

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA
IDENTIFIKACIJA POTENCIALNO TOKSIČNEGA
FITOPLANKTONSKEGA RODU *PSEUDO-NITZSCHIA*
V TRŽAŠKEM ZALIVU S POUDARKOM NA
GENETSKI ANALIZI

AJA BONČINA

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Zaključna naloga

**Identifikacija potencialno toksičnega fitoplanktonskega rodu
Pseudo-nitzschia v Tržaškem zalivu s poudarkom na genetski
analizi**

(Identification of the potentially toxic phytoplankton genus *Pseudo-nitzschia* in
the Gulf of Trieste with emphasis on genetic analysis)

Ime in priimek: Aja Bončina

Študijski program: Biodiverziteta

Mentor: izr. prof. dr. Patricija Mozetič

Somentor: Timotej Turk Dermastia, mag. ekosist. upravljanja z morskimi viri

Koper, september 2018

Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Aja BONČINA

Naslov zaključne naloge: Identifikacija potencialno toksičnega fitoplanktonskega rodu *Pseudo-nitzschia* v Tržaškem zalivu s poudarkom na genetski analizi

Kraj: Koper

Leto: 2018

Število strani: 43 Število slik: 15 Število preglednic: 5

Število referenc: 113

Mentor: izr. prof. dr. Patricija Mozetič

Somentor: Timotej Turk Dermastia, mag. ekosistemskega upravljanja z morskimi viri

Ključne besede: *Pseudo-nitzschia*, identifikacija, filogenetska analiza, *rbcL*, 28S, ITS1-5.8S-ITS2, Tržaški zaliv

Izvleček: *Pseudo-nitzschia* je globalno razširjen rod planktonskih diatomej. Nekatere vrste roda proizvajajo domojsko kislino, nevrotoksin, ki povzroča amnezijsko zastrupitev školjk, zato je identifikacija vrst izjemno pomembna z vidika ohranjanja zdravega ekosistema in zdravja ljudi. Ker v Tržaškem zalivu vrstna sestava rodu še ni poznana, smo v okviru zaključne naloge, ki je bila del večjega projekta, skušali: (a) identificirati vrste iz rodu *Pseudo-nitzschia*, ki so prisotne v slovenskem morju; (b) ugotoviti, ali so identificirane vrste iste, kot jih omenjajo v dosedanjih raziskavah v severnem Jadranu; (c) ugotoviti uporabnost markerja velike podenote Rubisca (*rbcL*) za identifikacijo vrst rodu *Pseudo-nitzschia* v primerjavi z uporabo markerjev 28S in ITS1-5.8S-ITS2; (d) preveriti hipotezo, da s filogenetsko analizo velike podenote Rubisca dobimo večji spekter informacij kot na regiji ITS1-5.8S-ITS2 ali 28S, in da se bodo filogenetska drevesa med seboj razlikovala. Na podlagi genetskih analiz smo v slovenskem morju identificirali šest potencialno toksičnih vrst fitoplanktonskega rodu *Pseudo-nitzschia*: *P. fraudulenta*, *P. manii*, *P. delicatissima*, *P. multistriata*, *P. calliantha* in *P. pungens*. Ugotovili smo, da se filogenetska drevesa v različnih regijah razlikujejo. Vpogled v filogenijo vrst z markerjem *rbcL* je bolj podroben, saj omogoča večjo intraspecifično divergenco vrst znotraj rodu *Pseudo-nitzschia* v primerjavi z ITS1-5.8S-ITS2 in 28S.

Key words documentation

Name and SURNAME: Aja BONČINA

Title of the final project paper: Identification of the potentially toxic phytoplankton genus *Pseudo-nitzschia* in the Gulf of Trieste with emphasis on genetic analysis

Place: Koper

Year: 2018

Number of pages: 43 Number of figures: 15 Number of tables: 5

Number of references: 113

Mentor: Assoc. Prof. Patricija Mozetič, PhD

Somentor: Timotej Turk Dermastia, MSc. Ecosystem-based Managment of Marine Systems

Keywords: *Pseudo-nitzschia*, identification, phylogenetic analysis, *rbcL*, 28S, ITS1-5.8S-ITS2, Gulf of Trieste

Abstract: *Pseudo-nitzschia* is a globally distributed genus of planktonic diatoms. Some species of *Pseudo-nitzschia* can produce domoic acid, a neurotoxin, which causes amnesic shellfish poisoning. Therefore, the species identification is extremely important for the maintenance of healthy marine ecosystems as well as human health. Since the species composition in the Gulf of Trieste is still unknown, the goal of this work was to: (a) identify the species of *Pseudo-nitzschia* distributed in the Slovenian sea; (b) compare our results of phylogenetic analysis based on different genome markers with known surveys of *Pseudo-nitzschia* in the northern Adriatic sea; (c) find out the advantage of Large Subunit of Rubisco (*rbcL*) as a phylogenetic marker, compared to 28S and ITS1-5.8S-ITS2 regions; (d) verify if the phylogenetic analysis based on the Large Subunit of the Rubisco is more informative than phylogenetic analysis based on ITS1-5.8S-ITS2 or 28S marker and if the phylogenetic trees will differ from each other. By applying genetic analysis, we identified six potentially toxic species of *Pseudo-nitzschia* in the Slovenian sea: *P. fraudulenta*, *P. manii*, *P. delicatissima*, *P. multistriata*, *P. calliantha* and *P. pungens*. We confirmed that phylogenetic trees based on different markers differ from each other. We also partially confirmed that *rbcL* marker is more informative, because it allows for a greater intraspecific divergence among the species of the genus *Pseudo-nitzschia*, compared to ITS1-5.8S-ITS2 and 28S markers.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem izr. prof. dr. Patriciji Mozetič za sprejetje mentorstva in usmerjanje pri pisanju zaključne naloge, ter za vso priporočeno relevantno literaturo. Iskreno se zahvaljujem tudi za vestno sodelovanje, ter celoten pregled zaključne naloge.

Prav tako bi se neizmerno zahvalila somentorju Timoteju Turku Dermasti-i, mag. ekosistemskega upravljanja z morskimi viri, za priporočeno relevantno literaturo in usmerjanje pri laboratorijskem delu projektne dela. Neizmerno sem mu hvaležna za ves čas, ki mi ga je posvetil za uvajanje v laboratorijsko delo, ter vestno razlago vsake nejasnosti v genetskih analizah. Prav tako bi se iskreno zahvalila za njegovo zaupanje vzorcev. Njegovo predhodno delo je zajemalo vzorčenje fitoplanktona v severnem Jadranu, vzgajanje živih kultur roda *Pseudo-nitzschia* ter ekstrakcija DNK vzorcev. Njegovo predhodno delo je vključevalo tudi pridobivanje sekvenc na 28S in ITS1-5.8S-ITS2 regijah. Na podlagi njegovega trdega in kompleksnega predhodnega dela je nastala moja zaključna naloga, zato sem mu neizmerno hvaležna za ves čas in trud, ki ga je nesebično vložil. Zahvaljujem se tudi za pomoč pri iskanju ustreznega PCR protokola in za vso dobro voljo in vztrajnost pri delu. Hvaležna sem mu tudi za vsa nova znanja, ki mi jih je nesebično prenesel, od raznoraznega laboratorijskega dela do uporabe programov za filogenetske analize. Zahvaljujem se tudi za pomoč pri izrisovanju filogenetskih dreves in analizi rezultatov.

Posebno se zahvaljujem Morski biološki postaji Piran Nacionalnega inštituta za biologijo, za omogočanje laboratorijskega in raziskovalnega dela v njihovih prostorih.

Navsezadnje bi se iskreno zahvalila vsem, ki so mi potrpežljivo stali ob strani, predvsem družini in fantu. Hvala vam za vso moralno podporo in nesebično vztrajanje skozi vsa leta mojega študija. Brez vas v življenju nikoli ne bi imela priložnosti, da sledim svojim željam po izobraževanju, kakršno ste mi nesebično ponudili.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
1.1	Značilnosti rodu <i>Pseudo-nitzschia</i>	1
1.1.1	Pomembnost raziskovanja rodu <i>Pseudo-nitzschia</i>	2
1.1.2	Morfologija.....	3
1.1.3	Taksonomija in razširjenost vrst.....	4
1.1.4	Razmnoževanje.....	5
1.2	Identifikacija vrst rodu <i>Pseudo-nitzschia</i>	7
1.2.1	Identifikacija na podlagi morfoloških lastnosti	7
1.2.2	Identifikacija z molekularno genetskimi metodami	8
1.3	Raziskave vrst rodu <i>Pseudo-nitzschia</i> v severnem Jadranu.....	13
1.4	Raziskovalne hipoteze in cilji	14
2	MATERIALI IN METODE	14
2.1	Pridobivanje in priprava vzorcev.....	15
2.2	Pomnoževanje izbranih fragmentov z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) 16	
2.2.1	Priprava reakcijskih mešanic in temperaturni protokoli pomnoževanja (reakcije PCR)	16
2.3	Analiza produktov reakcij PCR	18
2.3.1	Priprava vzorcev za agarozno gelsko elektroforezo	18
2.3.2	Priprava agaroznega gela in ločevanje produktov reakcij PCR	19
2.3.3	Sekveniranje produktov reakcij PCR	21
2.4	Analiza nukleotidnih zaporedij	21
2.5	Izris filogenetskih dreves	22
3	REZULTATI Z DISKUSIJO.....	22
3.1	Filogenetska analiza regije <i>rbcL</i>	22
3.2	Filogenetska analiza regije ITS1-5.8S-ITS2.....	27
3.3	Filogenetska analiza regije 28S	28
3.4	Interpretacija rezultatov	30
4	ZAKLJUČEK	30
5	LITERATURA IN VIRI.....	33

KAZALO PREGLEDNIC

<i>Preglednica 1: Pregled tipov školjčič v slovenskem morju.....</i>	15
<i>Preglednica 2: Reagenti za pripravo reakcijske mešanice PCR.....</i>	17
<i>Preglednica 3: Podatki o začetnih oligonukleotidih f in r.....</i>	17
<i>Preglednica 4: Temperaturni protokoli verižnih reakcij s polimerazo (PCR)</i>	18
<i>Preglednica 5: Evidenca pridobljenih sekvenc z vrstno pripadnostjo</i>	26

KAZALO SLIK

<i>Slika 1: Pseudo-nitzschia</i> spp.....	1
<i>Slika 2: Sinteza dejavnikov, ki vplivajo na produkcijo domojске kisline</i>	3
<i>Slika 3: Morfologija frustule</i>	4
<i>Slika 4: Razširjenost potencialno toksičnih vrst rodu Pseudo-nitzschia</i>	5
<i>Slika 5: Shematski prikaz spolnega razmnoževanja rodu Pseudo-nitzschia.</i>	6
<i>Slika 6: Primer filogenetskih dreves na različnih genetskih markerjih</i>	9
<i>Slika 7: Filogenetsko drevo sekvenc rbcL</i>	12
<i>Slika 8: Mesto vzorčenja.</i>	15
<i>Slika 9: Pipetiranje produktov PCR na parafilm</i>	19
<i>Slika 10: Standardna DNK lestvica.</i>	19
<i>Slika 11: Kalup za pripravo agaroznega gela</i>	20
<i>Slika 12: Primer uspešno pomnoženih produktov PCR, vidnih pod UV-lučjo transluminatorja.</i>	20
<i>Slika 13: Filogenetska analiza na podlagi regije rbcL</i>	24
<i>Slika 14: Filogenetska analiza na podlagi regije ITS1-5.8S-ITS2</i>	28
<i>Slika 15: Filogenetska analiza na podlagi regije 28S</i>	29

KAZALO PRILOG

Priloga A: Seznam in geografska razširjenost 37 vrst rodu *Pseudo-nitzschia*. Podatek o skupini (*delicatissima*, *seriata*, ni skupine) je določen na podlagi širine celice (ožje od 3 μm spadajo v skupino *delicatissima*; širše od 3 μm pa v skupino *seriata*), ki je izmerjena pod svetlobnim mikroskopom. Podatek o toksičnosti 'da/ne' je pri tistih vrstah, kjer se sposobnost sinteze domojke kisline razlikuje glede na različne seve (povzeto po Lelong in sod. 2012).

Priloga B: Podatki o analiziranih sekvencah regije *rbcL*. Za nekatere vrste je v podatkovni bazi GenBank dostopnih več sekvenc.

SLOVAR

Cvetenje: množična namnožitev planktonskih organizmov.

Črtna koda DNK: črtne kode DNK se uporabljajo za določevanje vrst z uporabo kratkih standardiziranih nukleotidnih zaporedij. Tako kot črtna koda določa izdelek, je kratka sekvenca DNK črtna koda »odtis« vrste.

Gametangij: struktura, v kateri nastajajo gamete.

Gametangiogamija: oblika spolnega razmnoževanja, pri katerem ne nastajajo spolne celice, ampak prihaja do združitve gametangijev.

Gamete: spolne celice, ki nastajajo v fazi mejotske delitve. Vsebujejo haploidno število kromosomov. Proces dozorevanja gamet se imenuje gametogeneza.

Haplotip: kombinacija alelov ali nukleotidnega zaporedja DNK, ki je haploidna (in ne diploidna). To je skupina genov ali kombinacija alelov, ki se podeduje v celoti od enega samega starša. Beseda »haplotip« izhaja iz besede »haploid«, ki opisuje celice s samo enim nizom kromosomov.

Heterotalični organizmi: organizmi, pri katerih je nemogoče križanje (zlitja celic in jeder) dveh celic, nastalih iz iste oz. genetsko identične zasnove (gametangiji). Omenjeno križanje ni mogoče zaradi genetske inkompatibilnosti (neujemanja), tj. jedra z enako genetsko zasnovo se odbijajo (+ : + ; - : -), zato se gamete ne zlijejo in ne tvorijo zigote. Moške gamete predstavljajo +, ženske pa -. Za uspešno razmnoževanje heterotaličnih organizmov sta torej potrebni tako moška kot ženska gameta. Pri diatomejah to pomeni, da ločeni kloni posebej proizvajajo moške in ženske gamete, ki ob zlitju tvorijo zigoto.

Hibridna cona: je širše geografsko območje, kjer se srečata dve genetsko različni populaciji, vrsti ali podvrsti, se med seboj razmnožujeta in producirata potomce z mešanimi genetskimi lastnostmi.

Intraspecifična divergenca: znotrajvrstna pestrost, ki je posledica divergentnega razvoja, tj. razvoja, pri katerem organizmi s skupnim prednikom postajajo vedno bolj različni. Bolj kot sta si dve vrsti (oz. podvrsti) sorodni, bližje v preteklosti je živel njun zadnji skupni prednik in manjše so njune razlike v genetskem zapisu.

Morfometrija: je kvantitativna analiza oblike, tj. štetje ali meritve dolžine oz. širine morfoloških znakov.

Parafiletska skupina: skupina, ki ne vključuje vseh potomcev skupnega prednika.

Plankton: večinoma mikroskopski organizmi, ki lebdiijo v vodi, njihov trenutni položaj pa je odvisen od premikanja vodnih mas s površinskimi tokovi.

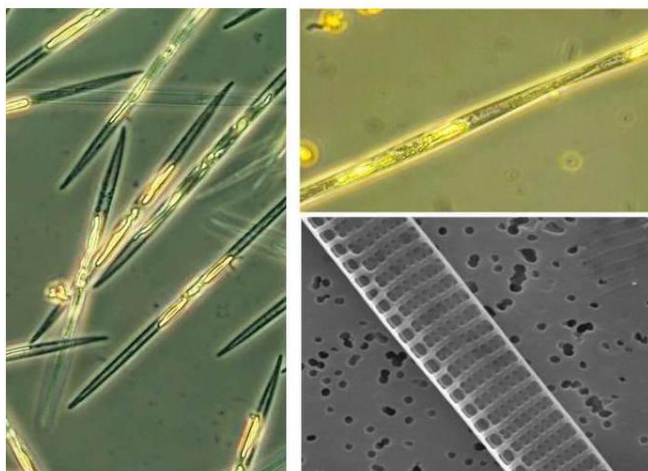
Primarni producenti (osnovni proizvajalci): organizmi, ki v procesu fotosinteze (in kemiosinteze) sintetizirajo kompleksne organske spojine iz anorganskih spojin. Imajo pomembno vlogo pri kroženju snovi in privzemu CO₂.

1 UVOD

Diatomeje ali kremenaste alge so izjemno pomemben del fitoplanktonske združbe morij in oceanov, saj prispevajo kar 25 % k svetovni primarni produkciji (Werner 1977; Willén 1991). Večina diatomej spada v velikostni razred mikroplanktona (od 20 do 200 µm; Parkinson in Gordon 1999). Med zanimive predstavnike morskih diatomej spadajo vrste rodu *Pseudo-nitzschia*. *Pseudo-nitzschia* je globalno razširjen rod diatomej. Nekatere vrste proizvajajo domojsko kislino (angl. *domoic acid*), nevrotoksin, ki povzroča amnezijsko zastrupitev s školjkami (ASP, angl. *amnesic shellfish poisoning*; Bates in sod. 1989). Ker so višji členi prehranjevalnih spletov odvisni od primarnih producentov, je sinteza domojske kisline rodu skrb vzbujajoč pojav, ki lahko vpliva na celoten morski ekosistem (Bejarano in sod. 2008) ter na človekovo zdravje in različne gospodarske dejavnosti (Perl in sod. 1990), zaradi česar je identifikacija vrst izjemno pomembna. Ker v slovenskem morju vrstna sestava diatomejskega rodu *Pseudo-nitzschia* še ni podrobno raziskana, želim v svoji zaključni nalogi predstaviti identifikacijo vrst rodu *Pseudo-nitzschia*, prav tako pa podati vpogled v sorodstvene filogenetske odnose vrst znotraj rodu s pomočjo genetskih analiz različnih regij genoma.

1.1 Značilnosti rodu *Pseudo-nitzschia*

Pseudo-nitzschia H. Peragallo 1899 (slika 1) je eden izmed najpogostejših rodov diatomej morskega fitoplanktona. Pojavlja se v polarnih, zmernih, subtropskih in tropskih območjih po vsem svetu (Lundholm in sod. 2002a). Nekaj vrst rodu je kozmopolitskih, tj. globalno razširjenih: *P. australis*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta*, *P. multiseriata*, *P. pseudodelicatissima* in *P. pungens* (Hasle 2002). Potencialno kozmopolitsko razširjene so tudi vrste v prilogi A, ki imajo široko geografsko razširjenost (Hasle 2002; Lelong in sod. 2012).



Slika 1: *Pseudo-nitzschia* spp. (vir: www.microalgae.org)

Kozmopolitsko razširjenost nekaterih vrst pojasni izjemna toleranca v velikih razponih temperature vode (od -1.5 do 30 °C; Bates in sod. 1998), slanosti (od 1 do 39,8; Thessen in sod. 2005) in pH morske vode (od 2 do 12; Lundholm in sod. 2004).

Rod *Pseudo-nitzschia* spada v skupino penatnih diatomej z vzdolžno simetrijo. Značilnost rodu je sposobnost oblikovanja verig, s čimer se več posameznih celic poveže v celoto (Hasle 1994). Dolžina verige je vrstno specifična, kljub temu pa je odvisna od nekaterih okoljskih dejavnikov, kot sta koncentracija hranilnih snovi v vodi in turbulenca (vrtinčenje, mešanje) vodnih slojev (Lundholm in sod. 2002a).

Za rod *Pseudo-nitzschia* so značilna monospecifična cvetenja, tj. cvetenja izključno ene vrste (Trainer in sod. 2009a), ki so še posebej obsežna v neritičnem območju (obalna morja nad šelfom ali kontinentalno polico) in ki so lahko toksična (Anderson in sod. 2006). Okoljski dejavniki, ki spodbujajo toksična cvetenja, so kompleksni in specifični za območja, kjer se taka cvetenja pojavljajo (zalivi, obalni predeli ali odprti ocean) (Trainer in sod. 2012).

