P. delicatissima* u ovom su istraživanju zabilježene nešto manje duljine i širine u odnosu na vrijednosti opisane u Arapov i sur., (2017). Najuže stanice kompleksa *P. delicatissima* zabilježene su u Jadranu prema Caroppo i sur., (2005) i Marić Pfannkuchen, (2013), a stanice sa najvećom širinom zabilježene su u istraživanju Quijano-Scheggia i sur., (2010).

Vrste *P. pseudodelicatissima* i *P. cuspidata* pripadaju pseudo-kriptičnom kompleksu *P. pseudodelicatissima* i nije ih moguće odrediti morfološkim obilježjima, stoga pripadaju jednoj

kategoriji: *P. pseudodelicatissima/cuspidata*. Prema Lundholm i sur., (2003) vrsta *P. cuspidata* morfološki se razlikuje se od *P. pseudodelicatissime* oblikom valve. Morfološke karakteristike odgovaraju onima iz prijašnjih istraživanja (Lundholm i sur., 2003; Quijano-Scheggia i sur., 2008; Moschandreou i sur., 2010; Ajani i sur., 2013; Rijal Leblad i sur., 2013). Zabilježena je razlika u duljini stanica. Zabilježena duljina stanica odgovara nalazima iz Kaštelanskog zaljeva prema Arapov i sur., (2017) (162,42 μm). Dosad zabilježene stanice su kraće za *P. pseudodelicatissima* vrstu. Prema Sar i sur., (2002) zabilježena je duljina do 140,00 μm , a prema Bosak i sur., (2010) zabilježena je duljina do 114,1 μm . Za vrstu *P. cuspidata* najveća zabilježena duljina je 72,00 μm prema Lundholm i sur., (2003). Morfometrijska obilježja vrste *P. fraudulenta* se razlikuju u odnosu na Arapov i sur., (2017) duljinom. U navedenom istraživanju stanice su nešto kraće. Morfometrijska obilježja vrste *P. fraudulenta* odgovaraju ostalim opisanim obilježjima vrste u Jadrankom moru (Ljubešić i sur., 2011; Marić Pfannkuchen, 2013) i drugdje (Hasle i sur., 1996; Quijano-Scheggia i sur., 2008; Moschandreou i Nikolaidis, 2010; Stonik i sur., 2011; Ajani i sur., 2013). Zabilježena širina vrste *P. subfraudulenta* manja je u odnosu na širinu prema Arapov i sur., (2016), a ostala morfometrijska obilježja odgovaraju već opisanima (Bosak i sur., 2010; Moschandreou i Nikolaidis, 2010; Arapov i sur., 2017).

4.3. Molekularna analiza okolišnih uzoraka *rbcL* genskim biljegom

Rezultati metabarkodiranja potvrđuju da je *rbcL* genski biljeg prikladan za razlučivanje vrsta unutar roda *Pseudo-nitzschia*, što je u skladu s prethodnim istraživanjima Sredozemlja (Ruggiero i sur., 2015; Turk Dermastia i sur., 2020). Većina analiziranih vrsta (*P. delicatissima*, *P. calliantha*, *P. galaxiae*, *P. multistriata*, *P. hasleana*, *P. mannii*, *P. pseudodelicatissima*, *P. subfraudulenta*, *P. allochroa*) u ovom istraživanju tvori odvojene i uglavnom monofiletske skupine s visokim vrijednostima čvorne potpore, što odgovara filogenetskim obrascima dobivenima *rbcL* analizama (Ruggiero i sur., 2015; Turk Dermastia i sur., 2020; 2023). Unutar pojedinih vrsta uočeno je izraženo unutarnje grananje ASV-ova, osobito kod dominantnih skupina poput *P. galaxiae* i kompleksa *P. delicatissima*, što upućuje na značajnu interspecijsku genetsku raznolikost. Takav obrazac je usporediv s nalazima (Ruggiero i sur., 2015, 2022) te Turk Dermastia i sur., (2020), koji su pokazali da *P. galaxiae* predstavlja kompleks genetski razdvojenih linija koje često odgovaraju različitim morfotipovima i mogu imati različita ekološka i toksična svojstva. Iako ovo istraživanje nije vremenski strukturirano poput navedenih studija, široka prostorna rasprostranjenost *P. galaxiae* u svim istraživanim područjima i prisutnost više ASV-ova unutar iste grupe u skladu su s pretpostavkom o koegzistenciji više genetskih linija unutar istih ekosustava (Ruggiero i sur., 2015; Turk Dermastia i sur., 2020). Važan dio ovog istraživanja odnosi se na ograničenja taksonomske identifikacije temeljene isključivo na BLAST pretraživanju. U više slučajeva BLAST analize dale su gotovo identičan postotak podudarnosti za nekoliko vrsta roda *Pseudo-nitzschia*, što je osobito izraženo kod blisko srodnih taksona unutar kompleksa (*P. delicatissima*, *P. calliantha*, *P. mannii*, *P. americana*, *P. linea*). Slična dvosmislenost BLAST analize opisana je u ranijim istraživanjima, gdje su autori naglasili da automatska klasifikacija može biti nepouzdana u rodovima s kriptičnim vrstama i nepotpunim referentnim bazama podataka (Ruggiero i sur., 2015; Turk Dermastia i sur.,

2020; 2023). U ovom istraživanju takvi su ASV-ovi dodatno uspoređeni s nativnim *rbcL* sekvencama generiranim u sklopu ovoga istraživanja, što je omogućilo preciznije razlučivanje do razine vrste te definiranje prijelaznih skupina (*Pseudo-nitzschia* sp., *Pseudo-nitzschia* sp. (*americana/linea*), *Pseudo-nitzschia* sp. (*mannii/calliantha*)), u skladu s preporukama iz literature o nužnosti korištenja lokalnih referentnih sekvenci.

Skupina *Pseudo-nitzschia* sp. (*americana/linea*), koja u ovom istraživanju tvori zasebnu i vrlo dobro podržanu grupu zabilježenu u Malostonskom i Šibenskom zaljevu, ukazuje na slabu zastupljenost i čestu podcijenjenost vrste *P. linea* u klasičnom monitoringu zbog njezine male veličine i epifitskog načina života (Lundholm i sur., 2002; Ruggiero i sur., 2015; Turk Dermastia i sur., 2020). Niska do umjerena relativna abundancija ove skupine u metabarkodnim podacima dodatno podupire pretpostavku da se radi o taksonima koji su rijetki ili ih nije moguće odrediti optičnim analizama, ali su genetski prisutni u zajednici (Ruggiero i sur., 2015). Izražena dominacija pojedinih vrsta, osobito unutar kompleksa *P. delicatissima*, *P. calliantha* i *P. multistriata*, u skladu je s nalazima koji pokazuju da dominantnije skupine često posjeduju i veću haplotipnu raznolikost te da broj ASV-ova korelira s relativnom abundancijom. Prisutnost više genetskih linija unutar istih vrsta *Pseudo-nitzschia* može se razmatrati i u kontekstu biotičkih interakcija. Eksperimentalna istraživanja pokazala su da su virusi dijatomeja često visoko specifični te da mogu poticati mikrodiverzifikaciju populacija domaćina (Nagasaki i sur., 2004; Carlson i sur., 2016). Iako virusne interakcije nisu analizirane u ovom istraživanju, uočena unutarvrstna raznolikost i stabilna koegzistencija više ASV-ova unutar istih filogenetskih grupa u skladu su s hipotezama o selektivnoj ulozi virusa u oblikovanju populacijske strukture roda *Pseudo-nitzschia* (Carlson i sur., 2016; Ruggiero i sur., 2022). Ovi rezultati dodatno potvrđuju da unatoč visokoj informativnosti *rbcL* markera, pouzdana identifikacija unutar roda *Pseudo-nitzschia* zahtijeva kombinaciju molekularne i morfološke analize.

4.4. Molekularna analiza okolišnih uzoraka ITS1 genskim biljegom

Filogenetska analiza temeljem ITS1 genskog biljega pokazala je jasno razdvajanje većine analiziranih vrsta roda *Pseudo-nitzschia* (uključujući *P. delicatissima*, *P. calliantha*, *P. fraudulenta*, *P. galaxiae*, *P. multistriata* i *P. pseudodelicatissima*), uz visoke vrijednosti čvorne potpore za glavne filogenetske skupine (uglavnom $\geq 0,96$). ITS1 omogućuje visoku taksonomsku rezoluciju na razini vrste u analizama okolišnih uzoraka, što je u skladu s rezultatima istraživanja roda *Pseudo-nitzschia* temeljem ITS genskog biljega (Lim i sur., 2018; Niu i sur., 2022). ITS1 i šira ITS regija pokazuju veću razlučivost u odnosu na često korištene SSU (18S V4/V9) i LSU (28S D1) regije, za koje je više puta potvrđeno da ne mogu pouzdano razlučiti blisko srodne vrste i kompleksne skupine unutar roda *Pseudo-nitzschia* (Malviya i sur., 2016; Nishimura i sur., 2021; Ruggiero i sur., 2015; 2022; Niu i sur., 2022). Unutar većine identificiranih vrsta zabilježena je prisutnost više ASV-ova, što upućuje na izraženu unutar-specifičnu genetsku raznolikost ili istodobnu koegzistenciju više genetskih linija iste vrste u okolišu (Niu i sur., 2022).

Prostorna analiza ITS1 ASV-ova pokazala je da je većina vrsta *Pseudo-nitzschia* prisutna u više istraživanih područja, ali s izraženim razlikama u relativnoj brojnosti. Takva prostorna heterogenost u strukturi zajednice u skladu je s prethodnim istraživanjima koja upućuju da okolišni uvjeti, uključujući temperaturu, hranjive tvari i druge abiotičke čimbenike sudjeluju u oblikovanju *Pseudo-nitzschia* zajednica (Quijano-Scheggia i sur., 2008; Marić i sur., 2011; Niu i sur., 2022). Posebno je izražena dominacija kompleksa *P. delicatissima* te vrste *P. allochryna*, koje pokazuju široku prostornu rasprostranjenost i visoke vrijednosti abundancije (Niu i sur., 2022; Roche i sur., 2022; Sterling i sur., 2022). Suprotno tome, pojedine vrste, poput *P. subfraudulenta* i *P. pseudodelicatissima*, zabilježene su s nižom relativnom brojnošću, što je u skladu s opažanjima da ITS1 metabarkodiranje omogućuje detekciju rijetkih ili povremeno prisutnih rodova (Malviya i sur., 2016; Niu i sur., 2022). Dio ASV-ova označenih kao *P. sp.* nije se grupirao u jedinstvene, visoko podržane skupine, već je pokazivao slabije podržane filogenetske odnose s više vrsta. Takvi ASV-ovi čest su nalaz u ITS istraživanjima i mogu odražavati nedostatak odgovarajućih referentnih sekvenci, prisutnost još neopisanih filotipova ili složene unutar-specifične odnose koji zahtijevaju dodatne kriterije određivanja (Guo i sur., 2015; Niu i sur., 2022). Već ranije je istaknuta potreba za pažljivo generiranim referentnim bazama podataka kako bi se osigurala pouzdana taksonomska interpretacija ITS1 podataka metabarkodiranja (Lim i sur., 2018; Giulietti i sur., 2021; Niu i sur., 2022; Percopo i sur., 2022). Dobiveni rezultati podupiru zaključak da je ciljano ITS1 metabarkodiranje, uz primjenu specifičnih početnica i referentne baze iznimno vrijedan alat za razlučivanje vrsta roda *Pseudo-nitzschia* u okolišnim uzorcima (Niu i sur., 2022; Lundholm i sur., 2023).

4.5. Utjecaj prostorne i sezonske raspodjele

Na globalnoj razini sezonska dinamika roda *Pseudo-nitzschia* snažno povezana s temperaturom i dostupnošću nutrijenata te da se najveća raznolikost često bilježi u prijelaznim razdobljima, dok u toplijem dijelu godine dolazi do smanjenja raznolikosti (Trainer i sur., 2012; Lelong i sur., 2012). Obrasci sezonalnosti opisani su i u sjeverozapadnom Mediteranu, gdje su *P. calliantha*, *P. galaxiae*, *P. linea*, *P. multistriata* te vrste iz kompleksa *P. delicatissima* i *P. pseudodelicatissima* prepoznate kao ključne sastavnice zajednice kroz cijelu godinu, uz jasne sezonske razlike u relativnoj brojnosti (Sarno i sur., 2005; Quijano-Scheggia i sur., 2010). U ovom istraživanju najveća je raznolikost morfotipova utvrđena tijekom jeseni i zime, dok je u proljetnim i ljetnim mjesecima zabilježen manji broj vrsta. Takav obrazac u skladu je s istraživanjima (Bates i sur., 1998; Quijano-Scheggia i sur., 2010; Trainer i sur., 2012).

U Mediteranu je više istraživanja pokazalo da u toplijem dijelu godine dominiraju pseudo-kriptični kompleksi *P. delicatissima* i *P. pseudodelicatissima*, dok je u hladnijem razdoblju zajednica raznolikija (Sarno i sur., 2005; Spatharis i sur., 2007; Quijano-Scheggia i sur., 2010). Rezultati provedenog istraživanja zabilježili su prevladavanje vrste *P. pseudodelicatissima/curvata*, koja čini više od polovice ukupne brojnosti (51,6% u proljeće i 58,9% ljeti), dok kompleks *P. delicatissima* i prateće vrste (*P. mannii*, *P. calliantha*, *P. spp.*) sudjeluju manjim, ali stabilnim

udjelima. Nasuprot tome, jesenski i zimski uzorci odlikuju se većom raznolikošću, pri čemu se uz dominantne komplekse (*P. delicatissima* kompleks, *P. pseudodelicatissima/cuspidata*) pojavljuju i rjeđe vrste kao što su *P. brasiliiana*, *P. fraudulentata*, *P. multistriata* i *P. sp. 1*. U Jadranskom moru ranijim je istraživanjima već utvrđeno da rod *Pseudo-nitzschia* čini stalnu i čestu sastavnicu fitoplanktonske zajednice (Marić Pfannkuchen, 2013; Ninčević-Gladan i sur., 2020; Turk Dermastia i sur., 2020; Giulietti i sur., 2021; Skejić i sur., 2024). U sjevernom Jadranu zabilježeno je da vrste poput *P. calliantha*, *P. mannii*, *P. cf. delicatissima* i *P. cf. pseudodelicatissima* pokazuju eurivalentno ponašanje, budući da se pojavljuju u širokom rasponu okolišnih uvjeta i kroz veći dio godine (Marić Pfannkuchen, 2013; Turk Dermastia i sur., 2020; Giulietti i sur., 2021). Slični obrasci potvrđeni su i u novijim sveobuhvatnim istraživanjima srednjeg i jugoistočnog Jadrana, u kojima su *P. mannii*, *P. calliantha*, *P. delicatissima* kompleks i *P. pseudodelicatissima* utvrđene kao ključne, široko rasprostranjene vrste (Arapov i sur., 2017, 2020; Bonačić i sur., 2025). Rezultati ovog istraživanja nadovezuju se na te nalaze, budući da su upravo *P. pseudodelicatissima/cuspidata*, *P. calliantha*, *P. delicatissima* kompleks, *P. subfraudulenta* i *P. mannii* utvrđene kao vrste koje najviše doprinose sezonskim i prostornim razlikama u sastavu zajednice.

Sezonski faktor objašnjava veći dio promjene u sastavu zajednice ($R^2 \approx 25,8\%$) od prostornog faktora ($R^2 \approx 18,9\%$), što upućuje da sezonska dinamika ima značajniju ulogu u oblikovanju zajednice roda *Pseudo-nitzschia*. Usporedni testovi su pokazali da su najsnažnije razlike između zime i ljeta te između ljeta i jeseni, dok kombinacije sezona: zima–jesen i proljeće–ljetno ne pokazuju značajne razlike. Time su uočene sličnosti jeseni i zimete proljeća i ljeta, ali i jasne granice između hladnijeg i toplijeg dijela godine. SIMPER analiza potvrdila je da sezonske razlike u najvećoj mjeri oblikuju *P. pseudodelicatissima/cuspidata* i kompleks *P. delicatissima*, uz važan doprinos vrsta *P. calliantha* i *P. subfraudulenta*. Ovakvi rezultati podudaraju se s prethodnim istraživanjima u Jadranskom moru, gdje je uočeno da sezonske promjene temperature, stratifikacije vodenog stupca i raspoloživosti nutrijenata utječu na dominaciju pojedinih vrsta *Pseudo-nitzschia* (Marić Pfannkuchen, 2013; Turk Dermastia i sur., 2020; Arapov i sur., 2020).

