

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli
Fakultet za odgojne i obrazovne znanosti

SANJA LIPIĆ

**Ispitivanje prisutnosti gljiva u dagnji *Mytilus galloprovincialis*
Lamarck, 1819**

Završni rad

Pula, rujan 2018.

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli
Fakultet za odgojne i obrazovne znanosti

SANJA LIPIĆ

**Ispitivanje prisutnosti gljiva u dagnji *Mytilus galloprovincialis*
Lamarck, 1819**

Završni rad

JMBAG: 0303053935, redoviti student

Studijski smjer: Znanost o moru

Predmet: Mikrobiologija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Interdisciplinarno

Znanstvena grana: Znanost o moru

Mentor: doc.dr.sc. Emina Pustijanac

Komentor: doc.dr.sc. Ines Kovačić

Pula, rujan 2018



IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, dolje potpisana SANJA LIPIĆ, kandidatkinja za prvostupnicu Znanosti o moru ovime izjavljujem da je ovaj Završni rad rezultat isključivo mogega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na objavljenu literaturu kao što to pokazuju korištene bilješke i bibliografija. Izjavljujem da niti jedan dio Završnog rada nije napisan na nedozvoljen način, odnosno da je prepisan iz kojega necitiranog rada, te da ikoji dio rada krši bilo čija autorska prava. Izjavljujem, također, da nijedan dio rada nije iskorišten za koji drugi rad pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj ili radnoj ustanovi.

Student

U Puli, _____ 2018. godine



IZJAVA

o korištenju autorskog djela

Ja, Sanja Lipić dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj završni rad pod nazivom Ispitivanje prisutnosti gljiva u dagnji *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 koristi na način da gore navedeno autorsko djelo, kao cjeloviti tekst trajno objavi u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli te kopira u javnu internetsku bazu završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice (stavljanje na raspolaganje javnosti), sve u skladu s Zakonom o autorskom pravu i drugim srodnim pravima i dobrom akademskom praksom, a radi promicanja otvorenoga, slobodnoga pristupa znanstvenim informacijama.

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

U Puli, 2018.

Potpis

Sadržaj

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | UVOD..... | 1 |
| 2 | LITERATURNI PREGLED..... | 2 |
| 2.1 | Dagnje..... | 2 |
| 2.2 | Gljive | 4 |
| 2.2.1 | Gljive u dagnjama | 5 |
| 2.2.2 | Psilocybe sp..... | 5 |
| 2.2.3 | Ulocladium sp..... | 6 |
| 2.2.4 | Alternaria sp..... | 6 |
| 2.3 | Histološke metode..... | 6 |
| 2.4 | Molekularne metode | 7 |
| 2.4.1 | Deoksiribonukleinska kiselina | 7 |
| 2.4.2 | Izolacija DNA | 8 |
| 2.4.3 | Lančana reakcija polimerazom | 8 |
| 2.4.4 | Agarozni gel..... | 9 |
| 2.4.5 | Elektroforeza..... | 9 |
| 3 | CILJ ISTRAŽIVANJA..... | 11 |
| 4 | MATERIJALI I METODE..... | 12 |
| 4.1 | Materijali za histološku analizu | 12 |
| 4.2 | Materijali za molekularnu analizu | 12 |
| 4.3 | Uzorkovanje | 13 |
| 4.3.1 | Istraživano područje | 13 |
| 4.4 | Metode histološke analize | 15 |
| 4.5 | Metode molekularne analize | 15 |
| 4.5.1 | Izolacija DNA | 15 |
| 4.5.2 | Lančana reakcija polimerazom | 16 |
| 4.5.3 | Priprema agaroznog gela | 17 |
| 4.5.4 | Elektroforeza..... | 17 |
| 5 | REZULTATI | 18 |
| 5.1 | Rezultati histološke analize | 18 |

| | | |
|-----|-------------------------------------|----|
| 5.2 | Rezultati molekularne analize | 22 |
| 6 | DISKUSIJA | 23 |
| 7 | ZAKLJUČAK | 25 |
| 8 | LITERATURA | 26 |
| | Popis slika | 32 |
| | Popis tablica | 32 |
| | SAŽETAK | 33 |
| | ZAHVALA | 34 |

1 UVOD

Mediteranska dagnja (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) je poznati biološki indikatorski organizam. Zbog sesilnog načina života i prehrane filtriranjem morske vode ukazuje ne samo na prisutnost ili odsutnost zagađivala, već se pomoću nje mogu pratiti i periodične promjene razine zagađenja određenog područja. Dagnje su rasprostranjeni uzgojni organizmi i dio su ljudske prehrane. Važno je utvrditi njihovu kvalitetu zbog utjecaja na marikulturu i čovjeka.

U ovom radu ispitivana je prisutnost i identifikacija gljiva u mediteranskoj dagnji. Uzorci probavne žlijezde dagnji analizirano je histološkim i molekularnim metodama. Dagnje su uzorkovane sa šest lokacija u sjevernom Jadranu u veljači i travnju 2014. godine. Dvije lokacije su korištene kao kontrolne lokacije, na kojima nema izvora onečišćenja (Strunjan i Sv. Katarina). Ostale četiri lokacije su izložene zagađivalima iz okoliša (Dobrova, Seča, ACI Marina Rovinj, ACI Marina Pula).

2 LITERATURNI PREGLED

2.1 Dagnje

Meditranska dagnja *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 (Slika 1.) sistematski pripada koljenu mekušaca (*Mollusca*), razredu školjkaša (*Bivalvia*), obitelji *Mytilidae*, rodu *Mytilus*. Ljuštura dagnje je izduženog trokutastog oblika sa zaobljenom najkraćom stranicom. Ljuštura je zrcalno simetrična, i crne boje. Tkivo dagnji je zaštićeno unutar ljuštura. Unutarnja strana ljuštura prekrivena je s plaštom. Unutar plašta sakupljaju se spolne stanice u reprodukcijsko vrijeme. U plaštu se nalaze i trepetljike usmjeravaju otpadne tvari prema crijevnom otvoru, a hranjive čestice prema škrgama (Seed i Suchanek, 1992). Na vanjskoj površini ljuštura su vidljive linije rasta školjke. Ljuštura se zatvaraju pomoću mišića aduktora. Zbog mogućnosti otvaranja i zatvaranja svojih čvrstih ljuštura, dagnje su prilagođene životu u promjenjivim uvjetima morskog okoliša (Kovačić, 2015). Dobro podnose variranje temperature, promjenu saliniteta i povremeno izranjanje (Seed, 1976).



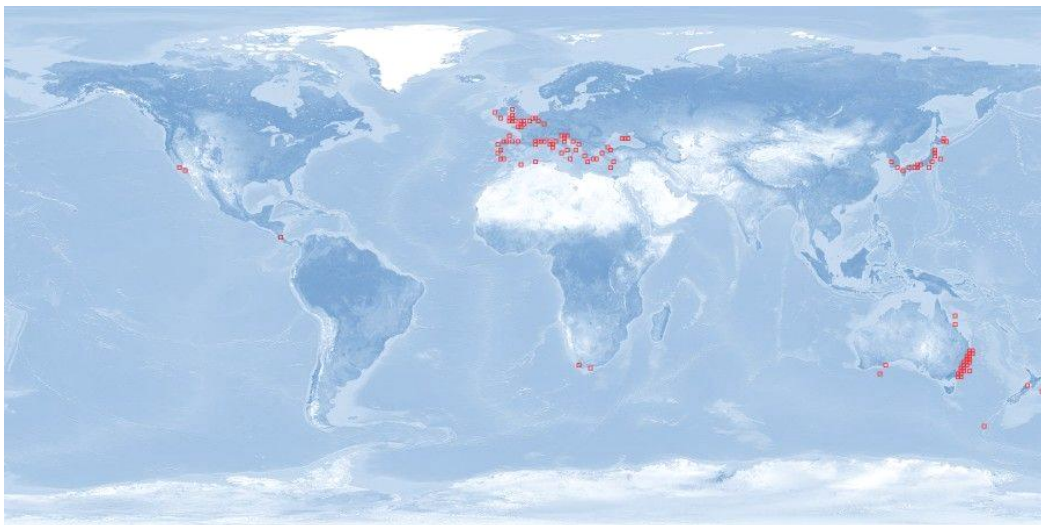
Slika 1. Vanjski izgled mediteranske dagnje (*M. galloprovincialis*)

(<http://www.elrincondelmalacologo.com/Web%20fotos%20marinos%20no%20gasteropodos/Mytilidae2.htm>)

Nalazimo ih u obalnom području, a najgušće su naseljene u zoni plime i oseke. Možemo ih naći na stjenovitim obalama s velikim strujanjem valova, ali i na zaštićenim obalama te u gustim nakupinama na muljevitoj dnu slanih laguna (Ceccherelli i Rossi, 1984). Na šiljastom dijelu školjke imaju bisusne niti pomoću kojih se školjka veže za razne površine (Seed i Suchanek, 1992). Nastanjuju se na kamenoj ili šljunčanoj podlozi, na konopima, plutačama, usidrenim brodovima, sidru,

kavezima na uzgajalištima itd. Pričvršćene bisusnim nitima formiraju guste kolonije (Župan i sur., 2014).