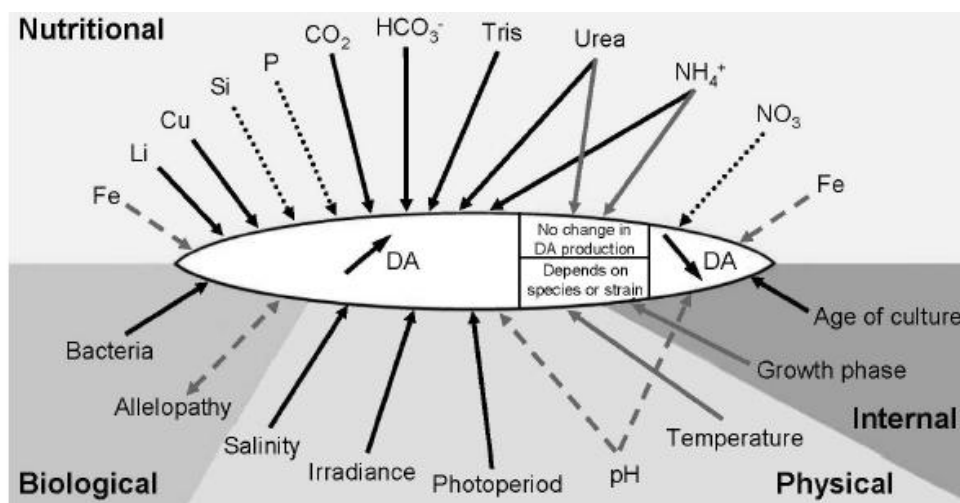
1.1.1 Pomembnost raziskovanja rodu *Pseudo-nitzschia*

Zanimanje za raziskovanje roda *Pseudo-nitzschia* se je izjemno povečalo po letu 1987, ko je prišlo do prve ASP zastrupitve na otoku Princa Edwarda v Kanadi. Vzrok množične zastrupitve ljudi je bilo prehranjevanje z užitnimi klapavicami (*Mytilus edulis*), ki so vsebovale domojisko kislino (Bates in sod. 1998). Zaradi zastrupitve so umrli trije starejši ljudje, več kot 100 ljudi pa je utrpelo negativne učinke ASP (Bates in sod. 1998; Pulido 2008). Ugotovili so, da je prisotnost domojiske kisline v školjkah posledica cvetenja vrste *Pseudo-nitzschia multiseries*, s katero so se prehranjevale filtratorske užitne klapavice. Ta dogodek velja za prvi dokaz, da so diatomeje zmožne proizvajati nevrotoksin (Wright in sod. 1989). Zaradi kritičnega dogodka iz leta 1987 (Bates in sod. 1989) in velikega pomora morskih organizmov v zalivu Monterey leta 1991 (Work in sod. 1993; Scholin in sod. 2000) so na številnih obalnih predelih po svetu začeli izvajati redni monitoring pojavljanja vrst rodu *Pseudo-nitzschia* (Anderson in sod. 2001).

Zaradi produkcije domojiske kisline in negativnih vplivov nevrotoksina na ekosisteme sta razumevanje in raziskovanje vrst *Pseudo-nitzschia* izjemno pomembni. Bioakumulacija domojiske kisline povzroča bolezni in umrljivost številnih morskih ptic, morskih vider, morskih levov, kitov, tuljnov in delfinov (Work in sod. 1993; Scholin in sod. 2000; Bejarano in sod. 2008), predvsem na pacifiški obali Severne Amerike, kjer so cvetenja toksičnih vrst zelo pogost pojav (Work in sod. 1993). Toksin se kopiči v organizmih višjih trofičnih ravni, kar nakazuje, da se prenaša skozi celotno prehranjevalno verigo (Scholin in sod. 2000).

Domojska kislina je vodotopna, ekscitotoksična kislina, ki vsebuje tri karboksilne skupine in je analog L-glutaminske in kainske kisline (Falk in sod. 1991). Ta poškoduje nevrone v hipokampusu, kar povzroči amnezijo ali kratkotrajne izgube spomina (Pulido 2008). Zastrupitev ima različne simptome, od prebavnih motenj in zmedenosti v prvih 24 urah do nevroloških motenj, vključno z izgubo spomina (Teitelbaum in sod. 1990). Svetovno veljavna mejna vrednost, ki jo lahko vsebujejo školjke, namenjene za prodajo, je 20 µg domojske kisline na g mokrega tkiva školjke (Kumar in sod. 2009).

Dejavniki, ki spodbujajo sintezo domojske kisline, so v večji meri nepoznani. Produkcijo domojske kisline povezujejo z omejenostjo hranil (silikatov in fosfatov; Pan in sod. 1996), privzemom kovin v sledih (Subba Rao in sod. 1998; Trainer in sod. 2009b) ter s spremembami slanosti (Doucette in sod. 2008) in pH morske vode (Lundholm in sod. 2004), kar nakazuje, da je produkcija toksina domojske kisline zelo zapleten pojav, odvisen od številnih okoljskih dejavnikov, ki so lahko zelo specifični glede na različna okolja (slika 2).

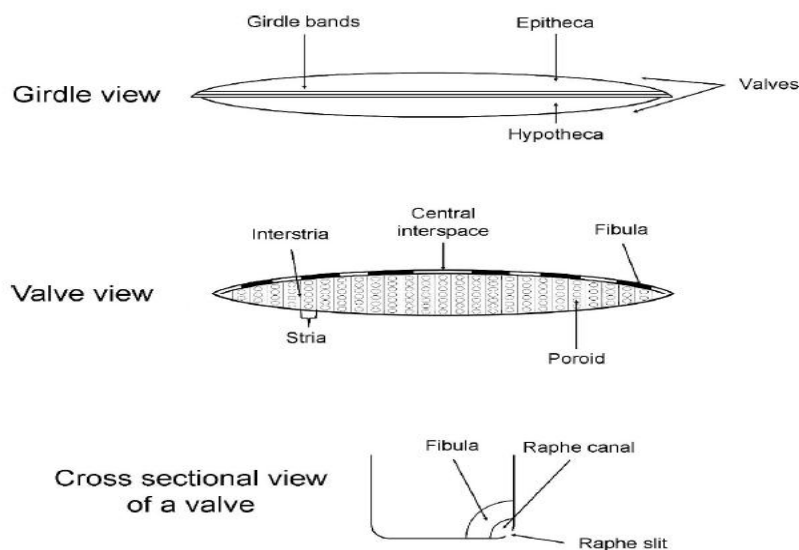


Slika 2: Sinteza vseh dejavnikov (zunanjih –bioloških, kemičnih ter fizikalnih in notranjih), ki vplivajo na povečano (označeno z ↗ DA) ali zmanjšano produkcijo domojske kisline (označeno z ↘ DA). Črna puščica označuje učinek povečevanja parametra; črna pikčasta puščica označuje učinek pomanjševanja parametra; siva črtasta puščica označuje dejavnike, pri katerih so rezultati raziskav kontradiktorni; siva puščica označuje dejavnike, ki variirajo med različnimi vrstami rodu *Pseudo-nitzschia*. Primer: povečevanje koncentracije bakra (Cu) spodbuja produkcijo domojske kisline; zmanjšana koncentracija fosfata (P) spodbuja povečano produkcijo domojske kisline (povzeto po Lelong in sod. 2012).

1.1.2 Morfologija

Vse vrste rodu *Pseudo-nitzschia* imajo v splošnem enako morfologijo (slika 3). Kot vse diatomeje imajo značilno celično steno v obliki škatlice, imenovano frustula, ki jo gradi silicijeva kislina [Si(OH)₄]. Frustulo tvorita dve polovici – valvi (angl. valve) ali teki (angl.

thecae), ki se tesno prilegata ena na drugo. Hipoteka (angl. *hypotheca*) predstavlja manjšo polovico in se z robovi prilega notranjosti večje polovice epiteke (angl. *epitheca*). Valvi ločuje rafa (angl. *raphe*). Ta je v notranjosti celice ojačena s silikatnimi mostovi ali fibulami (angl. *fibulae*; Willén 1991; Amato in sod. 2007). Pri nekaterih vrstah rafo prekinja osrednji medprostor (angl. *interspace*). Na notranji strani valv so interstrije (angl. *interstriae*), ločujejo pa jih strije (angl. *striae*). Znotraj strij so ugreznjeni poroidi (angl. *poroids*), ki služijo izmenjavi snovi skozi frustulo med notranjostjo celice in zunanjim medijem (Willén 1991; Hernández-Becerril 1998).



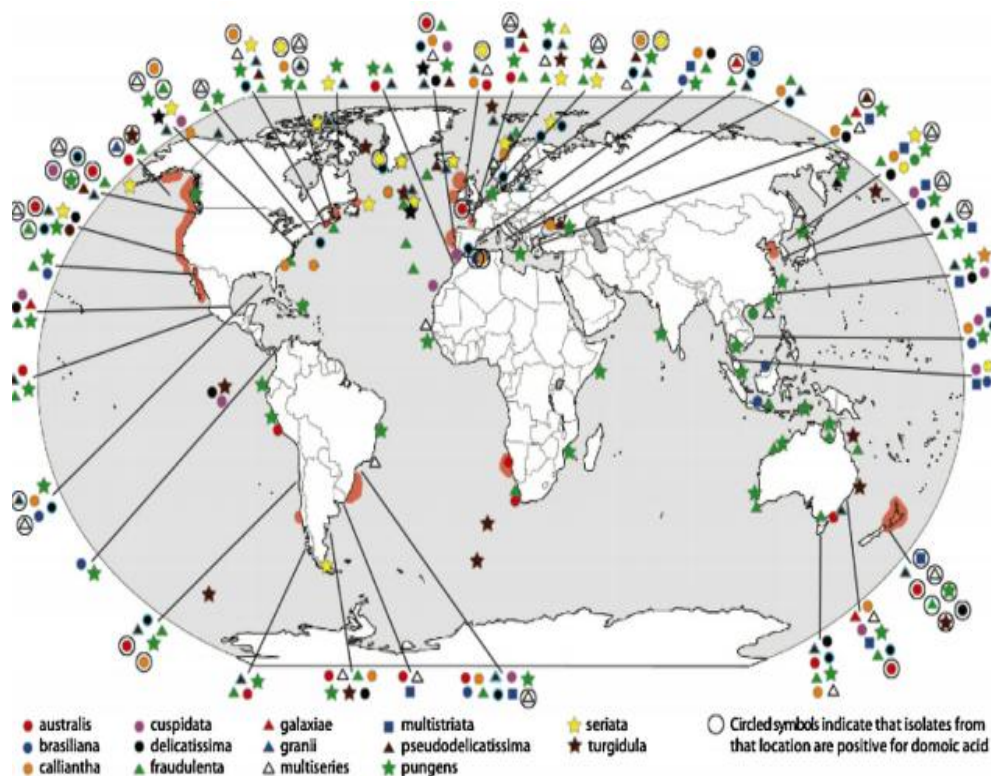
Slika 3: Morfologija frustule, prikazana v treh različnih pogledih (povzeto po Thessen 2007).

Morfometrično jih lahko razlikujemo po številu in razmiku fibul, strij in poroidov, ki so pri veliki večini vrst vidne le z uporabo elektronskega mikroskopa (Lundholm in sod. 2002a). Vendar pa identifikacija *Pseudo-nitzschia* spp. ni mogoča le s pomočjo morfometričnih lastnosti, ker se te lahko razlikujejo celo med populacijami iste vrste (Amato in sod. 2007; Trainer in sod. 2008).

1.1.3 Taksonomija in razširjenost vrst

V zgodovini raziskovanja rodu je večkrat prišlo do sprememb v taksonomski klasifikaciji vrst *Pseudo-nitzschia* (Hasle 1994). Razlikovanje vrst na podlagi morfoloških znakov je težavno, saj se praviloma razlikujejo le v ultrastrukturnih lastnostih frustule (Jeffery in sod. 2004). Rod *Pseudo-nitzschia* (Heterodonta, Bacillariophyceae) je bil prvič opisan v delu Peragallo in Peragallo (1897–1908). Leta 1958 jih je Hustedt zaradi podobnosti napačno vključil v soroden rod *Nitzschia*. Pozneje jih je Hasle (1994) ponovno uvrstila v rod *Pseudo-nitzschia*, saj ta v nasprotju z rodом *Nitzschia* tvori verige z ozkimi, dolgimi celicami, pri čemer se le-te na konicah rahlo prekrivajo.

Do leta 2010 je bilo opisanih 37 vrst rodu *Pseudo-nitzschia*, od tega je bilo v kulturah potrjenih 14 toksičnih (Trainer in sod. 2010; Lelong in sod. 2012) (slika 4). Glavni podatki o 37 vrstah (seznam vrst in geografska razširjenost) roda *Pseudo-nitzschia* so zbrani v prilogi A. Vendar se je število opisanih vrst iz leta 2010 še povečalo, tako da je trenutno v podatkovni bazi Algaebase registriranih 55 vrst, od teh pa je 48 taksonomsko sprejetih (www.algaebase.org).



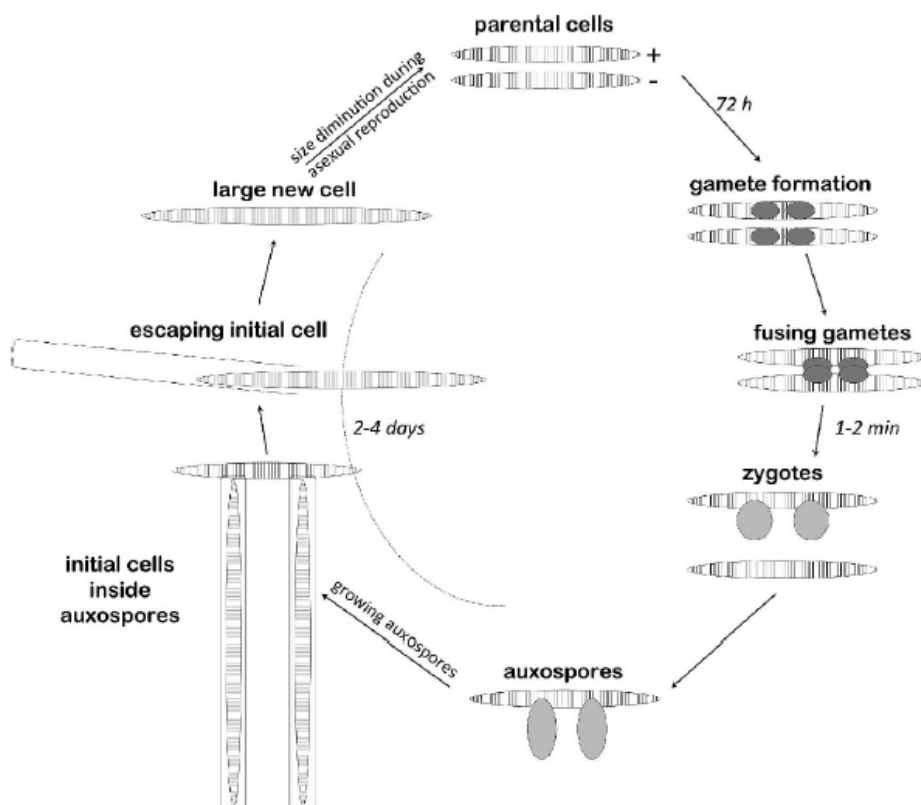
Slika 4: Razširjenost potencialno toksičnih vrst rodu *Pseudo-nitzschia*. Obkroženi simboli ponazarjajo vrste, ki so v kulturi sintetizirale domojsko kislino (povzeto po Trainer in sod. 2012).

1.1.4 Razmnoževanje

Vrste rodu *Pseudo-nitzschia* se razmnožujejo tako spolno kot nespolno. Prvo spolno razmnoževanje (imenovano tudi auksosporulacija) tega rodu je bilo opisano leta 1998 (Davidovich in Bates 1998). Celice diatomej se z nespolnim razmnoževanjem postopoma zmanjšujejo, zato je spolno razmnoževanje nujno potrebno za obnovitev prvotne velikosti populacij vrst (Davidovich in Bates 1998; Amato in sod. 2005). Zmanjševanje celic je posledica vegetativne delitve celic in cepitve frustule med dvema hčerinskima celicama (Chepurnov in sod. 2005). Za obnovitev maksimalne velikosti celice morajo diatomeje izoblikovati auksosporo, to pa lahko dosežejo le s spolnim razmnoževanjem (Davidovich in Bates 1998). Spolno razmnoževanje poteče, ko celica doseže mejno oz. najmanjšo

vrednost velikosti. Ta mejna vrednost je vrstno specifična in ima velik velikostni razpon (Amato in sod. 2005).

Večina vrst rodu *Pseudo-nitzschia* je heterotaličnih, z izjemo vrst *P. brasiliiana* in *P. subcurvata* (Chepurnov in sod. 2005). Kljub manjšim razlikam je spolno razmnoževanje enako pri vseh vrstah (slika 5).



Slika 5: Shematski prikaz spolnega razmnoževanja rodu *Pseudo-nitzschia* (povzeto po Lelong in sod. 2012).

Spolno razmnoževanje se začne z gametangiogamijo – parjenjem starševskih celic različnih spolov (+ in -). Gametangiji različnih spolov se paralelno poravnajo. Sledi stopnja gametogeneze (nastajanje gamet). Spojeni celici se mejotsko delita, pri čemer se vsebina vsake celice porazdeli vzdolž transapikalne ravnine. Nastaneta dve kroglasti gameti v vsaki celici. Gamete so po videzu enake (izogamne) in neobičkanе, vendar se obnašanje gamet med spoloma razlikuje (fiziološka anizogamija). Ena od celic namreč proizvaja dve aktivni gameti (moški, +), druga pa dve pasivni gameti (ženski, -). Frustuli obeh celic se odpreta, da lahko aktivni gameti vstopita v nasprotno celico in se spojita s pasivnimi gametami. Z združitvijo gamet (plasmogamija) nastaneta dve kroglasti zigoti. Zigoti ostaneta pritrjeni na frustulo »ženske (-)« matične celice in se oblikujeta v auktosporo, ki jo obkroža perizonium. Znotraj auktospore nastane inicialna celica, ki zapusti perizonium, ko doseže za vrsto specifično maksimalno velikost (Davidovich in Bates 1998; D'Alelio in sod. 2009). Izstopajoča inicialna celica nima enakih morfoloških

lastnosti kot matična celica, v kateri je nastala. Velikokrat se razlikuje v strukturi epivalve, ki je lahko ožja ali širša od starševske celice, ima nenavadno oblikovano rafo in reducirane fibule (Kaczmarska in sod. 2000). Pogosto so potomci še bolj toksični, kot so bile starševske celice (Bates in sod. 1999).

1.2 Identifikacija vrst rodu *Pseudo-nitzschia*

Identifikacija diatomejskih vrst temelji na morfoloških značilnostih, predvsem na obliki celice in lastnostih frustule. Z mikroskopijo so ugotovili, da se pri nekaterih vrstah *Pseudo-nitzschia* pojavljajo dodatne nejasne lastnosti frustule, ki so posledica hibridizacije med dvema ločenima entitetama (vrsta, podvrsta ali populacija) znotraj rodu *Pseudo-nitzschia*. Takšni potomci imajo mešane genetske lastnosti staršev, ki se odražajo tudi v kombiniranih morfoloških lastnostih (Amato in sod. 2007; Casteleyn in sod. 2009). Molekularne metode so potrdile, da znotraj morfoloških vrst obstajajo genetsko različne vrste, imenovane kriptične in psevdokriptične vrste (Orsini in sod. 2004; Amato in sod. 2007). Kriptične vrste so vrste, ki se razlikujejo v genetskem zapisu, vendar imajo enake morfološke značilnosti. Psevdokriptične vrste pa so vrste, ki se genetsko razlikujejo ter izražajo manjše morfološke razlike, ki jih lahko vidimo le z natančno elektronsko mikroskopijo (Mann in Evans 2007). Številne kriptične in psevdokriptične vrste so tudi reproduktivno izolirane entitete, ki predstavljajo biološko ločene enote (Lundholm in sod. 2003; Amato in sod. 2007). Zato razlikovanje zgolj na morfoloških lastnostih vrst ni vedno dovolj, saj je na ta način biotska diverziteta fitoplanktona podcenjena. Kljub neopaznim razlikam v morfologiji se kriptične in psevdokriptične vrste razlikujejo po bioloških zahtevah, izbiri habitatov, fiziologiji, življenjskih ciklih ter ekoloških preferencah (Amato in sod. 2007).

Pravilna identifikacija vrst *Pseudo-nitzschia* je pomembna, saj omogoča razumevanje kompleksnih vzorcev produkcije domojke kisline, geografske razširjenosti potencialno toksičnih vrst, razkriva (psevdo)kriptične vrste, evolucijo in mehanizme speciacije ter ekologijo vrst (Amato in sod. 2007; McDonald in sod. 2007).