Prostorni faktor je statistički značajan, a Velebitski kanal odstupa po svojim hidrografskim obilježjima od ostalih istraživanih područja (Kaštelanski, Šibenski i Malostonski zaljev). Specifičnost Velebitskog kanala se preslikava na sastav zajednice fitoplanktona, a time i roda *Pseudo-nitzschia*. Hidrodinamički je otvoren i dubok morski prolaz izložen intenzivnim udarima bure, što rezultira intenzivnim miješanjem i smanjenom stabilnošću vodenog stupca (Orlić i sur., 1994; Bićanić i Hell, 1998). Utjecaj brojnih podmorskih izvora slatke vode (vrulja) dodatno pojačava promjene temperature i saliniteta te doprinosi prostornoj i vremenskoj heterogenosti fizikalno-kemijskih uvjeta (Novosel i sur., 2002). Dominacija vrsta *P. fraudulentata*, *P. multistriata* i *P. sp. 1* u Velebitskom kanalu u ovom istraživanju stoga je u skladu s njihovom ranije zabilježenom pojavnosti u hladnijim i miješanim vodenim masama sjevernog Jadrana (Marić Pfannkuchen, 2013; Turk Dermastia i sur., 2020; Giulietti i sur., 2021).

Kaštelanski, Šibenski i Malostonski zaljev pokazali su međusobno sličniju zajednicu i izraženiju sezonsku stratifikaciju tijekom toplijih mjeseci, što odražava njihovu poluzatvorenu hidrografiju (Ninčević Gladan i sur., 2006; Arapov i sur., 2016, 2017). U takvim je sustavima uobičajena dominacija eurivalentnih i pseudo-kriptičnih kompleksa roda *Pseudo-nitzschia*, osobito *P.*

pseudodelicatissima/cuspidata, *P. calliantha* i kompleksa *P. delicatissima*, što je dosljedno zabilježeno u brojnim mediteranskim lagunama i priobalnim ušćima (Spatharis i sur., 2007; Sarno i sur., 2010; Quijano-Scheggia i sur., 2010). Ovakvi obrasci potvrđeni su i u prethodnim istraživanjima Jadrana, gdje su pseudo-kriptični kompleksi *P. delicatissima* i *P. pseudodelicatissima* te vrste *P. calliantha* i *P. mannii* opisane kao stabilne komponente obalnih područja (Arapov i sur., 2016, 2017, 2020; Bonačić i sur., 2025). Rijetke i prostorno ograničene vrste kao npr.: *P. brasiliiana*, *P. multistriata*, *P. fraudulenta*, *P. sp. 1* utječu na prostornu raznolikost.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih morfoloških i molekularnih analiza uspostavljenih staničnih kultura i okolišnih uzoraka roda *Pseudo-nitzschia*, postavljene su četiri hipoteze na četiri istraživana područja.

Hipoteza 1, prema kojoj nema razlike u prostornoj i sezonskoj raspodjeli vrsta roda *Pseudo-nitzschia* određenih morfološkom analizom, nije potvrđena. Velebitski kanal se dosljedno izdvajao od istraživanih područja te je pokazivao jedinstven taksonomski sastav. Jedino u Velebitskom kanalu zabilježena je vrsta *P. sp. 1*, a uočena je i najveća brojnost vrste *P. linea*, što je povezano sa specifičnim hidrografskim i ekološkim obilježjima ovoga kanala. Morfološka analiza je ukazala na postojanje sezonsko uvjetovanih razlika u zajednici. Najveća raznolikost i brojnost vrsta zabilježene su u jesen i zimu, dok su proljeće i ljeto obilježeni smanjenom raznolikošću i brojnošću vrsta. **Hipoteza 1 se odbacuje.**

Hipoteza 2, prema kojoj nema razlike u prostornoj i sezonskoj raspodjeli vrsta određenih molekularnom analizom okolišnih uzoraka, nije potvrđena. Izdvajanje Velebitskog kanala, potvrđenoje morfološkim i molekularnim metodama. Rezultati metabarkodiranja sa filogenetskim obrascima potvrđuju postojanje sezonske razlučivosti. Molekularne analize ukazuju na veću raznolikost vrsta tijekom jeseni i zime, a na smanjenu raznolikost i dominaciju pseudo-kriptičnih kompleksa tijekom proljeća i ljeta, što je u skladu s morfološkim analizama. **Hipoteza 2 se odbacuje.**

Hipoteza 3, prema kojoj između izolata pojedinih vrsta *Pseudo-nitzschia* nema genetske varijacije bez obzira na područje ili sezonu izolacije, nije potvrđena. Analizom Sanger sekvenci (ITS, LSU i *rbcL*) uočena je interspecifična varijabilnost između sekvenci iste vrste *Pseudo-nitzschia*. Genetske varijacije uočene su među izolatima s iste lokacije i istog razdoblja, primjerice unutar *P. allochroa* i *P. galaxiae*. ITS genski biljeg pokazao je najveći stupanj varijabilnosti, dok je *rbcL* genski biljeg omogućio razlučivanje i unutar pseudo-kriptičnih kompleksa. Usporedne p-udaljenosti ukazuju na jasnu genetsku razdvojenost među vrstama. **Hipoteza 3 se odbacuje.**

Hipoteza 4, prema kojoj nema razlike u sastavu vrsta *Pseudo-nitzschia* određenih metabarkodiranjem ITS1 i *rbcL* regije, nije potvrđena. Utvrđeno je da se sastav vrsta roda *Pseudo-nitzschia* razlikuje ovisno o korištenom genskom biljegu. Genski biljeg ITS1 pokazao je veću taksonomsku rezoluciju, omogućivši veću unutar-specifičnu gensku raznolikost. *RbcL* genski biljeg nije omogućio jasno razdvajanje blisko srodnih vrsta. Stoga se zaključuje da metabarkodiranje ITS1 i *rbcL* regija ne daje jednak sastav vrsta roda *Pseudo-nitzschia*, već da se rezultati dvaju biljega međusobno razlikuju i nadopunjavaju. **Hipoteza 4 se odbacuje.**

U konačnici, sve četiri hipoteze su odbijene na temelju provedenih analiza. Time je potvrđeno da zajednica *Pseudo-nitzschia* u srednjem Jadranu pokazuje taksonomsku i genetsku raznolikost, koja se može jasnije razumjeti sveobuhvatnim morfološko-molekularnim pristupom.

6. LITERATURA

- Alelio, D. D., Ribera D'alcalà, M., Dubroca, L., Sarno, D., Zingone, A. i Montresor, M. (2010). The time for sex: A biennial life cycle in a marine planktonic diatom. <http://www.fao.org/>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. i Lipman, D. J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, 215. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Álvarez, G., Uribe, E., Quijano-Scheggia, S., López-Rivera, A., Mariño, C. i Blanco, J. (2009). Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia australis* and *Pseudo-nitzschia calliantha* isolated from North Chile. *Harmful Algae*, 8(6), 938–945. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.05.005>
- Amato, A., Orsini, L., D'Alelio, D. i Montresor, M. (2005). Life cycle, size reduction patterns, and ultrastructure of the pennate planktonic diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 41(3), 542–556. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2005.00080.x>
- Amato, A., Kooistra, W. H. C. F., Levialdi Giron, J. H., Mann, D. G., Pröschold, T. i Montresor, M. (2007). Reproductive Isolation among Sympatric Cryptic Species in Marine Diatoms. *Protist*, 158(2), 193–207. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2006.10.001>
- Amato, A., Kooistra, W. H. C. F. i Montresor, M. (2019). Cryptic Diversity: a Long-lasting Issue for Diatomologists. *Protist*, 170(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2018.09.005>
- Andersen, R. A. (2005). Algal Culturing Techniques. Elsevier Academic Press, Phycological Society of America.
- Anderson, M. J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, 26(1), 32–46. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x>
- Arapov, J., Ujević, P., Pfannkuchen, D. M., Godrić, J., Bakrač, A., Gladan, Ž. N. i Marasović, I. (2016). Domoic acid in phytoplankton net samples and shellfish from the Krka river estuary in the central Adriatic Sea. *Mediterranean Marine Science*, 17(2), 340–350. <https://doi.org/10.12681/mms.1471>
- Arapov, J., Skejić, S., Bužančić, M., Bakrač, A., Vidjak, O., Bojanić, N., Ujević, I. i Gladan, Ž. N. (2017). Taxonomical diversity of *Pseudo-nitzschia* from the Central Adriatic Sea. *Phycological Research*, 65(4), 280–290. <https://doi.org/10.1111/pre.12184>
- Arapov, J., Bužančić, M., Skejić, S., Mandić, J., Bakrač, A., Straka, M. i Gladan, Ž. N. (2020). Phytoplankton dynamics in the middle Adriatic estuary, with a focus on the potentially toxic genus *Pseudo-nitzschia*. *Journal of Marine Science and Engineering*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/JMSE8080608>
- Arapov, J., Tomašević, T., Bonačić, T., Pejković, M., Bužančić, M., Bušelić, I., Lepen Pleić, I., Casabianca, S., Penna, A., Skejić, S. i Ninčević Gladan, Ž. (2023). A New Insight into the Taxonomy of *Pseudo-nitzschia* Genus from the Adriatic Sea: Description of *P. brasiliensis*, *P. galaxiae*, *P. hasleana*, and *P. linea*. *Journal of Marine Science and Engineering*, 11(7), 1370. <https://doi.org/10.3390/jmse11071370>
- Arapov, J., Bužančić, M., Skejić, S., Mandić, J., Bonačić, T., Tomašević, T. i Ninčević Gladan, Ž. (2025). In situ diversity of the marine diatom genus *Pseudo-nitzschia* based on morphological characterisation. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 323. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2025.109433>
- Artegiani, A., Bregant, D., Paschini, E., Pinardi, N., Raicich, F. i Russo, A. (1996). The Adriatic Sea General Circulation. Part I: Air-Sea Interactions and Water Mass Structure. [https://doi.org/10.1175/1520-0485\(1997\)027<1492:TASGCP>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1175/1520-0485(1997)027<1492:TASGCP>2.0.CO;2)
- Baričević, A., Kogovsek, T., Smoljaka Tanković, M., Grižančić, L., Knjaz, M., Vlasiček, I., Podolsaki, K., Kuzat, N., Pfannkuchen, M. i Marić Pfannkuchen, D. (2024). Coastal Eukaryotic Plankton Diversity of the Southern Adriatic as Revealed by Metabarcoding. *Diversity*, 16(5). <https://doi.org/10.3390/d16050293>
- Basioli Josip. (1984). Ribarstvo na našem južnom primorju. Nakladni Zavod Znanje.
- Bates, S. S., Garrison, D. L. i Horner, R. A. (1998). Bloom Dynamics and Physiology of Domoic-Acid-Producing *Pseudo-nitzschia* Species: Differential accumulation of domoic acid by temperate oysters and mussels. U Anderson, D.M., A.D. Cembella, and G.M. Hallegraeff. U Physiological ecology of harmful algal blooms, 267-292. Springer-Verlag, Heidelberg. <https://www.researchgate.net/publication/237345461>
- Bates, S. S., Hubbard, K. A., Lundholm, N., Montresor, M. i Leaw, C. P. (2018). *Pseudo-nitzschia*, and domoic acid: New research since 2011. *Harmful Algae*, 79 (3–43). <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.06.001>
- Benac, C., Rubinić, J. i Ožanić, N. (2003). The origin and evolution of coastal and submarine springs in Bakar Bay. *Acta Carsologica*, 32(1), 157-171. <https://doi.org/10.3986/ac.v32i1.371>
- Bonacci, O. i Roje-Bonacci, T. (2000). Interpretation of groundwater level monitoring results in karst aquifers: Examples from the Dinaric karst. *Hydrological Processes*, 14(14), 2423–2438. [https://doi.org/10.1002/1099-1085\(20001015\)14:14<2423::AID-HYP104>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1099-1085(20001015)14:14<2423::AID-HYP104>3.0.CO;2-2)
- Bristow, L. A., Mohr, W., Ahmerkamp, S., & Kuypers, M. M. M. (2017). Nutrients that limit growth in the ocean. *Current Biology*, 27(11), R474–R478. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.03.030>
- Bouillon, J., Gravel, C., Pagès, F., Gili, J.-M. i Boero, F. (2006). Hydrozoa: An Introduction to. U Backhuys Publishers BV. <http://www.mnhn.fr/publication/>

- Buchner, D., Macher, T.-H. & Leese, F. (n.d.). APSCALE: advanced pipeline for simple yet comprehensive analyses of DNA meta-barcoding data. *Bioinformatics*, 32 (1-3). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/xxxxx>
- Burić, Z., Viličić, D., Mihalić, K. C., Carić, M., Kralj, K. & Ljubešić, N. (2008). *Pseudo-nitzschia* blooms in the Zrmanja River estuary (eastern Adriatic Sea). *Diatom Research*, 23(1), 51–63. <https://doi.org/10.1080/0269249X.2008.9705736>
- Čalić, M., Carić, M., Kršinić, F., Jasprica, N. & Pećarević, M. (2013). Controlling factors of phytoplankton seasonal succession in oligotrophic Mali Ston Bay (south-eastern Adriatic). *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(9), 7543–7563. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3118-2>
- Carlson, M. C. G., McCary, N. D., Leach, T. S. & Rocap, G. (2016). *Pseudo-nitzschia* challenged with co-occurring viral communities display diverse infection phenotypes. *Frontiers in Microbiology*, 7(527). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00527>
- Caroppo, C., Congestri, R., Bracchini, L. & Albertano, P. (2005). On the presence of *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup et Hasle and *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Cleve) Heiden in the Southern Adriatic Sea (Mediterranean Sea). *Journal of Plankton Research*, 27(8), 763–774. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbi050>
- Casteleyn, G., Adams, N. G., Vanormelingen, P., Debeer, A. E., Sabbe, K. & Vyverman, W. (2009). Natural Hybrids in the Marine Diatom *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae): Genetic and Morphological Evidence. *Protist*, 160(2), 343–354. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2008.11.002>
- Cerino, F., Orsini, L., Sarno, D., Dell'Aversano, C., Tartaglione, L. & Zingone, A. (2005). The alternation of different morphotypes in the seasonal cycle of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia galaxiae*. *Harmful Algae*, 4(1), 33–48. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2003.10.005>
- Chepurnov, V. A., Mann, D. G., Sabbe, K., Vannerum, K., Casteleyn, G., Verleyen, E., Peperzak, L. & Vyverman, W. (2005). Sexual reproduction, mating system, chloroplast dynamics and abrupt cell size reduction in *Pseudo-nitzschia pungens* from the North Sea (Bacillariophyta). *European Journal of Phycology*, 40(4), 379–395. <https://doi.org/10.1080/09670260500254735>
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, G. S., Tartaglione, L., Quilliam, M. A., Tubaro, A. & Poletti, R. (2005). Hydrophilic interaction liquid chromatography/mass spectrometry for determination of domoic acid in Adriatic shellfish. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(14), 2030–2038. <https://doi.org/10.1002/rcm.2021>
- Clarke, K. & Gorley, R. N. (2015). PRIMER v7: User manual/tutorial. PRIMER-E Ltd, Plymouth, Ujedinjeno Kraljevstvo.
- Davidovich, N. A. & Bates, S. S. (1998). Sexual reproduction in the pennate diatoms *Pseudo-nitzschia multiseries* and *P. pseudodelicatissima* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 34(1), 126–137. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1998.340126.x>
- De Luca, K. L., Rullens, P. M. J., Karpinska, M. A., de Vries, S. S., Gacek-Matthews, A., Pongor, L. S., Legube, G., Jachowicz, J. W., Oudelaar, A. M. & Kind, J. (2024). Genome-wide profiling of DNA repair proteins in single cells. *Nature Communications*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-54159-4>
- Dijkman, N. A. & Kromkamp, J. C. (2006). Photosynthesis and carbon fixation in marine diatoms. *Marine Ecology Progress Series*, 321, 85–96. <https://doi.org/10.3354/meps321085>
- Dong, H. C., Lundholm, N. T., Li, A., Wang, C., Hu, Y. & Li, Y. (2020). Occurrence of *Pseudo-nitzschia* species and associated domoic acid production along the Guangdong coast, South China Sea. *Harmful Algae*, 98. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101899>
- Elder, J. F. & Turner, B. J. (1995). The quarterly review of biology, concerted evolution of repetitive DNA sequences in Eukaryotes. *Quarterly Review of Biology*, 70(3). <http://www.journals.uchicago.edu/t-and-c>
- Evans, K. M., Wortley, A. H. & Mann, D. G. (2007). An Assessment of Potential Diatom “Barcode” Genes (cox1, rbcL, 18S and ITS rDNA) and their Effectiveness in Determining Relationships in *Sellaphora* (Bacillariophyta). *Protist*, 158(3), 349–364. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2007.04.001>
- Falkowski, P. G., Barber, R. T., & Smetacek, V. (1998). Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science*, 281(5374), 200–206. <https://doi.org/10.1126/science.281.5374.200>
- Falkowski, P. G. & Raven, J. A. (2007). Aquatic photosynthesis (2. izdanje). Princeton University Press, Princeton, SAD. <https://doi.org/10.1515/9781400849727>
- Ganley, A. R. D. & Kobayashi, T. (2007). Highly efficient concerted evolution in the ribosomal DNA repeats: Total rDNA repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data. *Genome Research*, 17(2), 184–191. <https://doi.org/10.1101/gr.5457707>
- Gelfond, J., Goros, M., Hernandez, B. & Bokov, A. (2018). A System for an Accountable Data Analysis Process in R. *The R Journal*, 10(1). <https://doi.org/https://journal.r-project.org/archive/2018/RJ-2018-001/index.html>
- Giulietti, S., Romagnoli, T., Siracusa, M., Bacchiocchi, S., Totti, C. & Accoroni, S. (2021). Integrative taxonomy of the *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) populations in the NW Adriatic Sea, with a focus on a novel cryptic species in the *P. delicatissima* species complex. *Phycologia*, 60(3), 247–264. <https://doi.org/10.1080/00318884.2021.1899733>