Iako je većina populacija dagnji rasprostranjena u obalnom području zbog bioloških čimbenika kompeticije i predacije, stabilnije populacije se mogu naći i u infralitoralnoj zoni na dubinama preko 20 metara (Gosling, 1992). Dominantna je u Mediteranskom području, no također se može naći uz sjeverni dio obale Atlantika do sjeverozapadne Irske i jugozapadne Engleske. *M. galloprovincialis* je također nađena sa zapadne obale Sjeverne Amerike, Australije i Azije (Gardner 1992) (Slika 2).



Slika 2. Geografska rasprostranjenost dagnje (*M. galloprovincialis*) (https://media.eol.org/content/2011/11/08/17/77247_orig.jpg)

M. galloprovincialis se često koristi kao bioindikatorski organizam zbog široke geografske distribucije, jednostavnosti uzgoja te praktičnosti uzorkovanja (Viarengo i sur., 2007). Škrge dagnje služe za disanje, ali imaju i važnu ulogu u hranjenju. Uz proces disanja, imaju mogućnost filtriranja vode uz adsorpciju hranjivih čestica. Prehrana dagnji sastoji se od suspendiranih čestica detritusa, bakterija, fitoplanktona, mikrozooplanktona, razgrađene organske tvari te anorganske čestice (Jørgensen, 1990). Zbog takvog načina ishrane, filtriranje vode kroz škrge, dobar je pokazatelj kvalitete okoliša u kojem se nalazi jer u sebi akumulira zagađivala i toksine iz vodenog stupca (Mubiana i sur., 2006).

M. galloprovincialis ima široku rasprostranjenost duž Jadranske obale te je od velike ekonomske važnosti zbog uzgoja (Pavičić-Hamer i sur., 2016). Godišnja proizvodnja

u Hrvatskoj iznosi oko 3000 tona. Proizvodnja je zastupljena i u ostalim mediteranskim zemljama. Vrhunac proizvodnje na Mediteranu je bio 2003. godine. Ukupna proizvodnja je iznosila 146 368 tona, a Španjolska i Grčka su bili najveći proizvođači Mediterana (Mišura i sur. 2008).

2.2 Gljive

Mikologija je znanost koja se bavi istraživanjem gljiva, uključujući njihova genetska i biokemijska svojstva te njihovu taksonomiju. Kraljevstvo gljiva (*Fungi*) obuhvaća porodice gljiva, kvasaca i plijesni. Gljive su posebna skupina organizama te obuhvaćaju oko 250 000 vrsta. Zajedno s bakterijama sudjeluju u razgradnji organskih tvari u našem okolišu (Duraković 1991).

Gljive imaju široku distribuciju, nalaze se po cijeloj Zemlji i rastu na brojnim staništima. Možemo ih naći i u ekstremnim staništima kao što su pustinje, područja s visokim salinitetom te u sedimentu dubokih mora (Dadachova i sur. 2007.; Raghukumar i Raghukumar 1998).

Gljive imaju čvrste stanične stjenke građene od hitina. Heterotrofi su, hrane se apsorpcijom hranjivih organskih molekula. Mogu se hraniti organskom tvari proizvedene od drugih živih organizama kao paraziti, ili ostacima mrtvih organizama kao saprofiti (Duraković 1991).

Gljive smatramo glavnim razgraditeljima u ekološkom sustavu. Imaju bitnu ulogu u razgradnji organske tvari, ali i u ciklusu hranjivih tvari. Imaju široku primjenu, u ljudskoj prehrani, npr. kvasac za kruh, fermentacija raznih prehrambenih proizvoda. Od prošlog stoljeća se koriste za proizvodnju antibiotika, a u novije doba razni enzimi proizvedeni gljivicama se koriste u industriji. Također imaju široku primjenu kao biološki pesticidi za suzbijanje korova, biljnih bolesti te protiv insekata. Mnoge vrste gljiva proizvode bioaktivne spojeve, mikotoksine, kao što su alkaloidi i poliketidi. Mikotoksini su toksični i za životinje i za ljude, mogu biti patogeni. Gljive različitih taksonomskih skupina mogu izazvati bolesti kod ljudi i biti uzrok alergija. Od 12 000 vrsta koje su opisane, procjenjuje se da je najmanje 300 vrsta koje su patogene za ljude. Procjena iz 2017. godine je da ima između 2,2 do 3,8 milijuna vrsta gljiva. Neke vrste sadrže psihotropne spojeve, kemijske tvari fiziološkog učinka koje mijenjaju

moždanu funkciju. Takvi spojevi rezultiraju privremenom promjenom raspoloženja, svijesti, precepcije i ponašanja (Hawksworth i Lücking, 2017).

Plijesni su skupina gljiva koja spadaju u odjel *Deuteromycota*. Tijelo plijesni je izgrađeno od gustog sustava dugih cjevastih stanica bez klorofila. Nitaste su građe. Niti (hife) se sastoje od cjevastih stanica koje rastu kao isprepletana masa, a zajedno se naziva micelij. Veliki broj hifa je vegetativan; one aktivno rastu i oblikuju tijelo plijesni u koloniju (Prescott i sur., 2002).

2.2.1 Gljive u dagnjama

Gljive su jedne od uzročnika bolesti kod školjkaša (Santos i sur., 2017). Istraživanje gljiva koje utječu na školjkaše od ekološkog i gospodarskog interesa ključno je za upravljanje prirodnim staništima i marikulturom (Boehs i sur., 2010). Rezultati dobiveni istraživanjem Kovačić i sur. (2018) uključuju prvu evidenciju gljivičnih spora *Ulocalum* sp., *Psilocybe* sp. i *Alternaria* sp. u *M. galloprovincialis* u sjevernom Jadranu (Hrvatska).

Povećano iskorištavanje obalnog područja i mora zbog urbanizacije, rasta stanovništva, te turizama koji je povezan s intenzivnim prometom plovila i pomorskog prometa, ima štetan utjecaj na zdravstveno stanje školjkaša (Burgos-Aceves i sur., 2017, Savorelli i sur., 2017, Burgos-Aceves i sur., 2018, Faggio i sur., 2018). Smanjenje kakvoće vode može utjecati na imunološki odgovor vodenih organizama što ih čini podložnijima infekcijama (Khan, 1991). Širenje gljiva može biti potpomognuto uvjetima okoline, kao što su vjetar i morske struje (Sallenave-Namont i sur., 2000). Epibiotičke i endobiotične gljive žive na površini i u unutrašnjim tkivima ili čak u stanicama njihovih domaćina (Zhang i sur., 2009). Gljive se također mogu pojaviti u morskom okolišu na organizmima bez da pokazuju simptome zaraze (Ein-Gil i sur., 2009).

2.2.2 Psilocybe sp.

Psilocybe je rod gljiva koje su rasprostranjene širom svijeta u većini bioma. To su male žućkasto smeđe gljive koje su saprotrofi, hranu uzimaju iz nežive organske

tvari, te rastu na raznim vrstama propadajućih organskih tvari. *Psilocybe sp.* su gljive koje sadrže psihoaktivne spojeve psilocin i psilocibin (Largent i Baroni, 1988).

Psilocin i psilocibin je prvi put izolirao i imenovao švicarski kemičar Albert Hormann, 1958. godine iz gljive *Psilocybe mexicana*. Psilocibin je prirodni spoj koji proizvodi više od 200 vrsta gljiva, zajednički poznate kao psilocibinske gljive. Najviše ih nalazimo u gljivama roda *Psilocybe*. Psilocibin se u tijelu čovjeka defosforizacijom pretvara u psilocin. Takav spoj izaziva euforiju, vizualne halucinacije, promjene u percepciji, mučnine i napade panike (Hofmann i sur., 1959).

2.2.3 Ulocladium sp.

Ulocladium rod je prvi otkrio Preuss 1851. godine. To su tamno pigmentirane gljive, okruglog do ovalnog oblika spora. Vrste su kozmopoliti, velike rasprostranjenosti i sveprisutne na većini kontinenata. Obično se nalaze u tlu i kod razgradnje biljaka, papira, tekstila, gnojiva, emulzijske boje, trave, vlakana i drva. Nalazi se na vlažnim područjima. Smatraju se odličnim pokazateljem onečišćenja vode jer zahtijevaju veliku količinu vode za razvoj (Gravesen i sur., 1999). Spore *Ulocladiuma* se prvenstveno šire zrakom i poznate su kao alergeni dišnih puteva i oportunistički ljudski patogeni, što znači da će se infekcija pojaviti u slučaju oslabljenog imuniteta zbog prisutnosti neke druge bolesti ili predispozicije za oboljenje (Al-Suwaine i sur., 1999. i de Hoog i Horre, 2002).

2.2.4 Alternaria sp.

Alternaria sp. je vrsta iz koljena Ascomycota. *Alternaria sp.* je poznata kao glavni patogen biljaka. Ove vrste preferiraju močvarna i vlažna područja, šume i vrtove. Oni su također uobičajeni alergeni kod ljudi. U rodu se nalazi više od 40 vrsta koje su sveprisutne u okolišu i prirodni su dio gljivične flore gotovo posvuda. Oni su normalni uzročnici raspadanja. Spore se mogu nalaziti u zraku, vodi i tlu. Spore mogu biti jednodijelne ili tvoriti duge lance (Kirk i sur., 2008).

2.3 Histološke metode

Histologija je grana biologije koja se bavi proučavanjem stanica i tkiva. Histološki preparati su obojene sekcije tkiva, do 10 mikrometara debljine koje promatramo pod mikroskopom (James i sur. 2015).