1.2.1 Identifikacija na podlagi morfoloških lastnosti

Identifikacija vrst rodu *Pseudo-nitzschia* s svetlobnim mikroskopom je zahtevna, v večini primerov celo nemogoča (Amato in sod. 2007). Večino morfometričnih lastnosti, ki so pomembne za identifikacijo vrst (število in razmik fibul, strij in poroidov) lahko razločimo le z uporabo vrstične (SEM) ali preseвне (TEM) elektronske mikroskopije. Kriptičnih vrst ni moč določiti z uporabo mikroskopskih metod, saj imajo zaradi hibridizacije mešane morfološke značilnosti (Casteleyn in sod. 2009). S pomočjo svetlobne mikroskopije lahko določimo obliko, dolžino in širino celic (Hasle in Syvertsen 1997), v nekaterih primerih pa

tudi vrste (Hasle 1965). Vendar pa je velikost celice relativna morfometrična lastnost, saj se zmanjšuje z delitvijo celic (Davidovich in Bates 1998). Glede na širino celice vrste razdelimo v dve skupini (Hasle in Syvertsen 1997):

- 1.) skupina *seriata*: vrste s širino celice, večje od 3 μm ,
- 2.) skupina *delicatissima*: vrste s širino celice, manjše od 3 μm .

Hasle (1965) je na podlagi morfoloških lastnosti opisala okoli 20 vrst rodu *Pseudo-nitzschia*. Analiza rezultatov, pridobljenih z molekularnimi metodami, kaže na veliko večjo raznolikost vrst znotraj naravnih populacij, ki jih ni mogoče zaznati z morfološkimi značilnostmi (Amato in sod. 2007). Vendar so s pomočjo elektronske mikroskopije določili z relativno veliko natančnostjo tudi nekaj vrst v Jadranskem morju: *P. manii*, *P. pungens* in *P. fraudulenta* (Ljubešić in sod. 2011), *P. delicatissima* (Caroppo in sod. 2005), *P. pseudodelicatissima* in *P. subfraudulenta* (Marić 2013), *P. calliantha* (Marić in sod. 2011), *P. heimii* (Burić in sod. 2008) in *P. multistriata* (Pistocchi in sod. 2012).

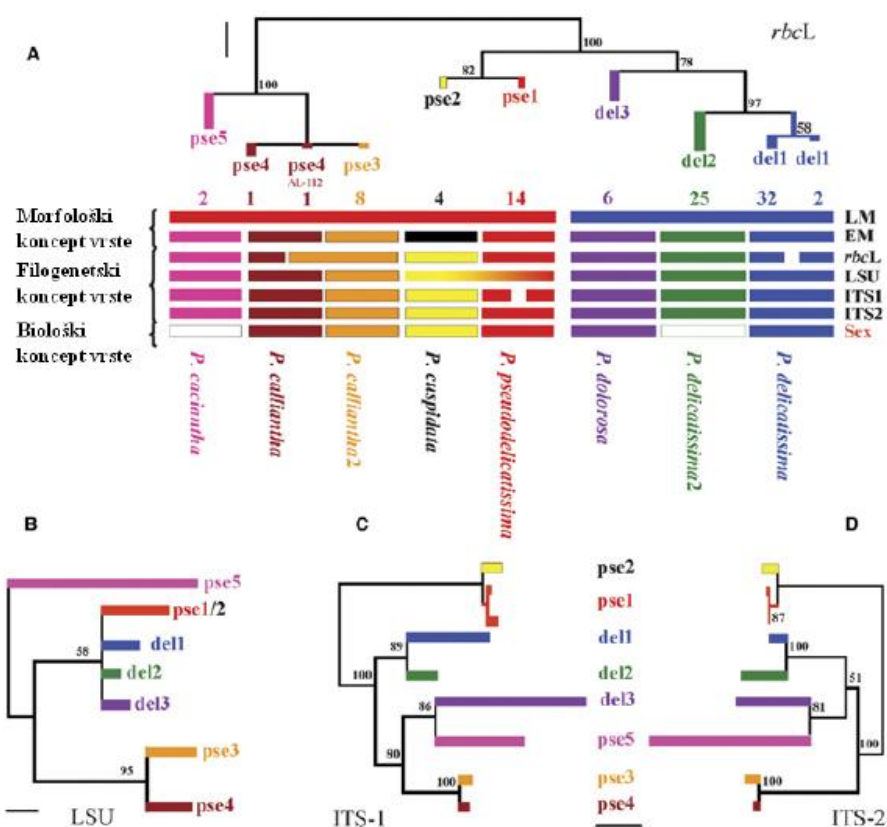
1.2.2 Identifikacija z molekularno genetskimi metodami

V zadnjem desetletju je bilo objavljenih več študij, ki združujejo morfološke in genetske značilnosti za preučevanje taksonomije in evolucije rodu *Pseudo-nitzschia* (npr. Amato in Montresor 2008). Raziskave so pokazale, da je pojav kriptičnih in psevdokriptičnih vrst veliko bolj pogost pojav, kot so sprva domnevali (Amato in sod. 2007). Obstoj (psevd) kriptičnih vrst dodatno otežuje določanje vrst rodu *Pseudo-nitzschia*, saj je znotraj morfoloških vrst več različnih genotipov, ki posledično izražajo drugačne fenotipske lastnosti (McDonald in sod. 2007; Amato in Montresor 2008).

Genetske analize diatomejskega rodu *Pseudo-nitzschia*, ki odkrivajo sorodstvene povezave med vrstami (filogenija oz. filogenetski odnosi), se izvajajo s pomočjo različnih regij genoma. Te omogočajo višjo raven razlikovanja znotraj-vrstne ali intraspecifične pestrosti naravnih populacij, ki jih ni mogoče odkriti zgolj na podlagi morfoloških značilnosti (Amato in sod. 2007; Casteleyn in sod. 2009). Za identifikacijo se uporabljajo **velika ribosomska podenota 28S** (LSU; angl. *large subunit*; Thessen in sod. 2009), **notranja prepisana regija ITS** (ITS1 in ITS2; angl. *Internal transcribed Spacer*; Lundholm in sod. 2006), **mitohondrijska DNK** (citokrom C oksidaza I; Kaczmarska in sod. 2008) in **velika podenota Rubisca** (*rbcL*; angl. *Large Subunit of Rubisco*; Amato in sod. 2007). Z genetskimi analizami so ugotovili, da znotraj morfoloških taksonomskih enot obstaja veliko različnih genotipov, ki so med seboj lahko reproduktivno izolirani. Z raziskovanjem spolne kompatibilnosti se lahko potrdi reproduktivna izolacija določenih genotipov/haplotipov, kar potrjuje, da genotip predstavlja novo vrsto znotraj morfološke vrste (Amato in sod. 2007).

Na podlagi molekularno genetskih analiz sta se filogenija in taksonomija vrst rodu *Pseudo-nitzschia* skozi čas spreminjali. Identifikacija z genetskimi metodami je potrdila veliko različnih genotipov vrst, zato je vrstna pestrost roda veliko večja, kot so sprva predvidevali (Amato in sod 2007; Amato in Montresor 2008; Amato in sod. 2010).

Čeprav imajo molekularno genetske metode veliko prednosti, imajo tudi pomembne pomanjkljivosti. Če primerjamo filogenetska drevesa različnih genetskih markerjev (ITS1, ITS2, *rbcL*, LSU), lahko prikažejo različne filogenetske odnose med vrstami (slika 6) (Amato in sod. 2007; Marić 2013).



Slika 6: Primer filogenetskih dreves vrst rodu *Pseudo-nitzschia*, ki temeljijo na različnih genetskih markerjih. A) *rbcL*; B) LSU; C) ITS-1; D) ITS-2. Leva stran slike 6A prikazuje ločevanje vrst rodu *Pseudo-nitzschia* glede na različne koncepte vrste (morfološki, filogenetski, biološki). Glede na morfološke lastnosti se vrste pod svetlobnim mikroskopom (LM) delijo na skupini *pseudodelicatissima* in *delicatissima*. Znotraj teh skupin je še več morfoloških vrst, ki se razlikujejo v ultrastrukturnih morfoloških lastnostih, določenih pod elektronskim mikroskopom (EM). Kljub temu pa so filogenetski odnosi med vrstami različni glede na različne markerje (*rbcL*, LSU, ITS1, ITS2), kar dodatno otežuje identifikacijo vrst rodu *Pseudo-nitzschia* (povzeto po Amato in sod. 2007).

Poleg tega pri genetskih analizah pogosto prihaja do napak genotipizacije (z genetsko analizo določeni genotipi ne ustrezajo resničnemu genotipu preiskovanega osebk), napak

polimeraze (zaradi biokemičnih anomalij; Smith in sod. 1995) in do mutacij v kulturah (Bonin in sod. 2004; Pompanon in sod. 2005). Ker lahko napake pri genotipizaciji vodijo v napačne zaključke v raziskavah populacijske genetike, je treba v genetske študije vključiti oceno napak genotipizacije, kjer je to mogoče (Bonin in sod. 2004; Pompanon in sod. 2005). Prav tako lahko genetske analize prikazujejo preveliko intraspecifično razlikovanje vrst znotraj rodu *Pseudo-nitzschia* (Amato in sod. 2007).

1.2.2.1 Notranja prepisana regija ITS (ITS1-5.8S-ITS2)

Osnovna predpostavka za razumevanje molekularne filogenije je, da različni geni kopičijo mutacije z različno frekvenco in hitrostjo. Notranja prepisana regija ribosomske RNK (v nadaljevanju ITS) lahko kljub številnim spremembam nukleotidov ohranja svojo strukturo in funkcionalnost. Zato regija ITS kopiči mutacije zelo hitro (Patwardhan in sod. 2014).

Največkrat uporabljena regija za identifikacijo je ITS1-5.8S-ITS2, saj je zelo informativna in prikazuje ločevanje vrst rodu *Pseudo-nitzschia* tako na med-vrstnem kot tudi na znotraj-vrstnem nivoju (Lundholm in sod. 2003; Amato in sod. 2007). Tu je prednost uporabe regije ITS za identifikacijo vrst rodu *Pseudo-nitzschia*, saj v primerjavi z mikroskopskimi metodami daje vpogled v obstoj (psevdo) kriptičnih vrst, ki jih z elektronskim mikroskopom ne moremo odkriti (Amato in sod. 2007). Poleg tega ITS2 služi kot sekvenca črtne kode in je edina, ki zelo natančno razločuje biološko ločene vrste rodu *Pseudo-nitzschia*, tj. vrste, ki se med seboj razmnožujejo in so reproduktivno izolirane od drugih takšnih entitet (Evans in sod. 2007; Amato in sod. 2007). Za preučevanje spolnega razmnoževanja se uporablja sekundarna struktura regije ITS2. Veriga RNK, ki jo kodira regija ITS2, oblikuje kompleksno sekundarno strukturo s stebrički (angl. *stems*) in zankami (angl. *loops*), ki naj bi igrala pomembno vlogo pri izgradnji ribosomov (Tschochner in Hurt 2003). Osnovne spremembe baznih parov na stebričkih imenujemo CBC (angl. *compensating base changes*) in pol-CBC (angl. *hemi compensating base changes*). Te spremembe so povezane z razmnoževalnim uspehom vrst *Pseudo-nitzschia* (Coleman 2009).

Primer uporabe. Uspešnost taksonomskega razvrščanja na podlagi regije ITS so potrdili Amato in sod. (2007). Ugotovili so, da vrsto *P. pseudodelicatissima* v resnici sestavlja pet psevdokriptičnih vrst: *P. cuspidata*, *P. calliantha*, *P. calliantha2* (morfološko neuvrščen takson), *P. cacialantha* in *P. pseudodelicatissima*; vrsto *P. delicatissima* pa tri psevdokritične vrste: *P. delicatissima*, *P. delicatissima2* (morfološko neuvrščen takson) in *P. dolorosa*. Reprodukativna izolacija je bila prisotna pri vrstah, ki so v sekundarni strukturi ITS-2 vsebovale CBC ali pol-CBC; torej če vrste pripadajo različnim kladom CBC, se med seboj niso sposobne uspešno razmnoževati (Coleman 2009; Amato in sod. 2007). Obstoj

reproduktivne izolacije genotipov odpira vprašanje o ekološkem pomenu skrite genetske diverzitete znotraj vrst. Najverjetneje različne (psevdo) kriptične vrste zasedajo različne ekološke niše (Amato in sod. 2007).

1.2.2.2 Jedrna ribosomska rRNK (28S)

Ribosomska DNK velja za eno izmed najboljših regij za preučevanje filogenetskih odnosov, saj je univerzalna in hkrati zelo specifična. Sestavljena je iz dobro evolucijsko ohranjenih regij in tudi iz variabilnih regij (Woese 1987). Geni, ki kodirajo rRNK pri evkariontih (malo podenoto 18 rRNK in veliko podenoto 5S, 5.8S, 25S ali 28S rRNK), so zelo konservativni in počasno razvijajoči, zato nakazujejo na spremembe, ki so se zgodile zgodaj v evoluciji organizmov (Moritz in sod. 1993). Zato so primerni za filogenetsko analizo daljno sorodnih vrst in za preučevanje zgodnjih evolucijskih procesov. Pri večini evkariontov velika podenota (v nadaljevanju LSU) vsebuje tri vrste RNK (5S, 5.8S in 25S ali 28S rRNK; Patwardhan in sod. 2014).

Primeri uporabe. McDonald in sod. (2007) so na podlagi genetske analize regije 28S identificirali številne prevdokriptične vrste v naravnem habitatu. Prav tako je filogenetska analiza na tej regiji pokazala, da je rod *Pseudo-nitzschia* parafiletski (Lundholm in sod. 2002b).

1.2.2.3 Velika podenota Rubisca (*rbcL*)

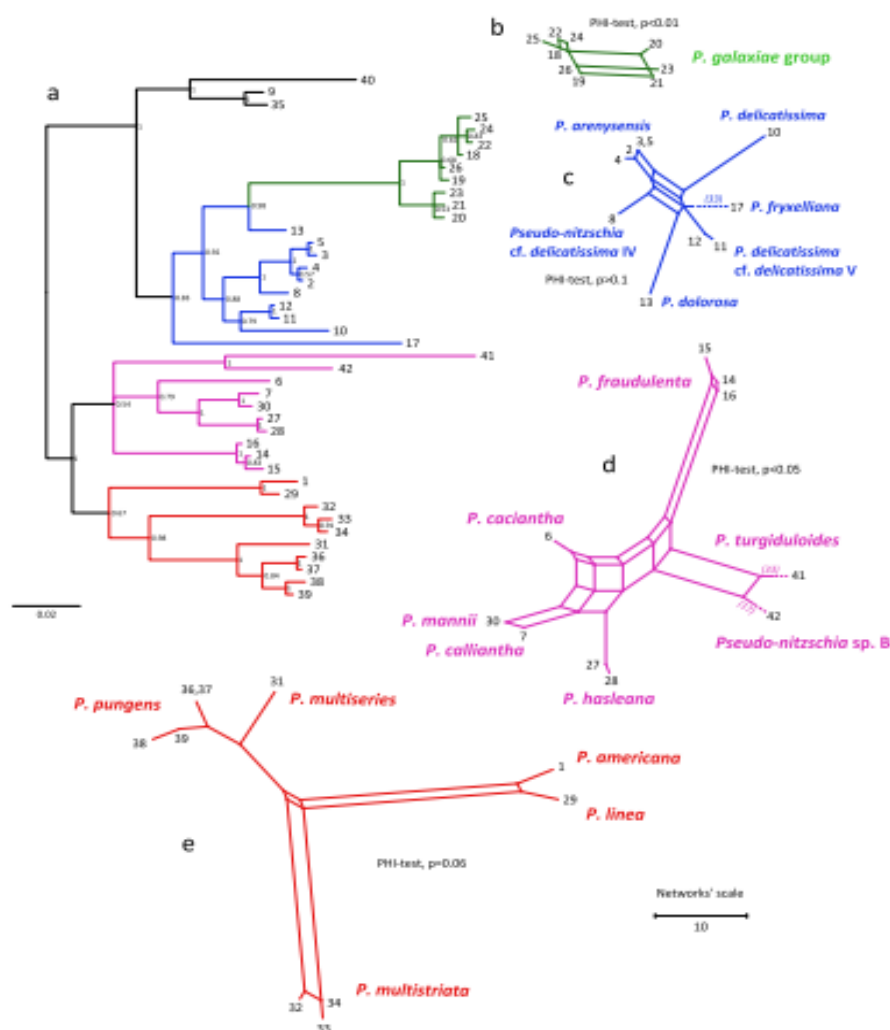
Velika podenota Rubisca (v nadaljevanju *rbcL*) je gen, ki je na kloroplastnem genomu in se pojavlja v eni kopiji (angl. *single copy gen*). Je ena izmed dobro evolucijsko ohranjenih regij, zato je zelo primeren za filogenetske analize. Sestavljen iz 1428 baznih parov in je univerzalen gen pri rastlinskih vrstah (Patwardham in sod. 2014), kljub temu pa se ne uporablja kot črna koda za identifikacijo vrst rodu *Pseudo-nitzschia* zaradi prevelike intraspecifične divergence (Macgillivray in Kaczmarska 2011).

Z analizo regije *rbcL* je vpogled v genetski sklad vrste zelo podroben; regija je namreč zelo uporabna za prepoznavanje polimorfizma haplotipov. Haplotipe *rbcL* uporabljamo za raziskovanje plastidnega dedovanja med spolnim razmnoževanjem (anizogamijo) in posledično za identificiranje obstoja naravnih hibridov znotraj vrst rodu *Pseudo-nitzschia* (D'Alelio in Ruggiero 2015). Dedovanje plastidne DNK pri vrstah rodu *Pseudo-nitzschia* je večinoma biparentalno ali obojestarševsko (Ghiron in sod. 2008).

Hibridizacija ima pomembno vlogo pri ustvarjanju nove genetske raznolikosti. To poteka ali z introgresijo edinstvenih alelov ali z ustvarjanjem novih rekombiniranih genotipov, ki

vodijo v nastanek novih vrst (Barton 2001). Marker *rbcL* je zelo uporaben pri zaznavanju hibridizacije med vrstami, saj neodvisno od morfoloških lastnosti razkriva alele in haplotepe, nastale med procesom hibridizacije in introgresije alelov (Casteleyn in sod. 2009). *rbcL* je kodirajoča in bolj konservativna regija (manj spreminjajoča skozi evolucijske procese) kot ITS, ki je bolj dovzeten za mutacije (Patwardham in sod. 2014).

Primeri uporabe. Ker se vrste rodu *Pseudo-nitzschia* razmnožujejo spolno, je treba raziskovati procese hibridizacije med vrstami. Glede na sekvence *rbcL* sta D'Alelio in Ruggiero (2015) ugotovila, da se znotraj rodu pojavlja 42 haplotipov *rbcL*, ki se glede na sorodnost razvrščajo v pet kladov (slika 7).



Slika 7: Filogenetsko drevo sekvenc *rbcL*. Rekombinirano plastidno dedovanje je opazno pri vrstah: *P. fraudulenta* (številke 14, 15, 16; vijolični klad) in *P. multistriata* (številke 32, 33, 34; rdeči klad). Šibkejši signali rekombinacije so opazni tudi v modrem kladu (povzeto po D'Alelio in Ruggiero 2015).

D'Alelio in Ruggiero (2015) sta dokazala obstoj rekombiniranega dedovanja plastidne DNK pri vrstah *Pseudo-nitzschia*. Rekombinacija je bila prisotna v 4 od 5 kladov (tako na intra- kot interspecifični ravni vrst), kar dokazuje:

- 1) prisotnost plastidne rekombinacije pri diatomejah ter

- 2) prisotnost znotrajvrstne in medvrstne hibridizacije, ki ima lahko ključno vlogo pri speciaciji vrst rodu *Pseudo-nitzschia*.

1.3 Raziskave vrst rodu *Pseudo-nitzschia* v severnem Jadranu

Vrste rodu *Pseudo-nitzschia* so v evropskih morjih poznane že več kot stoletje. Pogosto se pojavljajo v velikem številu, v nekaterih obalnih območjih pa v določenem delu leta tvorijo obsežna cvetenja (Ljubešić in sod. 2011). Toksične vrste rodu *Pseudo-nitzschia*, ki jih najdemo v evropskih vodah, so: *P. australis*, *P. calliantha*, *P. galaxiae*, *P. multiseriata*, *P. multistriata*, *P. pseudodelicatissima*, *P. pungens*, *P. heimii*, *P. seriata*, *P. fraudulenta* in *P. delicatissima* (Lundholm in sod. 1994; Orsini in sod. 2002; Cerino in sod. 2005; Burić in sod. 2008; Ljubešić in sod. 2011; Marić in sod. 2011; Pistocchi in sod. 2012). Domojska kislina se kopiči predvsem v evropskih vrstah školjk pokrovač (EFSA 2009; Trainer in sod. 2012).

