

Smrtnost plemenite periske (*Pinna nobilis*) u Sredozemnome moru

Čeliković, Lovro

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:339763>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-21**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Lovro Čeliković

**Smrtnost plemenite periske (*Pinna nobilis*)
u Sredozemnome moru**

Završni rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Lovro Čeliković

**Mortality of the noble pen shell
(*Pinna nobilis*) in Mediterranean Sea**

Bachelor thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Biologija na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Petra Kružića.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Završni rad

Smrtnost plemenite periske (*Pinna nobilis*) u Sredozemnome moru

Lovro Čeliković

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Plemenita periska (*Pinna nobilis*) endem je Mediterana koji je od 2016. godine pogođen masovnim izumiranje. Do danas je utvrđeno nekoliko patogena kao potencijalnih uzročnika, no mnoga pitanja ostaju neodgovorena čemu u prilog idu pojava hibrida *P. nobilis* x *P. rudis* te pojava jedinki rezistentnih na opisane patogene. Budućnost vrste još uvijek je nepredvidiva.

Ključne riječi: endem, masovno izumiranje, patogeni, hibridizacija, rezistencija

(19 stranica, 13 slika, 3 tablice, 50 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof. dr. sc. Petar Kružić

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Bachelor thesis

Mortality of the noble pen shell (*Pinna nobilis*) in Mediterranean Sea

Lovro Čeliković

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The noble pen shell (*Pinna nobilis*) is an endemic species of the Mediterranean which has been facing MME since the 2016. Several pathogens have been detected as a causative factor but to this day many questions regarding MME stay unanswered. Detection of hybrid *P. nobilis* x *P. rudis* and pathogen resistance as well additionally intensify the mystery. At this point future of the species stays unclear.

Keywords: endemic species, MME, pathogens, hybridization, resistance

(19 pages, 13 figures, 3 tables, 50 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: prof. dr. sc. Petar Kružić

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Kronologija izumiranja.....	2
3. Etiologija.....	6
3.1. <i>Haplosporidium pinnae</i>	6
3.2. <i>Mycobacterium sp.</i>	7
3.3. <i>Vibrio sp.</i>	9
3.4. <i>Rhodococcus erythropolis</i>	10
3.5. Picornavirus.....	10
4. Patohistološke promjene.....	10
5. Patofiziološke promjene.....	13
6. Pojava rezistencije.....	14
6.1. Hibridizacija s <i>P.rudis</i>	14
6.2. Nezahvaćene jedinke.....	15
7. Zaključak.....	16
8. Literatura.....	17
9. Životopis.....	19

1. Uvod

Plemenita periska (*Pinna nobilis*) jedan je od najvećih školjkaša na Zemlji i zasigurno najveći školjkaš u Sredozemnom moru. Pripada redu *Ostreidae*, porodici *Pinnidae* te se smatra endemom Sredozemnog mora koji može doseći duljinu i do imponantnih 120cm u odraslom stadiju (Darriba 2017). Vrsta *P. nobilis* živi u obalnim vodama do 60m dubine često nastanjujući morske livade vrsta *Posidonia oceanica*, *Cymodocea nodosa* i dr. gdje igra bitnu ulogu u morskom ekosistemu kao čvrsta podloga za bentičke vrste poput algi, spužvi, mnogočestinaša i sl. Budući da je riječ o vrsti koja živi sedentarnim načinom života, pričvršćena za pješčano dno bisusnim nitima, hrani se filtracijom morske vode. Jedinka vrste *P. nobilis* sposobna je profiltrirati 6L vode u minuti što znatno doprinosi kakvoći okolnog mora (Scarpa i sur. 2021).

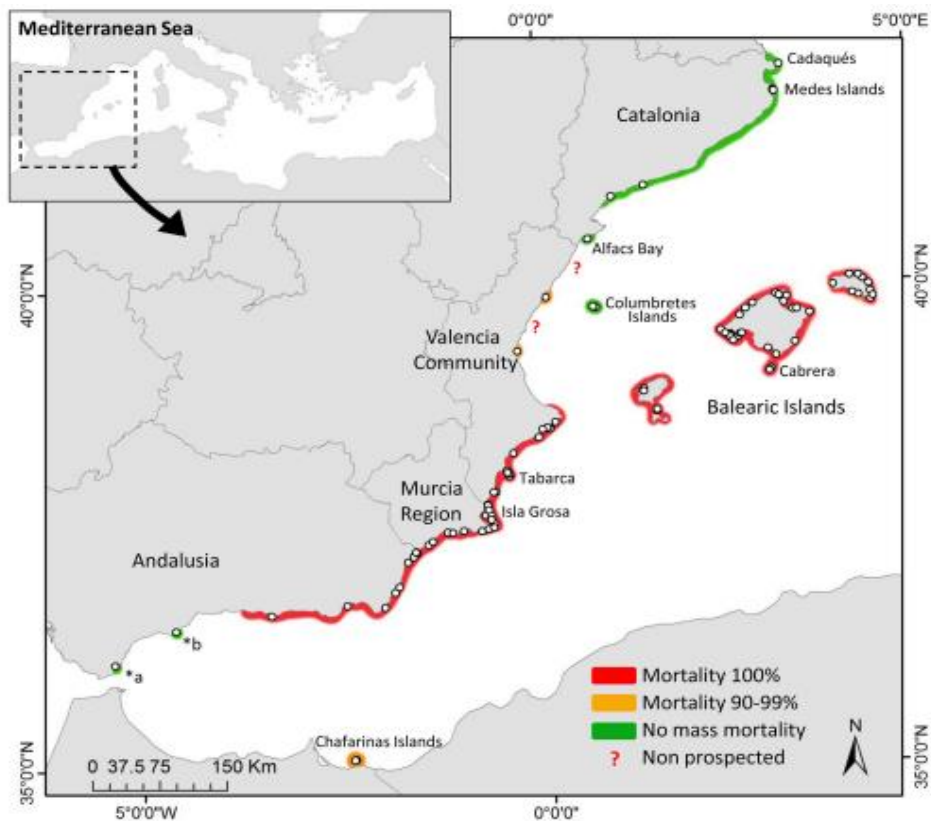


Slika 1. Zdrava jedinka vrste *P. nobilis*. Fotografirao Fabio Scarpa. Preuzeto i prilagođeno iz Scarpa i sur. 2021.

Iako je riječ o vrsti koja je ljudima poznata od davnina veća ugroza javlja se tek u 80-im godinama prošlog stoljeća kada se brojnost jedinki, prvenstveno radi ljudskog nemara, počinje smanjivati što je rezultiralo uvođenjem mjera zaštite u mnogim mediteranskim državama (Scarpa i sur. 2021). Kroz narednih nekoliko desetljeća mjere zaštite su urodile plodom i populacija *P. nobilis* se uspješno oporavila, no nažalost ne dugotrajno. Od jeseni 2016. godine populacije plemenitih periski u obalnim vodama Španjolske počinju rapidno izumirat bez objašnjenja (Scarpa i sur., 2021). Masovno izumiranje izrazito se brzo počinje širiti prema istočnim dijelovima Sredozemnog mora te 2019. godine zahvaća i populacije koje nastanjuju Jadran (Šarić i sur. 2020.). Kroz naredne godine, od početka masovnog izumiranja, detektirano je nekoliko potencijalnih uzročnika poput praživotinje *Haplosporidium pinnae* te bakterija *Mycobacterium sp*, *Rhodococcus erythropolis* i sl. mada je precizna etiologija dugo vremena izostajala. Do danas je broj jedinki *P. nobilis* sveden na svega nekoliko desetaka čime je vrsta dovedena na sami rub izumiranja. Masovno izumiranje *P. nobilis* predstavlja prvi zabilježen slučaj ovakve prirode među školjkašima što dodatno otežava napore u pokušaju očuvanja vrste (Scarpa i sur. 2021.).