Uzorci biološkog tkiva se fiksiraju kako bi se stanice i tkivo zadržale u što prirodnijem stanju. Razlikujemo kemijsku fiksaciju i fiksaciju zamrznute sekcije. U slučaju kemijske fiksacije biološke strukture su očuvane u stanju koje je najbližije živom tkivu, u kemijskim i strukturnom smislu. Kod fiksacije zamrznutih sekcija uzimamo malene komade tkiva i stavljamo umedij za ugrađivanje te se tkivo smrzava u tekućem dušiku (Kovačić i Pustijanac, 2017). Kod fiksacije zamrznutih sekcija uzorak tkiva nije izložen organskim otapalima i izloženost fiksativu je minimalna za razliku od kemijske fiksacije (Lačković i sur., 2014).

Zatim se tkivo reže u hladnom mikrotomu ili kriostatu. Razlikujemo vertikalni i horizontalni presjek. Najčešće se koristi vertikalni presjek. Ovaj korak je neophodan da bi dobili dovoljno tanke slojeve uzorka tkiva da se detalji mikrostrukture tkiva mogu jasno raspoznati pod mikroskopom. Postupak kriosekcije ne uključuje dehidraciju, koja je tipična za druge postupke sekcioniranja, te se zbog toga smanjuje vrijeme pripreme uzoraka. Brzo zamrzavanje reducira stvaranje kristala leda i smanjuje morfološku štetu. Isto tako, postupkom kriosekcije, tkivo je bliže prirodnom stanju (Kovačić i Pustijanac, 2017). Uklopljeno tkivo se boji otopinom hematoksilina i eozina. Sposobnost vizualizacije, tj. razlikovanje mikroskopskih struktura se poboljšava bojanjem seciranog tkiva. Biološko tkivo ima vrlo malo varijacija u bojama i nijansama kada se promatra svjetlosnim mikroskopom. Bojenje biološkog tkiva se radi kako bi se povećao kontrast boja tkiva i kako bi se istaknule specifične značajke od interesa. Na kraju se tkivo postavlja na predmetno stakalce, pokriva potkrovnim stakalcem te je spremno za mikroskopiranje (Lačković i sur., 2014; James i sur., 2015).

2.4 Molekularne metode

2.4.1 Deoksiribonukleinska kiselina

Deoksiribonukleinska kiselina (DNA) je dvostruka molekula koja se sastoji od dva suprotno usmjerena polinukleotidna lanca. Svaki lanac sadrži purinske i pirimidinske baze vezane za fosforilirani šećer, deoksiriboza. Purinske baze su adenin i gvanin, a pirimidinske timin i citozin. Baze se nalaze na unutrašnjoj strani, pa vodikove veze između komplementarnih parova baza povezuju dva lanca. Genetska informacija se nalazi u purinskim i pirimidinskim bazama. Deoksiriboza i fosfatne skupine imaju

strukturnu ulogu. Većina DNA u eukariotskim organizmima, pa tako i kod gljiva je smještena u staničnoj jezgri. Manja količina DNA se nalazi u mitohondriju (mtDNA). Važno svojstvo DNA je da se može replicirati. Svaki lanac dvostruke uzvojnice DNA služi kao uzorak da dupliciranje sekvenca baza (Alberts i sur., 2014).

2.4.2 Izolacija DNA

Postupak izolacije DNA započinje liziranjem stanica. Potom je potrebno ukloniti makromolekule kao stanične proteine i RNA, ugljikohidrate, lipide, fosfolipide pomoću kemijske ekstrakcije ili enzimskim reakcijama. Proteini se razgrađuju enzimom proteinaza K tako da enzim cijepa peptidnu vezu proteina. Potom se DNA izdvaja taloženjem. Zadnji korak je otapanje DNA u EDTA puferu (Speers, 2006).

2.4.3 Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (engl. PCR, *Polymerase Chain Reaction*) je laboratorijska tehnika koja služi za umnažanje određenog i kratkog fragmenta DNA. PCR koristi enzim koji se pojavljuje u prirodi kako bi kopirao specifičan dio DNA ponovo i iznova. Cilj PCR-a je napraviti dovoljno određenog fragmenta DNA koja se može iskoristiti za vizualizaciju na gelu elektroforezom i sekvenciranje, tj. određivanje slijeda nukleotida. DNA polimeraza koja se koristi u PCR-u se naziva Taq polimeraza, po bakteriji *Thermus aquaticus*. *T. Aquaticus* živi u vrućim hidrotermalnim izvorima. DNA polimeraza *T. Aquaticus* je vrlo termostabilna i najaktivnija na oko 70 °C. Takva termostabilnost čini Taq polimerazu idealnu za PCR zbog visokih temperatura koje se koriste za denaturiranje DNA i separaciju (Reece i sur., 2012).

PCR reakcija se sastoji od tri koraka: denaturacija, vezivanje početnica i produljivanje lanaca DNA. Prvi osnovni korak PCR-a je denaturacija dvostrukog lanca DNA, toplinska reakcija na 95°C koja razdvaja ili denaturira DNA lance što omogućuje jednolančani predložak za sljedeći korak. Drugi korak je vezivanje oligonukleotidnih početnica, hlađenjem reakcije na oko 50 °C-65 °C tako da se početnice mogu vezati na njihove komplementarne sekvence na jednolančanom predlošku DNA. Zadnji korak je produljivanje komplementarnih lanaca na povećanoj temperaturi od 72°C tako da Taq polimeraza nastavlja sintezu stvarajući nove lance DNA. Ta tri ciklusa se

ponavljaju oko 30-40 puta, te reakcija može trajati od 2 do 4 sata, ovisno o dužini područja DNA koje se kopira kao i o broju ciklusa (Reece i sur., 2011). Rezultate PCR reakcije možemo vizualizirati na gel elektroforezi.

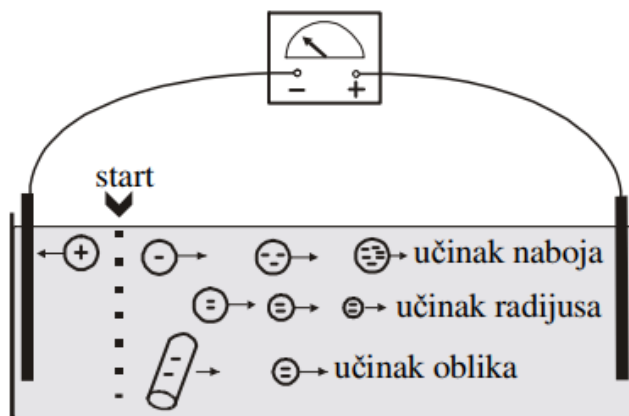
2.4.4 Agarozni gel

Agaroz je polisaharid dobiven iz agara. Agar se dobiva iz vrsta crvenih algi roda *Gelidium* i *Gracilaria* (Armisen i Galatas 1987).

Agarozni gel se priprema tako da se agaroz otapa u puferu, koji se naknadno hladi (Generalić 2007). Tokom hlađenja na dijelovima agaroze dolazi do umrežavanja molekule i nastanak polimerne vlaknaste strukture. U porama polimernih vlakana se zadržava voda. U toj vodi se nalazi otopina elektrolita te tako nastaje gel (Piljac, 2005.). Na jednom kraju gela stavljamo češljice koji će stvoriti jažice u gelu, u koje stavljamo uzorke iz PCR reakcije. Prije stavljanja DNA uzoraka gel se stavlja u kadu tako da se na jednom kraju nalazi anoda, pozitivna elektroda, a na drugoj katoda, negativna elektroda. Kraj s jažicama se postavi na strani s negativnom elektrodom. Kraj bez jažica se nalazi na strani pozitivne elektrode. DNA fragmenti će migrirati prema pozitivnoj elektrodi jer je DNA negativno nabijena zbog fosfatnih skupina (Kratz i Siegfried, 2010).

2.4.5 Elektroforeza

Elektroforezom nazivamo migraciju električki nabijenih čestica kroz otopinu/gel djelovanjem električnog polja. Njome se omogućuje separacija čestica zbog različitih brzina migracije s obzirom na njihov radijus, oblik i električni naboj (Piljac, 2005). Čestice s većim negativnim nabojem, a istog radijusa putuju brže kroz gel od manje negativno nabijenih čestica. Također čestice manjeg radijusa, a istog naboja putuju brže od većih (Slika 3.).



Slika 3. – Brzina putovanja čestica kroz gel (I. Piljac)

Sve DNA molekule imaju istu količinu naboja po masi. Upravo zbog toga, gel elektroforeze DNA fragmenata ih dijeli samo po veličini. Pomoću elektroforeze možemo vidjeti koliko je različitih duljina fragmenata DNA prisutno u ispitivanom uzorku (Kratz i Siegfried, 2010).

Nukleinske kiseline se boje etidij-bromidom. DNA molekule imaju negativni naboj zbog fosfatnih skupina u šećeru te putuju kroz električno polje prema anodi (pozitivnoj elektrodi). DNA se kreće prema katodi (negativnoj elektrodi) što omogućuje umetanje etidium-bromida između baza DNA tada molekula DNA postaje vidljiva pod UV svjetlom. Tokom pripreme agaroznog gela dodaje se određena količina etidium-bromida. Naime, pod UV-zrakama DNA fragmenti s interkaliranim etidium-bromidom svijetle, njihove pozicije možemo slikati te tako dokumentiramo rezultate (Reece i sur., 2012).