Prvo raziskovanje fitoplanktonske združbe v Tržaškem zalivu sega več kot stoletje nazaj (Steuer 1903). Nekaj desetletij nazaj je severni Jadran veljal za enega izmed najbolj produktivnih območij Sredozemskega morja (Sournia 1973). V zadnjem času pa je opazen trend zmanjševanja koncentracij klorofila *a* (pokazatelj fitoplanktonske biomase), kar nakazuje na zmanjšano produktivnost in čedalje bolj oligotrofni značaj severnega Jadrana (Mozetič in sod. 2010) zaradi manjšega vnosa hranil z rekami, kot sta Pad in Soča. To je posledica vse manjšega vodotoka reke Pad v severni Jadran (in reke Soče v Tržaški zaliv), kar se odraža v zmanjšanem vnosu hranilnih snovi (Solidoro in sod. 2009; Cozzi in sod. 2012). Manjša vsebnost hranil in spremenjena razmerja med njimi vplivajo na spremenjen čas cvetenja in sestavo fitoplanktonske združbe (Cabrini in sod. 2012).

Tako v zadnjih letih v severnem Jadranu prevladuje cvetenje nanoflagelatov in malih diatomej, ki tvorijo verige (Mozetič in sod. 2012), tj. vrst, ki so se najboljše prilagodile na manjše koncentracije hranilnih snovi (Cabrini in sod. 2012; Marić 2013). Vrste iz rodu *Pseudo-nitzschia* imajo veliko sposobnost fiziološkega prilagajanja, zato prevladujejo v številnih obalnih morjih, vključno s severnim Jadranom (Bates 1998; Ljubešić in sod. 2011). Kljub trendu zmanjševanja celotne abundance fitoplanktona je abundanca vrst rodu *Pseudo-nitzschia*, ki so v severnem Jadranu prisotne skozi celo leto, vse večja (Marić 2013). Jeseni 2007 je *Pseudo-nitzschia* spp. predstavljala kar 90-odstotni delež diatomej na območju Limskega zaliva, pri čemer je skoraj izključno prevladovala *P. calliantha* (Marić in sod. 2011; Ljubešić in sod. 2011).

Poznavanje vrstne pestrosti in toksičnosti rodu *Pseudo-nitzschia* je v severnem Jadranu razmeroma majhno. Do zdaj so bile identificirane vrste: *P. manii*, *P. pseudodelicatissima*, *P. pungens* in *P. fraudulenta* (Ljubešić in sod. 2011), *P. calliantha* (Marić in sod. 2011), *P.*

subfraudulenta (Marić 2013), *P. multistriata* (Pistocchi in sod. 2012), *P. delicatissima* (Caroppo in sod. 2005), *P. galaxiae* in *P. seriata* (Bosak in sod. 2011). Vrsti *P. calliantha* in *P. manii* sta pogosto prevladujoči vrsti fitoplanktonske združbe (Ljubešić in sod. 2011; Marić 2013). Prvič so domojsko kislino na tem območju zaznali leta 2000 v sredozemskih užitnih klapavicah (*Mytilus galloprovincialis*) v regiji Emilia-Romagna v Italiji (Ciminiello in sod. 2005; Ljubešić in sod. 2011).

Ker v slovenskem morju vrstna pestrost rodu *Pseudo-nitzschia* še ni poznana, želimo v sklopu zaključne naloge predstaviti pestrost rodu v Tržaškem zalivu in preveriti, ali se na območju Tržaškega zaliva pojavljajo iste vrste kot na širšem območju severnega Jadrana in katere vrste so potencialno toksične. Identifikacija potencialno toksičnih vrst je namreč zelo pomembna z vidika vzpostavitve rednega monitoringa za spremljanje toksičnih cvetenj v slovenskem morju.

1.4 Raziskovalne hipoteze in cilji

V raziskovalni zaključni nalogi sem se posvetila identifikaciji vrst fitoplanktonskega rodu *Pseudo-nitzschia* v slovenskem morju na podlagi različnih genetskih regij. Zaključna naloga je del večje raziskave, ki vključuje vzorčenje fitoplanktona na lokaliteti v slovenskem delu Tržaškega zaliva, izolacijo sevov različnih vrst in gojenje kultur ter identifikacijo vrst z uporabo elektronske mikroskopije in molekularno genetskih metod regij ITS1-5.8S-ITS2 in 28S. V sklopu zaključne naloge želim:

- a) identificirati vrste iz rodu *Pseudo-nitzschia*, ki so prisotne v slovenskem morju z uporabo genetskih metod;
- b) ugotoviti, ali so identificirane vrste iste, kot jih omenjajo v raziskavah na območju severnega Jadrana;
- c) primerjati rezultate filogenetske analize z drugimi raziskavami diatomejskih vrst *Pseudo-nitzschia* spp.;
- d) ugotoviti uporabnost markerja velike podenote Rubisca za identifikacijo vrst rodu *Pseudo-nitzschia* v primerjavi z uporabo markerjev 28S in ITS1-5.8S-ITS2;
- e) preveriti hipotezo, da s filogenetsko analizo velike podenote Rubisca dobimo večji spekter informacij kot na regiji ITS1-5.8S-ITS2 ali na 28S in da se bodo filogenetska drevesa med seboj razlikovala.

2 MATERIALI IN METODE

V tem poglavju bomo predstavili potek reakcij pomnoževanja genskih regij (reakcije PCR), natančno opisali analizo produktov reakcije PCR in obdelavo podatkov z različnimi programi za genetske analize. Druge metode (mikroskopija) in postopke (vzorčenje,

priprava medija, izolacija sevov in gojenje kultur), pri katerih nisem sodelovala, bom le na kratko omenila, prav tako tudi opis območja raziskav.

2.1 Pridobivanje in priprava vzorcev

Vzorčenje fitoplanktona je potekalo na slovenski strani Tržaškega zaliva na vzorčnem mestu 0DB2 (45°35,9' S, 13°42,5' V), v neposredni bližini gojišča školjk na Debelem rtiču (slika 8). Različni tipi območij gojenja oz. nabiranja školjk v slovenskem morju so prikazani v preglednici 1. Vzorčenje fitoplanktona je potekalo enkrat mesečno od oktobra 2016 do marca 2018. Vzorci so bili pobrani s planktonsko mrežico z velikostjo okenc 20 µm s petkratnim vertikalnim potegom vzdolž vodnega stolpa (globina 17 m) in s petkratnim horizontalnim potegom (Turk Dermastia, osebni stik 2018).



Slika 8: Območja gojišč školjk (ID 0, 2 in 3) in prostega nabiranja školjk (rdeče obrobene površine) v slovenskem morju, označena z zaporednimi števkami od 0 do 5 v preglednici 1. Zelena pika označuje mesto vzorčenja fitoplanktona (0DB2) na gojišču školjk na Debelem rtiču.

Preglednica 1: Pregled tipov školjčič v slovenskem morju, ki so prikazana na sliki 8.

ID	OBMOČJE	TIP
0	Strunjan	gojitev
1	Debeli Rtič	prosto nabiranje
2	Debeli Rtič	gojitev
3	Sečovlje	gojitev
4	Piran	prosto nabiranje
5	Strunjan	prosto nabiranje

Po vzorčenju je sledil pregled vzorcev s svetlobnim mikroskopom. Celice, prepoznane kot vrste rodu *Pseudo-nitzschia*, so bile izolirane od drugih mikroorganizmov s pomočjo Pasteurjeve pipete. Izolirane celice so bile nato vzgajane v kulturnih posodah 3x4 Nunclon®, ki so vsebovale medij 1/5x L1¹ (Guillard in Hargraves 1993). Kulture, ki so po dveh tednih uspešno rasle v kultiviranem mediju, so bile prenesene v avtoklavirane 50 ml erlenmajerice, ki so vsebovale medij L1. Uspešno rastoče kulture so bile vzgajane v rastnem inkubatorju pri temperaturi 16°C s ciklično fotoperiodo (12 ur svetlobe, 12 ur teme). Kulture so bile prenesene v svež medij vsakih 14 dni. Vzgojenih je bilo 38 kultur, vendar vse kulture niso preživele skozi celotno obdobje raziskave, bodisi zaradi naravnega propada ali kontaminacije z drugimi mikroorganizmi. Sledila je ekstrakcija DNK kultur (Turk Dermastia, osebni stik 2018).

2.2 Pomnoževanje izbranih fragmentov z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR)

2.2.1 Priprava reakcijskih mešanic in temperaturni protokoli pomnoževanja (reakcije PCR)

Verižna reakcija s polimerazo (v nadaljevanju PCR) je metoda, ki omogoča pomnoževanje točno določenih delov DNK s pomočjo encima DNK-polimeraze. Metodo je leta 1983 razvil ameriški biokemik Kary Mullis. Reakcija poteka verižno; to pomeni, da poteka v večkrat ponovljenih ciklih. Reakcija poteka v strogo nadzorovanih pogojih s točno določeno temperaturo in trajanjem. Verižna polimerizacija vključuje tri osnovne korake: 1) denaturacijo genskega materiala, pri čemer s segrevanjem povzročimo razpad vodikovih vezi v dvojni vijačnici (nastane enoverižna DNK); 2) prileganje začetnih nukleotidov, pri čemer z nižano temperaturo omogočimo povezavo med začetnimi oligonukleotidi in matrično DNK; 3) sintezo verig DNK s polimerazo, pri čemer DNK-polimeraza prebere določen del verige in ga primerja s komplementarnimi nukleotidi. PCR izvajamo v natančnih termostatih, ki jih je mogoče programirati.

Z molekularno metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR, angl. *Polymerase chain reaction*) smo pomnožili določene odseke genoma (28S, *rbcL* in ITS1-5.8S-ITS2). Pri tem smo uporabili začetne oligonukleotide, ki so jih navedli različni avtorji (White in sod. 1990; Scholin in sod. 1994; Nunn in sod. 1996; Jones in sod. 2007; Murray in sod. 2012). Podatki o začetnih nukleotidih so prikazani v preglednici 3.

¹ 1/5x L1 predstavlja petkrat redčen medij (na liter) prefiltrirane morske vode. Medij se pripravi v litrskih posodah iz dvakrat prefiltrirane morske vode, kateri se doda metale, fosfate, nitrate ter silicijevo kislino. Ti služijo kot hranljive snovi oziroma nutrienti, ki so nujno potrebni za rast kultur diatomej.

Reakcijsko mešanico in protokol PCR smo prilagodili in optimizirali za točno določene odseke DNK (28S, *rbcL* in ITS1-5.8S-ITS2), ki smo jih želeli pomnožiti. Reakcijsko mešanico smo pripravili po navodilih proizvajalca reagentov (Qiagen TopTaqpolymerase). Reakcijska mešanica je bila enaka za vse pomnožene odseke, z izjemo uporabljenih začetnih nukleotidov f in r.

Reagenti reakcijske mešanice za pomnoževanje določenih odsekov, ki omogočajo identifikacijo posamezne vrste rodu *Pseudo-nitzschia*, so prikazani v preglednici 2. Podatki o začetnih oligonukleotidih f in r so podani v preglednici 3. Končni volumen reakcije je znašal 25 µl (preglednica 2). V fazi priprave reakcijske mešanice smo skozi celotno pripravo vse reagente in nastalo reakcijsko PCR mešanico shranjevali na ledu.

Preglednica 2: Reagenti za pripravo reakcijske mešanice PCR za pomnoževanje odsekov, ki identificirajo vrste rodu *Pseudo-nitzschia*.

Reagent	<i>rbcL</i> , 28S in ITS1-5.8S-ITS2	
	Volumen na vzorec (µl)	koncentracija na vzorec
sterilna voda MiliQ	9,875	
10x PCR-pufer	2,5	1x
5x Q-solution	5	1x
barvilo CoralLoad	2,5	
10 mM dNTP	0,5	200 µM
začetni oligonukleotid f	1	0,4 µM
začetni oligonukleotid r	1	0,4 µM
Taq-polimeraza	0,125	0,025 U/µl

Preglednica 3: Podatki o začetnih oligonukleotidih.

Odsek DNK	Začetni oligonukleotidi f in r	Sekvenca	Referenca
<i>rbcL</i>	DPrbcL1_mod DPrbcL7_mod	5'-AAG GAG AAA THA ATG TCT -3' 5'-AAR CAA CCT TGT GTA AGT CTC -3'	Jones in sod. 2007
28S	D1R-F D3B-R	5'-ACCCGCTGAATTAAGCATA-3' 5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3'	Scholin in sod. 1994 Nunn in sod. 1996
ITS1-5.8S-ITS2	ITS1/ITS4 ITS-F/ITS-R	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'/ 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' 5'-TTTCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'/ 5'-ATATGCTTAAATTCAGCGGGT-3'	White in sod. 1990 Murray in sod. 2012

Pomnoževanje je potekalo v PCR mikrocentrifugirkah ali epicah. V vsako epico smo odpipetirali 22,5 µl reakcijske mešanice in 2,5 µl izolirane DNK vzorca. Za sledenje uspešnega pomnoževanja DNK fragmentov smo vedno dodali negativno (sterilno *MiliQ* vodo) in pozitivno kontrolo (DNK uspešno pomnoženega vzorca). Vzorce v epicah smo homogenizirali z vorteksom, nato pa centrifugirali približno 2 minuti in jih prenesli v ciklični termostatski PCR TProfessional Thermocycler (Biometra). Temperaturne protokole

smo priredili in optimizirali po navodilih proizvajalca ter po člankih Casteleyn in sod. (2009) in Ten in sod. (2013), pri čemer smo s precejšnjimi ponovitvami sestavili ustrezen temperaturni protokol, opisan v preglednici 4. Osnovne korake denaturacije, prileganja nukleotidov in podaljševanje verige smo izvedli v 35 ciklih. Pomnoževanje odseka gena *rbcL* je potekalo enkrat do dvakrat tedensko, od februarja do julija 2018.

Preglednica 4: Temperaturni protokoli verižnih reakcij s polimerazo (PCR).

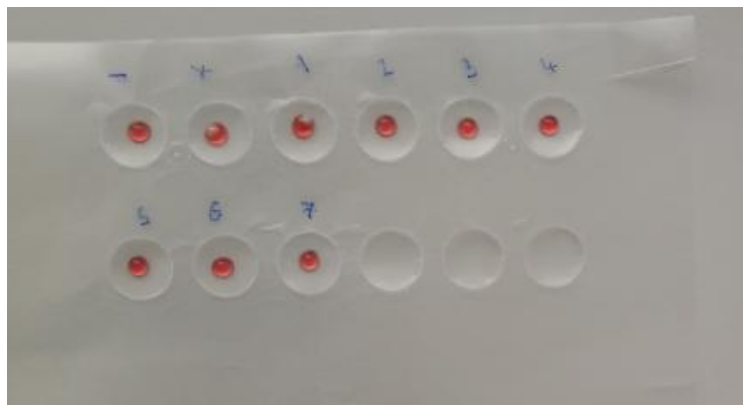
Osnovni koraki PCR	<i>rbcL</i>		28S		ITS1-5.8S-ITS2	
	T(°C)	t	T(°C)	t	T(°C)	t
1. Začetna denaturacija	94	3 min	94	5 min	94	5 min
2. Denaturacija	94	30 s	94	45 s	94	45 s
3. Prileganje nukleotidov	52	30 s	47–49	30 s	47–49	30 s
4. Podaljševanje verige	72	110 s	72	90 s	72	90 s
5. Končno pomnoževanje	72	10 min	72	8 min	72	8 min
6. Hlajenje	4	inf	4	inf	4	inf

2.3 Analiza produktov reakcij PCR

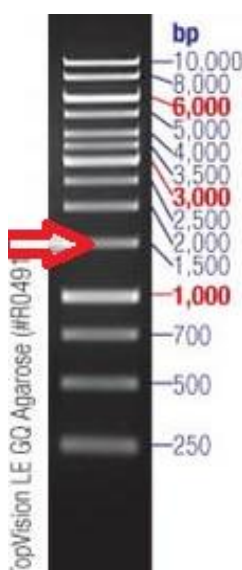
Pomnoževanju regij *rbcL*, 28S in ITS1-5.8S-ITS2 je sledila analiza pomnoženih delov DNK na agarozni elektroforezi. Agarozna gelska elektroforeza je metoda, s katero ločujemo DNK fragmente glede na njihovo velikost. Na ta način preverimo uspešnost pomnoževanja določenih fragmentov DNK. Ustvari se električno polje, pod vplivom katerega se fragmenti DNK zaradi negativnega naboja fosfatne skupine na verigi DNK začnejo premikati proti pozitivnemu potencialu. Pot, ki jo prepotuje vsak produkt reakcije PCR, je odvisna od dolžine produkta; manjši produkti PCR v določenem času prepotujejo daljšo razdaljo v gelu. Ustrezna električna napetost je pomemben dejavnik; višja, kot je, hitreje potuje DNK skozi agarozni gel.

2.3.1 Priprava vzorcev za agarozno gelsko elektroforezo

Produkte PCR smo po končanem pomnoževanju v cikličnem termostatu pripravili za analizo agarozne gelske elektroforeze. Iz PCR epic smo na parafilm odpipetirali 5,5 µl vsakega produkta PCR (slika 9). Nato smo produkte PCR odpipetirali iz parafilma v jamice agaroznega gela. V prvo jamico smo vstavili standardno lestvico DNK (GeneRuler™ 1kb+), ki je služila za primerjavo velikosti pomnoženih produktov PCR (slika 10).



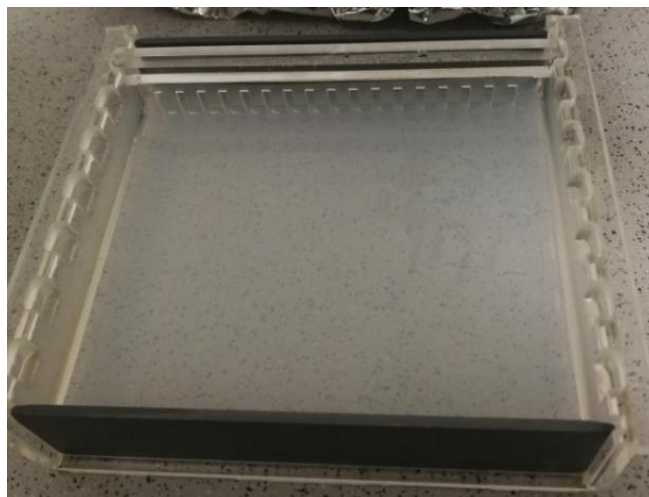
Slika 9: Pipetiranje produktov PCR na parafilm



Slika 10: Standardna DNK-lestevica (GeneRuler™ 1kb+) z označenimi velikostnimi razredi števila baznih parov (bp). Rdeča puščica označuje pričakovano velikost pomnoženih fragmentov regije *rbcL*.

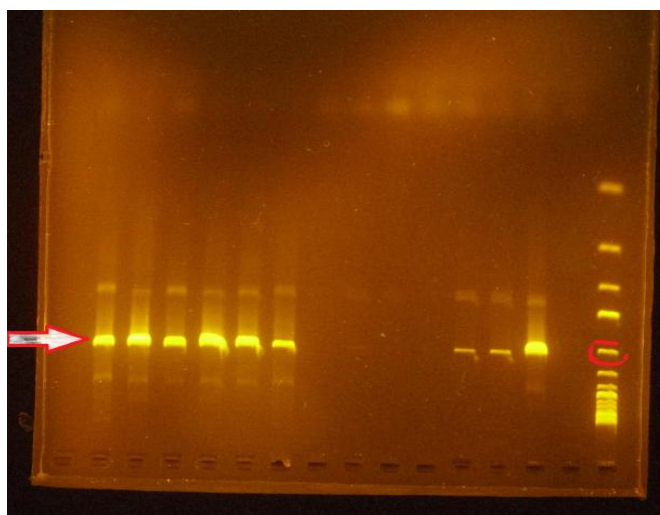
2.3.2 Priprava agaroznega gela in ločevanje produktov reakcij PCR

Uspešnost vsakega pomnoževanja produktov PCR smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo na 2-odstotnem agaroznem gelu. 2-odstotni agarozni gel smo pripravili iz 1,6 g agaroze, 80 ml 1xTAE pufra (20 mM Tris-acetat s pH 7,4) in 2 μ l etidijevega bromida (EtBr). Stehtali smo 1,6 g agaroze, ki smo jo prenesli v 200 ml čašo in ji dodali 80 ml 1xTAE pufra. V mikrovalovni pečici smo čašo segrevali toliko časa, dokler nismo agaroze popolnoma raztopili. Tekoči gel smo delno ohladili (do približno 50°C), dodali EtBr ter vsebino dobro premešali in prelili v kalup za izdelavo agaroznega gela (slika 11). Po 30 minutah se je gel strdil, zato smo ga odstranili iz kalupa in ga prenesli v elektroforezno kad (Power Pack P25, Biometra), kamor smo predhodno nalili 1xTAE pufer.