- Godrijan, J., Drapeau, D. i Balch, W. M. (2020). Mixotrophic uptake of organic compounds by coccolithophores. *Limnology and Oceanography*, 65(6), 1410–1421. <https://doi.org/10.1002/lno.11396>
- Grbin, D., Pfannkuchen, M., Babić, M., Mejdandžić, M., Mihanović, H., Marić Pfannkuchen, D., Godrijan, J., Peharec Štefanić, P., Olujić, G. i Ljubešić, Z. (2017). Multigene phylogeny and morphology of a newly isolated strain of *Pseudo-nitzschia mannii* Amato i Montresor (Adriatic Sea). *Diatom Research*, 32(1), 127–131. <https://doi.org/10.1080/0269249X.2017.1284158>
- Grižančić, L., Baričević, A., Tanković, M. S., Vlašičeki, Knjaz, M., Podolšaki, Kogovšek, T., Pfannkuchen, M. A. i Pfannkuchen, D. M. (2023). A metabarcoding based (species) inventory of the northern Adriatic phytoplankton. *Biodiversity Data Journal*, 11. <https://doi.org/10.3897/BDJ.11.E106947>
- Guiry, M. D. (2024). How many species of algae are there? A reprise. Four kingdoms, 14 phyla, 63 classes and still growing. *Journal of Phycology*, 60(2), 214–228. <https://doi.org/10.1111/jpy.13431>
- Hansen, L. R., Soyly, S. i, Kotaki, Y., Moestrup, Ø. i Lundholm, N. (2011). Toxin production and temperature-induced morphological variation of the diatom *Pseudo-nitzschia seriata* from the Arctic. *Harmful Algae*, 10(6), 689–696. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.05.004>
- Hasle, G. R. (1994). *Pseudo-nitzschia* as a genus distinct from *Nitzschia* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 30, (6), 1036–1039. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1994.01036.x>
- Hasle, G. R., Lange, C. B. i Syvertsen, E. E. (1996). A review of *Pseudo-nitzschia*, with special reference to the Skagerrak, North Atlantic, and adjacent waters. *U Helgoländer Meeresunters* 50, 131–17.
- Hasle, G. R. i Fryxell, G. A. (1970). Diatoms: Cleaning and Mounting for Light and Electron Microscopy. *Transactions of the American Microscopical Society*, 89(4). <https://doi.org/https://www.jstor.org/stable/3224555?origin=crossref>
- Hasle, G. R. (2002). Are most of the domoic acid-producing species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* cosmopolites? *Harmful Algae*, 1(2), 137–146. [https://doi.org/10.1016/S1568-9883\(02\)00014-8](https://doi.org/10.1016/S1568-9883(02)00014-8)
- Holtermann, K. E., Bates, S. S., Trainer, V. L., Odell, A. i Armbrust, E. V. (2010). Mass sexual reproduction in the toxigenic diatoms *Pseudo-nitzschia australis* and *P. pungens* (Bacillariophyceae) on the Washington coast, USA. *Journal of Phycology*, 46(1), 41–52. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00792.x>
- Jeffrey, S. W., Mantoura, R. F. C. i Wright, S. W. (1997). Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. UNESCO Publishing, Paris, Francuska. *Bilješka u Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 77(3). <https://doi.org/10.1017/S0025315400036389>
- Jones, H. M., Simpson, G. E., Stickle, A. J. i Mann, D. G. (2005). Life history and systematics of *Petronia* (Bacillariophyta), with special reference to British waters. *European Journal of Phycology*, 40(1), 61–87. <https://doi.org/10.1080/09670260400024675>
- Kaczmarek, J., Martin, J. L., Ehrman, J. M. i LeGresley, M. M. (2007). *Pseudo-nitzschia* species population dynamics in the Quoddy Region, Bay of Fundy. *Harmful Algae*, 6(6), 861–874. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2007.05.001>
- Kaczmarek, J. i Ehrman, J. M. (2015). High colonisation and propagule pressure by ship ballast as a vector for the diatom genus *Pseudo-nitzschia*. *Management of Biological Invasions*, 6(1), 31–43. <https://doi.org/10.3391/mbi.2015.6.1.03>
- Kirk, J. T. O. (2011). Light and photosynthesis in aquatic ecosystems (3. izdanje). Cambridge University Press, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139168212>
- Kvrgić, K., Lešić, T., Džafić, N. i Pleadin, J. (2022). Occurrence and Seasonal Monitoring of Domoic Acid in Three Shellfish Species from the Northern Adriatic Sea. *Toxins*, 14(1). <https://doi.org/10.3390/toxins14010033>
- Legović Tihomir. (1991). Exchange of water in a stratified estuary with an application to Krka (Adriatic Sea). *Marine Chemistry*, 32, 121–135. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-4203\(91\)90032-R](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-4203(91)90032-R)
- Lelong, A. L., Garet, H. É., Soudant, P. i Bates, S. S. (2012). *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: revisiting previous paradigms. *Phycologia*, 51 (2), 168–216. <https://doi.org/10.2216/11-37>
- Lim, H. C. teng, S. T., Leaw, C. P. i Lim, P. T. (2013). Three novel species in the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* complex: *P. batesiana* sp. nov., *P. lundholmiae* sp. nov., and *P. fukuyoi* sp. nov. (Bacillariophyceae) from the Strait of Malacca, Malaysia. *Journal of Phycology*, 49(5), 902–916. <https://doi.org/10.1111/jpy.12101>
- Lim, H. C., Tan, S. N. teng, S. T., Lundholm, N., Orive, E., David, H., Quijano-Scheggia, S., Leong, S. C. Y., Wolf, M., Bates, S. S., Lim, P. T. i Leaw, C. P. (2018). Phylogeny and species delineation in the marine diatom *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyta) using *cox1*, *LSU*, and *ITS2* rRNA genes: A perspective in character evolution. *Journal of Phycology*, 54(2), 234–248. <https://doi.org/10.1111/jpy.12620>
- Ljubenković. (2014). Hydrodynamic modelling of a stratified estuary: Case study of the Jadro River (Croatia). *Journal of Hydrology and Hydromechanics*, 63(1), 29–37. <https://doi.org/10.1515/johh-2015-0001>
- Ljubešić, Z., Bosak, S., Viličić, D., Borojević, K. K., Marić, D., Godrijan, J., Ujević, Peharec, P. i Dakovac, T. (2011). Ecology and taxonomy of potentially toxic *Pseudo-nitzschia* species in Lim Bay (north-eastern Adriatic Sea). *Harmful Algae*, 10(6), 713–722. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.06.002>

- Lundholm, N. i Moestrup, Ø. (2002). The marine diatom *Pseudo-nitzschia galaxiae* sp. nov. (Bacillariophyceae): Morphology and phylogenetic relationships. *Phycologia*, 41(6), 594–605. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-41-6-594.1>
- Lundholm, N., Moestrup, Ø., Hasle, G. R. i Hoef-Emden, K. (2003). A study of the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima/cuspidata* complex (Bacillariophyceae): What is *P. pseudodelicatissima*? *Journal of Phycology*, 39(4), 797–813. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2003.02031.x>
- Lundholm, N., Moestrup, Ø., Hasle, G. R. i Hoef-Emden, K. (2004). A study of the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima/cuspidata* complex. *Phycologia*, 43, (2), 89–109. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-43-2-89.1>
- Lundholm, N., Moestrup, Ø., Kotaki, Y., Hoef-Emden, K., Scholin, C. i Miller, P. (2006). Inter- and intraspecific variation of the *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex (Bacillariophyceae) illustrated by rRNA probes, morphological data and phylogenetic analyses. *Journal of Phycology*, 42(2), 464–481. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00211.x>
- Lundholm, N., Bates, S. S., Baugh, K. A., Bill, B. D., Connell, L. B., Léger, C. i Trainer, V. L. (2012). Cryptic and pseudo-cryptic diversity in diatoms with descriptions of *Pseudo-nitzschia hasleana* sp. nov. and *P. fryxelliana* sp. nov. *Journal of Phycology*, 48(2), 436–454. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01132.x>
- Lundholm, N., Churro, C., Fraga, S., Hoppenrath, M. i wataki, M., Larsen, J., Mertens, K., Moestrup, Ø. i Zingone, A. (2023). Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae. <https://doi.org/10.14284/362>
- Lundholm, N., Christensen, A. L., Olesen, A. K. J., Beszteri, B., Eggers, S. L., Krock, B. i Altenburger, A. (2024). Diversity, toxicity, and distribution of potentially toxic diatoms in Antarctic waters—With description of *Pseudo-nitzschia meridionalis* sp. nov. and *P. glacialis* sp. nov. *Harmful Algae*, 139, 102724. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2024.102724>
- Malviya, S., Scalco, E., Audic, S., Vincent, F., Veluchamy, A., Poulain, J., Wincker, P. iudicone, D., De Vargas, C., Bittner, L., Zingone, A. i Bowler, C. (2016). Insights into global diatom distribution and diversity in the world's oceans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(11), E1516–E1525. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509523113>
- Mann, K. H. i Lazier, J. R. N. (2006). Dynamics of marine ecosystems: Biological-physical interactions in the oceans (3. izdanje). Blackwell Publishing, Oxford, Ujedinjeno Kraljevstvo.
- Marasović I., Gačić M., Kovačević V., Krstulović N., Kušpilić G., Pucher-Petković T., Odžak N. i Šolić M. (1991). Development of the red tide in the Kaštela Bay (Adriatic Sea). *Marine Chemistry* (37), 375–385. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-4203\(91\)90050-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-4203(91)90050-7)
- Marchetti, A. i Harrison, P. J. (2007). Coupled changes in the cell morphology and the elemental (C, N, and Si) composition of the pennate diatom *Pseudo-nitzschia* due to iron deficiency. *Limnology Oceanography*, 52(5), 2270–2284. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-4203\(91\)900897](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-4203(91)900897)
- Marić, D., Ljubešić, Z., Godrijan, J., Viličić, D., Ujević, i Precali, R. (2011). Blooms of the potentially toxic diatom *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup i Hasle in coastal waters of the northern Adriatic Sea (Croatia). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 92(3), 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2011.01.002>
- Marić Pfannkuchen D. (2013). Potencijalno toksične dijatomeje roda *Pseudo-nitzschia* u sjevernom Jadranu: ekološke, taksonomske i molekularne značajke. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zarebu.
- Matek, A., Mucko, M., Casotti, R., Trano, A. C., Achterberg, E. P., Mihanović, H., Čižmek, H., Čolić, B., Cuculić, V., & Ljubešić, Z. (2023). Phytoplankton diversity and co-dependency in a stratified oligotrophic ecosystem in the South Adriatic Sea. *Water*, 15(12), 2299. <https://doi.org/10.3390/w15122299>
- McCarron, P., Emteborg, H., Nulty, C., Rundberget, T., Loader, J. i teipel, K., Miles, C. O., Quilliam, M. A. i Hess, P. (2011). A mussel tissue certified reference material for multiple phycotoxins. Part 1: Design and preparation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400(3), 821–833. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4786-9>
- Montagnes, D. J. S. i Franklin, D. J. (2001). Effect of temperature on diatom volume, growth rate, and carbon and nitrogen content: Reconsidering some paradigms. *Limnology Oceanography*, 46(8). [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-4203\(91\)90050-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-4203(91)90050-7)
- Moschandreou, K. K. i Nikolaidis, G. (2010). The genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in Greek coastal waters. *Botanica Marina*, 53(2), 159–172. <https://doi.org/10.1515/BOT.2010.014>
- Nagasaki, K., Tomaru, Y., Katanozaka, N., Shirai, Y. nishida, K. itakura, S. i Yamaguchi, M. (2004). Isolation and Characterisation of a Novel Single-Stranded RNA Virus Infecting the Bloom-Forming Diatom *Rhizosolenia setigera*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 704–711. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.704-711.2004>
- Nishimura, T., Murray, J. S., Boundy, M. J., Balci, M., Bowers, H. A., Smith, K. F., Harwood, D. T. i Rhodes, L. L. (2021). Update of the planktonic diatom genus *Pseudo-nitzschia* in Aotearoa New Zealand coastal waters: Genetic diversity and toxin production. *Toxins*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/toxins13090637>
- Niu, B. pang, J., Lundholm, N., Liang, C. teng, S. T., Zheng, Q., Guo, X. i Li, Y. (2024). A *Pseudo-nitzschia* metabarcoding approach with a calibrated ITS1 reference sequence database applied in the Taiwan Strait. *Harmful Algae* (133), 102602. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2024.102602>