3 CILJ ISTRAŽIVANJA

1. Utvrditi prisutnost gljiva u probavnoj žlijezdi dagnje histološkom i molekularnom analizom
2. Identificirati gljive pronađene u uzorku dagnji
3. Usporediti prisutnost gljiva u dagnji na različitim postajama uzorkovanja

4 MATERIJALI I METODE

4.1 Materijali za histološku analizu

Kemikalije korištene za analizu su sljedeće:

- tekući dušik
- N-heksan
- O.C.T.TM (Microm Inc. GmbH, Germany)
- otopina hematoksilina (Sigma-Aldrich, USA)
- otopina eozima (Sigma-Aldrich, USA)
- glicerol želatina (Sigma - Aldrich, USA)

Za ovu analizu smo koristili:

- škarice
- hladnjak
- predmetno stakalce
- pokrovno stakalce
- svjetlosni mikroskop Nikon-SA (Nikon, UK)
- CCD kamera Ikegami ICD-803P

4.2 Materijali za molekularnu analizu

Kemikalije koje smo koristili za ovu analizu su sljedeće:

- Komercijalni komplet za izolaciju DNA, DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen
- Proteinaza, Proteinaze K (20 mg/ml), Qiagen
- Agarosa, Agarose Broad Range, Roth
- Pufer za elektroforezu, 1X TAE (40 mM Tris, 20 mM octena kiselina, 1 mM EDTA)
- Pufer za nanošenje uzoraka na gel, 6X Loading dye solution, Fermentas
- Etidijev bromid
- DNA biljeg, GeneRuler 1kb DNA Ladder, Fermentas
- Dream Taq DNA polimeraza i pufer, Fermentas

- Komercijalni komplet za pročišćavanje PCR produkta, Wizard SV Gel and PCR Clean - Up System, Promega

Uređaji koje smo koristili za ovu analizu su sljedeći:

- Mješalica (vortex)
- Termoblok
- Centrifuga
- Mikrovalna peć
- Elektroforeza (kadica, kalup za izlivanje gela, napon)
- UV transiluminator
- PCR uređaj (C1000 Thermal Cyclor, Bio-Rad, SAD)

4.3 Uzorkovanje

Uzorkovali smo dagnje (*M. galloprovincialis*) prosječne veličine oko 5 cm (± 1 cm). Uzorke smo sakupili sa šest postaja u sjevernom Jadranu: ACI Marina Pula, otok Sv. Katarina, ACI Marina Rovinj, Strunjan, Seča i Dobrova (Slika 4). Sa svake postaje smo sakupili po 5 uzoraka u veljači i ožujku 2014. godine.

4.3.1 Istraživano područje

Postaja Dobrova je okružena turističkim naseljima i pod utjecajem je rijeke Dragonje. Rijeka Dragonja ima kišni ljetni režim. Po ljeti tijekom sušnih razdoblja često presuši, a tokom kišnih razdoblja zimi, vodostaj se naglo povećava te je moguće izlivanje iz korita. Rijekom tvari iz okolnih poljoprivrednih površina dolaze u Piranski zaljev. Postaja je također u blizini Marine Kopar što također karakterizira povišenu koncentraciju zagađivala.

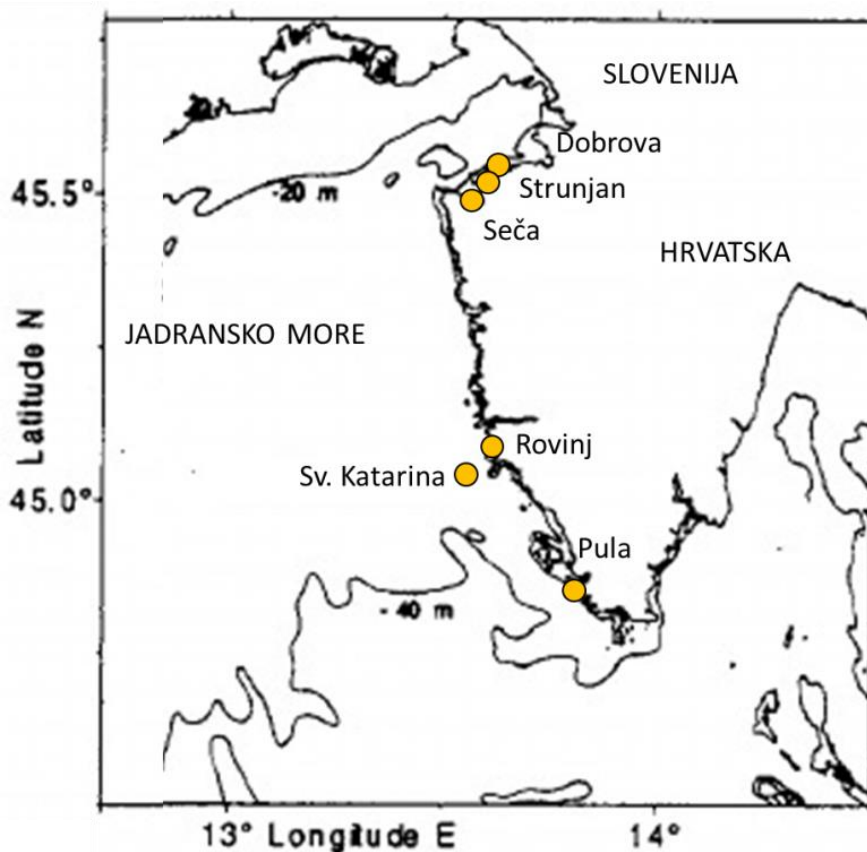
Postaja Strunjan je park prirode u Sloveniji gdje se nalazi uzgajalište dagnji. Dobro je sklonište od sjevernih vjetrova i djelomično od bure te nema donosa onečišćenja. Zbog toga je postaja Strunjan uzeta kao kontrolna točka.

Postaja Seča se nalazi u urbaniziranom naselju te je pod velikim utjecajem industrijskih otpadnih voda i voda s poljoprivrednih površina koje se mehanički pročišćavaju i otpuštaju.

Postaja ACI marina Rovinj ima povišenu koncentraciju zagađivala zbog brodova. Nalazi se u urbaniziranom području Rovinja te je pod utjecajem otpadnih voda iz tvornice za preradu riba Mirna.

Postaja Sv. Katarina se nalazi na zapadnoj obali poluotoka Istra oko 200 metara udaljenosti zračne linije od Rovinja. Koristi se kao kontrolnu postaju jer u blizini nema izvora onečišćenja, ali ima donosa strujom iz rovinjske luke.

Postaja ACI marina Pula je smještena u centru Pule, u urbanističkom području. Pod negativnim je utjecajem zagađenja iz brodogradilišta i luke u Puli.



Slika 4. Postaje uzorkovanja dagnje (*Mytilus galloprovincialis*) u sjevernom Jadranu

Nakon uzorkovanja jedinke smo prenijeli u spremnicima s morskom vodom u laboratorij.

4.4 Metode histološke analize

Nakon uzorkovanja tkivo probavne žlijezde i škruga odvojeno je škaricama. Polovice probavne žlijezde smo ohladili u tekućem dušiku te fiksirali u N-heksanu. Obradene uzorke smo pohranili na -80 °C, do pripreme histoloških preparata.

Prije kriosekcije, procesa sekcije uzorka pomoću kriotoma, uzorci su pričvršćeni za nosač mikrotoma i uklopljeni u medij O.C.T.TM (Microm Inc. GmbH, Germany).

Uzorke žlijezdi smjestili smo na nosač kriotoma (ZeissHyrax C 50, Microm GmbH, Germany) prethodno ohlađenim na -30 °C. Za pojedini uzorak od pet žlijezda pripremili smo preparate prereza debljine 10 µm. Smrznute poprečne prereze probavnih žlijezda nanijeli smo na predmetno stakalce zagrijano na sobnu temperaturu. Preparate smo bojali otopinom hematoksilina i eozima (Sigma-Aldrich, USA) na sobnoj temperaturi. Nakon bojanja, preparate smo uklopili u glicerol želatinu (Sigma – Aldrich, USA). Prisutnost i identifikaciju gljiva smo procijenili na svjetlosnom mikroskopu Nikon-SA pod povećanjem od 500x. Probavne kanaliće na kojima smo uočili gljive su slikane svjetlosnim mikroskopom koji je spojen sa CCD kamerom Ikegami ICD-803P.

4.5 Metode molekularne analize

Tkivo potrebno za molekularnu analizu smrznuto je u tekućem dušiku te pohranjeno na temperaturi od -80 °C do izolacije DNA.

4.5.1 Izolacija DNA

Koristili smo DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen za izolaciju DNA iz probavne žlijezde dagnje.

Uzorak smrznutog tkiva najprije smo držali na sobnoj temperaturi kako bi se odmrznuo.

Uzeli smo 25 mg tkiva probavne žlijezde dagnje i dobro homogenizirali uz dodatak 100 µl ALT pufera. Uzorak smo stavili u Eppendorf tube volumena 1.5 ml. Dodali smo još 80 µl pufera ALT i označili uzorke.

Zatim smo dodali 20 µl proteinaze K, kratko promiješali u vorteksu i inkubirali 60 minuta na 56°C kako bi se tkivo potpuno razgradilo uz povremeno miješanje.