Slika 11: Kalup za pripravo agaroznega gela

Na gel smo nanесли vzorce in standardno DNK lestvico (GeneRuler™ 1kb+). Elektroforeza je potekala 75 minut pri napetosti 125 V. Po končani elektroforezi smo gel prenesli na UV-transluminator, kjer smo vizualizirali produkte reakcije PCR. Vizualizacijo produktov PCR omogoča barvilo etidijev bromid, ki se veže na DNK vijačnico in pod UV-svetlobo fluorescira. Na ta način vidimo, kolikšno dolžino so produkti PCR prepotovali med elektroforezo. Če je bilo pomnoževanje produktov PCR uspešno, je bil na transluminatorju viden signal pomnoževanja pri dolžini okoli 1500 baznih parov (slika 12). Kljub temu da so se pomnožili tudi nespecifični produkti, vidni na sliki 12 (v različnih velikostnih razredih), so bili signali specifičnih produktov PCR dovolj močni za uspešno sekveniranje.



Slika 12: Primer uspešno pomnoženih produktov PCR, vidnih pod UV-lučjo transluminatorja. Na desni strani je označen velikostni razred standardne DNK-lestvice, kjer pričakujemo signale pomnoženih fragmentov gena *rbcL*. Puščica označuje signale (elektroforezne črte) uspešno pomnoženih fragmentov gena *rbcL*.

Gel smo fotografirali s fotoaparatom Nikon in rezultate vnesli v evidenčni laboratorijski program Scinote. Na ta način smo imeli pregled nad pomnoževanjem in sekveniranjem

vzorcev. Za vsak vzorec smo pregledali slike vseh verižnih reakcij PCR in na podlagi elektroforezne črte ter dolžine produkta PCR (vsak par začetnih nukleotidov pomnoži produkt določene značilne dolžine, v našem primeru okoli 1500 bp) predvideli, ali so dolžine sekvence *rbcL* ustrezne za identifikacijo vrst rodu *Pseudo-nitzschia*.

2.3.3 Sekveniranje produktov reakcij PCR

Po uspešno pomnoženih produktih PCR smo morali določiti nukleotidno zaporedje pomnoženim delom DNK (vseh treh regij) ter pregledati in primerjati nukleotidna zaporedja. Uspešno pomnoženim fragmentom DNK smo odstranili začetne oligonukleotide, enoverižno DNK in druge nespecifične produkte s pomočjo eksonukleaze (Exonuclease I, ThermoFisher Scientific) in alkalne fosfataze (FastAP, ThermoFisher Scientific) v razmerju 1 : 0,1 : 0,2 μ l (vzorec: eksonukleaza: alkalna fosfaza). Pridobljene amplikone regij *rbcL*, ITS1-5.8S-ITS2 in 28S smo poslali sekvenirati v podjetje Macrogen Inc. Nukleotidna zaporedja sekvenc so določili z avtomatizirano metodo sekveniranja po Sangerju.

2.4 Analiza nukleotidnih zaporedij

Pridobljena nukleotidna zaporedja rodu *Pseudo-nitzschia* (vseh treh regij) smo nato primerjali z dostopnimi sekvencami v podatkovni bazi GenBank, ki smo jih izvozili v Fasta formatu. V podatkovni bazi je bilo dostopnih 71 *rbcL* sekvenc rodu *Pseudo-nitzschia* (priloga B). Te smo primerjali s 13 pridobljenimi *rbcL* sekvencami. Po vzoru članka Lundholm in sod. (2012) smo v analizo sekvenc *rbcL* vključili zunanjo skupino (*Nitzschia frustulum*, akcisijska številka HF675069,1).

S pomočjo programske opreme DAMBE7 (Xia 2018) smo najprej preverili, ali se med sekvencami pojavljajo identična nukleotidna zaporedja, pri čemer identične sekvence nismo uporabili pri analizi (priloga B). Nato smo s programom MAFFT 7 (Katoh in sod. 2002) poravnali sekvence z metodo FFT-NS-i (angl. *iterative refinement method*), ki za analizo podatkov podobnosti med sekvencami uporablja algoritem hitre Fourijeve transformacije (FFT; Katoh in sod. 2002). Poravnane sekvence smo izvozili v obliki fasta formata in jih analizirali v programu Aliview 1.22 (Larsson 2014), kjer smo sekvence obrezali z namenom poenotenja dolžine med različno dolgimi sekvencami. Na ta način smo odstranili dvomljive in neinformativne regije na začetku in koncu poravnave sekvenc, kjer pogosto prihaja do napak pri pomnoževanju in sekveniranju, zato z obrezanimi regijami nismo izgubili relevantnih informacij genetskega zapisa. Pravilno poravnane in orientirane primarne strukture sekvenc smo nato uporabili za filogenetske analize.

2.5 Izris filogenetskih dreves

Iz poravnanih nukleotidnih zaporedij smo izdelali filogenetsko drevo Bayesovega sklepanja z uporabo nukleotidnega substitucijskega modela GTR+I+G (model z gama distribuirano različnostjo v stopnji mutacij; Tavaré 1986), ki ocenjuje šest možnih stopenj sprememb baz (nst=6). Model predpostavlja, da: (a) je substitucijska matrika simetrična in zato časovno reverzibilna; (b) se timin spreminja v adenin z isto stopnjo hitrosti, kot se adenin v timin; (c) ima vsaka nukleotidna substitucija različno stopnjo v hitrosti evolucije; (d) se nukleotidi pojavljajo z različno frekvenco (Tavare 1986; Rodríguez in sod.1990).

Model GTR z gama distribuirano različnostjo v stopnji mutacij (+G) in z določeno mero nevariabilnih mest (+I) smo določili z orodjem JModelTest2 (Posada 2008). Filogenetsko analizo smo izvedli v programu MrBayes 3.2.6. (Ronquist in Huelsenbeck 2003), ki temelji na Bayesovi statistiki (Huelsenbeck in Ronquist 2001). Pri tem smo izvajali filogenetsko analizo za 5 milijonov generacij. Filogenetska drevesa smo nato preučili in uredili v programu FigTree 1.4.3.(tree.bio.ed.ac.uk), pri čemer smo filogenetsko drevo ukoreninili glede na nukleotidno zaporedje zunanje skupine. Filogenetsko drevo smo v končnem koraku vizualizirali s pomočjo programa InkScape 3 (inkscape.org), kjer smo vizualno poudarili pridobljene sekvence in olajšali pregled sorodstvenih odnosov med vrstami rodu *Pseudo-nitzschia*.

3 REZULTATI Z DISKUSIJO

3.1 Filogenetska analiza regije *rbcL*

S pomočjo molekularnih metod na različnih delih genoma (*rbcL*, 28S in ITS1-5.8S-ITS2) smo želeli identificirati vrste rodu *Pseudo-nitzschia* v slovenskem morju in jih primerjati z vrstami iz severnega Jadrana.

Velika podenota Rubisca (*rbcL*) je ena izmed dobro evolucijsko ohranjenih regij. Omogoča podroben vpogled v filogenetske odnose vrst, predvsem zaradi velike intraspecifične divergence (Macgillivray in Kaczmarska 2011). Dedovanje plastidne DNK (kot je *rbcL*) je namreč pri vrstah rodu *Pseudo-nitzschia* po večini bi-parentalno (obojestarševsko), zato prihaja do rekombinacije genetskega materiala, kar se odraža v večji intraspecifični divergenci znotraj rodu (D'Alelio in Ruggiero 2015). Z analizo *rbcL* smo želeli pridobiti informacije o morebitnem obstoju varietet znotraj populacij vrst rodu *Pseudo-nitzschia*, pridobiti informacije o filogenetskih odnosih vrst in rezultate regije *rbcL* primerjati z ITS in 28S. Kjer je podpora filogenetskih odnosov sekvenc *rbcL* visoka (blizu 1; označeno z

rdečo zvezdico na sliki 13), lahko z veliko verjetnostjo trdimo, da gre za identificiran haplotip oziroma različico znotraj populacije (npr. sekvenca 817_A1).

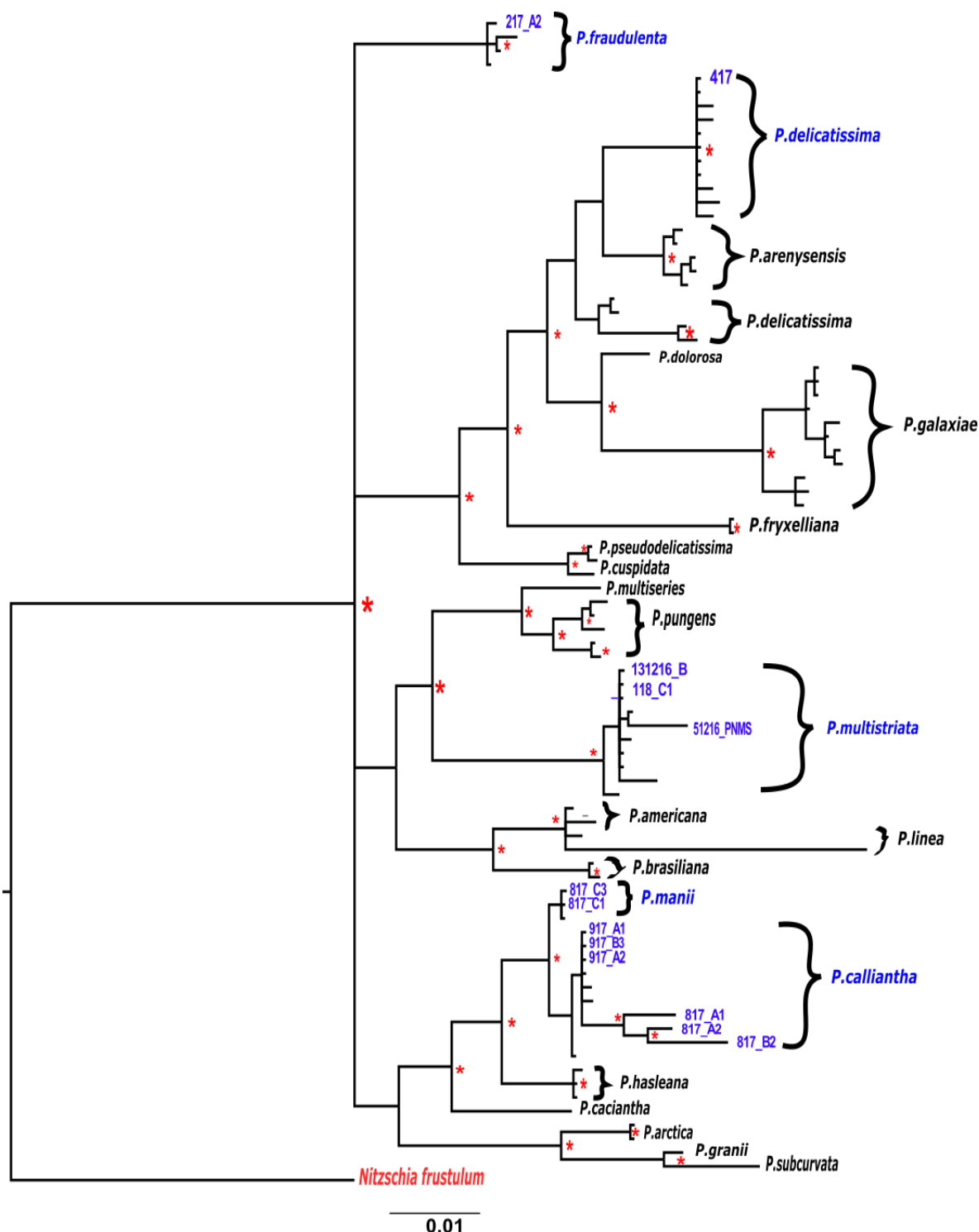
rbcL je ustrezen marker tudi za odkrivanje haplotipske raznolikosti znotraj vrstne pestrosti rodu *Pseudo-nitzschia* (Amato in sod. 2008), česar pa v naši raziskavi nismo uspeli izvesti. Haplotipi *rbcL* se lahko nadaljnje uporabljajo za raziskovanje plastidnega dedovanja med spolnim razmnoževanjem (anizogamijo) in posledično za identificiranje obstoja naravnih hibridov znotraj vrst rodu *Pseudo-nitzschia* (Amato in sod. 2007; Ghiron in sod. 2008). Ker je pojav naravnih hibridov med vrstami *Pseudo-nitzschia* pogost pojav (Amato in sod. 2007), lahko z markerjem *rbcL* določimo hibridizacijo med naravnimi hibridi tako na intraspecifičnem² (D'Alelio in sod. 2009) kot interspecifičnem³ nivoju (Casteleyn in sod. 2009; D'Alelio in Ruggiero 2015). *rbcL* je kodirajoča in bolj konservativna regija kot regija ITS, ki je bolj dovzetna za mutacije, zato je zelo uporabna za preučevanje filogenetskih odnosov znotraj rodu *Pseudo-nitzschia*. V sklopu naše filogenetske raziskave smo zato želeli potrditi hipotezo, da je marker *rbcL* veliko bolj informativen v primerjavi z ITS in 28S.

Pri filogenetski analizi regije *rbcL* smo primerjali 13 pridobljenih sekvenc *rbcL* z 71 sekvencami, dostopnimi v podatkovni bazi GenBank. Rezultati pridobljenih sekvenc *rbcL* potrjujejo, da se sevi nahajajo znotraj kladov vrst ***P. fraudulenta*** (oznaka 217_A2), ***P. delicatissima*** (oznaka 417), ***P. multistriata*** (oznake 131216_B, 188_C1, 51216_PNMS), ***P. manii*** (oznaki 817_C1, 817_C3) in ***P. calliantha*** (oznake 917_A1, 917_A2, 917_B3, 817_A1, 817_A2, 817_B2). Filogenetski odnosi sekvenc *rbcL* so prikazani na sliki 13, pri čemer so podpore filogenetskega drevesa dokaj visoke. Izjema je ločitev klada *P. delicatissima* in *P. arenysensis* (*P. arenysensis* je kriptična vrsta znotraj klada *P. delicatissima*; Quijano-Scheggia in sod. 2009), kar moramo v analizi upoštevati kot nezanesljiv filogenetski odnos.

Na podlagi dosedanjih raziskav toksičnosti so izmed naštetih identificiranih vrst v slovenskem morju potencialno toksične *P. fraudulenta*, *P. delicatissima*, *P. multistriata* in *P. calliantha* (priloga A; Lelong in sod. 2012), zato je nujna podrobnejša raziskava omenjenih vrst v slovenskem morju, predvsem z vidika produkcije domojke kisline.

² intraspecifičnem ali znotrajvrstnem nivoju. To pomeni, da poteka hibridizacija tudi na nivoju populacij ali podvrst.

³ interspecifičnem ali medvrstnem nivoju. To pomeni, da poteka hibridizacija med različnimi vrstami znotraj rodu *Pseudo-nitzschia*.



Slika 13: Filogenetska analiza rodu *Pseudo-nitzschia* na podlagi regije *rbcL*. Rdeča barva označuje zunanjo skupino (angl. *outgroup*), modra barva pa označuje sekvence, pridobljene v naši raziskavi. Rdeča zvezdica označuje dobro evolucijsko podprte klade (filogenetske odnose nad 0,95). Filogenetska rekonstrukcija temelji na metodi Bayesovega sklepanja. Pri analizi smo uporabili model GTR+I+G. Filogenetska analiza zajema evolucijo 5 milijonov generacij.

Filogenetski odnosi se ujemajo z raziskavo avtorjev D'Alelio in Ruggiero (2015) z navidezno izjemo klada *P. fraudulenta* (slika 7 in 13). V naši raziskavi *P. fraudulenta*

predstavlja navidezno ločen klad, v raziskavi D'Alelio in Ruggiero (2015) pa *P. fraudulent*a spada v klad skupaj s *P. hasleana*, *P. turgiduloides*, *P. manii*, *P. calliantha* in *P. cacialantha*, pri čemer je najbolj sorodna vrsti *P. hasleana*. Kljub temu pa je razlika le navidezna. Razlikovanje v razmejitvi kladov je posledica dodane zunanje skupine *Nitzschia frustulum* v sklopu naše raziskave, kar je filogenetsko drevo ukoreninilo na drugačnem mestu, v primerjavi z raziskavo D'Alelio in Ruggiero (2015), ki filogenetskega drevesa nista ukoreninila. Prav tako ima tipologija filogenetskega drevesa njune raziskave slabo podprto razmejitev omenjenih kladov (*P. fraudulent*a in *P. hasleana*, *P. turgiduloides*, *P. manii*, *P. calliantha* in *P. cacialantha*), čeprav iz morfoloških raziskav vemo, da sta klada (*P. fraudulent*a in *P. hasleana* z ostalimi omenjenimi vrstami) ločena, kot je prikazano v naši raziskavi. Razlikovanje v filogenetskih odnosih sekvenc *rbcL* bi lahko pripisali tudi dodatnim obravnavanim sekvencam *rbcL* v sklopu naše raziskave, saj je bilo v teku raziskovanja na voljo več sekvenc *rbcL* v podatkovni bazi GenBank kot v letu 2015.

Pridobljene sekvence z oznakami ter vrstno pripadnostjo so prikazane v preglednici 4. Filogenetske analize pridobljenih sekvenc so ne glede na različne regije uvrstile obravnavane sekvence pod iste vrste (preglednica 5; slike 13, 14 in 15). Glede na varietete znotrajvrstne pestrosti regije *rbcL* smo opazili različno filogenijo sekvenc 817 A1, 817 A2, 817 B2, 917 A1, 917 A2 in 917 B3 v primerjavi s filogenetsko analizo na regiji ITS (slika 14) in 28S (slika 15). Ker so podpore filogenetskih odnosov visoke (blizu vrednosti 1), lahko glede na filogenijo sekvenc *rbcL* z veliko gotovostjo trdimo, da gre za dva različna haplotipa znotraj populacije *P. calliantha*. Omenjene sekvence imajo namreč veliko večjo intraspecifično divergenco na pomnoženi regiji *rbcL*, saj se sekvence 817 (A1, A2 in B2) uvrščajo v posebno podklado znotraj klade *P. calliantha* v primerjavi z markerji ITS in 28S, ki ne razlikujejo med omenjenimi sekvencami. Na ta način smo potrdili hipotezo o večji informativnosti markerja *rbcL* v primerjavi z regijo ITS in 28S. Glede na rezultate le ene analize ne moremo povsem potrditi obstoja divergentnih haplotipov. Regija ITS naj bi bila podobno informativna kot regija *rbcL*, vendar ni prikazala divergence znotraj populacije *P. calliantha*. Ker se rezultati regij *rbcL* in ITS deloma razlikujejo, analiza ni popolna, zato bi morali narediti dodatne raziskave za potrditev obstoja varietet znotraj populacije *P. calliantha*. To bi lahko preverili z mikroskopskim opazovanjem ultrastrukturnih lastnosti frustule posameznih identificiranih sekvenc ali s podrobnejšo filogenetsko analizo haplotipov z metodo Neighbor ali Median Joining. Sekvence *rbcL* prikazujejo tudi divergenco znotraj populacije *P. multistriata* (vzorec 51216-PNMS), vendar zaradi slabe kvalitete sekvence 51216-PNMS in slabo podprtih filogenetskih odnosov ni mogoče potrditi, da gre za haplotipsko različico znotraj klade *P. multistriata*.

Preglednica 5: Evidenca pridobljenih sekvenc in vrstna pripadnost, prepoznana na podlag regije *rbcL*, ITS in 28S. Preglednica ne zajema vseh sekvenc regij ITS in 28S. Zajema le tiste, ki smo jih pridobili na regiji *rbcL* in jih primerjali z regijo ITS in 28S. Oznaka X označuje regije, kjer nismo pridobili sekvence določenih sevov.