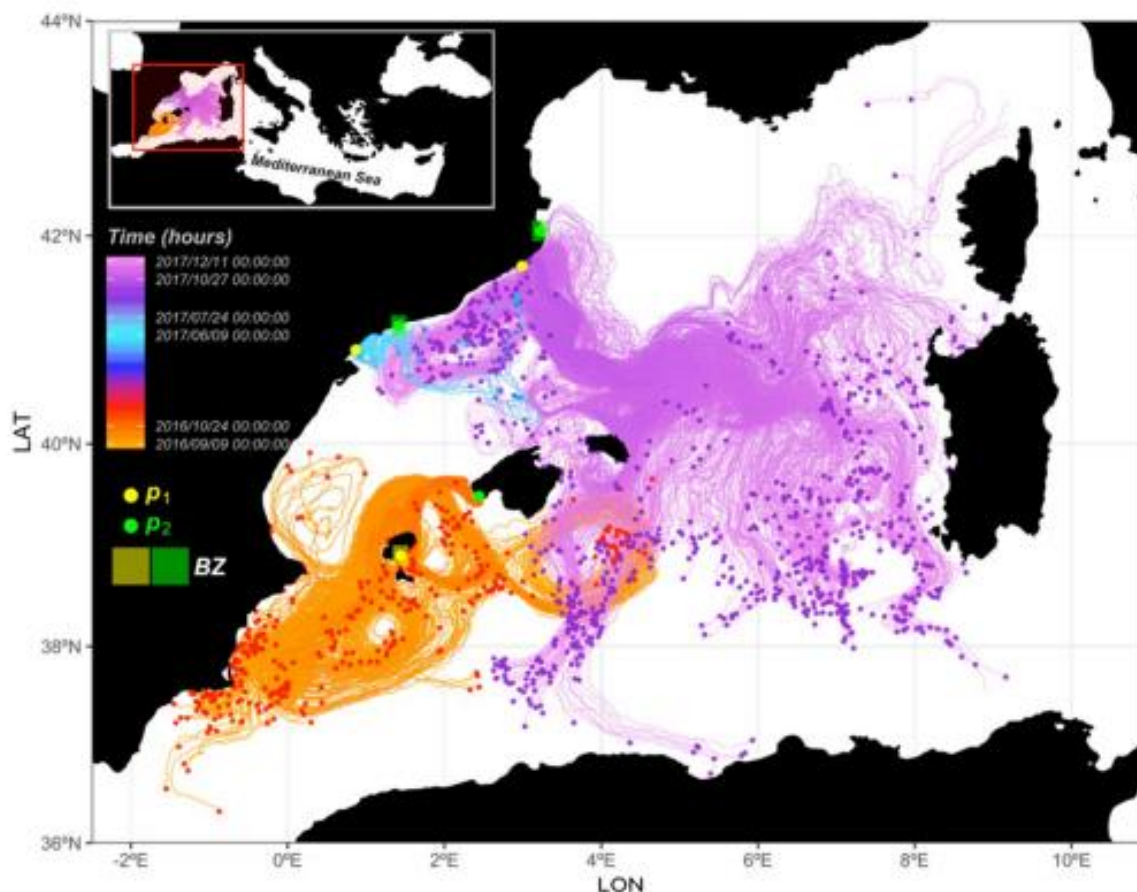
2. Kronologija izumiranja

Krajem rujna 2016. godine prve naznake izumiranja javljaju se uz španjolsku obalu. Dana 28. rujna, a potom 4. i 5. listopada zabilježena su prva opažanja ove pojave u obalnim vodama Andaluzijske, Murcijske i Valencijske regije te oko Balearskog arhipelaga. U navedenim regijama smrtnost dostiže 90% kroz naredna tri tjedna (Vazquez-Luis i sur. 2017.).



Slika 2. Bijele točke predstavljaju lokalitete gdje je izumiranje primijećeno od rujna 2016. do lipnja 2017. godine, crveni obrub područje sa 100% smrtnosti dok zeleni obrub predstavlja područje gdje masovno izumiranje još nije zabilježeno, narančasti obrub predstavlja područje s 90-99% smrtnosti. Preuzeto i prilagođeno iz Vazquez-Luis i *sur.* 2017.

Kako masovno izumiranje uzima maha i širi se na obalna područja Francuske i Italije ustanovljeno je da je prisutnost praživotinje *H. pinnae* te bakterije *Mycobacterium sp.* uzrok ove pojave (Panerese i *sur.* 2019). Po svemu sudeći haplosporidijski parazit gotovo se sigurno uspio rasprostraniti s područja obala Alicante i Murcie nošen morskim strujama čemu u prilog idu i računalne simulacije koje potvrđuju realna opažanja (Cabanellas-Reboredo i *sur.* 2019).