- Noyer, C., Abot, A., Trouilh, L., Le Berre, V., Dreanno Phytochip, C., Anton Leberre, V. i Dreanno, C. (2015). Phytochip: Development of a DNA-microarray for rapid and accurate identification of *Pseudo-nitzschia* spp. and other harmful algal species. *Journal of Microbiological Methods* (112), 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.03.002>
- Nunn, G. B., Theisen, B. F., Christensen, B. i Arctander, P. (1996). Simplicity-Correlated Size Growth of the Nuclear 28S Ribosomal RNA D3 Expansion Segment in the Crustacean Order Isopoda. *Journal of Molecular Evolution* (42), 211–223. <https://doi.org/10.1007/BF02198847>
- Official Bulletin of Dubrovnik and Metković (1983) No 01-4408/1-82. (2014).
- Orlić, M., Kuzmić, M. i Pasarić, Z. (1994). Response of the Adriatic Sea to the bora and sirocco forcing. *Continental Shelf Research*, 14(1), 91–116. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-4203>
- Orlova, T. Y., Stoniki, V., Aizdaicher, N. A., Bates, S. S., Léger, C. i Fehling, J. (2008). Toxicity, morphology and distribution of *Pseudo-nitzschia calliantha*, *P. multistriata* and *P. multiseriata* (Bacillariophyta) from the northwestern Sea of Japan. *Botanica Marina*, 51(4), 297–306. <https://doi.org/10.1515/BOT.2008.035>
- Orsini, L. (2004). Multiple rDNA ITS-types within the diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae) and their relative abundances across a spring bloom in the Gulf of Naples. *Marine Ecology Progress Series*, 271, 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2011.05>
- Orsini, L., Sarno, D., Procaccini, G., Poletti, R., Dahlmann, J. i Montresor, M. (2002). Toxic *Pseudo-nitzschia multistriata* (Bacillariophyceae) from the Gulf of Naples: Morphology, toxin analysis and phylogenetic relationships with other *Pseudo-nitzschia* species. *European Journal of Phycology*, 37(2), 247–257. <https://doi.org/10.1017/S0967026202003608>
- Pan, Y., Rao, D. V. S. i Mann, K. H. (1996). Acclimation to low light intensity in photosynthesis and growth of *Pseudo-nitzschia multiseriata* Hasle, a neurotoxic diatom. *Journal of Plankton Research* 18(8), 1427–1438. <https://academic.oup.com/plankt/article/18/8/1427/1488355>
- Parsons, T. R., Takahashi, M., & Hargrave, B. (1984). *Biological Oceanographic Processes* (3. izdanje). Pergamon/Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-07690-9>
- Parsons, M. L., Okolodkov, Y. B. i Aké-Castillo, J. A. (2012). Diversity and morphology of the species of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyta) of the National Park Sistema Arrecifal Veracruzano, SW Gulf of Mexico. *Acta Botanica Mexicana* 98, 51–72. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2011.0586478>
- Penna, A., Casabianca, S., Perini, F., Bastianini, M., Riccardi, E., Pigozzi, S. i Scardi, M. (2013). Toxic *Pseudo-nitzschia* spp. in the northwestern Adriatic Sea: Characterisation of species composition by genetic and molecular quantitative analyses. *Journal of Plankton Research*, 35(2), 352–366. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbs093>
- Percopoi., Ruggiero, M. V., Sarno, D., Longobardi, L., Rossi, R., Piredda, R. i Zingone, A. (2022). Phenological segregation suggests speciation by time in the planktonic diatom *Pseudo-nitzschia allochroa* sp. nov. *Ecology and Evolution*, 12(8). <https://doi.org/10.1002/ece3.9155>
- Piredda, R., Claverie, J. M., Decelle, J., de Vargas, C., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Eikrem, W., Forster, D., Kooistra, W. H. C. F., Logares, R., Massana, R., Montresor, M., Not, F., Ogata, H. i Pawłowski, J., Romac, S., Sarno, D., Stoeck, T. i Zingone, A. (2018). Diatom diversity through HTS-metabarcoding in coastal European seas. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36345-9>
- Pistocchi, R., Guerrini, F., Pezzolesi, L., Riccardi, M., Vanucci, S., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Forino, M., Fattorusso, E., Tartaglione, L., Milandri, A., Pompei, M., Cangini, M., Pigozzi, S. i Riccardi, E. (2012). Toxin levels and profiles in microalgae from the North-Western Adriatic Sea - 15 Years of studies on cultured species. *Marine Drugs* 10(1), 140–162. <https://doi.org/10.3390/md10010140>
- Quijano-Scheggia, S., Garcés, E., Sampedro, N., van Lenning, K., Floeva, A. K., Fortuño, J. M. i Camp, J. (2008). Identification and characterisation of the dominant *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) along the NE Spanish coast (Catalonia, NW Mediterranean). *Scientia Marina* 72(2), 343–359. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2011.0586478>
- Quijano-Scheggia, S., Garcés, E., Andree, K. B., de la Iglesia, P., Diogène, J., Fortuño, J. M., & Camp, J. (2010). *Pseudo-nitzschia* species on the Catalan coast: Characterization and contribution to current knowledge of the distribution of the genus in the Mediterranean Sea. *Scientia Marina*, 74(2), 395–410. <https://doi.org/10.3989/scimar.2010.74n2395>
- Reynolds, C. S. (2006). The ecology of phytoplankton. Cambridge University Press, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511542145>
- Rengefors, K. i Legrand, C. (2001). Toxicity in *Peridinium aciculiferum* - an adaptive strategy to outcompete other winter phytoplankton? *Limnology Oceanography* 46(8) <https://doi.org/10.1016/j.ecss.limn.ocean.25>
- Rhodes, L., Selwood, A., McNabb, P., Briggs, L., Adamson, J., Van Ginkel, R. i Laczka, O. (2006). Trace metal effects on the production of biotoxins by microalgae. *African Journal of Marine Science*, 28(2), 393–397. <https://doi.org/10.2989/18142320609504185>
- Rijal Leblad, B., Lundholm, N., Goux, D., Veron, B., Sagou, R., Taleb, H., Nhahla, H. i Er-raïoui, H. (2013). *Pseudo-nitzschia* Peragallo (Bacillariophyceae) diversity and domoic acid accumulation in tuberculate cockles and sweet clams in M'diq Bay, Morocco. *Acta Botanica Croatia*, 72(1), 35–47. <https://doi.org/10.1016/j.next.2013>

- Roche, K. M., Sterling, A. R., Ryneerson, T. A., Bertin, M. J. i Jenkins, B. D. (2022). A Decade of Time Series Sampling Reveals Thermal Variation and Shifts in *Pseudo-nitzschia* Species Composition That Contribute to Harmful Algal Blooms in an Eastern US Estuary. *Frontiers in Marine Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.889840>
- Ronquist, F. teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A. i Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Ruggiero, M. V., Sarno, D., Barra, L., Kooistra, W. H. C. F., Montresor, M. i Zingone, A. (2015). Diversity and temporal pattern of *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) through the molecular lens. *Harmful Algae*, 42(1), 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.12.001>
- Sar, E. A., Ferrario, M. E., Reguera, B., Ferrario, M. E., Sar, E. A. i Sala, S. E. (2002). Chapter 7: potentially toxigenic diatoms of the southern cone of south america. Institut za oceanografiju, Španjolska.
- Sarno, D., Kooistra, W. H. C. F., Medlin, L. K., Percopoi. i Zingone, A. (2005). Diversity in the genus *Skeletonema* (Bacillariophyceae). II. An assessment of the taxonomy of *S. costatum*-like species with the description of four new species. *Journal of Phycology*, 41(1), 151–176. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2005.04067.x>
- Sarno, D., Zingone, A. i Montresor, M. (2010). A massive and simultaneous sex event of two *Pseudo-nitzschia* species. Deep-Sea Research Part II. *Topical Studies in Oceanography*, 57(3–4), 248–255. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2009.09.012>
- Scholin, C. A., Villac, M. C., Buck, K. R., Krupp, J. M., Powers, D. A., Fryxell, G. A. i Chavez, F. P. (1994). Ribosomal DNA Sequences Discriminate Among Toxic and Non-Toxic *Pseudo-nitzschia* Species. *Natural Toxins*, 2, 152–165. <https://doi.org/10.1002/nt.2620020403>
- Sieburth, J. M., Smetacek, V. i Lenz, J. (1978). Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnology and Oceanography*, 23, (6), 1256–1263. <https://doi.org/10.4319/lo.1978.23.6.1256>
- Skejić S, Matijević S, Vilibić I i Jozić S. (2015). Long-term regulating mechanisms of phytoplankton biomass in a traditional shellfish aquaculture area. *Fresenius environmental bulletin*, 24 (9a). <https://www.researchgate.net/publication/281839435>
- Skejić, S., Milić Roje, B., Matic, F., Arapov, J., Francé, J., Bužančić, M., Bakrač, A., Straka, M. i Ninčević Gladan, Ž. (2024). Phytoplankton Assemblage over a 14-Year Period in the Adriatic Sea: Patterns and Trends. *Biology*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/biology13070493>
- Smayda, T. J. (1997). Harmful algal blooms: Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnology and Oceanography*, 42(5 II), 1137–1153. https://doi.org/10.4319/lo.1997.42.5_part_2.1137
- Smoldaka Tanković, M., Baričević, A., Gerić, M., Domijan, A. M., Pfannkuchen, D. M., Kužat, N., Ujević, Kuralić, M., Rožman, M., Matković, K., Novak, M., Žegura, B., Pfannkuchen, M. i Gajski, G. (2022). Characterisation and toxicological activity of three different *Pseudo-nitzschia* species from the northern Adriatic Sea (Croatia). *Environmental Research*, 214. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114108>
- Spatharis, S., Danielidis, D. B. i Tsirtsis, G. (2007). Recurrent *Pseudo-nitzschia calliantha* (Bacillariophyceae) and *Alexandrium insuetum* (Dinophyceae) winter blooms induced by agricultural runoff. *Harmful Algae*, 6(6), 811–822. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2007.04.006>
- Sterling, A. R., Kirk, R. D., Bertin, M. J., Ryneerson, T. A., Borkman, D. G., Caponi, M. C., Carney, J., Hubbard, K. A., King, M. A., Maranda, L., McDermith, E. J., Santos, N. R., Strock, J. P., Tully, E. M., Vaverka, S. B., Wilson, P. D. i Jenkins, B. D. (2022). Emerging harmful algal blooms caused by distinct seasonal assemblages of a toxic diatom. *Limnology and Oceanography*, 67(11), 2341–2359. <https://doi.org/10.1002/lno.12189>
- Stoniki. V., Orlova, T. Y. i Lundholm, N. (2011). Diversity of *Pseudo-nitzschia* H. Peragallo from the western North Pacific. *Diatom Research*, 26(1), 121–134. <https://doi.org/10.1080/0269249X.2011.573706>
- Su, Y., Lundholm, N. i Ellegaard, M. (2018). Effects of abiotic factors on the nanostructure of diatom frustules—ranges and variability. *Microbiology and Biotechnology*, 102(14), 5889–5899. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9087-1>
- Tamura, K., Stecher, G. i Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Teitelbaum J.S. (2025). Neurologic sequelae of fomoic acid intoxication due to the ingestion of contaminated mussels. *The New England Journal of Medicine*, 322 (25), 1781-1787. <https://doi.org/10.1093/sysbio/pyt.2055>
- Teng, S. T., Leaw, C. P., Lim, H. C. i Lim, P. T. (2013). The genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in Malaysia including new records and a key to species inferred from morphology-based phylogeny. *Botanica Marina*, 56(4), 375–398. <https://doi.org/10.1515/bot-2012-0194>
- Thessen, A. E., Bowers, H. A. i Stoecker, D. K. (2009). Intra- and interspecies differences in growth and toxicity of *Pseudo-nitzschia* while using different nitrogen sources. *Harmful Algae*, 8(5), 792–810. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.01.003>
- Thurman, H. V. i Trujillo, A. P. (2014). Essentials of oceanography (11. izdanje). Pearson Education, Harlow, Ujedinjeno Kraljevstvo

- Tomašević, T., Arapov, J., Ujevići., Bonačić, T., Bužančić, M., Bulić, A., Skejić, S., Roje-Busatto, R.i Ninčević Gladan, Ž. (2025). Growth Dynamics and Toxin Production of *Pseudo-nitzschia* Species Isolated from the Central Adriatic Sea. *Toxins*, 17(6). <https://doi.org/10.3390/toxins17060307>
- Trainer, V. L., Bates, S. S., Lundholm, N., Thessen, A. E., Cochlan, W. P., Adams, N. G.i Trick, C. G. (2012). *Pseudo-nitzschia* physiological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health. *Harmful Algae*, 14, 271–300. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.025>
- Tréguer, P., Nelson, D. M., Van Bennekom, A. J., DeMaster, D. J., Leynaert, A., & Quéguiner, B. (1995). The silica balance in the world ocean. *Science*, 268(5209), 375–379. <https://doi.org/10.1126/science.268.5209.375>
- Turk Dermastia, T., Cerino, F., Stanković, D., Francé, J., Ramšak, A., Žnidarič Tušek, M., Beran, A., Natali, V., Cabrini, M.i Mozetič, P. (2020). Ecological time series and integrative taxonomy unveil seasonality and diversity of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia* H. Peragallo in the northern Adriatic Sea. *Harmful Algae*, 93. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101773>
- Turk Dermastia, T., Dall'Ara, S., Dolenc, J.i Mozetič, P. (2022). Toxicity of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae): insights from toxicity tests and genetic screening in the northern Adriatic Sea. *Toxins*, 14(1), 60. <https://doi.org/10.3390/toxins14010060>
- Turk Dermastia, T., Vascottoi., Francé, J., Stanković, D.i Mozetič, P. (2023). Evaluation of the *rbcL* marker for metabarcoding of marine diatoms and inference of population structure of selected genera. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1071379>
- Ujevići.ninčević-Gladan, Ž., Roje, R., Skejić, S., Arapov, J.i Marasovići. (2010). Domoic acid new toxin in the Croatian Adriatic shellfish toxin profile. *Molecules*, 15(10), 6835–6849. <https://doi.org/10.3390/molecules15106835>
- Ujevići., Roje-Busatto, R.i Ezgeta-Balić, D. (2019). Comparison of amnesicparalytic and lipophilic toxins profiles in cockle (*Acanthocardia tuberculata*) and smooth clam (*Callista chione*) from the central Adriatic Sea (Croatia). *Toxicon*, 159, 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.12.008>
- Viličić, D. (1985). An Examination of Cell Volume in Dominant Phytoplankton Species of the Central and Southern Adriatic Sea. Koeltz Scientific Books, Koenigstein, Njemačka. <https://www.researchgate.net/publication/288991606>
- Viličić, D., Kuzmić, M., Bosak, S., Tinašilović, T. T., Hrustić, E., Burić, Z., Viličić, D., Kuzmić, M., Bosak, S., Silović, T., Hrustić, E.i Burić, Z. (2009). Distribution of phytoplankton along the thermohaline gradient in the north-eastern Adriatic channel; winter aspect. *Oceanologia*, 51, (4). <http://www.iopan.gda.pl/oceanologia/496>
- von Dassow, P., Mikhno, M., Percopoi., Orellana, V. R., Aguilera, V., Álvarez, G., Araya, M., Cornejo-Guzmán, S., Llona, T., Mardones, J. I., Norambuena, L., Salas-Rojas, V., Kooistra, W., Montresor, M.i Sarno, D. (2023). Diversity and toxicity of the planktonic diatom genus *Pseudo-nitzschia* from coastal and offshore waters of the Southeast Pacificincluding *Pseudo-nitzschia dampieri* sp. nov. *Harmful Algae*, 130. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2023.102520>
- Zore-Armanda, M., Bone, M., Grbec, B., Morović, M., Ratković, B.i Vučak, Z. (1991). Hydrographic properties of the Adriatic Sea in the period from 1971 through 1983. *Acta Adriatica*, 32, 1–554.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S.i Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A guide to methods and applications*, 38, 315–322. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>
- Wright, J. L. C., Boyd, R. K., W De Freitas, A. S., Falk, M., Foxall, R. A., Jamieson, W. D., Laycock, M. V, Mcculloch, A. W., Mcinnes, A. G., Odense, P.pathak, V. P., Quilliam, M. A., Ragan, M. A., Sim, P. G., Thibault, P., Walter, J. A., Gilgan, M., A Richard, D. J., Dewar, D., Dewar Can Chem, D. J. (1989). Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acidin toxic mussels from eastern Prince Edward Island. *Canadian Journal of Chemistry*, 67(3), 481–490. <https://doi.org/10.1139/v89-075>
- Yang, Z. (1994). Journal of Molecular Evolution Maximum Likelihood Phylogenetic Estimation from DNA Sequences with Variable Rates over Sites: Approximate Methods. *Journal of Molecular Evolution*, 39, 306-314. <https://doi.org/10.1007/BF00160154>

7. PRILOZI

Prilog 1. Na promatranim područjima (Velebitski kanal, Šibenski zaljev, Kaštelanski zaljev i Malostonski zaljev) od veljače 2022. do veljače 2024. mjesečno su prikupljeni uzorci morske vode fitoplanktonskom mrežicom s okom promjera 20 μm . Uzorkovalo se vertikalnim potegom od dubine 5 metara do površine. Istovremeno su na svakoj postaji mjerene vrijednosti temperature i saliniteta sondom YSI Pro 1030 (0, 5, 7 m) koje su prikazane u Prilogu 1.