Vrstna pripadnost glede na regijo			
Sekvence	<i>rbcL</i>	ITS	28S
217_A2	<i>P.fraudulenta</i>	<i>P. fraudulenta</i>	<i>P. fraudulenta</i>
417	<i>P.delicatissima</i>	X	<i>P.delicatissima</i>
131216_B	<i>P.multistriata</i>	X	<i>P.multistriata</i>
118_C1	<i>Pmultistriata</i>	<i>P.multistriata</i>	X
51216_PNMS	<i>P.multistriata</i>	<i>P.multistriata</i>	<i>P.multistriata</i>
817_C3	<i>P.manii</i>	X	<i>P.manii</i>
817_C1	<i>P.manii</i>	<i>P.manii</i>	<i>P.manii</i>
917_A1	<i>P.calliantha</i>	<i>P.calliantha</i>	<i>P.calliantha</i>
917_A2	<i>P.calliantha</i>	<i>P.calliantha</i>	<i>P.calliantha</i>
917_B3	<i>P.calliantha</i>	<i>P.calliantha</i>	<i>P.calliantha</i>
817_A1	<i>P.calliantha</i>	X	<i>P.calliantha</i>
817_A2	<i>P.calliantha</i>	<i>P.calliantha</i>	<i>P.calliantha</i>
817_B2	<i>P.calliantha</i>	<i>P.calliantha</i>	<i>P.calliantha</i>

V nadaljevanju bi morali natančneje analizirati identificirane varietete znotraj *P. calliantha* in *P. multistriata*, pri čemer bi bilo treba na podlagi regije ITS2 ali z opazovanjem v kulturah ugotoviti spolno (in)kompatibilnost med identificiranimi varietetami. Na ta način bi preverili, ali gre za reproduktivno ločene entitete. Prav tako bi morali narediti dodatne raziskave o ekologiji ter morfologiji odkritih varietet, da bi ugotovili, ali med njimi prihaja do ekoloških, fizioloških in morfoloških razlikovanj. Na ta način bi pojasnili, ali odkrite varietete znotraj populacij predstavljajo morebitne naravne hibride med vrstami ali populacije z različno populacijsko dinamiko, ali pa je marker *rbcL* pokazal zgolj preveliko intraspecifično divergenco, kot je že bilo dokazano v nekaterih študijah na podlagi regije *rbcL* (Amato in sod. 2007; Macgillivray in Kaczmarska 2011). Kljub temu pa smo potrdili, da se filogenetska drevesa različnih regij genoma razlikujejo, saj ima filogenetska analiza regije *rbcL* večjo intraspecifično divergenco v primerjavi z regijama ITS in 28S.

V analizi so nekatere podpore filogenetskih odnosov slabo podprte (klade, ki niso označene z rdečo zvezdico). To je posledica slabše kakovosti nekaterih sekvenc ali pa so slabo podprte klade posledica predpostavk izbranega substitucijskega modela (GTR-modela z gama distribuirano različnostjo v stopnji mutacij (+G) in z določeno mero nevariabilnih mest (+I)). Za slabo podprte filogenetske odnose ni povsem verjetno, da sta taksona sestrski (npr. taksona *P. arenysensis* in *P. delicatissima* na sliki 13). Zaradi slabe podpore so zato nekateri filogenetski odnosi dvomljivi. Kljub temu da GTR-model podaja

realističen potek evolucije predvsem zaradi upoštevanja vseh stopenj mutacij, ima GTR-model veliko parametrov. To lahko vodi do preparametrizirane statistične analize, kar lahko vodi do statističnih napak tipa 1 (angl. *type I errors*). Zato moramo biti pri dojemanju filogenetskih odnosov znotraj rodu *Pseudo-nitzschia* previdni, saj niso vse klade dobro podprte, kar lahko vodi v napačno sklepanje filogenetskih odnosov med vrstami.

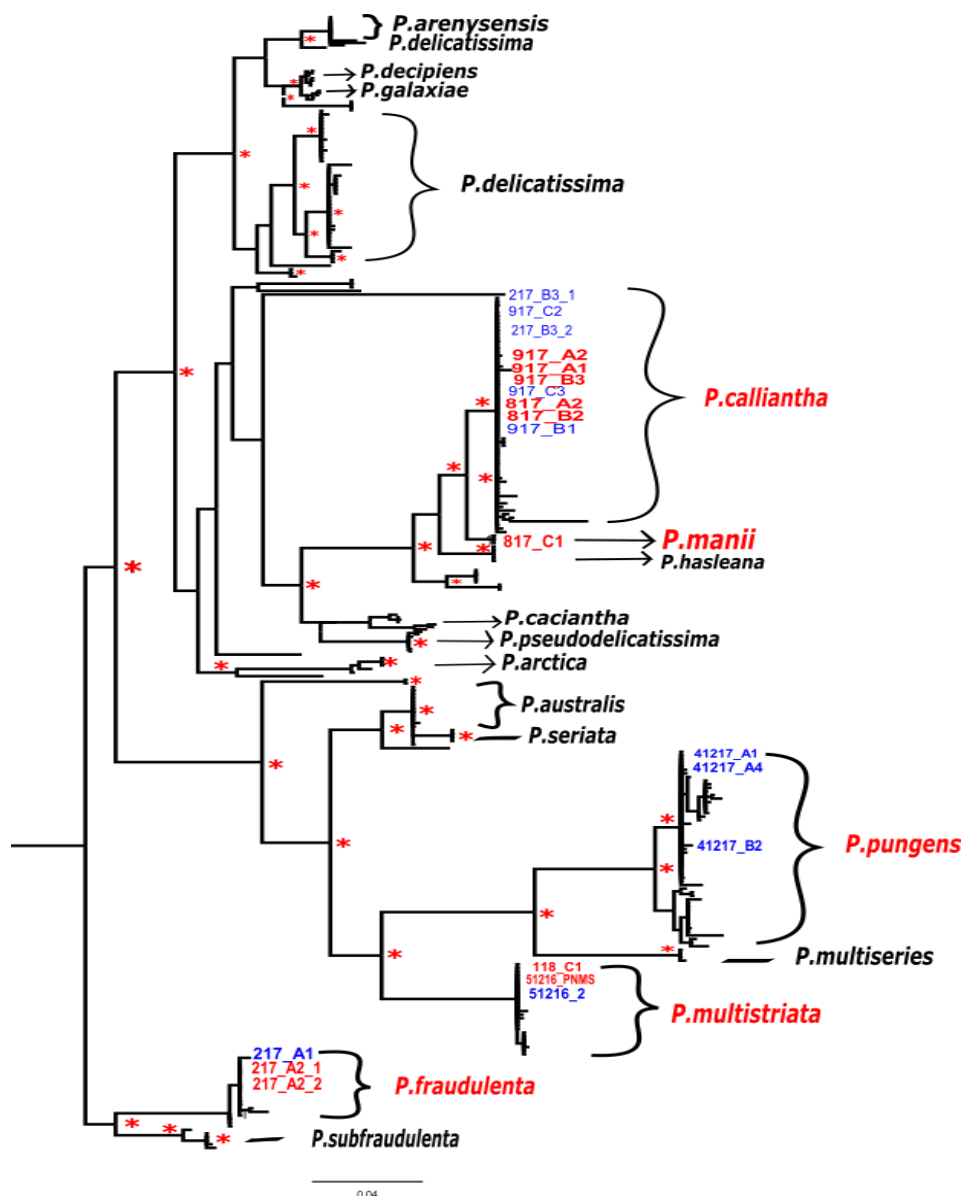
3.2 Filogenetska analiza regije ITS1-5.8S-ITS2

Poleg petih identificiranih vrst na podlagi sekvenc *rbcL* (slika 13) smo na podlagi regij ITS (slika 14) in 28S (slika 15) identificirali tudi vrsto *P. pungens*. S sekvencami *rbcL* je tekom naše raziskave nismo utegnili identificirati.

Največkrat uporabljena regija za identifikacijo je notranja prepisana regija (ITS; slika 14), pri čemer je najpogosteje uporabljena regija ITS1-5.8S-ITS2, saj je zelo informativna in jasno prikazuje ločevanje vrst rodu *Pseudo-nitzschia* (Lundholm in sod. 2003; Amato in sod. 2007). Je del jedrnega ribosomalnega RNK cistrona (Hillis in Dixon 1991). Regija ITS ribosomske RNK ohranja svojo strukturo in funkcionalnost kljub številnim spremembam nukleotidov. Zato regija ITS kopiči mutacije zelo hitro (Cech 1990; Patwardhan in sod. 2014) ter je zelo dober marker za preučevanje taksonomije in molekularne filogenije, ker dobro diskriminira med biološko različnimi entitetami, ki so v tesno sorodnih odnosih (Coleman 2003). Kot marker ima številne pozitivne lastnosti:

- je majhna, univerzalna regija, sestavljena iz dobro ohranjenih in tudi variabilnih območij (Patwardhan in sod. 2014);
- je evolucijsko hitro razvijajoča se regija, zato so pogoste bazne substitucije in naključne mutacije, kar omogoča znotrajvrstno razlikovanje rodu. Cistroni se namreč pojavljajo v vsakem genomu v tandemskih ponovitvah. Takšna organizacija dovoljuje sekvenčni homogenizacijski mehanizem, kjer prihaja do pretvorbe genov in do naključnih prekrižanj (angl. *crossing over*) med mejotsko delitvijo (Hillis in Dixon 1991). Naključna narava takšnega mehanizma omogoča diferenciacijo reproduktivno ali geografsko izoliranih populacij (D'Alelio in sod. 2009);
- prikazuje visoko stopnjo variacij med ozko-sorodnimi vrstami, kar omogoča vpogled v znotrajvrstno pestrost rodu *Pseudo-nitzschia* (Cech 1990; D'Alelio in sod. 2009).

Te lastnosti uvrščajo marker ITS kot dobro orodje za preučevanje ozkosorodnih taksonov. Vendar filogenetska drevesa regije ITS in 28S naše raziskave niso najboljše podprta, kar je treba pri interpretaciji filogenetskih odnosov vrst *Pseudo-nitzschia* vzeti v obzir kot negotove sorodstvene odnose. Kot že omenjeno, so slabe filogenetske podpore lahko posledica slabše kvalitete nekaterih sekvenc ali pa izbranega substitucijskega modela.

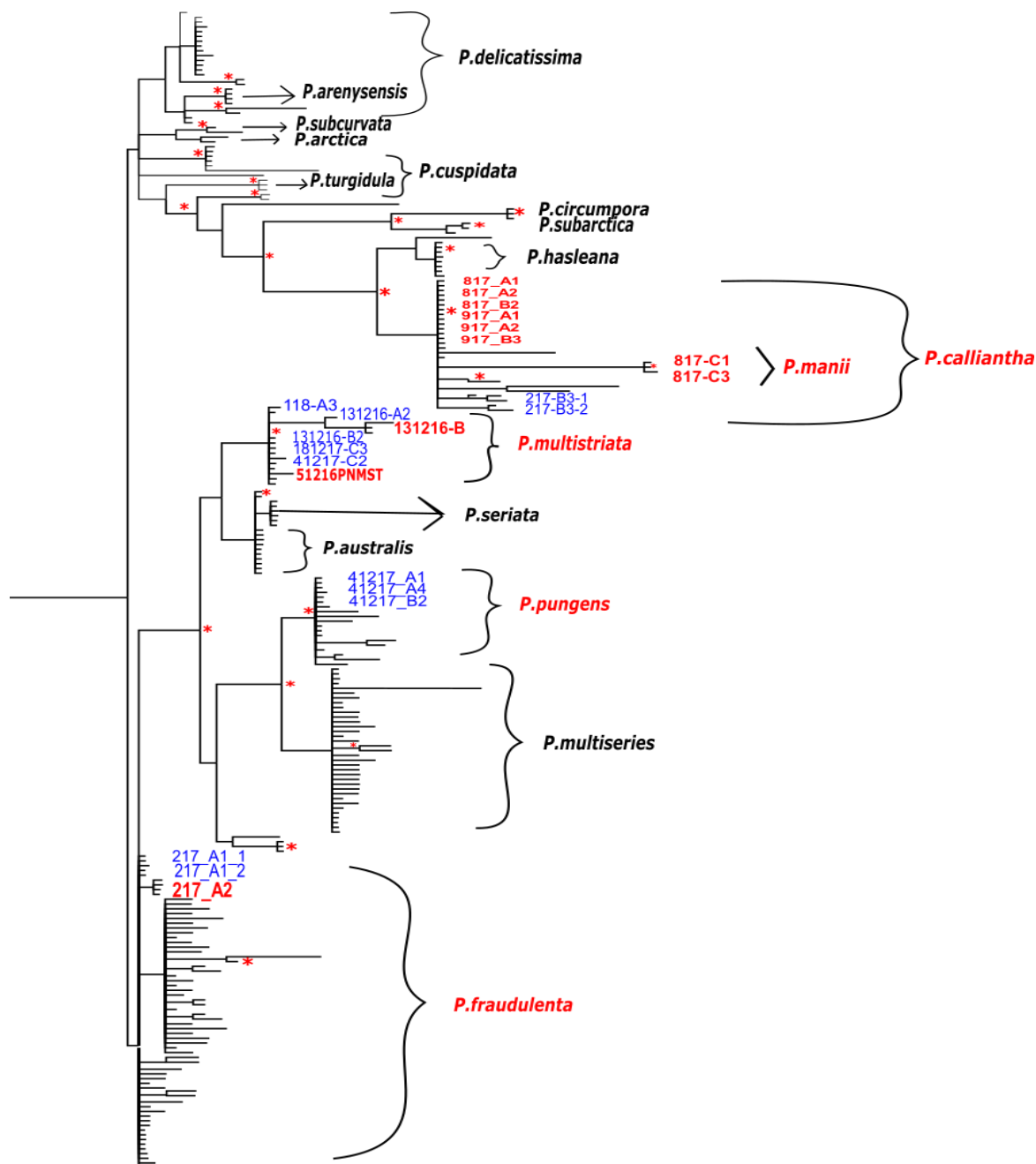


Slika 14: Filogenetska analiza rodu *Pseudo-nitzschia* na podlagi regije ITS1-5.8S-ITS-2, izvedena z modelom GTR+I+G (Turk Dermastia 2018, neobjavljeno). Rdeča barva prikazuje sekvence, ki smo jih primerjali s sekvencami *rbcL*, modra pa sekvence, ki smo jih dodatno pridobili le na regiji ITS (ne pa tudi *rbcL*). Rdeča zvezdica prikazuje dobro podprte klade. Drevo smo ukoreninili na kladu *P. fraudulenta*.

3.3 Filogenetska analiza regije 28S

Regija 28S velja za dober marker za preučevanje filogenije in taksonomije vrst, saj je zelo univerzalna in hkrati vrstno specifična. Sestavljena je iz dobro ohranjenih regij in variabilnih regij (Woese 1987). Geni, ki kodirajo rRNK, so zelo konservativni in počasno razvijajoči, zato nakazujejo na spremembe, ki so se zgodile zgodaj v evoluciji organizmov (Moritz in sod. 1993). Zato je marker 28S uporaben za raziskovanje daljnih filogenetskih odnosov rodu *Pseudo-nitzschia*, ne pa tudi za preučevanje evolucijsko novejših mutacij. Zaradi počasne evolucije regije ni najbolj primeren marker za raziskovanje filogenetskih

odnosov rodu *Pseudo-nitzschia*. Znotraj rodu *Pseudo-nitzschia* gre namreč za razlikovanje med ozkosorodnimi taksoni, ki so visoko divergentni, zato marker 28S ne omogoča vpogleda v znotrajvrstno pestrost, ampak zgolj v medvrstno pestrost rodu. S tega vidika je regija *rbcL* veliko bolj informativna, saj omogoča vpogled tudi v intraspecifično divergenco rodu *Pseudo-nitzschia*.



Slika 15: Filogenetska analiza rodu *Pseudo-nitzschia* na podlagi regije 28S, izvedena z modelom HKY (angl. Hasegawa-Kishino-Yani model; Turk Dermastia 2018, neobjavljeno). Rdeča barva sekvenc označuje sekvence, ki smo jih primerjali s pridobljenimi sekvencami *rbcL*, modra pa sekvence, ki smo jih pridobili le na podlagi regije 28S. Z rdečo barvo so označene vrste, ki smo jih identificirali na podlagi regije 28S. Rdeče zvezdice označujejo dobro evolucijsko podprte klade. Drevo smo ukoreninili na kladu *P. fraudulenta*.

3.4 Interpretacija rezultatov

Rezultate raziskave (predvsem filogenetskih odnosov) ne smemo interpretirati kot popolnoma zanesljive, saj so nekatere filogenetske podpore slabe in zato ne potrjujejo, da so nekateri taksoni zares sorodni. Prav tako je treba upoštevati, da pri vsaki genotipizaciji (določevanju genotipa) prihaja do genotipizacijskih napak (Bonin in sod. 2004). Te so opredeljene kot ugotovljene razlike med molekularnimi genotipi, pridobljenimi neodvisno iz istega vzorca. Vsak genski zapis namreč vsebuje nekaj popačenih genotipov. Tako identificirani genotip ne sovпада z resničnim genotipom osebkov, ki ga preiskujemo (Bonin in sod. 2004; Pompanon in sod. 2005). Napake pri genotipizaciji so vedno prisotne, ker molekularna analiza in ročna obdelava vzorcev nista 100-odstotno zanesljivi. Te lahko nastanejo na vsakem koraku genotipizacije (pri vzorčenju, ekstrakciji DNK, molekularni analizi, analizi podatkov) ter zaradi različnih dejavnikov (naključje, človeške ali tehnične napake). Po avtorjih članka Bonin in sod. (2004) bi morali v vsako molekularno raziskavo vključiti oceno napak genotipizacije. V raziskavah populacijske genetike napake genotipizacije namreč vplivajo na oceno frekvenc alelov in na natančno razlikovanje med različnimi genotipi (Bonin in sod. 2004). Napačna ocena frekvence alelov lahko poda napačne informacije o presežku homozigotnosti (Taberlet in sod. 1996), pojavu interbreedinga (razmnoževanje med ozkosorodnimi taksoni) v populaciji (Taberlet in sod. 1999) ali o nezanesljivih podatkih o populacijskih podstrukturah (Miller in sod. 2002). Prav tako lahko napačno prepoznani genotipi vplivajo na neustrezno oceno velikosti populacije (Creel in sod. 2003), napačno identifikacijo organizmov (Paetkau 2003) in starševske analize (Miller in sod. 2002). Zaradi časovne omejitve v sklopu naše raziskave nismo ocenili napak genotipizacije. Glede na to, da smo analizirali le tri gene, lahko predpostavljamo, da je napak genotipizacije zelo malo ali pa ji sploh ni.

4 ZAKLJUČEK

Identifikacija potencialno toksičnih fitoplanktonskih vrst rodu *Pseudo-nitzschia* je zelo pomembna z vidika ohranjanja zdravega morskega ekosistema in zdravja ljudi. Številne vrste tega rodu proizvajajo toksično domojso kislino, ki se kopiči v organizmih višjih trofičnih nivojev prehranjevalnega spleta. Zato je prepoznavanje ločenih taksonomskih enot izjemno pomembno tako za ugotavljanje biotske pestrosti fitoplanktonske združbe nekega območja kot za razumevanje ekologije, biogeografskih vzorcev, evlucijskih procesov ter mehanizmov speciacije vrst rodu *Pseudo-nitzschia* (Amato in sod. 2007) in toksičnosti posameznih vrst.

V naši raziskavi smo želeli: identificirati vrste rodu *Pseudo-nitzschia* v slovenskem morju z uporabo genetskih metod; ugotoviti, ali so identificirane vrste iste, kot jih omenjajo v

dosedanjih raziskavah na območju severnega Jadrana; primerjati rezultate filogenetske analize z drugimi raziskavami diatomejskih vrst *Pseudo nitzschia* spp.; ugotoviti uporabnost markerja *rbcL* za identifikacijo vrst rodu *Pseudo-nitzschia* v primerjavi z uporabo markerjev 28S in ITS1-5.8S-ITS2; preveriti hipotezo, da s filogenetsko analizo regije *rbcL* dobimo večji spekter informacij kot na regiji 28S ali ITS1-5.8S-ITS2 in da se bodo filogenetska drevesa med seboj razlikovala.

V raziskavi smo identificirali potencialno toksične vrste rodu *Pseudo-nitzschia* ter potrdili hipotezo o večji informativnosti regije *rbcL* v primerjavi z regijami ITS in 28S. Potrdili smo tudi hipotezo, da se filogenetska drevesa med seboj razlikujejo.

Na podlagi genetske analize na treh različnih regijah genoma (*rbcL*, ITS1-5.8S-ITS2 in 28S) smo v slovenskem morju identificirali šest vrst: ***P. manii***, ***P. delicatissima***, ***P. multistriata***, ***P. calliantha***, ***P. fraudulenta*** in ***P. pungens***. Vrst *P. pseudodelicatissima*, *P. subfraudulenta*, *P. galaxiae* in *P. seriata*, ki se pojavljajo na širšem območju severnega Jadrana, v naši raziskavi nismo našli. Identificirane vrste v slovenskem morju so se v številnih raziskavah izkazale kot toksične (z izjemo *P. manii*; Amato in Montresor 2008), zato to narekuje nadaljnje analize, predvsem ugotavljanje sposobnosti produkcije domojске kisline v povezavi z okoljskimi in biološkimi dejavniki.