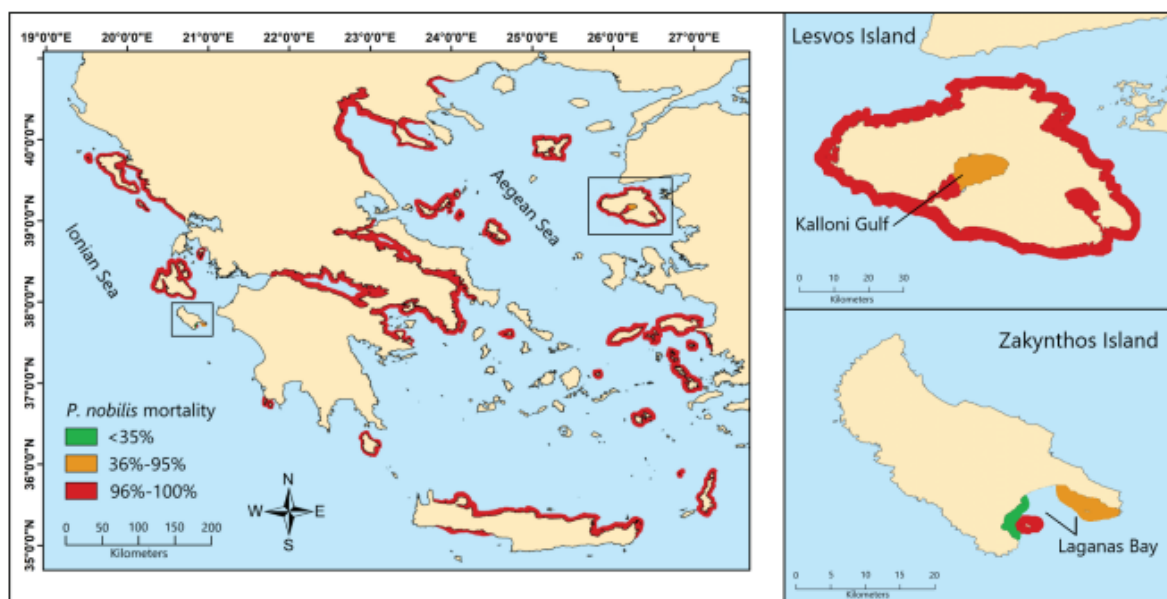


Slika 3. Retrogradna simulacija na području Baleara (narančasti put), progresivne simulacije na području L’Ametlla de Mar (plavi put) i na području Katalonije (ljubičasti put). Točke na krajevima puteva predstavljaju konačnu destinaciju čestica. P_1 predstavlja područje s prisutnom zarazom, a P_2 područje gdje nema zaraze na početku simulacije te područje s prisutnom zarazom u specifičnom vremenu. Pravokutnici predstavljaju tampon zonu od 650 km^2 . Preuzeto i prilagođeno iz Cabanellas-Reboredo i sur. 2019.

Tablica 1. Usporedba zabilježenih i pretpostavljenih datuma pristizanja čestica u 3 simulacije. $LonLat$ (geografska dužina i širina), $Omme_f$ (zabilježen datum pojave masovnog izumiranja), AEt_f (pretpostavljeni datum pojave masovnog izumiranja), FET_f (prvi dan pristizanja čestica), LEt_f (zadnji dan pristizanja čestica). Preuzeto i prilagođeno iz Cabanellas-Reboredo i sur.2019.

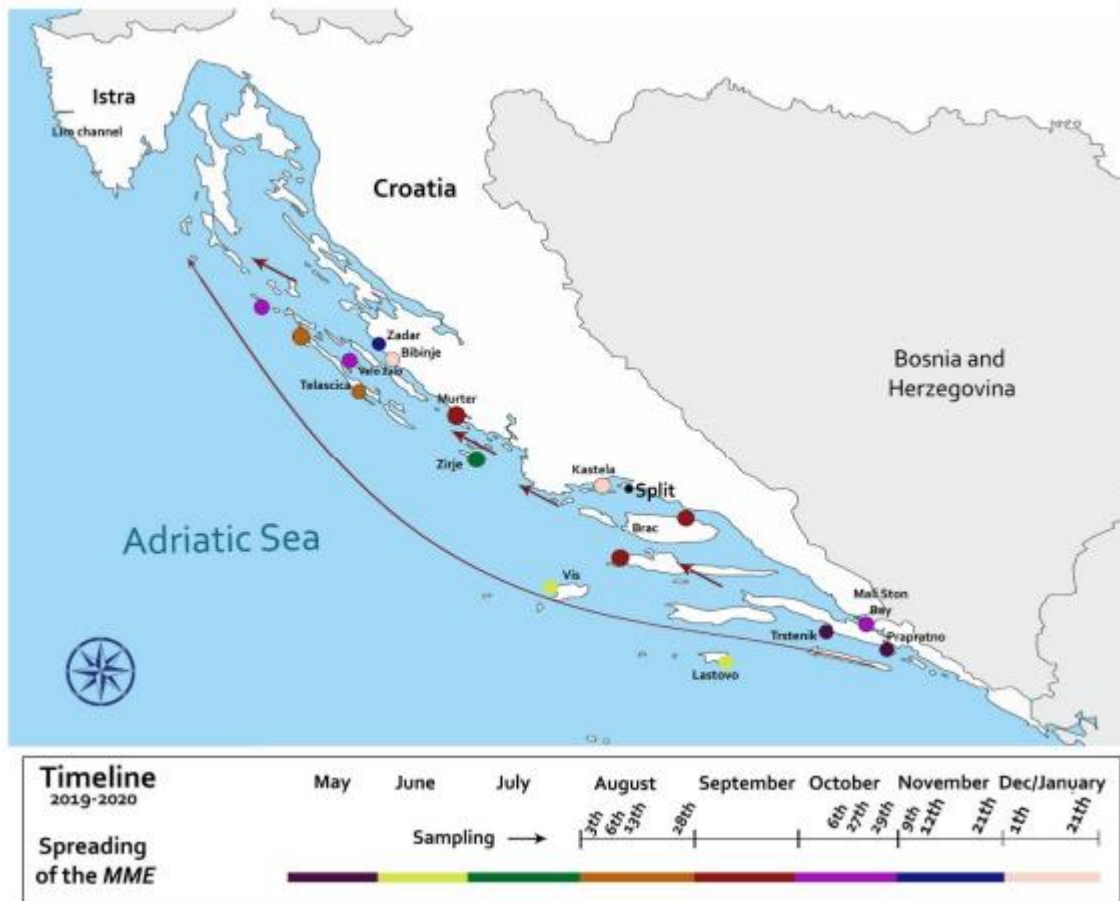
Simulation	Area	LonLat p_1		LonLat p_2		$Omme_f$	AEt_f	FET_f	LEt_f
Backward	Balearic Islands	2.45°E	39.50°N	1.44°E	38.91°N	2016/09/28	2016/09/29	2016/09/09	2016/10/16
Forward	L’Ametlla de Mar	1.42°E	41.14°N	0.87°E	40.91°N	2017/07/14	2017/07/11	2017/06/25	2017/07/24
Forward	North Catalonia	2.99°E	41.71°N	3.22°E	42.05°N	2017/12/07	2017/11/11	2017/11/07	2017/12/04

Već 2018. godine zabilježen je slučaj izumiranja plemenitih periski u Egejskom moru s visokom smrtnošću gdje je molekularnim analizama utvrđena prisutnost *H. pinnae* među uginulim jedinkama. Korelacija između prisutnosti haplosporidija i izumiranja plemenitih periski u ovom trenutku je odavno potvrđena. U narednom periodu od dvije godine većina populacija *P. nobilis* uz obalu Grčke doživljava kolaps (Zotou i sur. 2020).



Slika 4. Stanje populacija *P. nobilis* u priobalnim vodama Grčke. Crveni obrub predstavlja 96-100% smrtnosti, narančasti 36%-95% smrtnosti dok zeleni obrub predstavlja <35% smrtnosti. Preuzeto i prilagođeno iz Zotou i sur. 2020.

U proljeće 2019. godine masovno izumiranje zahvaća i najjužnije dijelove hrvatske obale te do jeseni iste godine zahvaća i središnji Jadran, a potom se širi i na sjeverozapad čime je zahvaćen cijeli Mediteranski bazen. U ovom je slučaju među mrtvim jedinkama najveća prisutnost bila bakterije *Mycobacterium sp.*, zatim *H. pinnae*, a potom i bakterije *Vibrio mediterranei* (Šarić i sur. 2020). Treba imati na umu da manjak podataka glede masovnog izumiranja *P. nobilis* uz sjevernoafričku obalu ne ukazuje na odsustvo masovnog izumiranja na tim područjima.