Temperatura 0m	Temperatura 5m	Salinitet 0m	Salinitet 5m	Područja	Mjesec	Godina
16,6	18	36,6	37,7	Velebitski kanal	11	2022
12,8	15,9	14,1	36	Velebitski kanal	12	2022
15,1	18,1	18,9	36,5	Velebitski kanal	11	2023
11,7	15,2	24,2	36,6	Velebitski kanal	12	2023
27,3	25,5	34	37	Velebitski kanal	7	2022
24,5	25	33,9	37,1	Velebitski kanal	8	2022
22,9	23,6	36,1	36,6	Velebitski kanal	9	2022
18,8	19	33,4	37	Velebitski kanal	10	2022
22,6	21	28,1	35	Velebitski kanal	7	2023
23,1	22,7	34,2	35,7	Velebitski kanal	8	2023
21,8	22,9	36,6	37	Velebitski kanal	9	2023
20,1	20,4	36	36,9	Velebitski kanal	10	2023
14,2	12,6	31,2	36,4	Velebitski kanal	5	2022
20,2	16,8	32,3	36,6	Velebitski kanal	5	2022
14	15	29,1	36,1	Velebitski kanal	5	2023
21,1	17,9	18,2	36,1	Velebitski kanal	6	2023
10,3	11,6	33,9	36	Velebitski kanal	2	2022
9,5	10	37	37,6	Velebitski kanal	3	2022
10,4	11,6	27,4	35,2	Velebitski kanal	4	2022
14,2	15,4	27,7	37,8	Velebitski kanal	1	2023
7,3	13,3	26,1	36,9	Velebitski kanal	2	2023
9,19	13	22,2	37,3	Velebitski kanal	3	2023
11,8	12,4	22,9	36	Velebitski kanal	4	2023
11,8	16	20,1	37	Velebitski kanal	1	2024
15,8	20,9	26,6	38,8	Šibenski zaljev	11	2022
12,1	18,8	4,1	38,7	Šibenski zaljev	12	2022
18,1	21,8	19,8	36,8	Šibenski zaljev	11	2023
10,6	20,1	4,6	36,9	Šibenski zaljev	12	2023
27	23,3	22,4	33,6	Šibenski zaljev	7	2022
24,2	19,4	25,8	38,9	Šibenski zaljev	8	2022
22,4	21,7	28,8	38,7	Šibenski zaljev	9	2022
20,2	21,7	26,9	38,9	Šibenski zaljev	10	2022
25,3	20,4	11,4	37,2	Šibenski zaljev	7	2023
24,6	26,4	16,9	36,7	Šibenski zaljev	8	2023

22,6	23,9	22	37,3	Šibenski zaljev	9	2023
19,8	23,2	17,7	37,3	Šibenski zaljev	10	2023
18,2	15,9	9,2	37,9	Šibenski zaljev	5	2022
21,9	20,5	12,3	37,7	Šibenski zaljev	5	2022
16,4	16,2	7,1	36,6	Šibenski zaljev	5	2023
20,4	19,1	3,6	36,5	Šibenski zaljev	6	2023
8,8	14,6	7,1	38,2	Šibenski zaljev	2	2022
7,7	13,8	15,4	38,3	Šibenski zaljev	3	2022
11,6	13,8	10,7	38	Šibenski zaljev	4	2022
11,9	16,9	2,7	36,9	Šibenski zaljev	1	2023
6,3	15,7	10,1	37,5	Šibenski zaljev	2	2023
9,9	14,6	5,8	36,8	Šibenski zaljev	3	2023
11	14,7	17,3	36,6	Šibenski zaljev	4	2023
11,6	17,1	6,6	36,8	Šibenski zaljev	1	2024
19	19,6	37,1	38	Kaštelanski zaljev	11	2022
12,9	15,9	27,8	36,2	Kaštelanski zaljev	12	2022
19,2	20,5	31,9	37,0	Kaštelanski zaljev	11	2023
14,9	16,9	27,5	36,3	Kaštelanski zaljev	12	2023
27,1	27,1	37,6	37,6	Kaštelanski zaljev	7	2022
24,5	23,2	36,4	38,7	Kaštelanski zaljev	8	2022
23,7	22,9	35	37,6	Kaštelanski zaljev	9	2022
20,2	20,4	36,1	37,5	Kaštelanski zaljev	10	2022
24,2	22,9	34	36,6	Kaštelanski zaljev	7	2023
26,3	26,4	36	37,1	Kaštelanski zaljev	8	2023
24,1	24,5	36	37,3	Kaštelanski zaljev	9	2023
22,6	22,5	37	37,2	Kaštelanski zaljev	10	2023
18,2	16,8	33,5	35,8	Kaštelanski zaljev	5	2022
22,1	20,8	34	36,9	Kaštelanski zaljev	6	2022
16,1	16,8	29,5	36	Kaštelanski zaljev	5	2023
20,1	21,5	29,4	36,6	Kaštelanski zaljev	6	2023
12,3	13	34	36,5	Kaštelanski zaljev	2	2022
11,3	11,5	36	37,1	Kaštelanski zaljev	3	2022
12,6	13,5	33	35,8	Kaštelanski zaljev	4	2022
13,9	14,5	34,8	36,2	Kaštelanski zaljev	1	2023
11,0	11,8	34,5	37	Kaštelanski zaljev	2	2023
13	13,3	31,1	35,8	Kaštelanski zaljev	3	2023
12,9	14	34	36,2	Kaštelanski zaljev	4	2023
14	14,2	33,1	35,9	Kaštelanski zaljev	1	2024
18,7	18,8	38,3	38,3	Malostonski zaljev	11	2022
13,9	17,3	32	37,8	Malostonski zaljev	12	2022
19,1	19,3	36,7	36,8	Malostonski zaljev	11	2023
15,5	16,2	35,5	35,9	Malostonski zaljev	12	2023
28,1	27,6	32,3	33	Malostonski zaljev	7	2022
27,1	26,9	35,4	35,4	Malostonski zaljev	8	2022

24,3	24,4	36,6	36,7	Malostonski zaljev	9	2022
19,4	20	36,6	37,2	Malostonski zaljev	10	2022
25	23,5	31	33,7	Malostonski zaljev	7	2023
24,1	23,4	36,3	36,4	Malostonski zaljev	8	2023
23,1	23,5	35	36,5	Malostonski zaljev	9	2023
21,3	22	35	35,9	Malostonski zaljev	10	2023
17,6	16	34,4	37,9	Malostonski zaljev	5	2022
20,3	17,4	36,3	38,1	Malostonski zaljev	6	2022
17,8	15,4	34,9	36,8	Malostonski zaljev	5	2023
20,6	18,5	30	36,5	Malostonski zaljev	6	2023
9,8	12	35,4	37	Malostonski zaljev	2	2022
10,1	10,4	37,1	37,1	Malostonski zaljev	3	2022
12,3	12,7	35,7	36,7	Malostonski zaljev	4	2022
16,8	16,9	38,4	38,5	Malostonski zaljev	1	2023
10,8	13,4	34,3	36	Malostonski zaljev	2	2023
14	14,5	35,8	36,7	Malostonski zaljev	3	2023
12,8	12,8	35,3	35,2	Malostonski zaljev	4	2023
15,4	16,1	36,3	36,7	Malostonski zaljev	1	2024

Prilog 2. Popis 138 izolata na kojima je provedeno sekvenciranje isključivo jedne genske regijete isti nisu korišteni za daljnje filogenetske analize.

Oznaka kulture	Vrste	Područje izolacije	Godina izolacije	Regija
M327ca	<i>P. calliantha</i>	Malostonski zaljev	2022	ITS
V060ca	<i>P. calliantha</i>	Velebitski kanal	2022	ITS
V256ca	<i>P. calliantha</i>	Velebitski kanal	2022	ITS
M089ca	<i>P. calliantha</i>	Malostonski zaljev	2022	ITS
K162de	<i>P. delicatissima</i>	Kaštelanski zaljev	2022	ITS
K165de	<i>P. delicatissima</i>	Kaštelanski zaljev	2022	ITS
K330de	<i>P. delicatissima</i>	Kaštelanski zaljev	2022	ITS
K344de	<i>P. delicatissima</i>	Kaštelanski zaljev	2022	ITS
K392de	<i>P. delicatissima</i>	Kaštelanski zaljev	2023	ITS
M177de	<i>P. delicatissima</i>	Malostonski zaljev	2022	ITS
M365de	<i>P. delicatissima</i>	Malostonski zaljev	2022	ITS
S353de	<i>P. delicatissima</i>	Šibenski zaljev	2022	ITS
S391de	<i>P. delicatissima</i>	Šibenski zaljev	2023	ITS
M419de	<i>P. delicatissima</i>	Malostonski zaljev	2023	ITS
K106ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	ITS
K108ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	ITS
K112ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	ITS

K117ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	ITS
K133ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	ITS
M093ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	ITS
K158ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	ITS
K160ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	ITS
K161ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	ITS
K163ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	ITS
K164ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	ITS
K180ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	ITS
K181ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	ITS
K182ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	ITS
K270ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	ITS
K324ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	ITS
K337ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	ITS
K398ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2023	ITS
M032ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2021	ITS
M034ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2021	ITS
M076ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	ITS
M086ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	ITS
M090ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	ITS
M147ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	ITS
M148ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	ITS
M149ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	ITS
M151ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	ITS
M152ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	ITS
M154ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	ITS
M166ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	ITS
M167ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	ITS
M168ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	ITS
M172ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	ITS
M176ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	ITS
M186ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	ITS
M187ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	ITS
M188ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	ITS
M189ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	ITS
M190ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	ITS
M191ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	ITS
M192ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	ITS
M193ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	ITS
M236ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	ITS
M276ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	ITS
M277ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	ITS
M279ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	ITS
M325ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	ITS

M402ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2023	ITS
M403ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2023	ITS
S393ma	<i>P. mannii</i>	Šibenski zaljev	2023	ITS
M405ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2023	ITS
M406ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2023	ITS
K407ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2023	ITS
M464ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2024	ITS
S384ca	<i>P. calliantha</i>	Šibenski zaljev	2023	LSU
V244ca	<i>P. calliantha</i>	Velebitski kanal	2022	LSU
V246ca	<i>P. calliantha</i>	Velebitski kanal	2022	LSU
V282ca	<i>P. calliantha</i>	Velebitski kanal	2022	LSU
K081ca	<i>P. calliantha</i>	Kaštelanski zaljev	2022	LSU
K095ca	<i>P. calliantha</i>	Kaštelanski zaljev	2022	LSU
K100ca	<i>P. calliantha</i>	Kaštelanski zaljev	2022	LSU
K104ca	<i>P. calliantha</i>	Kaštelanski zaljev	2022	LSU
K116ca	<i>P. calliantha</i>	Kaštelanski zaljev	2022	LSU
K118ca	<i>P. calliantha</i>	Kaštelanski zaljev	2022	LSU
K124ca	<i>P. calliantha</i>	Kaštelanski zaljev	2022	LSU
K126ca	<i>P. calliantha</i>	Kaštelanski zaljev	2022	LSU
K127ca	<i>P. calliantha</i>	Kaštelanski zaljev	2022	LSU
K152ca	<i>P. calliantha</i>	Kaštelanski zaljev	2022	LSU
V044ca	<i>P. calliantha</i>	Velebitski kanal	2021	LSU
V061ca	<i>P. calliantha</i>	Velebitski kanal	2022	LSU
V065ca	<i>P. calliantha</i>	Velebitski kanal	2022	LSU
V069ca	<i>P. calliantha</i>	Velebitski kanal	2022	LSU
V080ca	<i>P. calliantha</i>	Velebitski kanal	2022	LSU
K433de	<i>P. delicatissima</i>	Kaštelanski zaljev	2023	LSU
M048de	<i>P. delicatissima</i>	Malostonski zaljev	2021	LSU
S259de	<i>P. delicatissima</i>	Šibenski zaljev	2022	LSU
K045de	<i>P. delicatissima</i>	Kaštelanski zaljev	2021	LSU
K046de	<i>P. delicatissima</i>	Kaštelanski zaljev	2021	LSU
K059de	<i>P. delicatissima</i>	Kaštelanski zaljev	2022	LSU
M049de	<i>P. delicatissima</i>	Malostonski zaljev	2021	LSU
M052de	<i>P. delicatissima</i>	Malostonski zaljev	2021	LSU
M053de	<i>P. delicatissima</i>	Malostonski zaljev	2021	LSU
M054de	<i>P. delicatissima</i>	Malostonski zaljev	2021	LSU
M035ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2021	LSU
M039ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2021	LSU
K102ca	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	LSU
K105ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	LSU
K107ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	LSU
K109ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	LSU
K110ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	LSU
K113ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	LSU

K119ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	LSU
K121ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	LSU
K122ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	LSU
K200ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	LSU
K262ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	LSU
K263ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	LSU
K268ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	LSU
K304ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	LSU
K305ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	LSU
K306ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	LSU
K307ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	LSU
K329ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2022	LSU
K426ma	<i>P. mannii</i>	Kaštelanski zaljev	2023	LSU
M047ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2021	LSU
M092ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	LSU
M142ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	LSU
M143ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	LSU
M203ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	LSU
M204ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	LSU
M234ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	LSU
M266ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	LSU
M275ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2022	LSU
M413ma	<i>P. mannii</i>	Malostonski zaljev	2023	LSU
S194ma	<i>P. mannii</i>	Šibenski zaljev	2022	LSU
S293ma	<i>P. mannii</i>	Šibenski zaljev	2022	LSU
S385ma	<i>P. mannii</i>	Šibenski zaljev	2023	LSU
V229ma	<i>P. mannii</i>	Velebitski kanal	2022	LSU
V242ma	<i>P. mannii</i>	Velebitski kanal	2022	LSU
S387mu	<i>P. multistriata</i>	Šibenski zaljev	2023	LSU
V285su	<i>P. subfraudulenta</i>	Velebitski kanal	2022	LSU
K339ps	<i>P. pseudodelicatissima</i>	Kaštelanski zaljev	2022	LSU
V436ca	<i>P. calliantha</i>	Velebitski kanal	2023	<i>rbcL</i>
K460fr	<i>P. fraudulenta</i>	Kaštelanski zaljev	2023	<i>rbcL</i>

Prilog 3. Sekvence vrsta *Pseudo-nitzschia* korištene u filogenetskoj analizi, preuzete iz baze podataka Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (NCBI), prikazane su u Prilogu 3 zajedno s pripadajućim GenBank pristupnim brojevima.