Potom smo uzorke miješali 15 sekundi, dodali 200 μ l AL puferai 200 μ l etanola (96-100%). Dobivenu smjesu smo pipetirali u Mini spin kolonicu smještenu u tubicu za prikupljanje volumena 2 ml i centrifugirali 1 minutu na 600 x g (8000rpm) da bi se istaložili komadići nerazgrađenog tkiva. Nakon centrifuge, talog koji se skupio u protočnoj tubici smo odbacili. DNA je ostala na membrani Mini spin kolonice te smo membranu prebacili u novu protočnu tubicu od 2 ml. Dodali smo 500 μ l AW1 pufera da bi dodatno pročistili DNA i ponovno centrifugirali 1 minutu na 600 x g (8000rpm).

Talog iz protočne tubice smo odbacili te Mini spin kolonicu postavili u novu protočnu tubicu. U kolonice smo dodali po 500 μ L AW2 pufera, nakon toga centrifugirali 3 minute na 20000 x g (14000 rpm), te odbacili precipitat. Postavili smo Mini spin kolonice u čiste tubice od 1,5 ml i dodali po 200 μ L AE pufera, potom inkubirali 1 minutu na sobnoj temperaturi. Na kraju smo centrifugirali 1 minutu na 6000 x g (8000rpm).g

Dobiveni eluat koji sada sadrži izoliranu DNA smo spremili u hladnjak na +4 °C.

4.5.2 Lančana reakcija polimerazom

Uzorak DNA smo dodali u Master Mix, Primer F, Primer R i destiliranu vodu, ukupnog volumena od 25 μ l (Tablica 1). U reakciji smo koristili početnice Primer F TTGGCAGAGAGGGACATCTT i Primer R TTGGCTGCTTAGAGTGTCA.

Tablica 1. Reakcijska smjesa za lančanu reakciju polimerazom

| GoTaq®Flexi DNA Polymerase | volumen/ μ l | br. reakcija | Master Mix/ μ l-50 μ l |
|----------------------------|------------------|--------------|--------------------------------|
| Master Mix | 12,5 | 27 | 337,5 |
| Primer F | 1 | | 27 |
| Primer R | 1 | | 27 |
| dH2O | 8 | | 216 |
| kalup DNA | 2,5 | | |
| ukupni volumen | 25 | | 675 |

Na PCR uređaju smo namjestili temperature prikazane u tablici (Tablica 2.). Prvi korak PCR reakcije je početno denaturiranje na temperaturi od 95 °C na 5 minuta. Sljedeća tri koraka, denaturacija (95 °C / 35 sekundi), sparivanje početnica (53 °C / 35 sekundi) te produljivanje lanca (72 °C / 1 minuta), ponavljaju se u 40 ciklusa.

Zatim slijedi završno produljivanje na temperaturi od 72°C u trajanju od 10 minuta. Na kraju reakcija namještena na 4 °C.

Tablica 2. Temperaturni profil lančane reakcije polimerazom

| Temperatura | Vrijeme | Ponavljjanje |
|-------------|---------|--------------|
| 95°C | 5 min. | 1 X |
| 95°C | 35 sec | 40 X |
| 53°C | 35 sec | |
| 72°C | 1 min. | |
| 72°C | 10 min. | 1 X |
| 4°C | Hold | |

4.5.3 Priprema agaroznog gela

Izvagali smo 1 g agaroze (Agarose Broad Range, Roth) u staklenu tikvicu i dodali 100 ml TAE (1X) pufera za elektroforezu. Smjesu smo pažljivo zagrijali do vrenja da se agaroz potpuno otopi te ju ohladili na oko 60°C. Ohlađenu otopinu smo izlili u kalup u kojemu je stavljen češalj za izradu jažica. Gel se polimerizirao približno 30 minuta na sobnoj temperaturi.

4.5.4 Elektroforeza

Gel koji je u međuvremenu polimerizirao uronili smo u kadicu za elektroforezu i napunili s 2 litre TAE (1X) pufera. Nakon PCR reakcije, 5 µl PCR produkta smo stavili direktno u jažice agaroznog gela. Kao marker smo koristili 5 µl GeneRuler 1 kb (Ladder, Fermentas). Pokrenuli smo elektroforezu pri konstantnom naponu od 120 V (4 V/cm) u trajanju od 1 sata. Nakon elektroforeze, gel smo uronili u otopinu etidij-bromida (1 µg/ml) na 10 minuta kako bi se fragmenti DNA obojali. Gel smo zatim prebacili u kadicu sa dH₂O na 10 minuta na odbojavanje.

Tako pripremljen gel pogledali smo pod UV svjetlom (312 nm) transiluminatora i snimili digitalnim sistemom za dokumentaciju.

5 REZULTATI

5.1 Rezultati histološke analize

Spore *Psilocybe sp.* su zahvatile 10 % epitelnih stanica probavnih tubula dagnji iz postaje Sv. Katarina u travnju 2014., 20% na postaji ACI Pula u travnju 2014., te do 30% iz postaje Dobrova u veljači 2014. godine.

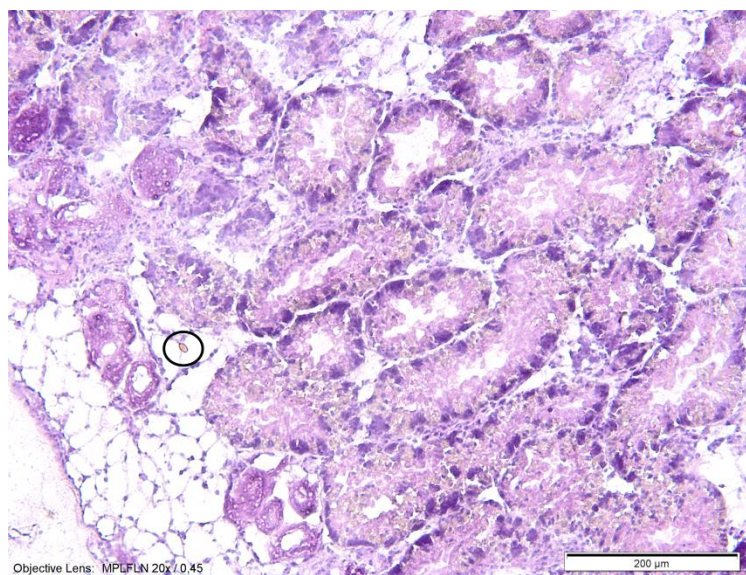
Zabilježili smo zahvaćenost od 10% sporama *Ulocladium sp.* unutar probavnih tubula školjki iz postaja izloženih zagađenju (Dobrova i ACI Marina Rovinj) u veljači, također iz kontrolne postaje (Sv. Katarina) u veljači i travnju 2014. godine.

Zabilježili smo 10% zahvaćenosti sporama *Alternaria sp.* unutar vezivnog tkiva u probavnoj žlijezdi dagnji uzorkovanih iz postaje Dobrova u veljači i travnju 2014. godine (Tablica 3.).

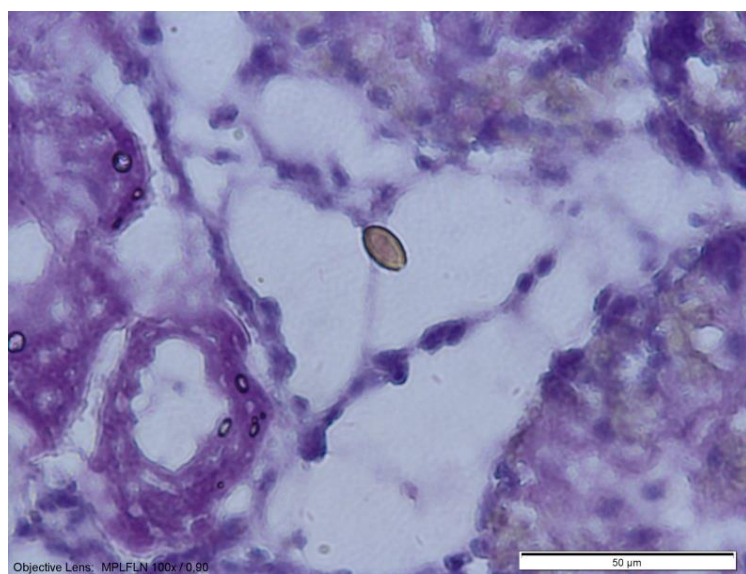
Tablica 3. Prisutnost gljiva u dagnji po postajama u veljači i travnju 2014. godine

| postaje/mjesec | <i>Psilocybe sp.</i> | | <i>Ulocladium sp.</i> | | <i>Alternaria sp.</i> | |
|----------------|----------------------|---------|-----------------------|---------|-----------------------|---------|
| | veljača | travanj | veljača | travanj | veljača | travanj |
| Dobrova | 30% | - | 10% | - | 10% | 10% |
| Strunjan | - | - | - | - | - | - |
| Seča | - | - | - | - | - | - |
| Sv. Katarina | - | 10% | 10% | 10% | - | - |
| ACI Rovinj | - | - | 10% | - | - | - |
| ACI Pula | - | 20% | - | - | - | - |

Spore *Psilocybe* sp. (Slika 5. i Slika 6.) su uočene u epitelnim stanicama probavnih tubula probavne žlijezde dagnji iz postaja koje su izložene zagađenju.