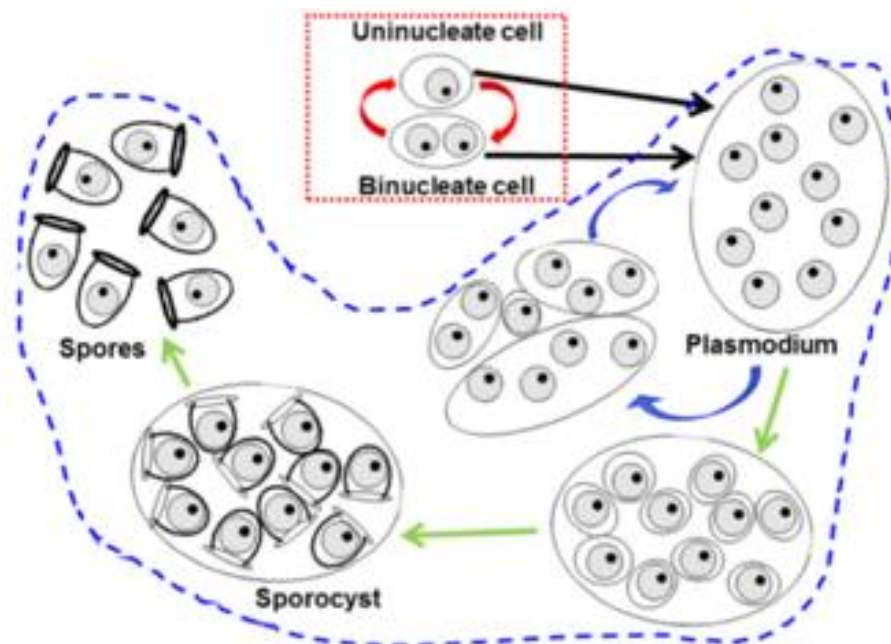
Slika 5. Kronološki slijed širenja masovnog izumiranja (MME) u istočnom Jadranu u razdoblju od svibnja 2019. godine do siječnja 2020. godine.

3. Etiologija

Molekularnim i histopatološkim metodama ustanovljena je prisutnost više potencijalnih patogena. Među mrtvim jedinkama detektirana je prisutnost *H. pinnae*, *Mycobacterium sp.*, *Vibrio mediterranei* i dr. Ovisno o lokalitetu uzorkovanja prisutnost patogena se razlikovala što samu prirodu masovnog izumiranja čini daleko složenijom. Sve do pojave masovnog izumiranja *P. nobilis* pojava više patogena začudo nije zaprimila preveliku pažnju u kontekstu proučavanja biologije mora uzevši u obzir da koinfekcije čine sami ishod bolesti nepredvidljivijim (Carella i sur.2020).

3.1. *Haplosporidium pinnae*

Protozojski haplosporidijski paraziti poput *Haplosporidium nelsoni* i *Bonamia ostreae* otprije su poznati radi devastacije populacija *Crassostrea virginica* u SAD-u i *Ostrea edulis* u Francuskoj, a karakterizira ih plazmodijski stadij koji prethodi formaciji spora s operkulumom.



Slika 6. Shematski prikaz razmnožavanja haplosporidijskih protozoa. Crveni obrub: ciklus binarne diobe, plavi obrub: višejezgreni plazmodiji, koji se dijele plazmotomijom, ulaze u stadij sporogona stvarajući jednojezgrene spore. Preuzeto i prilagođeno iz Grau i sur. 2020.

Do pojave masovnog izumiranja *P. nobilis* nisu dovedeni u vezu s natporodicom *Pinnoidea*. Nedugo nakon pojave masovnog izumiranja histopatološkom analizom uginulih jedinki s područja Alicante utvrđena je prisutnost ekstracelularnih tvorbi koje morfološkim osobinama nalikuju prije navedenim stadijima haplosporidijskih parazita što će molekularne analize i potvrditi (Susana Darriba 2017). Vrsta parazita iz roda *Haplosporidium*, kasnije nazvanom *pinnae*, smatrati će se specifičnim za vrstu *P. nobilis* i primarnim agensom nezabilježene anomalije. Unatoč tome, prema Scarpa i sur. 2020. ustanovljeno je kako *H. pinnae* nije specifičan za pojedinu vrstu budući da je u obalnim vodama Sardinije prisutnost praživotinje zabilježena i u jedinkama *Mythilus galloprovincialis* kao i *Ruditapes decussatus*. Uzevši u obzir činjenicu da su jedinke *R. decussatus* uzorkovane 2014. godine za zaključiti je da je *H. pinnae* prisutan u mediteranu barem od 2014. godine te se ne može smatrati isključivim uzročnikom masovnog izumiranja (Scarpa i sur. 2020). Tome u prilog idu i nalazi iz Grčke (Lattos i sur 2020.), Hrvatske (Šarić i sur. 2020.) te drugih lokaliteta. No, radi studije iz iste godine dolazi do revizije ideje da je *H. pinnae* primarni uzročnik bolesti plemenite periske na što ukazuju parametri povezani s antioksidativnim odgovorom (Box i sur. 2020).

3.2. *Mycobacterium sp.*

Sve do 2018. godine straživanja na temu izumiranja vrste *Pinna nobilis* uglavnom su se fokusirala na prisutnost *Haplosporidium pinnae* smatrajući ga jedinim uzročnikom bolesti među jedinkama. Međutim, 2018. godine cijela problematika se dodatno zakomplicirala budući da je u lezijama mrtvih jedinki *P. nobilis* u obalnim vodama Italije primijećena prisutnost *Mycobacterium sp.* (Carella i sur. 2019). Širenjem pojave masovnog izumiranja prisutnost

Mycobacterium sp. detektirana je u istočnom dijelu Sredozemnog mora čime je postala novi potencijalni uzročnik masovnog izumiranja. U prilog tome išla je velika podaktkovna varijabilnost glede prisutnosti patogena u tkivima jedinki s različitih lokaliteta. Tako je primjerice prisutnos bakterije među talijanskim populacijama bila manja u odnosu na jadranske populacije gdje je opisana i nova vrsta unutar roda *Mycobacterium* nazvana *Mycobacterium pinniadriaticum* (Spičić i sur. 2023).

Tablica 2. Lokaliteti uzorkovanja talijanske populacije oko Sardinije. PN: *Pinna nobilis*, PR: *Pinna rudis*, SD: naznake bolesti, FS: status vijabilnosti. Preuzeto i prilagođeno iz Scarpa i sur. 2020.