LSU	ITS	<i>rbcL</i>
OM9360071	DQ445651	MZ1518851
AF4167571	DQ9903641	MZ1518841
KX2908701	JN097561	MW2717821

KX2908711	AY2578391	MW2717811
KC0174611	JN0917641	MW2717801
EF5221081	JN0502881	M59080.1
U413901	DQ3292051	LR537041
MW5604971	KR021371	LR5370201
MK6824891	MK981231	LR5370121
MW5604981	MK690961	KU1834941
MW5604991	MW560745	KT8082581
JQ9954181	KIKS353643	KT8082571
GU2540651	MW114840	KP7578631
HQ5964051	MW114839	KP7578611
KM4006171	FJ859051	KP7578601
KP3373561	MG787881	KP7578591
MW5604941	GU254064	KC920826
MW5604951	HM236163	KC8010401
KR0213461	MW560739	KC8010391
KC1475371	KR021316	KC8010371
MN1289531	DQ813834	KC8010361
DQ8138121	MK412845	JN0503051
MW5604881	KC832998	JN0503041
AF4167611	AY257839	JN0503031
AF4176461	KC147521	JN0503021
AF4176471	MW560743	FJ1507651
AY5447911	JN252422	FJ1507631
AY5447921	KC017449	FJ1507621
DQ8138081	KT808254	FJ1507601
DQ8138141	KT808255	FJ1507401
DQ8138161	KP337355	FJ1507381
FJ8590561	MW560741	EF5203371
FJ8590571	ON775458	EF5203331
JN0502981	ON775459	EF4235151
JN0502991	MW560740	EF4235121
KC0174591	KT247435	EF4235091
KF2417161	KT247437	EF4235081
KR0213491	MN634972	EF4235051
KR0213501	MN634973	EF4235041
MK6824971	OQ517862	EF4235031
MK6824991	OQ517860	EF4235021
MK6825001	JN085962	DQ8138251
MK9716841	OQ517917	DQ8138241
MK9716871	MK106649	DQ8138231
MK9812161	MW527380	DQ8138221
MK9812171	FJ859050	DQ8138201
MK9812181	AY257854	DQ8138171
MK9812201	KR021300	
MT1146781	KR021299	
MT1146811	MK1066381	
MW2567081	JN0917561	

MW4495891	KR0213171
MW5241461	AY2578421
MW5241491	LC1949441
MW8983971	FJ2227551
MW8983991	OQ5179021
MW8984001	MW560736
OQ5260561	DQ8138391
OQ5260581	KX2159151
DQ8138131	DQ8138421
MF3747781	KR021301
AF4176511	KR021298
MT6825191	MK729547
KX5729541	MF374773
OR9783811	OQ517846
OQ5179241	DQ062667
JN0503001	OQ5178461
AF4176581	OQ5178481
MZ8389471	OQ5178781
OQ8481001	OQ5179131
MT0236491	OQ5179151
MT0400231	OQ5179461
JN2524311	
MW5604911P	
MW5604921P	
MW5604931P	
ON7755621	
OR6070991	
OR6071001	
AY544792	
AY544787	
AY081136	

Prilog 4. Detaljne informacije o izoliranim kulturama *Pseudo-nitzschia*, uključujući područje izolacije (V: Velebitski kanal, S: Šibenski zaljev, K: Kaštelanski zaljev, M: Malostonski zaljev), godinu izolacije, GenBank pristupne brojeve (LSUiTS i *rbcL*) i pripadajuće oznake kultura.

Oznaka kulture	Područje izolacije	Vrste	Godina izolacije	LSU (GenBank broj)	ITS (GenBank broj)	<i>rbcL</i> (GenBank broj)
S018al	S	<i>P. allochirona</i>	2021	OQ319822	OQ309053	PP213360
S019al	S	<i>P. allochirona</i>	2021	OQ319823	OQ309054	PP213361
S020al	S	<i>P. allochirona</i>	2021	OQ319824	OQ309055	/
S021al	S	<i>P. allochirona</i>	2021	OQ319825	OQ309056	PP213362

S022al	S	<i>P. allochirona</i>	2021	OQ319826	OQ309057	PP213363
S024al	S	<i>P. allochirona</i>	2021	OQ319827	OQ309058	PP213365
S029al	S	<i>P. allochirona</i>	2021	OQ319828	OQ309059	PP213364
S222al	S	<i>P. allochirona</i>	2022	PP216012	PP109422	PP213366
S223al	S	<i>P. allochirona</i>	2022	PP216013	PP109423	PP213367
S280al	S	<i>P. allochirona</i>	2022	PP216014	PP109425	PP213368
K055al	K	<i>P. allochirona</i>	2021	OQ319829	OQ309060	/
K273al	K	<i>P. allochirona</i>	2022	PP215940	PP10944	PQ351355
K341al	K	<i>P. allochirona</i>	2022	PP215950	PP109426	PP213344
M326al	M	<i>P. allochirona</i>	2022	PP215995	PP109424	PP213355
V008ca	V	<i>P. calliantha</i>	2020	OQ309020	OQ309028	PP213375
V013ca	V	<i>P. calliantha</i>	2020	OQ309021	OQ309030	PP213376
V014ca	V	<i>P. calliantha</i>	2020	OQ309018	OQ309031	PP213377
V062ca	V	<i>P. calliantha</i>	2022	OQ309027	OQ309032	/
V068ca	V	<i>P. calliantha</i>	2022	PQ063246	PP109445	/
V070ca	V	<i>P. calliantha</i>	2022	PQ002445	PP109446	PP213385
V071ca	V	<i>P. calliantha</i>	2022	PQ063247	PP109447	/
V072ca	V	<i>P. calliantha</i>	2022	PQ063248	PP109448	/
V077ca	V	<i>P. calliantha</i>	2022	PQ002442	PP109429	PP213386
V079ca	V	<i>P. calliantha</i>	2022	OQ309024	OQ309034	PP213387
V227ca	V	<i>P. calliantha</i>	2022	PQ063249	PP109444	/
V283ca	V	<i>P. calliantha</i>	2022	PQ002443	PP126545	PP213389
V285ca	V	<i>P. calliantha</i>	2022	PP215942	PP109449	PP213369
V299ca	V	<i>P. calliantha</i>	2022	PQ002446	PP109428	PP213354
V437ca	V	<i>P. calliantha</i>	2023	PQ002444	PQ002610	PQ351387
S354ca	S	<i>P. calliantha</i>	2022	PP216025	PP109450	PQ351385
K111ca	K	<i>P. calliantha</i>	2022	PP215933	PP109427	PP213333
K131ca	K	<i>P. calliantha</i>	2022	OQ309019	OQ309036	PP213335
K132ca	K	<i>P. calliantha</i>	2022	OQ309022	OQ309037	PP213336
K135ca	K	<i>P. calliantha</i>	2022	OQ309023	OQ309029	/
K274ca	K	<i>P. calliantha</i>	2022	PP215941	PP126544	PP213339
K367ca	K	<i>P. calliantha</i>	2023	PP215960	PP109430	PP213347
M074ca	M	<i>P. calliantha</i>	2022	OQ309026	OQ309033	PP213391
M091ca	M	<i>P. calliantha</i>	2022	OQ309025	OQ309035	/
V040de	V	<i>P. delicatissima</i>	2021	OQ309087	OQ309038	PP213381
V041de	V	<i>P. delicatissima</i>	2021	OQ309086	OQ309039	PP213382
V042de	V	<i>P. delicatissima</i>	2021	OQ309099	OQ309051	PP213383
V043de	V	<i>P. delicatissima</i>	2021	OQ309085	OQ309052	PP213384
V443de	V	<i>P. delicatissima</i>	2023	PQ063252	/	PQ366021
K057de	K	<i>P. delicatissima</i>	2021	OQ309088	OQ309040	/
K058de	K	<i>P. delicatissima</i>	2021	OQ309098	OQ309042	PP213329
K129de	K	<i>P. delicatissima</i>	2022	OQ309091	OQ309044	PP213330
K134de	K	<i>P. delicatissima</i>	2022	OQ309092	OQ309045	PP213337

K159de	K	<i>P. delicatissima</i>	2022	OQ309096	OQ309049	PQ366017
K368de	K	<i>P. delicatissima</i>	2023	PP215961	PP126525	/
K369de	K	<i>P. delicatissima</i>	2023	PP215962	PP126526	/
K370de	K	<i>P. delicatissima</i>	2023	PP215963	PP126527	/
K371de	K	<i>P. delicatissima</i>	2023	PP215964	PP126528	/
K372de	K	<i>P. delicatissima</i>	2023	PP215965	PP126529	/
K373de	K	<i>P. delicatissima</i>	2023	PP215966	PP126530	/
K374de	K	<i>P. delicatissima</i>	2023	PP215967	PP126531	/
K376de	K	<i>P. delicatissima</i>	2023	PP215968	PP126543	PQ351366
K377de	K	<i>P. delicatissima</i>	2023	PP215969	PP126533	/
K378de	K	<i>P. delicatissima</i>	2023	PP215970	PP126534	/
K379de	K	<i>P. delicatissima</i>	2023	PP215971	PP126535	/
K381de	K	<i>P. delicatissima</i>	2023	PP215972	PP126536	/
K399de	K	<i>P. delicatissima</i>	2023	PP215975	PP126537	/
K408de	K	<i>P. delicatissima</i>	2023	PP215976	PP126538	/
K421de	K	<i>P. delicatissima</i>	2023	PP215978	PP126540	/
K423de	K	<i>P. delicatissima</i>	2023	PP215979	PP126541	/
K424de	K	<i>P. delicatissima</i>	2023	PP215980	PP126542	/
K452de	K	<i>P. delicatissima</i>	2023	PQ002447	PQ002611	PQ351369
K454de	K	<i>P. delicatissima</i>	2023	PQ002448	PQ002612	PQ351370
K459de	K	<i>P. delicatissima</i>	2023	PQ002449	PQ002613	PQ351374
K465de	K	<i>P. delicatissima</i>	2024	PQ002470	PQ002627	PQ351375
K481de	K	<i>P. delicatissima</i>	2024	PQ002462	PQ002624	PQ351376
K484de	K	<i>P. delicatissima</i>	2024	PQ063250	PQ373929	/
K485de	K	<i>P. delicatissima</i>	2024	PQ002463	PQ002625	PQ351377
K486de	K	<i>P. delicatissima</i>	2024	PQ002464	PQ373930	PQ351389
M075de	M	<i>P. delicatissima</i>	2022	OQ309095	OQ309048	PP213349
M085de	M	<i>P. delicatissima</i>	2022	OQ309090	OQ309043	PP213351
M088de	M	<i>P. delicatissima</i>	2022	OQ309097	OQ309050	PQ366018
M138de	M	<i>P. delicatissima</i>	2022	OQ309093	OQ309046	PQ366019
M140de	M	<i>P. delicatissima</i>	2022	OQ309094	OQ309047	/
M144de	M	<i>P. delicatissima</i>	2022	OQ309089	OQ309041	PQ366020
M363de	M	<i>P. delicatissima</i>	2022	PP215996	PP126524	/
M364de	M	<i>P. delicatissima</i>	2022	PP215997	PP109431	PP213356
M375de	M	<i>P. delicatissima</i>	2023	PP215998	PP126532	PQ351378
M415de	M	<i>P. delicatissima</i>	2023	PP216003	PP126539	PQ351379
M461de	M	<i>P. delicatissima</i>	2024	PQ002450	PQ002614	PQ351380
M462de	M	<i>P. delicatissima</i>	2024	PQ063251	PQ373931	/
K450fr	K	<i>P. fraudulenta</i>	2023	PQ002451	PQ002615	PQ351367
K451fr	K	<i>P. fraudulenta</i>	2023	PQ002455	PQ002619	PQ351368
K455fr	K	<i>P. fraudulenta</i>	2023	PQ002452	PQ002616	PQ351371
K456fr	K	<i>P. fraudulenta</i>	2023	PQ002453	PQ002617	PQ351372
K458fr	K	<i>P. fraudulenta</i>	2023	PQ002454	PQ002618	PQ351373
K468fr	K	<i>P. fraudulenta</i>	2024	PQ063253	PQ373932	/

K136ga	K	<i>P. galaxiae</i>	2022	OQ312051	OQ309100	PP213338
M232ga	M	<i>P. galaxiae</i>	2022	OQ983983	OQ983978	PP213353
K056ha	K	<i>P. hasleana</i>	2021	OQ309152	OQ309102	PP213328
K082ha	K	<i>P. hasleana</i>	2022	OQ309153	OQ309099	PP213331
K083ha	K	<i>P. hasleana</i>	2022	OQ309154	OQ309103	PP213327
K101ha	K	<i>P. hasleana</i>	2022	OQ309155	OQ309104	PP213332
K115ha	K	<i>P. hasleana</i>	2022	OQ309156	OQ309105	PP213334
V015ma	V	<i>P. mannii</i>	2020	PQ002456	PP126522	PP213378
V016ma	V	<i>P. mannii</i>	2020	OQ319198	OQ309132	PP213379
V017ma	V	<i>P. mannii</i>	2020	PQ002469	PP109432	PP213380
V063ma	V	<i>P. mannii</i>	2022	OQ319203	OQ309136	/
V078ma	V	<i>P. mannii</i>	2022	OQ319205	OQ309139	PQ366031
V296ma	V	<i>P. mannii</i>	2022	PP216020	PP109485	/
V439ma	V	<i>P. mannii</i>	2022	PQ002460	PQ002622	PQ351388
S155ma	S	<i>P. mannii</i>	2022	OQ319212	OQ309147	PQ366030
S156ma	S	<i>P. mannii</i>	2022	PQ002468	PP109435	PP213357
S157ma	S	<i>P. mannii</i>	2022	OQ319213	OQ309148	PQ351382
S383ma	S	<i>P. mannii</i>	2023	PP215927	PP109467	/
S385ma	S	<i>P. mannii</i>	2023	PP215928	PP109464	PP213374
S393ma	S	<i>P. mannii</i>	2023	PP215973	PP109468	/
K026ma	K	<i>P. mannii</i>	2021	OQ319199	OQ309133	/
K103ma	K	<i>P. mannii</i>	2022	OQ319208	OQ309142	PQ366022
K128ma	K	<i>P. mannii</i>	2022	OQ319209	OQ309143	/
K130ma	K	<i>P. mannii</i>	2022	OQ319210	OQ309144	/
K216ma	K	<i>P. mannii</i>	2022	PP215936	PQ373933	/
K231ma	K	<i>P. mannii</i>	2022	PQ002457	PP109453	PQ366023
K237ma	K	<i>P. mannii</i>	2022	OQ319216	OQ309150	PQ366024
K260ma	K	<i>P. mannii</i>	2022	PP215939	PP109458	/
K321ma	K	<i>P. mannii</i>	2022	PP215944	PP109433	PP213340
K334ma	K	<i>P. mannii</i>	2022	PP215947	PP109460	PP213342
K397ma	K	<i>P. mannii</i>	2023	PP215974	PP109461	/
K410ma	K	<i>P. mannii</i>	2023	PP215977	PP109463	/
K478ma	K	<i>P. mannii</i>	2024	PQ063254	/	PQ366025
M002ma	M	<i>P. mannii</i>	2020	PP215981	PP109466	/
M003ma	M	<i>P. mannii</i>	2020	OQ319196	OQ309130	PP213348
M033ma	M	<i>P. mannii</i>	2021	OQ319200	OQ309137	/
M037ma	M	<i>P. mannii</i>	2021	OQ319201	OQ309134	/
M039ma	M	<i>P. mannii</i>	2021	OQ319202	OQ309135	/
M073ma	M	<i>P. mannii</i>	2022	OQ319204	OQ309138	/
M084ma	M	<i>P. mannii</i>	2022	PP215986	PP109436	PP213350
M094ma	M	<i>P. mannii</i>	2022	PQ002466	PP109434	PP213352
M141ma	M	<i>P. mannii</i>	2022	OQ319214	OQ309145	/
M150ma	M	<i>P. mannii</i>	2022	OQ319211	OQ309146	/
M153ma	M	<i>P. mannii</i>	2022	/	PQ373934	PQ366026