V sklopu raziskave smo ugotavljali tudi uporabnost markerja velike podenote Rubisca (*rbcL*) za identifikacijo vrst rodu *Pseudo-nitzschia* v primerjavi z uporabo markerjev 28S in ITS1-5.8S-ITS2. Potrdili smo hipotezo, da se filogenetska drevesa na podlagi teh markerjev razlikujejo. Filogenetsko drevo markerja *rbcL* prikazuje veliko večjo intraspecifično divergenco vrste *P.calliantha*, ki je nismo ugotovili z nobenim drugim markerjem. Na ta način smo potrdili hipotezo, da z uporabo markerja *rbcL* dobimo večji spekter informacij kot z ITS1-5.8S-ITS2 ali 28S.

Da bi v celoti potrdili večjo informativnost markerja *rbcL* (spolnem razmnoževanju, dedovanju plastidne DNK in obstoju hibridizacijskih con med identificiranimi vrstami), so potrebne nadaljnje analize. Zato predlagamo, da se v prihodnosti analizirajo:

- spolno razmnoževanje identificiranih haplotipov/varietet znotraj populacij na podlagi markerja *rbcL* z namenom ugotavljanja reproduktivno izoliranih haplotipov znotraj vrst rodu *Pseudo-nitzschia*;
- sekundarna struktura regije ITS2⁴, s katero preverimo, ali so identificirani haplotipi reproduktivno izolirani;

⁴ Določevanje spolne kompatibilnosti (ujemanja) med različnimi sevi/haplotipi rodu *Pseudo-nitzschia* je povezano s preučevanjem sekundarne strukture regije ITS2. Spremembe baznih parov na stebričkih (imenovane CBC in HCBC) se uporablja kot molekularno orodje za določevanje spolnega ujemanja.

- plastidno (rekombinirano) dedovanje identificiranih haplotipov, saj bi na ta način potrdili oz. zavrgli obstoj naravnih hibridov v slovenskem morju.

Poleg genetskih analiz so potrebne tudi dodatne morfološke raziskave ultrastrukturnih lastnosti frustul identificiranih haplotipov. Boljše poznavanje vrstne sestave rodu *Pseudo-nitzschia* bi pomenilo tudi napredek v ekoloških študijah, ki so zdaj omejene na poznavanje časovne in prostorske dinamike ter pojavov cvetenja zgolj na nivoju roda *Pseudo-nitzschia*.

5 LITERATURA IN VIRI

AlgaeBase. www.algaebase.org (datum dostopa: 19.8.2018)

Amato A., Orsini L., D'Alelio D., Montresor M. 2005. Life cycle, size reduction patterns and ultrastructure of the pennate planktonic diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 41: 542–556.

Amato A., Kooistra W.H.C.F., Ghiron J.H.L., Mann D.G., Pröschold T., Montresor M. 2007. Reproductive Isolation among Sympatric Cryptic Species in Marine Diatoms. *Protist* 158: 193–207.

Amato A., Montresor M. 2008. Morphology, phylogeny, and sexual cycle of *Pseudo-nitzschia mannii* sp. nov. (Bacillariophyceae): a pseudo-cryptic species within the *P. pseudodelicatissima* complex. *Phycologia* 47: 487–497.

Amato A., Ludeking A., Kooistra W.H.C.F. 2010. Intracellular domoic acid production in *Pseudo-nitzschia multistriata* isolated from the Gulf of Naples (Tyrrhenian Sea Italy). *Toxicon* 55: 157–161.

Anderson D.M., Andersen P., Bricelj V.M., Cullen J.J., Rensel J.E. 2001. Monitoring and management strategies for harmful algal blooms in coastal waters. Paris, Intergovernmental Oceanographic Commission Technical Series, 59.

Anderson C.R., Brzezinski M.A., Washburn L., Kudela R. 2006. Circulation and environmental conditions during a toxigenic *Pseudo-nitzschia australis* bloom in Santa Barbara Channel, California. *Marine ecology Progress Series* 327: 119–133.

Arapov J., Skejić S., Bužančić M., Bakrač A., Vidjak O., Bojanić N., Ujević I., Gladan Ž.N. 2017. Taxonomical diversity of *Pseudo-nitzschia* from the Central Adriatic Sea. *Phycological Research* 65: 280–290.

Barton N.H. 2001. The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology* 10: 551–568.

Bates S.S., Bird C., Freitas A., Foxall R., Gilgan M., Hanic L., Johnson G., McCulloch A., Odense P., Pocklington R., Quillam M., Sim P., Smith J., Subba Rao D., Todd E., Walter J., Wright J. 1989. Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from Eastern Prince Edward Island, Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 46: 1203–1215.

Bates S.S., Garrison D.L., Horner R.A. 1998. Bloom dynamics and physiology of domoic acid producing *Pseudo-nitzschia* species. Physiological ecology of harmful algal blooms 267–292.

Bates S.S., Hiltz M.F., Léger C. 1999. Domoic acid toxicity of large new cells of *Pseudo-nitzschia multiseriata* resulting from sexual reproduction. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences 2261: 21–26.

Bejarano A.C., Van Dola F.M., Gulland F.M., Rowles T.K., Schwacke L.H. 2008. Production and toxicity of the marine biotoxin domoic acid and its effects on wildlife : a review. Human and ecological Risk Assessment 14: 544–567.

Bonin A., Bellemain E., Bronken Eidesen P., Pompanon F., Brochmann C., Taberlet P. 2004. How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. Molecular Ecology 13: 3261–3273.

Bosak S., Godrijan J., Šilović T., Viličić D. 2011. Seasonal dynamics of potentially harmful microalgae in the coastal area of Rovinj, NE Adriatic Sea. V: Iveša L., Fafandel M.(ur). 46th European Marine Biology Symposium Book of Abstracts, Rovinj, Francija, 12.9.2011.

Burić Z., Viličić D., Mihalić K.C., Carić M., Kralj K., Ljubešić N. 2008. *Pseudo-nitzschia* blooms in the Zrmanja River estuar (Eastern Adriatic sea). Diatom Research 23: 51–63.

Cabrini M., Fomasaro D., Cossarini G., Lipizer M., Virgilio D. 2012. Phytoplankton temporal changes in a coastal northern Adriatic site during the last 25 years. Estuarine, Coastal and Shelf Science 115: 113–124.

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: 343–354.

Cech T.R. 1990. Self-splicing and enzymatic activity of an intervening sequence RNA from *Tetrahymena*. Bioscience Report 10: 239—261.

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: 33–48.

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: 379–395.

Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E. 2005. Hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) for determination of domoic acid in Adriatic Shellfish. *Rapid Communication of Mass Spectrometry* 19: 2030–2038.

Coleman A.W. 2003. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends in Genetics* 19: 370–375.

Coleman A.W. 2009. Is there a molecular key to the level of 'biological species' in eukaryotes? A DNA guide. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50: 197 – 203.

Cozzi S., Falconi C.F., Comici C., Cermelj B., Kovač N., Turk V., Giani M. 2012. Recent evolution of river discharges in the Northeastern Adriatic Sea and their potential response to climate changes and anthropogenic pressure. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 115: 14–24.

Creel S., Spong G., Sands J.L., Rotella J., Zeigle J., Joe L., Murphy K.M., Smith D. 2003. Population size estimation in Yellowstone wolves with error-prone noninvasive microsatellite genotypes. *Molecular Ecology* 12: 2003–2009.

D'Alelio D., Amato A., Luedeking A., Montresor M. 2009. Sexual and vegetative phases in the planktonic diatom *Pseudo-nitzschia multistriata*. *Harmful Algae* 8: 225 –232.

D'Alelio D., Ruggiero M.V. 2015. Interspecific plastidial recombination in the diatom genus *Pseudo-nitzschia*. *Journal of Phycology* 51: 1024–1028.

Davidovich N.A., Bates S.S. 1998. Sexual reproduction in the pennate diatoms *Pseudo-nitzschia multiseriata* and *P. pseudodelicatissima* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 34: 126 –137.

Doucette G.J., King K.L., Thessen A.E., Dortch Q. 2008. The effect of salinity on domoic acid production by the diatom *Pseudo-nitzschia multiseriata*. *Nova Hedwig, Beiheft* 133: 31–46.

European Food Safety authority. EFSA, 2009. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish-domoic acid. www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1181.pdf (datum dostopa: 24.7.2018).

Falk M., Seto P.F., Walter J.A. 1991. Solubility of domoic acid in water and in nonaqueous solvents. *Canadian Journal of Chemistry* 69: 1740–1744.

Ghiron J.H.L., Amato A., Montresor M., Kooistra W.H.C.F. 2008. Plastid Inheritance in the Planktonic Raphid Pennate Diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae). *Protist* 159: 91–98.

Guillard R.R.L., Hargraves P.E. 1993. *Stychochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia* 32: 234–236.

Hasle G.R. 1965. *Nitzschia* and *Fragilariopsis* species studied in the light and electron microscopes. *Ny Series* 18: 1–45.

Hasle G.R. 1994. *Pseudo-nitzschia* as a genus distinct from *Nitzschia* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 30: 1036–1039.

Hasle G.R. in Syvertsen E.E. 1997. Marine diatoms. V: Tomas C.R. Identifying marine phytoplankton. Academic Press: 5–385.

Hasle G.R. 2002. Are most of the domoic acid-producing species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* cosmopolites? *Harmful Algae* 1: 137–146.

Hernández-Becerril D.U. 1998. Species of planktonic diatom genus *Pseudo-nitzschia* of the Pacific coasts of Mexico. *Hydrobiologia* 379: 77–84.

Hillis D.M., Dixon M.T. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology* 66: 411–453.

Huelsenbeck J.P., Ronquist F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754–755.

Hustedt F. 1958. Phylogenetische Untersuchungen an Diatomeen. *Österreichische Botanische Zeitschrift* 105: 19–211.

Inkscape Draw Freely. <https://inkscape.org/en/> (datum dostopa: 6.8.2018).

Jeffery B., Barlow T., Moizer K., Paul S., Boyle C. 2004. Amnesic shellfish poison. *Food and Chemical Toxicology* 42: 545–557.

Jones H.M., Simpson G.E., Stickle A.J., Mann D.G. 2007. Life history and systematics of *Petroneis* (Bacillariophyta), with special reference to British waters. *European Journal of Phycology* 40: 61–87.

Kaczmarska I., Bates S.S., Ehrman J.M., Leger C. 2000. Fine structure of the gamete, auxospore and initial cell in the pennate diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* (Bacillariophyta). *Nova Hedwigia* 71: 337–357.

Kaczmarska I., Reid C., Martin J.L., Moniz M.B.J. 2008. Morphological, biological and molecular characteristics of *Pseudo-nitzschia delicatissima* from the Canadian Maritimes. *Botany* 86: 763–772.

Katoh K., Misawa K., Kuma K., Miyata T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic acids research* 30: 3059–3066.

Kumar K.P., Kumar S.P., Nair G.A. 2009. Risk Assessment of the Amnesic Shellfish Poison, Domoic Acid, on Animals and Humans. *Journal of Environmental Biology* 30: 319–325.

Larsson A. 2014. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large data sets. *Bioinformatics* 30: 3276–3278.

Lelong A., Hégaret H., Soudant P., Bates S. 2012. *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: revisiting previous paradigms. *Phycologia* 51: 168–216.

Ljubešić Z., Bosak S., Viličić D., Borojević K.K., Marić D., Godrić J., Ujević I., Peharec P., Đakovac T. 2011. Ecology and taxonomy of the potentially toxic *Pseudo-nitzschia* species in Lim Bay (north-eastern Adriatic Sea). *Harmful Algae* 10: 713–722.

Lundholm N., Skov J., Pocklington R., Moestrup Ø. 1994. Domoic acid, the toxic amino acid responsible for amnesic shellfish poisoning, now in *Pseudo-nitzschia seriata* (Bacillariophyceae) in Europe. *Phycologia* 33: 475–478.

Lundholm N., Hasle G.R., Fryxell G.A., Hargraves P.E. 2002a. Morphology, phylogeny and taxonomy of species within the *Pseudo-nitzschia americana* complex (Bacillariophyceae) with descriptions of two new species, *Pseudo-nitzschia brasiliensis* and *Pseudo-nitzschia linea*. *Phycologia* 41: 480–497.

Lundholm N., Daugbjerg N., Moestrup Ø. 2002b. Phylogeny of the Bacillariaceae with emphasis on the genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) based on partial LSU rDNA. *European Journal of Phycology* 37: 115–134.

Lundholm N., Moestrup Ø., Hasle G.R., Hoef-Emden K. 2003. A study of the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima/cuspidata* complex (Bacillariophyceae): what is *P.pseudodelicatissima*? Journal of Phycology 39: 797–813.

Lundholm N., Hansen P.J., Kotaki Y. 2004. Effect of pH on growth and domoic acid production by potentially toxic diatoms of the genera *Pseudo-nitzschia* and *Nitzschia*. Marine Ecology Progress Series 273: 1–15.

Lundholm N., Moestrup Ø., Kotaki Y., Hoef-Emden K., Scholin C., Miller P. 2006. Inter- and intraspecific variation of the *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex (Bacillariophyceae) illustrated by RNA probes, morphological data and phylogenetic analysis. Journal of Phycology 42: 464–481.

Lundholm N., Bates S.S., Baugh K.A., Bill B.D., Connell L.B., Léger C., Trainer V.L. 2012. Cryptic and pseudo-cryptic diversity in diatoms- with description of *Pseudo-nitzschia hasleana* sp.nov. and *P.fryxelliana* sp.nov. 2012. Journal of Phycology 48: 436–454.

Macgillivray M.L., Kaczmarek I. 2011. Survey of the Efficacy of a Short Fragment of the *rbcL* gene as a Supplemental DNA Barcode for Diatoms. The Journal of Eukaryotic Microbiology 58: 529–536.

Mann D.G., Evans K.M. 2007. Molecular genetics and the neglected art of diatomics. V: Brodie Brodie J., Lewis J. Unravelling the Algae - The Past, Present and Future of Algal Systematics. Boca Raton, CRC Press 231–265.

Marić D., Ljubešić Z., Godrić J., Viličić D., Ujević I., Precalli R. 2011. Blooms of the potentially toxic diatom *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup & Hasle in coastal waters of the northern Adriatic Sea (Croatia). Estuarine, Coastal and Shelf Science 30: 1–9.

Marić D., Pfannkuchen D. 2013. Potencijalno toksične dijatomeje roda *Pseudo-nitzschia* u sjevernom Jadranu: ekološke, taksonomske i molekularne značajke. Doktorska disertacija, Univerza u Zagrebu.

McDonald S.M., Sarno D., Zignone A. 2007. Identifying *Pseudo-nitzschia* species in natural samples using genus-specific PCR primers and clone libraries. Harmful Algae 6: 849–860.

Miller C.R., Joyce P., Waits L.P. 2002. Assessing allelic dropout and genotype reliability using maximum likelihood. Genetics 160: 357–366.

Molecular Evolution, Phylogenetics and Epidemiology. <http://tree.bio.ed.ac.uk/> (datum dostopa: 6.8.2018).

Moritz C., Dowling T.E., Brown W.M. 1987. Evolution of Animal mitochondrial DNA-relevance for population biology and systematic. Annual review of Ecology and systematics 18: 269–292.

Mozetič P., Solidoro C., Cossarini G., Socal G., Precali R., France J., Bianchi F., De Vittor C., Smodlaka N., Fonda Umani S. 2010. Recent Trends Towards Oligotrophication of the Northern Adriatic: Evidence from Chlorophyll *a* Times Series. Estuaries and Coasts 33: 362–375.

Mozetič P., Francé J., Kogovšek T., Talaber I., Malej A. 2012. Plankton trends and community changes in a coastal sea (northern Adriatic): Bottom-up vs. top-down control in relation to environmental drivers. Estuarine, Coastal and Shelf Science 115: 138–148.

Murray S.A. Garby T., Hoppenrath M., Neilan B.A. 2012. Genetic Diversity, Morphological Uniformity and Polykete Production in Dinoflagellates (*Amphidinium*, Dinoflagellata). Plos one 7: e38253.

Nunn G.B., Theisen B.F., Christensen B., 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.

Orsini L., Sarno D., Procaccini G., Poletti R., Dahlmann J., Montresor M. 2002. Toxic *Pseudo-nitzschia multistriata* (Bacillariophyceae) from the Gulf of Naples: morphology, toxin analysis and phylogenetic relationships with other *Pseudo-nitzschia* species. Journal of Phycology 37: 247–257.

Orsini L., Procaccini G., Sarno D., Montresor M. 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.

Paetkau D. 2003. An empirical exploration of data quality in DNA based population inventories. Molecular Ecology 12: 1375–1387.

Pan Y.L., Subba Rao D.V., Mann K.H., Brown R.G., Pocklington R. 1996. Effects of silicate limitation on production of domoic acid, a neurotoxin, by the diatom *Pseudo-nitzschia multiseries*. Marine Ecology Progress Series 131: 225–233.

Parkinson J., Gordon R. 1999. Beyond Micromachining: The potential of Diatoms. Trends in Biotechnology 17: 190–196.

Patwardhan A., Ray S., Roy A. 2014. Molecular Markers in Phylogenetic Studies – A Review. *Journal of Phylogenetics and Evolutionary Biology* 2: 2– 11.

Penna A., Casabianca S., Perini F., Bastianini M., Riccardi E., Pigozzi S., Scardi M. 2012. Toxic *Pseudo-nitzschia* spp. in the northwestern Adriatic Sea: characterization of species composition by genetic and molecular quantitative analyses. *Journal of Plankton Research* 35: 352–366.

Peragallo H., Peragallo M. 1897–1908 . *Diatomées de France*. France, Grez-sur-Loing, 492.

Perl T., Bedard L., Kosatsky T., Hockin J.C., Todd E. 1990. An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid . *The New Journal of Medicine* 322: 1775–1780.

Pistocchi R., Guerrini F., Pezzolesi L., Riccardi M., Vanucci S., Ciminiello P., Dell'Aversani C., Forino M., Fattoruso E., Tartaglione L., Milandi A., Marinella P., Cangini M., Pigozzi S., Riccardi E. 2012. Toxic levels and profiles in Microalgae from the North-Western Adriatic Sea -15 years of Studies in Cultural Species . *Marine Drugs* 10: 140–162.

Pompanon F., Bonin A., Bellemain E., Taberlet P. 2005. Genotyping errors: Causes, Consequences and Solutions. *Nature Reviews Genetics* 6: 847–859.

Posada D . 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging . *Molecular Biology and Evolution* 7: 1253–1260.

Pulido O.M. 2008. Domoic acid toxicologic pathology: a review. *Marine Drugs* 6: 180–219.

Quijano-Scheggia S., Garcés E., Lundholm N., Moestrup Ø., Andree K., Camp J. 2009. Morphology, physiology, molecular phylogeny and sexual compatibility of the cryptic *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex (Bacillariophyta), including the description of *P. arenysensis* sp. nov. *Phycologia* 48: 492–509.

Rodríguez F., Oliver J.L., Marín A., Medina J.R. 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology* 142: 485–501.

Ronquist F., Huelsenbeck J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian Phylogenetic Inference under mixed Models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.

Scholin C.A., Herzag M., Sogin M., Anderson D.M. 1994. Identification of group and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae); Sequence analysis of a fragment of the LSU rRNA gene . Journal of Phycology 30: 999 – 1011.

Scholin C.A., Guillard F., Doucette G.J., Benson S., Busman M., Chavez F.P., Cordado J., Delong R., De Vogelaere A., Harvey J., Haulena M., Lefebvre K., Lipscomb T., Loscut S., Lowenstine L.J., Marin R. III., Miller P.E., McLellan W.A., Moeller P.D.R., Powell C.L., Rowles T., Silvagni P., Silver M., Spraker T., Trainer V. Van Dolah F.M. 2000. Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom . Nature 403: 80–84.

Sournia A. 1973. La production primaire planctonique en Méditerranée. Essai de mise a jour. Bulletin Etude en commun de la Méditerranée 5: 1–128.

Steuer A. 1903. Urtiere als Shadlinge mariner Fischerei. Oscherreichische Fischerei-Zeitung, Jahrgang 10.

Smith J.R., Carpten J.D., Brownstein M.J., Ghosh S., Magnuson V.L., Gilbert D.A., Trent J.M., Collins F.S. 1995. Approach to genotyping errors caused by nontemplated nucleotide addition by Taq DNA-polymerase. Genome Research 5: 312–317.

Solidoro C., Bastianini M., Bandelj V., Codermatz R., Cossarini G., Melaku Canu D., Ravagnan E., Salon S., Trevisani S. 2009. Current state, scales of variability, and trends of biogeochemical properties in the northern Adriatic Sea. Journal of Geophysical Research 114: C07S9.

Subba Rao D.V., Pan Y., Mukhida K. 1998. Production of domoic acid by *Pseudo-nitzschia multiseries* Hasle, affected by lithium. Marine Ecology 19: 31–36.