Sample_ID	Locality	Code	Coordinates	SD	FS	<i>H. pinnar</i>	<i>Mycobacterium spp.</i>	<i>Vibrio spp.</i>
PN1	Sant'Antioco	SAN	39°03'49.2" N 8°27'47.6" E	NO	D	YES	NO	NO
PN2				NO	D	YES	NO	NO
PN3				NO	D	NO	NO	NO
PN4				NO	D	NO	NO	NO
PN5	Calasetta-Cussorgia	CAL	39°06'27.7" N 8°23'54.8" E	NO	D	YES	NO	NO
PN6				YES	D	YES	NO	NO
PN7				NO	D	NO	NO	NO
PN8				NO	D	NO	NO	NO
PN9				NO	D	NO	NO	NO
PN10				YES	D	NO	NO	NO
PN11				YES	D	NO	NO	NO
PN12				NO	D	NO	NO	NO
PN13				NO	D	NO	NO	NO
PN14				NO	D	NO	NO	NO
PN15				NO	D	NO	NO	NO
PN16	NO	D	NO	NO	NO			
PN17	NO	D	YES	NO	NO			
PN18	Tramariglio-MPA Capo Caccia Isola Piana	TRA	40°35'23.6" N 8°10'12.4" E	NO	D	YES	NO	NO
PN19				NO	D	NO	YES	NO
PN20	Porto Conte-MPA Capo Caccia Isola Piana	PRC	40°35'46.7" N 8°12'58.1" E	NO	A	NO	NO	NO
PN21	Cala Reale-MPA Isola dell'Asinara	CLR	41°03'47.6" N 8°16'59.5" E	NO	D	NO	NO	NO
PN22				YES	D	YES	NO	NO
PN23				NO	D	YES	NO	NO
PN24				YES	D	YES	NO	NO
PN25				NO	D	YES	NO	NO
PN26				NO	D	YES	NO	NO
PN27				YES	D	YES	NO	NO
PN28				YES	D	YES	NO	NO
PN29				YES	D	YES	NO	NO
PN30				YES	D	YES	NO	NO
PN31	Fornelli-MPA Isola dell'Asinara	FOR	40°59'04.1" N 8°15'06.3" E	YES	D	NO	NO	NO
PN32				YES	D	NO	NO	NO
PN33				NO	D	NO	NO	NO
PN34				NO	D	YES	NO	NO
PN35				YES	D	NO	NO	NO
PN36				YES	D	YES	NO	NO
PN37				YES	D	YES	NO	NO
PN38	Cala Scombro di dentro-MPA Isola dell'Asinara	CLS	41°01'43.5" N 8°14'44.6" E	YES	D	YES	NO	NO
PN39				YES	D	YES	NO	NO
PN40				NO	D	YES	NO	NO
PN41				YES	D	YES	NO	NO
PN42				YES	D	YES	NO	NO
PN43				YES	D	NO	NO	NO
PN44				NO	D	YES	NO	NO
PN45				NO	D	YES	NO	NO
PN46				YES	D	YES	NO	NO
PN47				YES	D	YES	NO	NO
PN48	Isola Piana-MPA Isola dell'Asinara	IPI	40°58'42.9" N 8°13'22.6" E	NO	A	NO	YES	NO
PR1				NO	A	NO	YES	NO
PR2				NO	A	NO	YES	NO

Tablica 3. Prisutnost lezija i patogena u uzorcima iz obalnih voda Hrvatske (Vidi pod Recorded lesions). Preuzeto i prilagođeno iz Šarić i *sur.* 2020.

Sample Date (day/month/yr)	Area	Animal Shell Length (cm)	Animal Mortality	Pathogens Diagnostic		Recorded Lesions
				Histopathology Myco/Haplo	PCR Myco/Haplo	
03/08/2019	Sakarun	31		+/+	+/+	Visible plasmodial phases of <i>H. pinnae</i> (score 1) and presence of <i>Mycobacterium</i> within single immune cells infiltrate digestive tissue (score 1);
03/08/2019	Sakarun	52	40%	-/+	-/+	Visible plasmodial phases of <i>H. pinnae</i> (score 1) and presence of <i>Mycobacterium</i> within single and immune cells aggregated within digestive tissue (score 2), areas of digestive gland necrosis and nodulation. <i>Mycobacterium</i> and <i>H. pinnae</i> presence within hemolymph vessels.
03/08/2019	Sakarun	19		+/+	+/+	Visible plasmodial phases of <i>H. pinnae</i> (score 1) and presence of <i>Mycobacterium</i> within single immune cells infiltrate digestive tissue (score 1);
03/08/2019	Sakarun	47		-/+	n.p. *	Few plasmodial phases of <i>H. pinnae</i> at mantle level (score 1); no other lesions visible
03/08/2019	Sakarun	35		-/+	+/+	No lesions visible
03/08/2019	Sakarun	32		+/+	+/+	Scarce inflammatory response; <i>H. pinnae</i> (score 1); <i>Mycobacterium</i> (score 1);
06/8/2019	Žirje	54	95%	-/-	-/-	Strong inflammation (infiltrative and nodular) at mantle and digestive gland
28/08/2019	Telašćica	54		+/+	+/+	Strong infiltrative inflammation; <i>H. pinnae</i> (score 2); <i>Mycobacterium</i> (score 1);
28/08/2019	Telašćica	49	65%	+/+	+/+	Strong infiltrative inflammation; presence of inflammatory nodules at digestive apparatus and connective tissue level <i>H. pinnae</i> (score 2); <i>Mycobacterium</i> (score 2);
28/08/2019	Telašćica	41		+/+	+/+	Light infiltrative inflammation; <i>H. pinnae</i> (score 1); <i>Mycobacterium</i> (score 1);
28/08/2019	Telašćica	23		+/+	+/+	Light infiltrative inflammation; <i>H. pinnae</i> (score 2); <i>Mycobacterium</i> (score 1);

Table 2. Cont.

Sample Date (day/month/yr)	Area	Animal Shell Length (cm)	Animal Mortality	Pathogens Diagnostic		Recorded Lesions
				Histopathology Myco/Haplo	PCR Myco/Haplo	
27/10/2019	Velo Žalo	46		+/-	-/-	No visible lesions; <i>Mycobacterium</i> (score 1);
27/10/2019	Velo Žalo	53	40%	+/+	-/+	Sporulation phases of <i>H. pinnae</i> (score 3) and inflammatory nodules filled with <i>Mycobacterium</i> in the interstitium of digestive tissue and at fibrous capsule of digestive gland (score 2).
09/11/2019	Mali Ston	58		+/-	+/-	Gill inflammation, acid mucin production with presence of ciliates; <i>Mycobacterium</i> (score 2)
09/11/2019	Mali Ston	55	60%	+/-	+/-	Gill inflammation, acid mucin production with presence of ciliates <i>Mycobacterium</i> (score 2)
09/11/2019	Mali Ston	57		+/-	+/-	Gill inflammation, acid mucin production with presence of ciliates <i>Mycobacterium</i> (score 1)
12/11/2019	Zadar	58	40%	-/+	+/-	Light infiltrative inflammation digestive tissue; <i>H. pinnae</i> (score 2)
01/01/2020	Bibinje	55		+/-	+/+	Strong infiltrative inflammation; <i>Mycobacterium</i> (score 1);
01/01/2020	Bibinje	47	80%	+/+	+/+	Strong infiltrative and nodular inflammation; <i>H. pinnae</i> (score 2); <i>Mycobacterium</i> (score 2);
01/01/2020	Bibinje	40		+/-	+/+	Strong infiltrative and nodular; <i>Mycobacterium</i> (score 2);
21/01/2020	Kaštela	49		+/+	+/+	Strong infiltrative inflammation; <i>H. pinnae</i> (score 2); <i>Mycobacterium</i> (score 1);
21/01/2020	Kaštela	38	95%	+/+	+/+	Strong infiltrative inflammation; <i>H. pinnae</i> (score 1); <i>Mycobacterium</i> (score 1);
21/01/2020	Kaštela	30		-/-	-/+	Strong infiltrative inflammation; <i>H. pinnae</i> (score 2); <i>Mycobacterium</i> (score 2);

* n.p. samples not present.