M205ma	M	<i>P. mannii</i>	2022	PP215988	PP109451	/
M208ma	M	<i>P. mannii</i>	2022	PP215989	PP109452	/
M219ma	M	<i>P. mannii</i>	2022	PQ002467	/	PQ366027
M233ma	M	<i>P. mannii</i>	2022	PP215991	PP109454	PQ366028
M239ma	M	<i>P. mannii</i>	2022	OQ319217	OQ309151	/
M240ma	M	<i>P. mannii</i>	2022	PP215993	PP109456	PQ366029
M241ma	M	<i>P. mannii</i>	2022	PP215994	PP109457	/
M380ma	M	<i>P. mannii</i>	2023	PP215999	PP109459	/
M400ma	M	<i>P. mannii</i>	2023	PP216000	PP109465	/
M401ma	M	<i>P. mannii</i>	2023	PP216001	PP109480	/
M404ma	M	<i>P. mannii</i>	2023	PP216002	PP109462	/
M435ma	M	<i>P. mannii</i>	2023	PP216004	PP109481	/
M463ma	M	<i>P. mannii</i>	2024	PQ002461	PQ002623	PQ351381
S004mu	S	<i>P. multistriata</i>	2020	OQ319167	OQ309016	PP213358
S005mu	S	<i>P. multistriata</i>	2020	OQ319168	OQ309017	PP213359
S290mu	S	<i>P. multistriata</i>	2022	PP216017	PP109438	PP213370
S294mu	S	<i>P. multistriata</i>	2022	PP216019	PP109469	/
S300mu	S	<i>P. multistriata</i>	2022	PP216022	PP126547	PP213372
S302mu	S	<i>P. multistriata</i>	2023	PP216023	PP109437	PP213373
S442mu	S	<i>P. multistriata</i>	2023	PQ002458	PQ002620	PQ351386
K028ps	K	<i>P. pseudodelicatissima</i>	2021	OQ318554	OQ318552	/
K319ps	K	<i>P. pseudodelicatissima</i>	2022	PP215943	PQ002621	PQ351356
K328ps	K	<i>P. pseudodelicatissima</i>	2022	PP216024	PP109439	PQ351357
K333ps	K	<i>P. pseudodelicatissima</i>	2022	PQ002465	PQ002626	PQ351358
K336ps	K	<i>P. pseudodelicatissima</i>	2022	PP215948	PP109440	PP213343
K339ps	K	<i>P. pseudodelicatissima</i>	2022	PQ063255	/	PQ366034
K340ps	K	<i>P. pseudodelicatissima</i>	2022	PP215949	PP109470	/
K349ps	K	<i>P. pseudodelicatissima</i>	2022	PP215951	PP109441	PP213345
K350ps	K	<i>P. pseudodelicatissima</i>	2022	PP215952	PP109442	PP213346
K351ps	K	<i>P. pseudodelicatissima</i>	2022	PP215953	PP109477	PQ351359
K352ps	K	<i>P. pseudodelicatissima</i>	2022	PP215954	PP109471	PQ351360
K356ps	K	<i>P. pseudodelicatissima</i>	2022	PP215955	PP109472	PQ351361
K357ps	K	<i>P. pseudodelicatissima</i>	2022	PP215956	PP109473	PQ351362
K358ps	K	<i>P. pseudodelicatissima</i>	2022	PP215957	PP109474	PQ351363
K359ps	K	<i>P. pseudodelicatissima</i>	2022	PP215958	PP109475	PQ351364
K366ps	K	<i>P. pseudodelicatissima</i>	2023	PP215959	PP109476	PQ351365
V253su	V	<i>P. subfraudulenta</i>	2022	PQ063257	/	PQ366033
V284su	V	<i>P. subfraudulenta</i>	2022	PQ002459	PP126523	PP213390
S287su	S	<i>P. subfraudulenta</i>	2022	PP216015	PP109482	PQ351383
S288su	S	<i>P. subfraudulenta</i>	2022	PP216016	PP109483	PQ351384
S291su	S	<i>P. subfraudulenta</i>	2022	PP216018	PP109484	/
S297su	S	<i>P. subfraudulenta</i>	2022	PP216021	PP126546	PP213371

Prilog 5. U Prilogu 5 prikazani su GenBank pristupni brojevi, uz pripadajuće vrste i autore sekvenci *Pseudo-nitzschia* korištenih u izradi filogenetskih stabala ITS genske regije.

GenBank broj ITS	Vrsta	Autor
DQ445651.1	<i>P. multiseriis</i>	Thessen A.E.
DQ990364.1	<i>P. fraudulenta</i>	Elandaloussi L.
JN091764.1	<i>P. turgidula</i>	Boardman C.L.
AY257839.1	<i>P. turgiduloides</i>	Lundholm N.
JN091764.1	<i>P. turgidula</i>	Boardman C.L.
JN050288.1	<i>P. fryxelliana</i>	Lundholm N.
DQ329205.1	<i>P. subcurvata</i>	Lundholm N.
KR021317.1	<i>P. fukuyoi</i>	Teng S.T.
MK981231.1	<i>P. galaxiae</i>	Turk Dermastia T.
MK69096.1	<i>P. galaxiae</i>	Turk Dermastia T.
MW560745.1	<i>P. pungens</i>	Giulietti S.
KX353643.1	<i>Nitzschia navis-varingica</i>	Tan S.N.
MW114840.1	<i>P. pungens</i>	Accoroni S.
MW114839.1	<i>P. pungens</i>	Accoroni S.
FJ859051.1	<i>P. pseudelicatissima</i>	Moshandreu K.
MG787881.1	<i>P. nanaoensis</i>	Li Y.
GU254064.1	<i>P. brasiliana</i>	Wang P.
HM236163.1	<i>P. brasiliana</i>	Wang P.
MW560739.1	<i>P. sp.</i>	Giulietti S.
KR021316.1	<i>P. lundholmia</i>	Teng S.T.
DQ813834.1	<i>P. caciantha</i>	Amato A.
MK412845.1	<i>P. qiana</i>	Huang C.X.
KC832998.1	<i>Fragilariopsis kerguelensis</i>	Fuchs N.
AY257839.1	<i>P. turgiduloides</i>	Lunc
KC147521.1	<i>P. fukuyoi</i>	Lim H.C.
MW560743.1	<i>P. delicatissima</i>	Giulietti S.
JN252422.1	<i>P. micropora</i>	Lim H.C.
KC017449.1	<i>P. micropora</i>	Ajani P.
KT808254.1	<i>P. arctica</i>	Percopo I.
KT808255.1	<i>P. arctica</i>	Percopo I.
KP337355.1	<i>P. decipiens</i>	Teng S.T.
MW560741.1	<i>P. sp</i>	Giulietti S.
ON775458.1	<i>P. allochroa</i>	Percopo I.
ON775459.1	<i>P. allochroa</i>	Percopo I.
MW560740.1	<i>P. sp</i>	Giulietti S.
KT247435.1	<i>P. calliantha</i>	Stonik I.V.
KT247437.1	<i>P. calliantha</i>	Stonik I.V.
MN634972.1	<i>P. delicatissima</i>	Turk Dermastia T.
MN634973.1	<i>P. delicatissima</i>	Turk Dermastia T.

OQ517862.1	<i>P. fraudulenta</i>	von Dassow P.
OQ517860.1	<i>P. fraudulenta</i>	von Dassow P.
JN085962.1	<i>P. hasleana</i>	Lundholm N.
OQ517917.1	<i>P. hasleana</i>	von Dassow P.
MK106649.1	<i>P. mannii</i>	Turk Dermastia T.
MW527380.1	<i>P. mannii</i>	Turk Dermastia T.
FJ859050.1	<i>P. pseudelicatissima</i>	Moshandreou K.
AY257854.1	<i>P. pseudelicatissima</i>	Lundholm N.
KR021300.1	<i>P. subfraudulenta</i>	Teng S.T.
KR021299.1	<i>P. subfraudulenta</i>	Teng S.T.
MK106638.1	<i>P. multistriata</i>	Turk Dermastia T.
JN091756.1	<i>P. lineola</i>	Boardman C.L.
KR021317.1	<i>P. fukuyoi</i>	Teng S.T.
AY257842.1	<i>P. australis</i>	Lundholm N.
LC194944.1	<i>P. americana</i>	Kim J.H.
FJ222755.1	<i>P. fraudulenta</i>	Boardman C.L.
OQ517902.1	<i>P. fraudulenta</i>	von Dassow P.
MW560736.1	<i>P. mannii</i>	Giulietti S.
DQ813839.1	<i>P. mannii</i>	Amato A.
KX215915.1	<i>P. mannii</i>	Grbin D.
DQ813842.1	<i>P. mannii</i>	Amato A.
KR02130.1	<i>P. subfraudulenta</i>	Teng S.T.
KR021298.1	<i>P. subfraudulenta</i>	Teng S.T.
MK729547.1	<i>P. plurisecta</i>	Caruana A.M.
MF374773.1	<i>P. simulans</i>	Li Y.
OQ517846.1	<i>P. sp.</i>	von Dassow P.
DQ062667.1	<i>P. seriata f. obtusa</i>	Lundholm N.
OQ517846.1	<i>P. sp.</i>	von Dassow P.
OQ517848.1	<i>P. sp.</i>	von Dassow P.
OQ517878.1	<i>P. sp.</i>	von Dassow P.
OQ517913.1	<i>P. hasleana</i>	von Dassow P.
OQ517915.1	<i>P. sp.</i>	von Dassow P.
OQ517946.1	<i>P. hasleana</i>	von Dassow P.

Prilog 6. U Prilogu 6 prikazani su GenBank pristupni brojevi, uz pripadajuće vrste i autore sekvenci *Pseudo-nitzschia* korištenih u izradi filogenetskih stabala LSU genske regije.

GenBank broj LSU	Vrsta	Autor
AF416757.1	<i>P. multistriata</i>	Orsini L.
AF416761.1	<i>P. subfraudulenta</i>	Orsini L.
AF417646.1	<i>P. subfraudulenta</i>	Orsini L.
AF417647.1	<i>P. fraudulenta</i>	Lundholm N.
AF417651.1	<i>P. australis</i>	Lundholm N.
AF417658.1	<i>Fragilariopsis kerguelensis</i>	Lundholm N.
AY081136.1	<i>P. galaxiae</i>	Lundholm N.
AY544787.1	<i>P. galaxiae</i>	Cerino F.
AY544791.1	<i>P. galaxiae</i>	Cerino F.
AY544792.1	<i>P. galaxiae</i>	Cerino F.
AY5447921.1	<i>P. galaxiae</i>	Cerino F.
DQ813808.1	<i>P. pseudodelicatissima</i>	Amato A.
DQ813812.1	<i>P. caciantha</i>	Amato A.
DQ813813.1	<i>P. dolorosa</i>	Amato A.
DQ813814.1	<i>P. mannii</i>	Amato A.
DQ813816.1	<i>P. mannii</i>	Amato A.
EF522108.1	<i>P. americana</i>	Marangoni C.
FJ859056.1	<i>P. pseudodelicatissima</i>	Moschandreu K.K.
FJ859057.1	<i>P. pseudodelicatissima</i>	Moschandreu K.K.
GU254065.1	<i>P. brasiliiana</i>	Wang P.
HQ596405.1	<i>P. brasiliiana</i>	Wang P.
JN050298.1	<i>P. hasleana</i>	Lundholm N.
JN050299.1	<i>P. hasleana</i>	Lundholm N.
JN050300.1	<i>P. lineola</i>	Lundholm N.
JN252431.1	<i>P. circumpora</i>	Lim H.C.
JQ995418.1	<i>P. arctica</i>	Balzano S.
KC017459.1	<i>P. multistriata</i>	Ajani P.
KC017461.1	<i>P. americana</i>	Ajani P.
KC147537.1	<i>P. fukuyoi</i>	Ajani P.
KF241716.1	<i>P. pseudodelicatissima</i>	Barra L.
KM400617.1	<i>P. sabit</i>	Teng S.T.
KP337356.1	<i>P. decipiens</i>	Teng S.T.
KR021346.1	<i>P. lundholmiae</i>	Teng S.T.
KR021349.1	<i>P. subfraudulenta</i>	Teng S.T.
KR021350.1	<i>P. subfraudulenta</i>	Teng S.T.
KX290870.1	<i>P. australis</i>	Bowers H.A.
KX290871.1	<i>P. australis</i>	Bowers H.A.
KX572954.1	<i>P. batesiana</i>	Lim H.C.

MF374778.1	<i>P simulans</i>	Li Y.
MK682489.1	<i>P. pungens</i>	Turk Dermastia T.
MK682497.1	<i>P multistriata</i>	Turk Dermastia T.
MK682499.1	<i>P. galaxiae</i>	Turk Dermastia T.
MK682500.1	<i>P. galaxiae</i>	Turk Dermastia T.
MK971684.1	<i>P. subfraudulenta</i>	Turk Dermastia T.
MK971687.1	<i>P. subfraudulenta</i>	Turk Dermastia T.
MK981216.1	<i>P calliantha</i>	Turk Dermastia T.
MK981217.1	<i>P. mannii</i>	Turk Dermastia T.
MK981218.1	<i>P calliantha</i>	Turk Dermastia T.
MK981220.1	<i>P. mannii</i>	Turk Dermastia T.
MN128953.1	<i>P qiana</i>	Huang C.X.
MT023649.1	<i>P. bipertita</i>	Dong H.C.
MT040023.1	<i>P. subpacifica</i>	Dong H.C.
MT114678.1	<i>P. hasleana</i>	Bowers H.
MT114681.1	<i>P. hasleana</i>	Bowers H.
MT682519.1	<i>P. hasleana</i>	Bowers H.
MW256708.1	<i>P. pseudodelicatissima</i>	Smoldaka Tanković H.
MW449589.1	<i>P. fraudulenta</i>	Ajani P.A.
MW524146.1	<i>P. subfraudulenta</i>	Turk Dermastia T.
MW524149.1	<i>P. galaxiae</i>	Turk Dermastia T.
MW560488.1	<i>P. calliantha</i>	Giulietti S.
MW560491.1	<i>P. cf. arenysensis</i>	Giulietti S.
MW560492.1	<i>P. cf. arenysensis</i>	Giulietti S.
MW560493.1	<i>P. cf. arenysensis</i>	Giulietti S.
MW560494.1	<i>P delicatissima</i>	Giulietti S.
MW560495.1	<i>P delicatissima</i>	Giulietti S.
MW560497.1	<i>P. pungens</i>	Giulietti S.
MW560498.1	<i>P. cf. arenysensis</i>	Giulietti S.
MW560499.1	<i>P. pungens</i>	Giulietti S.
MW898397.1	<i>P. fraudulenta</i>	Giulietti S.
MW898399.1	<i>P. mannii</i>	Giulietti S.
MW898400.1	<i>P. mannii</i>	Giulietti S.
MZ838947.1	<i>P. multiseriis</i>	Tardivo Kubis J.A.
OM936007.1	<i>Cylindrotheca sp.</i>	Li Y.
ON775562.1	<i>P. allochrone</i>	Percopo I.
OQ517924.1	<i>P. australis</i>	von Dassow P.
OQ526056.1	<i>P. fraudulenta</i>	von Dassow P.
OQ526058.1	<i>P. hasleana</i>	von Dassow P.
OQ848100.1	<i>P. cuspidata</i>	Teng S.T.
OR607099.1	<i>P. calliantha</i>	Turk Dermastia T.
OR607100.1	<i>P. calliantha</i>	Turk Dermastia T.
OR978381.1	<i>P. americana</i>	He Z.
U413901	<i>P. americana</i>	He Z.

Prilog 7. U Prilogu 7 prikazani su GenBank pristupni brojevi, uz pripadajuće vrste i autore sekvenci *Pseudo-nitzschia* korištenih u izradi *rbcL* filogenetskog stabla.