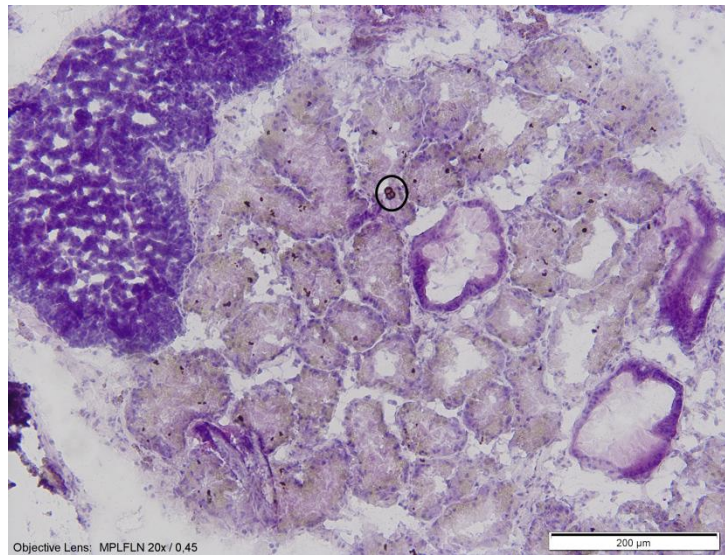


Slika 5. *Psilocybe* sp., povećanje 100X

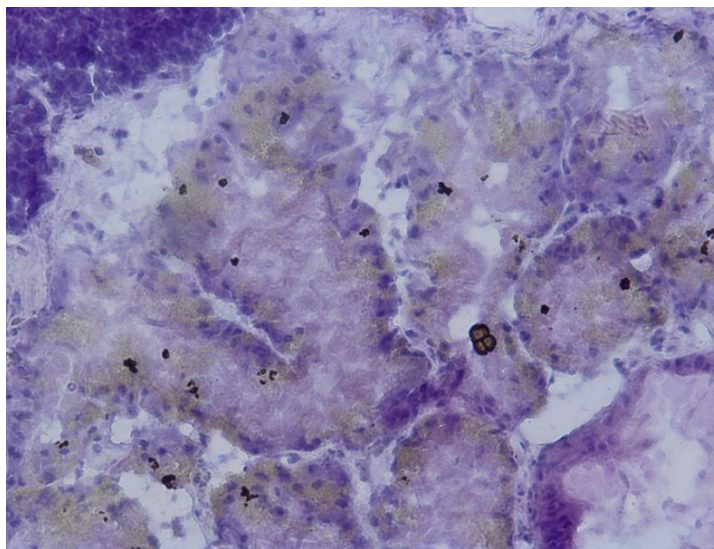


Slika 6. *Psilocybe* sp., povećanje 500X

Spore vrste *Ulocladium sp.* (Slika 7. i Slika 8.) pronađene su unutar probavnih tubula školjki iz postaja Dobrova, ACI Marina Rovinj u veljači, i Sv. Katarina u veljači i travnju 2014. godine.

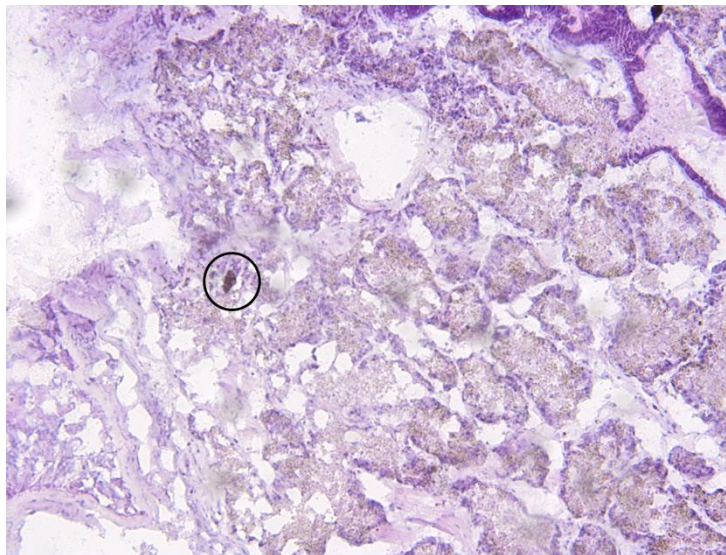


Slika 7. *Ulocladium sp.*, povećanje 100X

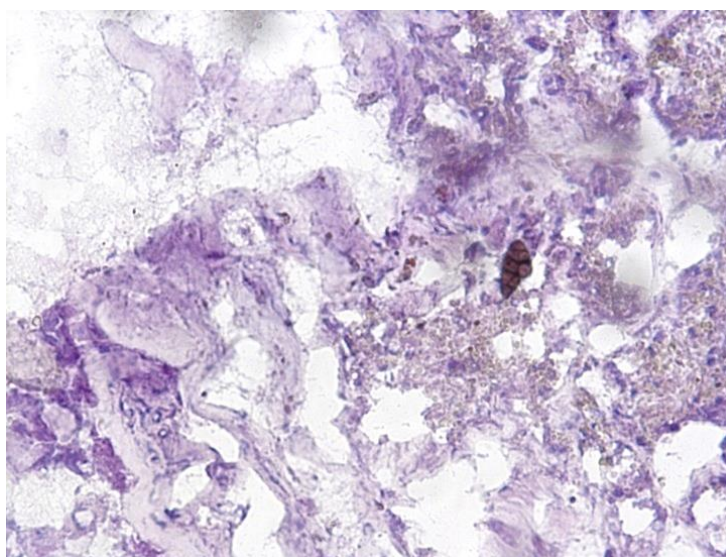


Slika 8. *Ulocladium sp.*, povećanje 500X

Spore *Alternaria* sp. (Slika 9. i Slika 10.) su zabilježene unutar vezivnog tkiva u probavnoj žlijezdi dagnji uzorkovanih iz postaje Dobrova u veljači i travnju 2014. godine.



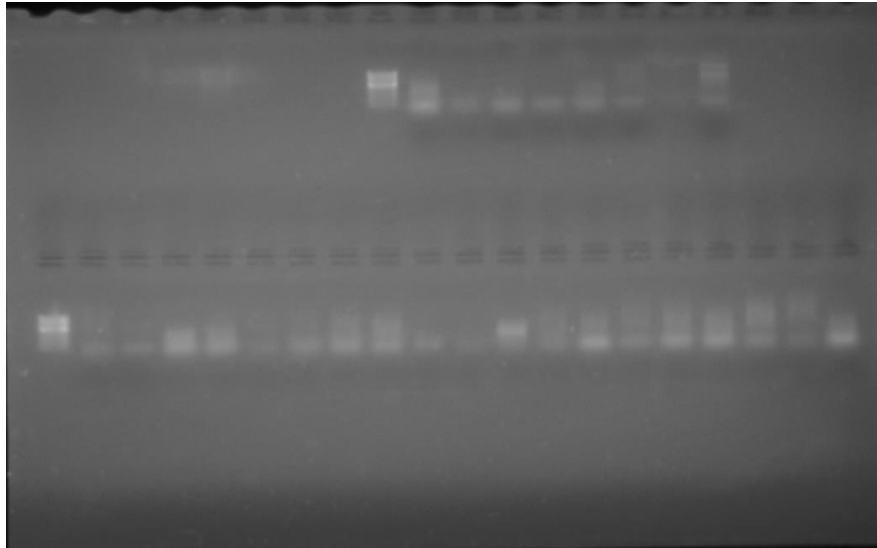
Slika 9. *Alternaria* sp., povećanje 100X



Slika 10. *Alternaria* sp., povećanje 500X

5.2 Rezultati molekularne analize

Rezultati gela molekularne analize su promatrani pod transiluminatorom. Na slici nije moguće uočiti pozitivne uzorke. U agaroznom gelu nisu vidljivi PCR produkti željene veličine. Na slici je vidljiv 1 kb marker i primer dimeri (Slika 11.).



Slika 11. Slika agaroznog gela pod UV svjetlom

6 DISKUSIJA

Dagnje roda *Mytilus* koriste se kao bioindikatorski organizam te su važne za procjenu kvalitete morskog okoliša i marikulture. One se koriste u prehrambenoj industriji, kao i u medicini, preventivnoj zdravstvenoj zaštiti i drugim komercijalnim svrhama (Venugopal 2008). *M. galloprovincialis* je dominantna školjka roda *Mytilus* (Hamer i sur. 2012). Na mediteranu *M. galloprovincialis* je učestali uzgojni organizam u marikulturi, osobito na sjevernom Jadranu (Marušić i sur. 2009). S obzirom na navedeno, istraživanja gljiva koje žive u unutarnjim organima komercijalno važnih i kultiviranih dagnji su neophodne za uspješan razvoj marikulture i sigurnu uporabu školjaka kao hrane (Zvereva & Vysotskaya 2005).

Prirodne karakteristike sjevernog Jadrana omogućuju širenje gljiva u malim, zaštićenim, obalnim područjima kao što su Strunjski i Piranski zaljev (Gombač i sur., 2014). Morske struje teku s juga uzduž istarske obale, te skreću zapadno uz slovensku obalu, i na taj način mogu prenositi parazite prema uzgajalištima sjevernoga Jadrana (Bricelj i Rejec Brancelj, 2009 i Kovačić i sur., 2016). Na širenje gljiva utječu i morske mijene tako da prenose gljive s domaćina koji živi na dnu mora do školjaka (Boehs i sur., 2010). Različiti stresori u takvim obalnim zajednicama zajedno s translokacijom vrsta kao što su balastne vode, disperzija vjetrom i klimatske promjene mogu dodatno utjecati na dinamiku gljiva, te je stoga od velike važnosti konstantno provoditi mjerenja kako bi se uklonila mogućnost zaraze parazitima (Kovačić i sur., 2018).