3.3. *Vibrio sp.*

Prisutnost bakterija *Vibrio mediterranei* i *Vibrio splendidus* ponajviše se povezuje sa slučajem masovnog izumiranja u obalnim vodama Grčke (Lattos i sur. 2021.), iako je bakterija detektirana u uzorcima s drugih područja poput Sardinije (Carella i sur. 2023). Trenutno dostupni podaci ukazuju da je riječ o oportunističkom patogenu koji pokazuje sezonalni karakter. Tome u prilog ide činjenica da je veća virulencija zabilježena pri nižim temperaturama dok je s porastom temperature virulencija opadala (Lattos i sur. 2021). Dosad nije zabilježena prisutnost isključivo bakterije roda *Vibrio* među mrtvim jedinkama u divljini.

3.4. *Rhodococcus erythropolis*

Prisutnost bakterije *Rhodococcus erythropolis* u tkivima *P. nobilis* prvi je put zabilježena 2020. godine u vodama Sardinije. Uloga *R. erythropolis* do kraja nije razjašnjena (Scara i sur. 2020). Iako postoji izgledna mogućnost da je riječ o patogenu činjenicu da mnogi sojevi ove vrste posjeduju antibiotička svojstva treba uzeti u obzir (Kitagawa i Tamura 2008).

3.5. *Picornavirus*

Picornavirus je *positive-sense* RNA virus koji se razmnožava u hemocitima *P. nobilis* te dovodi do mnogobrojnih promjena na staničnoj razini. Međuostalom, i do reorganizacije citosolnih membranskih struktura koje potpomažu umnažanje virusa. Prvi put je primijećen među uzorcima sakupljenima u razdoblju od 2021. do 2023 sa više različitih lokacija uz jugoistočnu španjolsku obalu te sjeverozapadnu talijansku obalu, a to ukazuje na sposobnost školjkaša da održe dugotrajnu infekciju sposobnu prijeći u kroničnu bolest što bi objasnilo pojavu jedinki naizgled rezistentnih na druge patogene jer bi trebao proći relativno dug vremenski period prije nego što jedinka podlegne drugim patogenima radi imunosupresije koja se javlja kao konačni ishod infekcije *Picornavirusom* (Carella i sur. 2023). *Picornavirus* ima potencijal biti kapitalni uzročnik masovnog izumiranja, no potrebna su daljnja istraživanja.

4. Patohistološke promjene

U najranijim stadijima infekcije nekim od prije spomenutih patogena prvi simptom bolesti je tromost mišića zatvarača pri zatvaranju ljušture. U kasnijim stadijima oboljela se jedinka odvaja od ljušture i tone u donji dio ljušture nakon čega ugiba (Carella i sur. 2019).



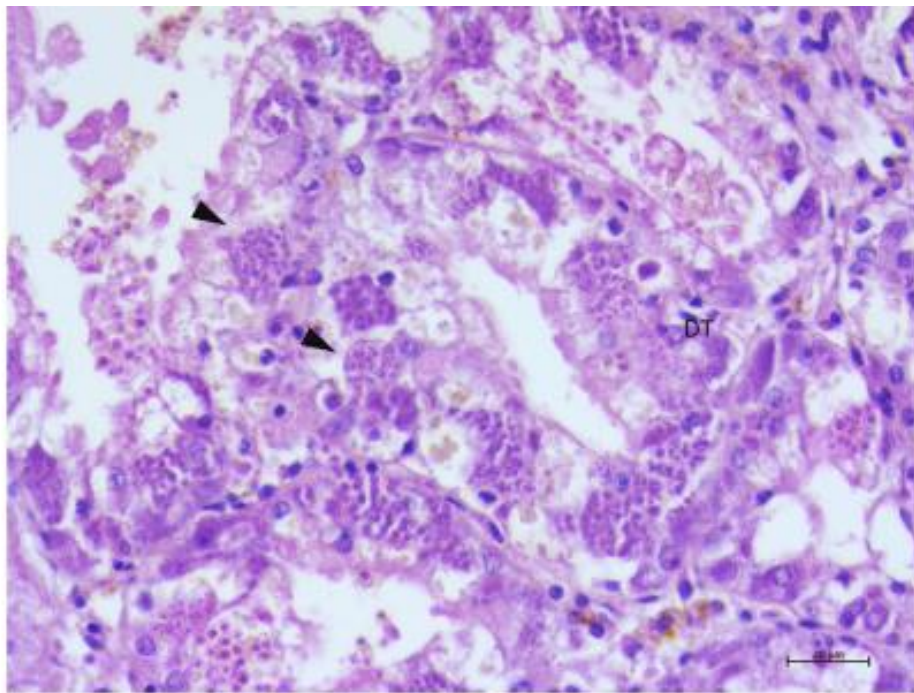
Slika 7. Uspravno stojeća mrtva jedinka *P. nobilis* s kolabiranim tkivom na dnu ljušture. Fotografirao Fabio Scarpa. Preuzeto i prilagođeno iz Scarpa i sur. 2021.



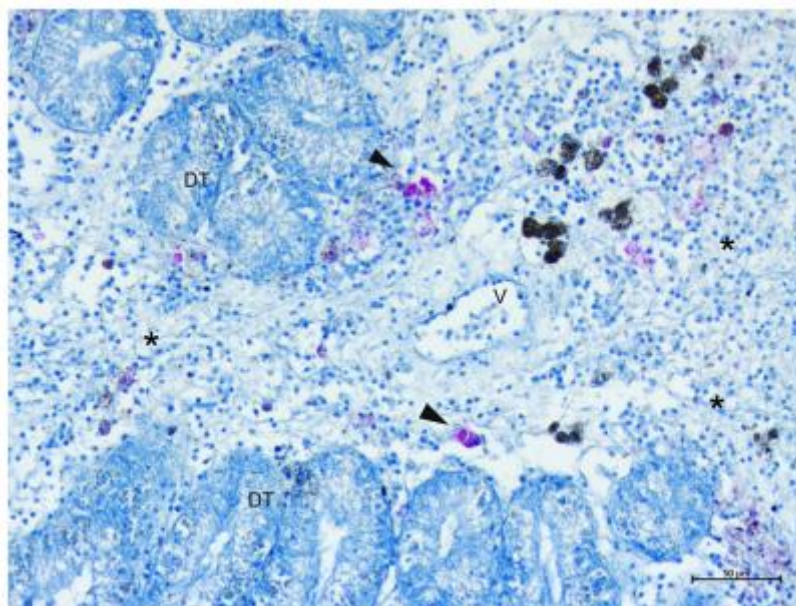
Slika 8. Prazna ljuštura uginule jedinke *P. nobilis*. Fotografirao Fabio Scarpa. Preuzeto i prilagođeno iz Scarpa i sur. 2021.