Taberlet P., Griffin S., Goossens B. 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. Nucleic Acids Research 24: 3189–3194.

Taberlet P., Waits L.P., Luikart G. 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. Trends in Ecology and Evolution 14: 323–327.

Tavaré S. 1986. Some Probabilistic and Statistical Problems in the Analysis of DNA sequences. Lectures on Mathematics in the Life Sciences 17: 57–86.

Teitelbaum J., Carpenter S., Cashman N.R. 1990. Neurologic sequelae after ingestion of mussels contaminated with domoic acid . New England Journal of Medicine 323: 1632–1633.

Thessen A.E., Dortch Q., Parsons M.L., Morrison W. 2005. Effect of salinity on *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) growth and distribution. *Journal of Phycology* 41: 21–29.

Thessen A.E., Bowers H.A., Stoecker D.K. 2009. Intra- and interspecies differences in growth and toxicity of *Pseudo-nitzschia* while using different nitrogen sources. *Harmful Algae* 8: 792–810.

Trainer V.L., Hickey B.M., Bates S.S. 2008. Toxic diatoms. V: *Oceans and human health: risks and remedies from the sea*, New York, Elsevier Science Publishers 219–237.

Trainer V.L., Wells M.L., Cochlan W.P., Trick C.G., Bill B.D., Baugh K.A., Beall B.F., Herdon J., Lundholm N. 2009a. An ecological study of a massive bloom of toxigenic *Pseudo-nitzschia cuspidata* off the Washington State coast. *Limnology and Oceanography* 54: 1461–1474.

Trainer V.L., Hickey B.M., Lessard E.J., Cochlan W.P., Trick C.G., Wells M.L., MacFadyen A., Moore S.K. 2009b. Variability of *Pseudo-nitzschia* and domoic acid in the Juan de Fuca eddy region and its adjacent shelves. *Limnology and Oceanography* 54: 289–308.

Trainer V.L., Pitcher G.C., Reguera B., Smayda T.J. 2010. The distribution and impacts of harmful algal bloom species in eastern boundary upwelling systems. *Progress in Oceanography* 85: 33–52.

Trainer V.L., Bates S.S., Lundholm N., Thessen A.E., Cochlan W.P., Adams N.G., Trick C.G. 2012. *Pseudo-nitzschia* physiological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health. *Harmful Algae* 14: 271–300.

Tschochner H., Hurt E. 2003. Pre-ribosomes on the road from the nucleus to the cytoplasm. *Trends in Cell Biology* 13: 225–263.

Turk Dermastia T., Stanković D., Mozetič P., Ramšak A., Francé J. 2018. Diversity and seasonal distribution of *Pseudo-nitzschia* from the Gulf of Trieste with insights in toxicity and potential introductions. Ecology – from the ecological niche to population dynamics and biogeography: The 18th International Conference of Harmful Algae from ecosystems to socio-ecosystems, Nantes, France, oktober 2018 (str. 518). Piran: Marine Biology Station, National Institute of Biology.

Werner D. 1977. The biology of diatoms. Botany monographs. New York, University of California Press.

White T.J., Bruns T.D., Lee S.B., Taylor J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. V: PCR – Protocols and Applications – A Laboratory Manual. Academic Press: 315 –322.

Willén E. 1991. Planktonic diatoms—an ecological review. Algological Studies 62: 69–106.

Woese C.R. 1987. Bacterial evolution. Microbiological Reviews 51: 221-271.

Work T.M., Barr B., Beale A.M., Fritz L., Quillam M.A., Wright J.L.C. 1993. Epidemiology of domoic acid poisoning in brown pelicans (*Pelecanus occidentalis*) and Brandt's cormorants (*Phalacrocorax penicillatus*) in California. Journal of Zoo and Wildlife Medicine 24: 54–62.

Wright J.L.C., Boyd R.K., De Freitas A.S.W., Falk M., Foxall R.A., Jamieson W.D., Laycock M.V., McCulloch A.W., McInnes A.G., Sim P.G., Thibault P., Walter J.A., Gilgan M., Richard D.J.A., Dewar D. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino-acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island . Canadian Journal of Chemistry 67: 481–490.

Xia X. 2018. DAMBE7: New and improved tools for data analysis in molecular biology and evolution. Molecular Biology and Evolution 35: 1550–1552.

Priloga A. Seznam in geografska razširjenost 37 vrst rodu *Pseudo-nitzschia*. Podatek o skupini (*delicatissima*, *seriata*, ni skupine) je določen na podlagi širine celice (ožje od 3 µm spadajo v skupino *delicatissima*; širše od 3 µm pa v skupino *seriata*), ki je izmerjena pod svetlobnim mikroskopom. Podatek o toksičnosti 'da/ne' je pri tistih vrstah, kjer se sposobnost sinteze domojke kisline razlikuje glede na različne seve (povzeto po Lelong in sod. 2012).

VRSTA	SKUPINA širina celice (µm)	TOKSIČNOST	GEOGRAFSKA RAZŠIRJENOST
<i>P. americana</i> (Hasle) Fryxell	Ni določena 2,5–4,5	Ne	Omejena: Avstralija, zaliv Fundy, Bermudi, Brazilija, Kalifornija, Čile, Kostarika, Francija (atlantska obala), Mehiški zaliv, zaliv Monterey, Nova Zelandija, Severno morje, severovzhodna Afrika, Oregon, Peru, Portugalska, Rusija, Skagerrak, Južna Afrika, Tajska, Urugvaj, Vietnam, Washington
<i>P. antarctica</i> Manguin	<i>seriata</i> 3–4	Ni testirana	Omejena: Antarktika (Terre Adélie)
<i>P. arenysensis</i> Quijano-Scheggia, Garcés, Lundholm	<i>delicatissima</i> 1,6–2,5	Ne	Omejena: Francija (ob atlantski obali), Neapeljski zaliv, Mehiški zaliv, Španija (sredozemska obala)
<i>P. australis</i> Frenguelli	<i>seriata</i> 4,6–10,0	Da/ne	Kozmopolitska
<i>P. brasiliiana</i> Lundholm, Hasle & G.A. Fryxell	<i>delicatissima</i> 1,8–3,4	Da/ne	Omejena: Brazilija, Mehiški zaliv, Panamski zaliv, Indonezija, Koreja, Malezija, Mehika (ob obali Pacifika), Španija (sredozemska obala), Tajska, Tunizija, Vietnam
<i>P. caciantha</i> Lundholm, Moestrup & Hasle	<i>delicatissima</i> 2,7–3,5	Ne	Omejena: Grčija, Neapeljski zaliv, Mehiški zaliv, Nova Zelandija, Rusija (Ohotsko morje in Japonsko morje), Španija (sredozemska obala), Tajska
<i>P. calliantha</i> Lundholm, Moestrup & Hasle	<i>delicatissima</i> 1,1–2,6	Da/ne	Potencialno kozmopolitska vrsta: Jadransko morje, Argentina, Avstralija, Beaufortske morje, Bermudi, Brazilija, zaliv Chesapeake, Čile, Danska, Francija (Sredozemlje), Nemčija (Kielski zaliv), Grčija, Mehiški zaliv, Neapeljski zaliv, zaliv sv. Lawrenca, Severni Atlantik, Norveška, Portugalska, Rusija (Japonsko morsko morje, Ohotsko morje), ruska arktična morja, Škotska, Slovenija, Španija (Atlantik, Sredozemlje), Tunizija, Turčija (Črno morje), Vietnam
<i>P. cuspidata</i> (Hasle) Hasle	<i>delicatissima</i> 1,0–2,0	Da/ne	Omejena: Avstralija, Brazilija, Kanarski otoki, zaliv Chesapeake, Hong Kong, Koreja, Mehiški zaliv, Portugalska, Španija (Atlantik), Tajska, zahodne obale ZDA, Vietnam, Mavretanija
<i>P. decipiens</i> Lundholm & Moestrup	<i>delicatissima</i> 1,4–2,5	Ne	Omejena: Črno morje, Kanarski otoki, Italija (Tirensko morje), Mehiški zaliv Portugalska
<i>P. delicatissima</i> (Cleve) Heiden	<i>delicatissima</i> 1,0–2,4	Da/ne	Kozmopolitska
<i>P. dolorosa</i> Lundholm & Moestrup	<i>seriata</i> 2,5–3,0	Ne	Omejena: Avstralija, Grčija, Neapeljski zaliv, Irska, zaliv Monterey, Portugalska, subarktični Pacifik
<i>P. fraudulentula</i> (Cleve) Hasle	<i>seriata</i> 4,0–8,0	Da/ne	Kozmopolitska
<i>P. fryxelliana</i> Lundholm	<i>delicatissima</i> 2,1–2,5	Ni testirana	Zelo omejena: Washington
<i>P. galaxiae</i> N.Lundholm &	<i>delicatissima</i> 1,0–1,8	Da/ne	Omejena: Avstralija, Francija (Atlantik), Grčija, Neapeljski zaliv, Mehiški zaliv, Španija

Moestrup			(Sredozemlje)
<i>P. granii</i> (Hasle) Hasle	<i>delicatissima</i> 1,3–1,8	Da/ne	Omejena: Koreja, arktična morja Rusije (Barentsovo, Belo morje), subarktični Pacifik
<i>P. hasleana</i> Lundholm	<i>delicatissima</i> 1,5–2,8	ne	Omejena: Japonska, severovzhodni Pacifik, Španija (Atlantik), Washington
<i>P. heimii</i> Manguin	<i>seriata</i> 3,5–6,0	Ne	Omejena: Argentina, zaliv Monterey, Nova Zelandija, Rusija (Ohotsko morje), Skagerrak, subarktični Pacifik, Tajska, zahodna obala ZDA, Antarktika
<i>P. inflatula</i> (Hasle) Hasle	<i>delicatissima</i> 1,3–2,0	Ne	Omejena: Danska, Italija (Tirensko morje), Mehika (Pacifik), zaliv Monterey, severovzhodni subarktični Pacifik, Tajska, Vietnam
<i>P. linea</i> Lundholm, Hasle in G.A.Fryxell	<i>delicatissima</i> 1,8–2,2	Ni testirana	Omejena: Brazilija, Kostarika, Mehiški zaliv, zaliv Narragansett, Španija (Sredozemlje)
<i>P. lineola</i> (Cleve) Hasle	<i>delicatissima</i> 2,0–2,7	Ne	Omejena: Argentina, Avstralija, Danska, Mehika (Pacifik), Antarktika (Weddelovo morje)
<i>P. manii</i> Amato & Montresor	<i>delicatissima</i> 1,7–2,6	Ni testirana	Omejena: Jadransko morje, Grčija, Neapeljski zaliv, Španija (Sredozemlje)
<i>P. micropora</i> Priisholm, Moestrup & Lundholm	<i>delicatissima</i> 1,3–2,0	Ni testirana	Zelo omejena: Tajska, Vietnam
<i>P. multiseries</i> (Hasle) Hasle	<i>seriata</i> 3,5–4,8	Da	Kozmopolitska
<i>P. multistriata</i> (H.Takano) H.Takano	Ni določena 2,5–3,7	Da/ne	Potencialno kozmopolitska vrsta: Avstralija, Brazilija, Kitajska, Francija (Atlantik), Grčija, Mehiški zaliv, Neapeljski zaliv, Japonska, Koreja, Nova Zelandija, Portugalska, Rusija (Japonsko morje, Ohotsko morje), Španija (Atlantik, Sredozemlje), Tajska, Urugvaj, Vietnam
<i>P. obtusa</i> (Hasle) Hasle & Lundholm	<i>seriata</i> 2,9–5,0	Ne	Omejena: Aljaska, Barentsovo morje, Arktika (Kanada), Danska, zaliv sv. Lawrenca, Irska, Norveška, Rusija (Ohotsko morje, Kamčatka)
<i>P. prolongatoides</i> (Hasle) Hasle	<i>delicatissima</i> 0,5–2,5	Ni testirana	Omejena: Mehiški zaliv, Antarktika (Weddel)
<i>P. pseudodelicatissima</i> (Hasle) Hasle	<i>delicatissima</i> 1,1–2,1	Da/ne	Kozmopolitska
<i>P. pungens</i> (Grunow ex Cleve) Hasle	<i>seriata</i> 2,2–5,4	Da/ne	Kozmopolitska
<i>P. pungiformis</i> (Hasle) Hasle	<i>Seriata</i> 4,0–5,0	Ni testirana	Zelo omejena: zaliv Monterey
<i>P. roundii</i> D.U Hernández-Becerril	<i>seriata</i> 4,6–6,5	Ni testirana	Zelo omejena: Mehika (Pacifik)
<i>P. seriata</i> (Cleve) H.Peragallo	<i>seriata</i> 4,6–8,0	Da/ne	Potencialno kozmopolitska vrsta
<i>P. sinica</i> * J.Z.Qi & J.Wang	Ni določena 2,5–5,0	Ni testirana	Zelo omejena: Kitajska, Tajska, Vietnam
<i>P. subcurvata</i> (Hasle) G.A.Fryxell	<i>delicatissima</i> 1,5–2,0	Ne	Omejena: Argentina, Antarktika (Drakov preliv, Weddelovo morje), Mehiški zaliv
<i>P. subfraudulenta</i> (Hasle) Hasle	<i>seriata</i> 5,0–7,0	Ne	Omejena: Avstralija, Čile, Kitajska, Francija (Sredozemlje), Grčija, Mehiški zaliv, Neapeljski zaliv, Panamski zaliv, Japonska, Koreja, Mehika (Pacifik), zaliv Monterey, severovzhodna Afrika, Portugalska, Španija
<i>P. subpacific</i> (Hasle) Hasle	<i>seriata</i> 5,0–7,0	Ne	Omejena: Avstralija, zaliv Fundy, Kalifornija, zaliv Chesapeake, Kitajska, Francija (Atlantik), Mehiški zaliv, Panamski zaliv, Irska, Koreja, zaliv Monterey, severozahodna Afrika, Portugalska, Španija (Atlantik), Washington
<i>P. turgidula</i> (Hustedt) Hasle	Ni določena 2,5–5,0	Da	Omejena: Argentina, Avstralija, Barentsovo morje, zaliv Fundy, Kitajska, zaliv Monterey,

			Nova Zelandija, Škotska, subarktični Pacifik, Antarktika (Weddelovo morje)
<i>P. turgiduloides</i> (Hasle) Hasle	<i>delicatissima</i> 1,7–2,5	Ne	Zelo omejena: Argentina, Antarktika (Weddelovo morje, Drakov preliv)

Priloga B. Podatki o analiziranih sekvencah regije. Za nekatere vrste je v podatkovni bazi GenBank dostopnih več sekvenc.

VRSTA	AKCESIJSKA ŠT.	KODA	IDENTIČNE SEKVENCE	SEV
<i>P. americana</i>	JN162807	PNAME	JN162806	IK_MTA307
<i>P. americana</i>	EF423504	PNAME	/	FBJun06.6
<i>P. arenysensis</i>	DQ813823	PNAREN	/	AL-64
<i>P. arenysensis</i>	DQ813819	PNAREN	/	AL-24
<i>P. arenysensis</i>	KP757859	PNAREN	/	SZN-B662
<i>P. arenysensis</i>	KC801036	PNAREN	/	SZN-B487
<i>P. brasiliiana</i>	FJ150752	PNBRA	FJ507753.1	ICMB-175
<i>P. brasiliiana</i>	FJ150740	PNBRA	/	ICMB-172
<i>P. cacialantha</i>	DQ813821	PNCAC	/	AL-56
<i>P. calliantha</i>	DQ813825	PNCALI	/	AL-117
<i>P. calliantha</i>	FJ150762	PNCALI	FJ150758.1	ICMB-159
<i>P. calliantha</i>	FJ150761	PNCALI	/	ICMB-157
<i>P. calliantha</i>	FJ150760	PNCALI	/	ICMB-155
<i>P. cuspidata</i>	DQ813820	PNCUS	/	AL-28
<i>P. delicatissima</i>	EF520341	PNDEL	/	CLA1.A2
<i>P. delicatissima</i>	EF520340	PNDEL	/	CLA1.A1
<i>P. delicatissima</i>	FJ150765	PNDEL	/	Ra3
<i>P. delicatissima</i>	FJ150764	PNDEL	/	AR1
<i>P. delicatissima</i>	FJ150763	PNDEL	/	A4
<i>P. delicatissima</i>	FJ150748	PNDEL	/	ICMB-162
<i>P. delicatissima</i>	FJ150747	PNDEL	/	ICMB-161
<i>P. delicatissima</i>	FJ150744	PNDEL	/	ICMB-134
			FJ150749; FJ150746;	
			FJ150745; FJ150743;	
<i>P. delicatissima</i>	FJ150756	PNDEL	FJ150742; FJ150741	D3
<i>P. delicatissima</i>	FJ150739	PNDEL	/	ICMB-169
<i>P. delicatissima</i>	FJ150738	PNDEL	/	ICMB-167

<i>P. delicatissima</i>	DQ813818	PNDEL	/	AL-22
<i>P. delicatissima</i>	JN162813	PNDEL	/	IK_MTA296
			JN162818; JN162816; JN162814; JN162811;	JN162817; JN162815; JN162812; JN162810;
<i>P. delicatissima</i>	JN162819	PNDEL	JN162809; JN162808	IK_Pdeli_W004
<i>P. delicatissima</i>	EF423516	PNDEL	/	AY11
<i>P. dolorosa</i>	DQ813822	PNDOL	/	AL-59
<i>P. fraudulenta</i>	EF520333	PNFRAU	/	AL75
<i>P. fraudulenta</i>	EF423503	PNFRAU	/	BB19
<i>P. fraudulenta</i>	EF423502	PNFRAU	/	AL50
<i>P. fryxelliana</i>	JN050303	PNFRYX	/	NWFSC 242
<i>P. fryxelliana</i>	JN050302	PNFRYX	/	NWFSC 241
<i>P. galaxiae</i>	FJ150754	PNGAL	FJ150751	ICMB-177
<i>P. galaxiae</i>	FJ150750	PNGAL	/	ICMB-173
<i>P. galaxiae</i>	KP757861	PNGAL	/	SZN-B586
<i>P. galaxiae</i>	KP757860	PNGAL	/	SZN-B576
<i>P. galaxiae</i>	EF423515	PNGAL	/	AL-8
<i>P. galaxiae</i>	EF423514	PNGAL	/	SM54
<i>P. galaxiae</i>	EF423513	PNGAL	/	SM55
<i>P. galaxiae</i>	EF423512	PNGAL	/	SM3
<i>P. galaxiae</i>	EF423511	PNGAL	/	SM1
<i>P. galaxiae</i>	EF423510	PNGAL	/	SM60
<i>P. galaxiae</i>	EF423509	PNGAL	/	FB06.17
<i>P. granii</i>	KU183494	PNGRAN	/	RCC:2006
<i>P. hasleana</i>	KP757862	PNHAS	/	SZN-B530
<i>P. hasleana</i>	JN050305	PNHAS	/	NWFSC 252
<i>P. hasleana</i>	JN050304	PNHAS	/	NWFSC 186
<i>P. linea</i>	KP757863	brez kode	/	PI-1
<i>P. linea</i>	FJ489631	brez kode	/	ICMB-156
<i>P. manii</i>	DQ813824	PNMAN	/	AL-101
<i>P. multiseries</i>	KC801040	PNMULTI	/	NWFSC-316

<i>P. multistriata</i>	EF520337	PNMST	/	279
<i>P. multistriata</i>	EF520336	PNMST	EF520335.1	DD4
<i>P. multistriata</i>	EF520334	PNMST	/	CLA1.B3
<i>P. multistriata</i>	FJ150766	PNMST	/	ICMB-150
<i>P. multistriata</i>	FJ150757	PNMST	/	CM2
<i>P. multistriata</i>	FJ150755	PNMST	/	CM3
<i>P. multistriata</i>	EF423505	PNMST	/	19A
<i>P. pseudodelicatissima</i>	DQ813817	PNPSEUD	/	AL-15
<i>P. pseudodelicatissima</i>	KC801039	PNPSEUD	/	SZN-B317
<i>P. pungens</i>	FJ150759	PNPUN	/	ICMB-143
<i>P. pungens</i>	EF423507	PNPUN	/	FBA2A11
<i>P. pungens</i>	EF423506	PNPUN	/	FBA1D5
<i>P. pungens</i>	FM207548	PNPUN	/	NA213
<i>P. pungens</i>	FM207547	PNPUN	/	NA108
<i>P. subcurvata</i>	HQ337586	PNSUBC	HQ337585.1	CCMP:1537
<i>P. turgiduloides</i>	EF423508	PNTURIDE	/	7A1