Histološkim metodama uočeno je i identificirano tri roda gljiva: *Ulocladium*, *Psilocybe* i *Alternaria* u uzorkovanim dagnjama s postaja Sv. Katarina, ACI Marina Pula, ACI Marina Rovinj i Dobrova. Rezultati pokazuju da je broj prisutnosti gljiva u dagnjama po postaji bio je veći na mjestima izloženim onečišćenju (Dobrova, ACI Marina Rovinj, ACI Marina Pula) u usporedbi s postajom koja nije direktno izložena zagađivalu (Sv. Katarina) i postajom u kojoj se odvija marikulturalna djelatnost (Strunjan). Na postaji Dobrova imamo zahvaćenost dagnji od 10% do 30% sa sporama *Psilocybe* sp. Na postajama izloženim zagađenju, Dobrova i ACI Marina Rovinj zabilježeno je u dagnji 10% zahvaćenosti sa sporama *Alternaria* sp. Dagnje s

postajene Sv. Katarina, ima zahvaćenost od 10% *Ulocladium sp.*, a na postaji Strunjan nije zabilježena zahvaćenost.

Iako je u histološkim preparatima utvrđena prisutnost više vrsta gljiva, molekularnim analizama nisu uspješno detektirane gljive u uzorcima. Razlog tome može biti količina uzorka za molekularnu analizu koja iznosi 25 mg, te je moguće da samim uzimanjem uzorka nismo zahvatili područje tkiva u kojem se gljive nalaze pošto nisu jednako raspoređene u probavnoj žlijezdi. Mogući razlog negativnih rezultata molekularnih analiza je i da se nije izolirala dovoljna količina DNA gljiva. Gljive su građene od hitina zbog čega je teže razbiti ovojnici te izolirati DNA.

Rješenje za buduće analize i uspješnije rezultate je korištenje histoloških presjeka za izolaciju DNA te time spriječiti uzimanje dijela tkiva koji ne sadrži gljive, te upotreba drugih kemikalija za izolaciju DNA koje su primjerenije za izolaciju DNA gljiva, tj. koje bi razgradile hitinsku ovojnici gljiva te omogućile bolju izolaciju DNA.

Rezultati dobiveni u našem istraživanju uključuju prvu evidenciju spora gljiva *Ulocladium sp.*, *Psilocibe sp.* i *Alternaria sp.* u dagnje *M. Galloprovinciali* su u sjevernom Jadranu (Kovačić i sur., 2018). Takva istraživanja su bitna jer su gljive jedne od uzročnika bolesti kod školjkaša (Santos i sur., 2017). Praćenje tih gljiva u morskim organizmima a naročito u školjkašima je ključno zbog upravljanja prirodnim staništima i marikulturom (Boehs i sur., 2010).

7 ZAKLJUČAK

1. Histološkom analizom pronađeni su rodovi gljiva *Ulocladium sp.*, *Psilocybe sp.* i *Alternaria sp.* u dagnji *M. galloprovincialis*.

2. Spore *Psilocybe sp.* nađene su u uzorku dagnji iz postaja ACI Marina Pula i Sv. Katarina u travnju 2014. i Dobrova u veljači 2014. godine; spore *Ulocladium sp.* su uočene u uzorcima dagnji iz Dobrove i ACI Marina Rovinj u veljači 2014. godine te Sv. Katarina u veljači i travnju 2014. godine, a spore *Alternaria sp.* su zabilježene u dagnji iz postaje Dobrova.

3. U dagnji s postaje Strunjan nisu pronađene spore gljiva. Iako je postaja Sv. Katarina uzeta kao kontrolna točka zbog udaljenosti od obale i onečišćenja, dagnje su ipak bile zahvaćene s gljivama.

4. Molekularnim analizama nisu detektirane gljive u uzorcima, vjerojatno jer nismo zahvatili područje tkiva u kojem se gljive nalaze te je nedovoljna količina DNA gljiva.

8 LITERATURA

Al-Suwaine AS, Bahkali AH, Hasnain SM (1999) Seasonal incidence of airborne fungal allergens in Riyadh. Saudi Arabia Mycopaythologia 145:15–22

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2014) Molecular Biology of the Cell (6th ed.). Garland. p. Chapter 4: DNA, Chromosomes and Genomes

Armisen, R., Galatas, F. (1987) Production, Properties and Uses of Agar - Chapter 1, Production and Utilization of Products From Commercial Seaweed; Ed. McHugh, D. J. FAO Fisheries Technical Paper No. 288; Rome.

Bricelj, M. and Rejec, Brancelj I. (2009) Integrated coastal zone management: case study on the Slovenian Mediterranean = Celovito upravljanje obalnega območja. Varstvo narave. 22, 47-62

Burgos-Aceves, M.A. and Faggio, C. (2017) An approach to the study of the immunity functions of bivalve haemocytes: Physiology and molecular aspects. Fish and Shellfish Immunology, 67,513-517

Burgos-Aceves, M.A., Cohen, A., Smith, Y. and Faggio, C. (2018) A potential microRNA regulation of immune-related genes in invertebrate haemocytes. Science of the Total Environment, 621,302-307

Boehs, G., Villalba, A., Ceuta, L.O. and Luz, J.R. (2010) Parasites of three commercially exploited bivalve mollusc species of the estuarine region of the Cachoeira river (Ilheus, Bahia, Brazil). Journal of Invertebrate Pathology, 103(1), 43-47

Cooper, G.M., Hausman, R.E. (2004) *The Cell: A Molecular Approach*, Washington, D.C.: Sunderland, Mass.: ASM Press

Ceccherelli, V.U., Rossi, R. (1984) Settlement, growth and production of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Ecology Progress Series* 16, 173-184.

Duraković, S. (1991) Prehrambena mikrobiologija - Gljive - morfologija i sistematika, Medicinska naklada Zagreb, 71-83

Dadachova, E., Bryan, RA, Huang, X., Moadel, T., Schweitzer, AD, Aisen, P., Nosanchuk, JD, Casadevall, A. (2007) Ionizing radiation changes the electronic properties of melanin and enhances the growth of melanized fungi. Department of Nuclear Medicine, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York, United States of America

Ein-Gil, N., Ilan, M., Carmeli, S., Smith, G.W., Pawlik, J.R. and Yarden, O. (2009) Presence of *Aspergillus sydowii*, a pathogen of gorgonian sea fans in the marine sponge *Spongia obscura*. *Isme Journal*, 3(6), 752-755

Faggio, C., Tsarpali, V. and Dailianis, S. (2018) Mussel digestive gland as a model for 441 assessing xenobiotics: an overview. *Science of the Total Environment*. in press

Gardner, J. P. A. (2012) *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) (Bivalvia, Mollusca): The Taxonomic Status of the Mediterranean Mussel, *Ophelia*. 35: 219–243.

Gombač, M. (2010) Protozoan infestation dynamics and occurrence of neoplasias in digestive gland of Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in Slovene Sea in correlation with sea temperature, salinity and oxygenation. PhD Thesis. Ljubljana University, Ljubljana, Slovenia

Gosling, E. (1992) The mussel *Mytilus*: eology, physiology, genetics and culture. *Developments in aquaculture and fisheries science*, 25: 589.

Gravesen S, Nielsen PA, Iversen R, Nielsen KF (1999) Microfungal contamination of damp buildings—examples of risk constructions and risk materials. *Environmental Health Perspect* 107: 505–508

Hamer, B., Korlević, M., Durmiši, E., Nerlović, V. & Bjerne, N. (2012) Nuclear marker Me 15-16 analyses of *Mytilus galloprovincialis* populations along the eastern Adriatic coast. *Cahiers de Biologie Marine* 53(1): 35-44

Hawksworth DL, Lücking R (2017) Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species". *Microbiology Spectrum*. 5:79.

Hofmann, A., Heim, R., Brack, A., Kobel, H., Frey, A., Ott, H., Petrzilka, T., Troxler, F. (1959) Psilocybin und Psilocin, zwei psychotrope Wirkstoffe aus mexikanischen Rauschpilzen [Psilocybin and psilocin, two psychotropic substances in Mexican magic mushrooms]. *Helvetica Chimica Acta* (in German). 42 (5): 1557–72

de Hoog GS, Horre R (2002) Molecular taxonomy of the *Alternaria* and *Ulocladium* species from humans and their identification in the routine laboratory. *Mycoses* 45:259–276. doi:10.1046

James S. Lowe BMedSci, BMBS, DM, FRCPath, Peter G. Anderson DVM, PhD, in **Stevens & Lowe's** (2015) *Human Histology* (Fourth Edition)

Jørgensen, C.B.(1990) *Bivalve Filter Feeding: Hydrodynamics, Bioenergetics, Physiology and Ecology*. Olsen & Olsen

Kovačić, I. (2015) Aktivnost kisele deoksiribonukleaze i histokemijske promjene u lizosomima. Doktorska disertacija.