Među uginulim jedinkama egzaminacijom tkiva zabilježene su intersticijske vodenaste ciste u probavnom sustavu koje dovode do otkazivanja probavnog epitela te proizvodnje haplosporidijskih sporocista u kanalčićima probavne žlijezde dok je plazmodijski stadij

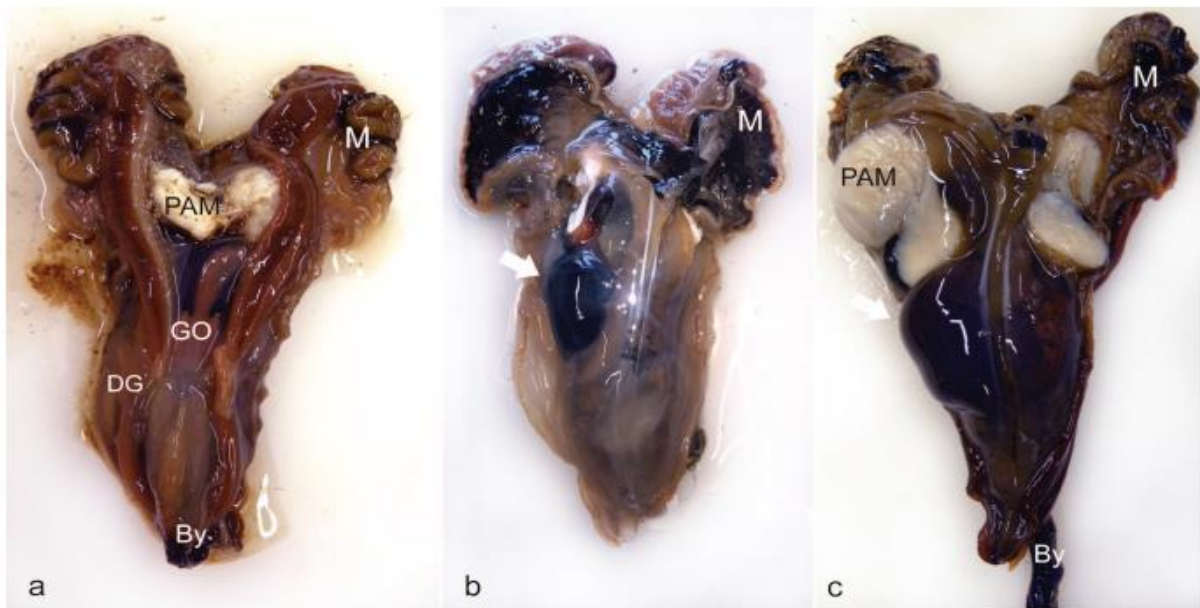
uglavnom prisutan u hemocitima, vezivnom tkivu plašta i probavnoj žlijezdi. Obično je riječ o jednojezgrenim plazmodijima. Otpuštanjem spora javlja se upalni proces koji dovodi do oticanja tkiva. U slučaju *Mycobacterium sp.* oticanje tkiva je također prisutno kao i pojava nespecifičnih lezija. Bakterija ima tendenciju nakupljati se u eozinofilnim granulocitima te rjeđe u smeđim stanicama kako bi izbjegla fagosome, taktika otprije opisana kod *Mycoplasma*. Bitno je za naglasiti da histopatološke metode potvrđuju teoriju o koinfekciji haplosporidijskim i bakterijskim parazitom budući da su lezije u tkivu bile izraženije u jedinki koje su istovremeno bile zarežene s oba patogena (Carella i sur. 2023).



Slika 9. Mikroskopski prikaz preparata probavnog tkiva koje sadrži sporulacijske stadije *H. pinnae* (strelice). DT: probavno tkivo. Preuzeto i prilagođeno iz Carella i sur. 2019.



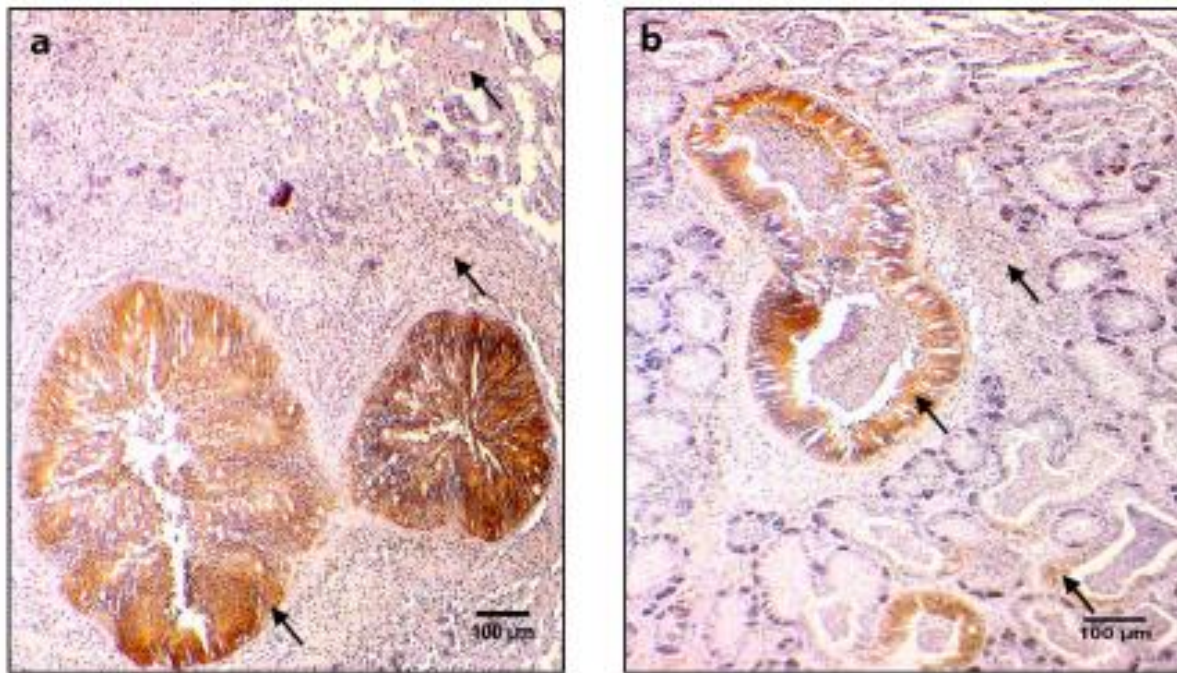
Slika 10. Mikroskopski prikaz preparata probavne žlijezde inficirane s *Mycobacterium sp.* DT: probavni kanalići. Preuzeto i prilagođeno iz Carella i sur. 2019.



Slika 11. Prikaz probavne žlijezde (DG) u zdrave jedinke (a) i bolesne probavne žlijezde ispunjene tekućinom kao posljedicom infekcije (strelice). By: bizus, GO: gonade, PAM: posteriorni mišić, M: plašt. Preuzeto i prilagođeno iz Carella i sur. 2023.