GenBank broj <i>rbcL</i>	Vrsta	Autor
MZ151885.1	<i>P. subfraudulenta</i>	Turk Dermastia T.
MZ151884.1	<i>P. subfraudulenta</i>	Turk Dermastia T.
MW271782.1	<i>P. calliantha</i>	Smodlaka Tanković H.
MW271781.1	<i>P. pseudodelicatissima</i>	Smodlaka Tanković H.
MW271780.1	<i>P. delicatissima</i>	Smodlaka Tanković H.
M59080.1	<i>Cylindrotheca</i> sp.	Hwang S.R.
LR537040.1	<i>P. mannii</i>	Turk Dermastia T.
LR537020.1	<i>P. mannii</i>	Turk Dermastia T.
LR537012.1	<i>P. fraudulenta</i>	Turk Dermastia T.
KU183494.1	<i>P. grannii</i>	Balzano S.
KT808258.1	<i>P. arctica</i>	Percopo I.
KT808257.1	<i>P. arctica</i>	Percopo I.
KP757863.1	<i>P. linea</i>	D'Alelio D.
KP757861.1	<i>P. galaxiae</i>	D'Alelio D.
KP757860.1	<i>P. galaxiae</i>	D'Alelio D.
KP757859.1	<i>P. arenysensis</i>	D'Alelio D.
KC920826.1	<i>Fragilariopsis kerguelensis</i>	Fuchs N.
KC801040.1	<i>P. multiseriis</i>	Lamari N.
KC801039.1	<i>P. pseudodelicatissima</i>	Lamari N.
KC801037.1	<i>P. cf. delicatissima</i>	Lamari N.
KC801036.1	<i>P. arenysensis</i>	Lamari N.
JN050305.1	<i>P. hasleana</i>	Lundholm N.
JN050304.1	<i>P. hasleana</i>	Lundholm N.
JN050303.1	<i>P. fryxelliana</i>	Lundholm N.
JN050302.1	<i>P. fryxelliana</i>	Lundholm N.
FJ150765.1	<i>P. delicatissima</i>	Elandalousi L.
FJ150763.1	<i>P. delicatissima</i>	Elandalousi L.
FJ150762.1	<i>P. calliantha</i>	Elandalousi L.
FJ150760.1	<i>P. calliantha</i>	Elandalousi L.
FJ150740.1	<i>P. brasiliiana</i>	Elandalousi L.
FJ150738.1	<i>P. delicatissima</i>	Elandalousi L.
EF520337.1	<i>P. multistriata</i>	Marangoni C.
EF520333.1	<i>P. fraudulenta</i>	Marangoni C.
EF423515.1	<i>P. galaxiae</i>	Marangoni C.
EF423512.1	<i>P. galaxiae</i>	Marangoni C.
EF423509.1	<i>P. galaxiae</i>	Marangoni C.
EF423508.1	<i>P. turgiduloides</i>	Marangoni C.
EF423505.1	<i>P. multistriata</i>	Marangoni C.
EF423504.1	<i>P. americana</i>	Marangoni C.

EF423503.1	<i>P. fraudulenta</i>	Marangoni C.
EF423502.1	<i>P. fraudulenta</i>	Marangoni C.
DQ813825.1	<i>P. calliantha</i>	Amato A.
DQ813824.1	<i>P. mannii</i>	Amato A.
DQ813823.1	<i>P. arenysensis</i>	Amato A.
DQ813822.1	<i>P. dolorosa</i>	Amato A.
DQ813820.1	<i>P. cuspidata</i>	Amato A.
DQ813817.1	<i>P. pseudodelicatissima</i>	Amato A.

Prilog 8. Koncentracije izolirane DNA u okolišnim uzorcima po sezonama i postajama tijekom 2022. i 2023. godine.

2022. GODINA	OZNAKA UZORKA	KONCENTRACIJA (ng/μL)	PROSJEČNA KONCENTRACIJA DNA (ng/μL)	SD
ZIMA	S_07022022_1	9,9	71,5	1,1
	S_07022022_2	72,3		
	S_07022022_3	70,7		
	V_08022022_1	13,8	15,9	4,1
	V_08022022_2	20,6		
	V_08022022_3	13,2		
	K_14022022_1	5,1	5,0	0,1
	K_14022022_2	4,9		
	K_14022022_3	5,1		
	M_14022022_1	46,7	38,6	11,2
	M_14022022_2	43,3		
	M_14022022_3	25,9		
PROLJEĆE	S_31052022_1	70,6	104,2	34,2
	S_31052022_2	139,0		
	S_31052022_3	103,0		
	V_31052022_1	15,4	11,3	4,9
	V_31052022_2	12,7		
	V_31052022_3	5,9		
	K_01062022_1	59,7	46,7	20,3
	K_01062022_2	57,2		
	K_01062022_3	23,3		
	M_01062022_1	23,2	26,7	8,3
	M_01062022_2	20,7		
	M_01062022_3	36,1		
	S_05092022_1	48,9	68,8	38,6
	S_05092022_2	44,2		
	S_05092022_3	113,2		
	V_06092022_1	69,6	78,5	7,8
	V_06092022_2	83,9		
	V_06092022_3	81,9		

LJETO	K_07092022_1	18,2	15,8	2,8
	K_07092022_2	12,7		
	K_07092022_3	16,6		
	M_07092022_1	4,7	5,8	2,1
	M_07092022_2	8,3		
	M_07092022_3	4,5		
	K_22092022_1	8,2	6,6	1,7
	K_22092022_2	6,6		
	K_22092022_3	4,8		
JESEN	S_05122022_1	50,0	27,2	22,2
	S_05122022_2	26,0		
	S_05122022_3	5,6		
	V_06122022_1	20,6	23,3	8,7
	V_06122022_2	16,3		
	V_06122022_3	33,1		
	K_12122022_1	15,2	13,4	2,4
	K_12122022_2	10,7		
	K_12122022_3	14,4		
	M_12122022_1	43,7	38,7	5,4
	M_12122022_2	33,0		
	M_12122022_3	39,5		
2023. GODINA	OZNAKA UZORKA	KONCENTRACIJA (ng/μL)	PROSJEČNA KONCENTRACIJA DNA (ng/μL)	STANDARDNA DEVIJACIJA
ZIMA	S_07022023_1	45,3	42,3	18,5
	S_07022023_2	22,4		
	S_07022023_3	59,1		
	V_07022023_1	39,1	34,6	3,9
	V_07022023_2	32,4		
	V_07022023_3	32,2		
	K_13022023_1	6,5	6,4	3,0
	K_13022023_2	3,3		
	K_13022023_3	9,3		
	M_13022023_1	10,2	6,2	4,5
	M_13022023_2	7,0		
	M_13022023_3	1,3		
PROLJEĆE	S_05062023_1	92,8	73,4	36,2
	S_05062023_2	95,8		
	S_05062023_3	31,7		
	V_14062023_1	17,7	17,7	1,0
	V_14062023_2	18,7		
	V_14062023_3	16,7		
	K_06062023_1	1,3	1,5	0,2
	K_06062023_2	1,4		
	K_06062023_3	1,8		
	M_01062023_1	58,0	62,4	12,3
	M_01062023_2	52,8		
	M_01062023_3	76,3		

LJETO	S_13092023_1	18,2	26,1	13,8
	S_13092023_2	42,0		
	S_13092023_3	18,1		
	V_13092023_1	22,1	24,7	13,2
	V_13092023_2	39,1		
	V_13092023_3	13,0		
	K_06092023_1	23,6	20,0	5,5
	K_06092023_2	13,7		
	K_06092023_3	22,7		
	M_06092023_1	86,4	107,4	36,9
	M_06092023_2	150,0		
	M_06092023_3	85,8		
JESEN	S_04122023_1	173,0	127,5	42,7
	S_04122023_2	88,4		
	S_04122023_3	121,0		
	V_04122023_1	31,4	32,7	4,6
	V_04122023_2	37,9		
	V_04122023_3	28,9		
	K_06122023_1	4,7	8,2	4,0
	K_06122023_2	7,4		
	K_06122023_3	12,6		
	M_06122023_1	57,3	56,7	20,1
	M_06122023_2	36,3		
	M_06122023_3	76,5		

8. SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU

U ovom je istraživanju po prvi put sveobuhvatnim pristupom određen sastav i sezonsko-prostorna raspodjela vrsta *Pseudo-nitzschia* na četiri uzgajališta školjkaša srednjeg Jadrana tijekom dvogodišnjeg razdoblja. Rod *Pseudo-nitzschia* sastavni je dio jadranske fitoplanktonske zajednice, a pojedine vrste proizvode neurotoksin domoičnu kiselinu (DK), odgovornu za amnezijsko trovanje školjkašima (ASP). Uspostavljene stanične kulture i sastav vrsta u okolišnim uzorcima određen je morfološki (FE-SEM/STEM) i molekularno (Sanger sekvenciranje: ITS, LSU, *rbcL*; metabarkodiranje: ITS1 i *rbcL*). Sveobuhvatni pristup omogućio je razlučivanje kriptičnih i pseudo-kriptičnih vrsta te procjenu utjecaja sezone i područja na strukturu zajednice. Uspostavljene su 362 kulture roda *Pseudo-nitzschia* u kojima je potvrđeno 10 vrsta. Morfološkom i molekularnom analizom okolišnih uzoraka određeno je 12 *Pseudo-nitzschia* vrsta. Značajnost prostornog faktora potvrđena je u Velebitskom kanalu, dok je sezonski obrazac pokazao na svim istraživanim područjima najveću raznolikost u hladnije dijelu godine (jesen i zima). Rezultati potvrđuju visoku raznolikost roda *Pseudo-nitzschia* u srednjem Jadranu te pokazuju da se najveća taksonomska preciznost postiže integracijom morfoloških i molekularnih metoda. Rezultati istraživanja predstavljaju temelj za pouzdanije praćenje potencijalno toksičnih populacija i procjenu rizika pojave domoične kiseline u uzgojnim područjima školjkaša.

9. SAŽETAK NA ENGLESKOM JEZIKU

In this study, the composition and seasonal–spatial distribution of *Pseudo-nitzschia* species were determined for the first time using a comprehensive integrative approach across four shellfish farming and harvesting areas of the central Adriatic Sea over a two-year period. The genus *Pseudo-nitzschia* is a regular component of the Adriatic phytoplankton community, and several of its species produce the neurotoxin domoic acid (DA), the causative agent of amnesic shellfish poisoning (ASP). Cell cultures and species composition in environmental samples were characterised using morphological (FE-SEM/STEM) and molecular methods (Sanger sequencing: ITS, LSU, *rbcL*; metabarcoding: ITS1 and *rbcL*). This integrative approach enabled the discrimination of cryptic and pseudo-cryptic species and the assessment of seasonal and regional influences on community structure. A total of 362 *Pseudo-nitzschia* cultures were established, within which 10 species were confirmed. Morphological and molecular analyses of environmental samples identified 12 *Pseudo-nitzschia* species and 2 taxa resolved to genus level (*P. sp. 1*, *P. spp.*). The significance of the spatial factor was most evident in the Velebit Channel, while seasonal patterns across all study areas showed the highest species diversity during the colder part of the year (autumn and winter). Overall, the results demonstrate high *Pseudo-nitzschia* diversity in the central Adriatic and show that the greatest taxonomic resolution is achieved by integrating morphological and molecular approaches. These findings provide a basis for more reliable monitoring of potentially toxic populations and for improved risk assessment related to domoic acid occurrence in shellfish aquaculture areas.

10. ZNANSTVENI RADOVI I SUDJELOVANJA NA ZNANSTVENIM SKUPOVIMA

Znanstveni radovi:

-Arapov J., Bužančić M., Skejić S., Mandić J., **Bonačić T.**, Tomašević T., Ninčević Gladan Ž. 2025. In situ diversity of the marine diatom genus *Pseudo-nitzschia* based on morphological characterisation//Estuarine, Coastal and Shelf Science 323 (2025). <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2025.109433>

-Tomašević T., Arapov J., Ujević I., **Bonačić T.**, Bužančić M., Bulić A., Skejić S., Roje-Busatto R., Ninčević Gladan Ž. 2025. Growth Dynamics and Toxin Production of *Pseudo-nitzschia* Species Isolated from the Central Adriatic Sea//Toxins 2025, 17 307. <https://doi.org/10.3390/toxins17060307>

-**Bonačić T.**, Arapov J., Bušelić I., Lepen Pleić I., Milić Roje B., Tomašević T., Bužančić M., Mladinić M., Casabianca S., Skejić S., Ninčević Gladan Ž. 2025. Advancing the Taxonomy of the Diatom *Pseudo-nitzschia* Through an Integrative Study Conducted in the Central and Southeastern Adriatic Sea// Plants, 14 (2025), 2; 245-257. doi: 10.3390/plants14020245

-Arapov J., Tomašević T., **Bonačić T.**, Pejković M., Bužančić M., Bušelić I., Lepen Pleić I., Casabianca S., Penna A., Skejić S., Ninčević Gladan Ž. 2023. A New Insight into the Taxonomy of the *Pseudo-nitzschia* Genus from the Adriatic Sea: Description of *P. brasiliiana*, *P. galaxiae*, *P. hasleana*, and *P. linea* // Journal of marine science and engineering, 11 (2023), 7;1370, 15. doi: doi.org/10.3390/jmse110071370

Sudjelovanje na stručnim i znanstvenim skupovima:

-Tomašević T., Arapov J., Ujević I., **Bonačić T.**, Bužančić M., Bulić A., Skejić S., Roje-Busatto R., Ninčević Gladan Ž. 2025. Growth Dynamics and Toxin Production of *Pseudo-nitzschia* Species Isolated from the Central Adriatic Sea//15.Hrvatski biološki kongres, Zagreb, Republika Hrvatska, 20.-23. studenoga 2025.

-**Bonačić T.**, Tomašević T., Pejković M., Bušelić Garber I., Lepen Pleić I., Ujević I., Bulić A., Roje-Busatto R., Penna, A. Casabianca S. Diversity and toxigenic characteristics of cultured *Pseudo-nitzschia* species from East Adriatic Sea // "Scientific Opportunities for a Global Algal Revolution" Program and Book of Abstracts of 8th European Phycological Congress / Connan, Solène; Creis, Emeline; Jacquemin, Bertrand i sur., (ur.). Brest: Federation of European Phycological Societies (FEPS), 2023. str. 212-212

-Arapov J., Bužančić M., **Bonačić T.**, Tomašević T., Skejić S., Ninčević Gladan Ž. *Pseudo-nitzschia* genus diversity in the central and southern Adriatic Sea // 15th European Diatom Meeting, Ohrid, North Macedonia, 7.-9. svibnja 2024.

-Bužančić M., Arapov J., Skejić S., **Bonačić T.**, Tomašević T., Bakrač A., Straka M., Ninčević Gladan Ž. A combination of electron microscopy methods for a better view // 2. Hrvatski mikroskopijski simpozij, Split, 24.-25. studenoga 2023.

-**Bonačić T.**, Arapov J., Milić Roje B., Bušelić I., Lepen Pleić I., Tomašević T., Ninčević Gladan Ž. Molecular and morphological characteristics of *Pseudo-nitzschia* species in the East Adriatic Sea // 15th European Diatom Meeting, Ohrid, North Macedonia, 7.-9. svibnja 2024.

-Arapov J., Tomašević T., **Bonačić T.**, Pejković M., Bužančić M., Mandić J., Bušelić I. The occurrence of new *Pseudo-nitzschia* species: *P. brasiliiana*, *P. hasleana* and *P. linea* in the Adriatic Sea. // 15th European Diatom Meeting, Ohrid, North Macedonia, 7.-9. svibnja 2024.

11. KRATKI ŽIVOTOPIS

Rođena sam 12.4.1995. godine u Splitu. Godine 2014. završila sam opću gimnaziju „Marko Marulić“ u Splitu, a potom i preddiplomski, smjer „Morsko ribarstvo“ Diplomski sveučilišni studij, smjer „Ekologija i zaštita mora“ sveučilišnog studija „Studij mora“ pri Sveučilištu u Splitu sam završila 2021. godine. Od 2022. radim kao doktorand/asistent na projektu UIP-2020-02-3249, „Ekologija i toksičnost vrsta roda *Pseudo-nitzschia* u obalnim vodama srednjeg i južnog Jadrana“ u Laboratoriju za plankton i toksičnost školjkaša na Institutu za oceanografiju i ribarstvo u Splitu, pod vodstvom dr. sc. Jasne Arapov i komentorstvom dr. sc. Ivane Bušelić Garber. Netom nakon zaposlenja upisujem doktorski sveučilišni studij Biofizike na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Splitu. Tijekom dokorskog studija sudjelovala sam na nekoliko bioinformatičkih radionica: Physalia Courses: „Metabarcoding in Microbial Ecology“, „Phylogenetic comparative methods in R“ te na radionici „Multivariate Analysis in Ecology, using PRIMER7 and PERMANOVA“, kao i na praktičnoj radionici „PCR i analiza sekvenci dobivenih Sanger sekvenciranjem“ u BICRO BIOCentru u Zagrebu. Prisustvovala sam na dva stručna kongresa: „8th European Phycological Congress“ u Brestu, Francuska i na „15th Diatom Meeting“ u Ohridu, Makedonija. Glavno područje interesa mi je primjena molekularnih metoda u istraživanjima dijatomeja s naglaskom na obradu podataka novih tehnika sekvenciranja.