Kovačić, I., Pavičić-Hamer, D., Pfannkuchen, M., Usich, M. (2016) *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) as host of *Mytilicola orientalis* (Mori, 1935) in the northern Adriatic Sea: presence and effect. *Aquaculture International*, 1-11

Kovačić, I. i Pustijanac, E. (2017) Parasites and endobiotic fungi in digestive gland cryosections of the mussel *Mytilus galloprovincialis* in the Northern Adriatic, Croatia. *Oceanological and Hydrobiological Studies*. 46:414

Kovačić, I., Pustijanac, E., Ramšak, A., Šebešćen, D., Lipić, S. (2018) Variation of parasite and fungi infection between farmed and wild mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) from the Adriatic Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 10.1017/S0025315418000644(u postupku objavljivanja)

Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA (2008) *Dictionary of the Fungi*. 10th ed. Wallingford: CABI. p. 22

Kratz, R. F. and Siegfried, D. R. (2010) Using gel electrophoresis to separate molecules. In *Biology for dummies* (2nd ed., pp. 132-133). Hoboken, NJ: John Wiley & Sons

Lačković, V., Nikolić, I., Todorović V. (2014) Osnovna i oralna histologija i embriologija, Data Status, Beograd

Largent DL, Baroni TJ (1988) "How to Identify Mushrooms to Genus VI: Modern Genera". Eureka, California: Mad River Press

Marušić, N., Vidaček, S., Medić, H. & Petrak, T. (2009) Index kondicije dagnji (*Mytilus galloprovincialis*) u uvali Budava i zaljevu Raša. *Ribarstvo* 67(3): 19-25

Mišura, A., I. Jahutka, N. Skakelja, J. Suić, V. Franičević (2008) Hrvatsko ribarstvo u 2007. godini. *Ribarstvo*, 66(4), 157–175

Mubiana, V. K., Vercauteren, K., Blust, R. (2006) The influence of body size, condition index and tidal exposure on the variability in metal bioaccumulation in *Mytilus edulis*. *Environmental Pollution* 144: 272-279

Pavičić-Hamer D., Kovačić I., Koščica L., Hamer B. (2016) Physiological indices of maricultured mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 in Istria, Croatia: seasonal and transplantation effect. *Journal of the World Aquaculture Society* 47, 768–778.

Piljac, I. (2006) *Elektroforeza*. Zagreb: Media Print. Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu. ISBN 953-95404-0-2

Prescott, L.M. , Harley, J.P. , Klein, D.A. (2002) *Microbiology - The Fungi (Eumycota), Slime Molds, and Water Molds*, McGraw Hill, 553-564

Raghukumar, C., Raghukumar, S. (1998) "Barotolerance of fungi isolated from deep-sea sediments of the Indian Ocean" *Aquatic Microbial Ecology*. 15 (2): 153–163

Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., and Jackson, R. B. (2011) *Amplifying DNA: The polymerase chain reaction (PCR) and its use in DNA cloning* (414-416). San Francisco, CA: Pearson

Reece, J. B., Taylor, M. R., Simon, E. J., and Dickey, J. L. (2012) DNA profiling. In *Campbell biology: Concepts & connections* (7th ed., pp 242-246).

Reece, J. B., Taylor, M. R., Simon, E. J., and Dickey, J. L. (2012) Gel electrophoresis sorts DNA molecules by size. In *Campbell biology: Concepts & connections* (7th ed., p. 243)

Sallenave-Namont, C., Pouchus, Y.F., Robiou du Pont, T., Lassus, P. and Verbist, J.F. (2000) Toxigenic saprophytic fungi in marine shellfish farming areas. *Mycopathologia*, 149(1), 21-25

Santos A., Hauser-Davis R.A., Santos M.J.S. and De Simone, S.G. (2017) Potentially toxic filamentous fungi associated to the economically important *Nodipecten nodosus*. *Marine Pollution Bulletin* 115, 75–79

Savorelli, F., Manfra, L., Croppo, M., Tornambè, A., Palazzi, D., Canepa, S., Trentini, P.L., Cicero, A.M. and Faggio, C. (2017) Fitness Evaluation of *Ruditapes philippinarum* Exposed to Ni. Biological Trace Element Research, 177(2),384-393

Seed, R. (1976) Ecology. In: Bayne, B.L. Marine Mussels. Cambridge University Press, Cambridge

Seed, R., Suchanek, T.H., (1992) Population and community ecology of *Mytilus*, in: G. E. (Ed.), The Mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture, 87–169

Speers DJ (2006) Clinical applications of molecular biology for infectious diseases. The Clinical Biochemist Reviews 27: 39-51

Venugopal, V. (2008) Marine products for healthcare: functional and bioactive nutraceutical compounds from the ocean. CRC press, 371-393.

Viarengo, A., Lowe, D. Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A. (2007) Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, pages 281-300

Zvereva, L.V. & Vysotskaya, M.A. (2005) Filamentous fungi associated with bivalve mollusks from polluted biotopes of Ussuriiskii Bay, Sea of Japan. Russian Journal of Marine Biology 31(6): 382-385.

Zhang, Y., Mu, J., Feng, Y., Kang, Y., Zhang, J., Gu, P.J., Wang, Y., Ma, L.F. and Zhu, Y.H. (2009) Broad-Spectrum Antimicrobial Epiphytic and Endophytic Fungi from Marine Organisms: Isolation, Bioassay and Taxonomy. Marine Drugs, 7(2), 97-112

Župan, I., Šarić, T. (2014) Prirast i indeks kondicije – dva važna čimbenika u uzgoju dagnji. MESO, XVI: 255 – 259

Popis slika

- Slika 1. Vanjski izgled mediteranske dagnje (*M. galloprovincialis*)
- Slika 2. Geografska rasprostranjenost dagnje (*M. galloprovincialis*)
- Slika 3. Brzina putovanja čestica kroz gel
- Slika 4. Postaje uzorkovanja dagnje (*Mytilus galloprovincialis*) u sjevernom Jadranu
- Slika 5. *Psilocybe* sp., povećanje 100X
- Slika 6. *Psilocybe* sp., povećanje 500X
- Slika 7. *Ulocladium* sp., povećanje 100X
- Slika 8. *Ulocladium* sp., povećanje 500X
- Slika 9. *Alternaria* sp., povećanje 100X
- Slika 10. *Alternaria* sp., povećanje 500X
- Slika 11. slika agaroznog gela pod UV svjetlom

Popis tablica

- Tablica 1. Reakcijska smjesa za lančanu reakciju polimerazom
- Tablica 2. Temperaturni profil lančane reakcije polimerazom
- Tablica 3. Prisutnost gljiva u dagnji po postajama u veljači i travnju 2014. godine

SAŽETAK

Gljive su važna skupina mikroorganizama prisutnih u morskom okolišu i u morskim organizmima. U ovom radu, ispitivano je prisutnost gljiva u mediteranskoj dagnji *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819. Uzorci dagnji su uzeti sa šest postaja: ACI Marina Pula, otok Sv. Katarina, ACI Marina Rovinj, Strunjan, Seča i Dobrova. Dvije postaje su uzete kao kontrolne točke: postaja Sv. Katarina zbog toga jer nema izvora onečišćenja u blizini, samo donos strujama iz rovinjske luke, te postaja Strunjan, uzgajalište dagnji. Dagnje su uzorkovane u veljači i travnju 2014. godine. Određivali smo prisutnost gljiva u probavnoj žlijezdi dagnji pomoću histološke i molekularne analize. Histološkom analizom utvrdili smo prisutnost i identificirali tri roda gljiva: *Ulocladium*, *Psilocibe* i *Alternaria*. Rodovi gljiva nađeni su u probavnoj žlijezdidagnji uzorkovanih na postajama Dobrova, ACI Marina Rovinj, ACI Marina Pula i Sv. Katarina. Na postaji Strunjan i Seča nisu uočene gljive u dagnji. Molekularnom analizom nisu nađene gljive u tkivima uzorkovanih dagnji.

Ključne riječi: histološka analiza, molekularna analiza, gljive, PCR, elektroforeza

SUMMARY

Fungi are an important constituent of microbes in marine environment and marine organisms. In this study, we investigated fungi in Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*, Lamarck 1819. Samples were taken from six stations: ACI Marina Pula, Sv. Katarina, ACI Marina Rovinj, Strunjan, Seča and Dobrova. We have taken two as control points: Sv. Katarina because there is no source of pollution in the vicinity, only by currents from the port of Rovinj, and Strunjan, a mussel farm. Mussels were sampled in February and April 2014. We determined the presence of fungi in digestive glands by histological and molecular analysis. By histological analysis, we identified the presence and identification of three fungi genus: *Ulocladium*, *Psilocibe*. i *Alternaria*. Fungal species were found in the digestive glands sampled at Dobrova, ACI Marina Rovinj, ACI Marina Pula and Sv. Catherine. No fungi were observed at Strunjan and Seča stations. Molecular analysis showed no fungi in the tissues of sampled mussels.

Key words: histological analysis, molecular analysis, fungi, PCR, electrophoresis

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Emini Pustijanac i komentorici doc.dr.sc. Ines Kovačić na pomoći, savjetima i strpljenju tijekom izrade završnog rada i provedbi eksperimenta.

Zahvaljujem Centru za istraživanje mora, Instituta Ruđer Bošković u Rovinju i Centru za istraživanje materijala Istarske županije Metrisu u Puli na ustupljenom prostoru i laboratorijskoj opremi.