5. Patofiziološke promjene

Otpuštanje slobodnih kisikovih radikala prethodeno fagocitozom te citokina u prisutnosti patogena je oblik urođenog imunološkog odgovora karakterističan za mnoge organizme pa tako i mekušce u kojima je urođena imunost ujedno i jedini oblik imunosti (Ertl i sur. 2016). U bolesnih jedinki dolazi do smanjene antioksidativne aktivnosti. Istraživanja su pokazala primjetno smanjenje u koncentraciji katalaze, sposobne razgraditi vodikov peroksid, te superoksid dismutaze, zadužene za uklanjanje superoksida, u škrigama jedinki zaraženih parazitom *H. pinnae*. U isto vrijeme dolazi do porasta po stanicu toksičnog malondialdehida kao posljedica peroksidacije lipida što dovodi do staničnog stresa (Box i sur. 2020). Nadalje, bolesno stanje jedinki *P. nobilis* u jeku masovnog izumiranja okarakterizirano je i povećanom prisutnošću Hsp skupine proteina, preciznije Hsp70 i Hsp90, bilo da je riječ o infekciji *H. pinnae* ili haplosporidijskoj i mikobakterijskoj koinfekciji. Hsp su protienski šaperoni čija je funkcija prevenirati denaturaciju proteina unutar stanice pri stresnim uvjetima poput infekcije ili povišene temperature. Također, povećana koncentracija ubikvitina se treba uzeti kao validan dokaz prisutnosti patogena tijekom imunohistokemijskih egzaminacija. Unatoč povećanim koncentracijama Hsp-ova i ubikvitina, sudeći po nalazima iz grčkih obalnih voda koncentracije interleukina Il-6, pro-upalnog citokina, i TNF- α (tumorski faktor nekroze) ostaju neznatno promijenje tijekom infekcija različitih patogena (Lattos i sur. 2021.).



Slika 12. Imunohistokemijska detekcija Hsp90 u probavnim kanalićima i vezivnom tkivu probavne žlijezde u zdrave (a) i bolesne (b) jedinke. Preuzeto i prilagođeno iz Lattos i sur. 2021.

6. Pojava rezistencije

Uzevši u obzir da je gotovo cjelokupna populacija *P. nobilis* u Sredozemnom moru dovedena na rub izumiranja evidentno je da je adaptivni potencijal vrste nedostatan pred određenim selektivnim pritiscima poput pojave visoko infektivnih patogena, posebice u slučajevima koinfekcije kao npr. koinfekcije *H. pinnae* i *Mycobacterium sp.* Bez obzira na ovakav nizak *fitness* od početka masovnog izumiranja pronađene su jedinke koje su uspjele preživjeti unatoč nepostojećim šansama, uzevši u obzir da su lokalne populacije istrebljene, što dodatno komplicira cijelu fabulu (Coupe i sur. 2023). No, još bitnije je što ovakvi izuzeci daju nadu u, još uvijek diskutabilan, opstanak vrste.

6.1. Hibridizacija s *Pinna rudis*

Pinna rudis je vrsta srodna *P. nobilis* koja većinski nastanjuje atlantske obale Afrike, no stanište joj se djelomice preklapa s *P. nobilis*. Baš poput *P. nobilis*, riječ je o zaštićenoj vrsti koja preferira šljunčanu podlogu mada je batimetrijska distribucija slična onoj u *P. nobilis*. Iako je riječ o srodnoj vrsti ne podliježe haplosporidijskom parazitu poput *P. nobilis*. Godine 2020. kod otoka Pantellerina zabilježena je prisutnost *P. rudis* što ukazuje na to da vrsta postupno zauzima nišu koju je donedavno nastanjivala *P. nobilis* (Rubino i sur. 2024). Nedugo nakon, uz otočić Cabrera opisane su tri jedinke *P. nobilis* s nekim morfološkim značajkama koje podsjećaju na *P. rudis*. Ispostavit će se da su u pitanju hibridi *P. nobilis* x *P. rudis* što će sekvenciranje 28S

gena i potvrditi. Također, sva tri hibrida su pokazivali rezistenciju na *H. pinnae*. U kontekstu masovnog izumiranja *P. nobilis* u Sredozemnom moru pronalazak ovakvih hibrida vrijedan su predmet proučavanja jer bi se upravo u njihovom genomu mogli nalaziti dijelovi slagalice koji nedostaju da se shvati priroda rezistencije (Vasquez-Luis i sur. 2021). Također, u najcrnjem mogućem scenariju hibridi bi mogli biti budući nositelji genskog naslijeđa *P. nobilis*.



Slika 13. Prikaz *P. nobilis* (A), *P. rudis* (B) te tri morfološki različita hibrida iz okolice Cabrere (C, D, E). Preuzeto i prilagođeno iz Vasquez-Luis i sur. 2021.

6.2. Nezahvaćene jedinke

Nakon ljeta 2018. godine u zaljevu Peyrefite preostale su svega četiri jedinke *P. nobilis*. Uzevši u obzir njihovu međusobnu blizinu bilo je za pretpostaviti kako nikako nisu mogle izbjeći infekciju parazitom *H. pinnae* te se nametalo pitanje jesu li preživjele jedinke rezistentne ili tolerantne na infekciju. Kako ne bi došlo do zamjene za drugu vrstu ili hibrid, sekvenciranje mtDNA potvrdilo je da su sve četiri jedinke pripadale vrsti *P. nobilis*, a PCR fragmenata rDNA specifičnog za vrstu (SSU rDNA) ukazalo je na rezistenciju jedinki budući da trenutna prisutnost *H. pinnae* nije potvrđena. U prilog hipotezi ide i pozitivan rezultat sekvenciranja 18S rDNA (SSU rDNA) genskog transkripta (LC338065) specifičnog za *H. pinnae* potvrđujući da

su jedinke nekoć bile u kontaktu s parazitom. Uspoređujući *de novo* transkriptome rezistentnih jedinki s jedinkama pronađenih na dvije druge lokacije (Agde i Leucate laguna) primijećena je razlika u ekspresiji gena za Sox15, Agrin, *Pol-like* protein, Cink-vezujući protein te 6 drugih nepoznatih gena koji se dovode u vezu s otpornošću jedinki na *H. pinnae* (Salis i sur. 2022).

7. Zaključak

Plemenita periska (*Pinna nobilis*) endem je Sredozemnog mora te je ujedno i najveći školjkaš koji ima izrazito bitnu ulogu u morskom ekosustavu kao stanište za brojne epibionte te kao filtrator morske vode. Populacija *P. nobilis* u Mediteranu dovedena je do granice izumiranja u svega nekoliko godina pojavom više patogena koji su glavni suspekti za masovno izumiranje od čega su najznačajniji i najviše proučavani *Haplosporidium pinnae*, *Mycobacterium sp.*, a potom i *Vibrio sp.* čija prisutnost među populacijama nije do kraja razjašnjena. Iako mnoge studije ukazuju na sinergistički efekt ovih patogena postoje naznake da glavnu ulogu u razvoju bolesti ipak ima novotkriveni *Picornavirus* koji izazvanom imunosupresijom stvara put za napad *H. pinnae* i drugih opisanih patogena. Otkriće hibrida *P. nobilis* x *P. rudis* i razlike u ekspresiji gena u nekoliko jedinki dokazuje postojanje rezistencije na patogene što daje nadu u oporavak vrste, no ekstremna ugroženost vrste i mali broj trenutno živućih jedinki otežavaju buduća istraživanja. Iako je opstanak vrste moguć još uvijek je nemoguće govoriti o optimističnom epilogu uzevši u obzir nerazjašnjenu prirodu izumiranja kao i samu pojavu patogena i rezistentnih jedinki zbog čega će *P. nobilis* ostati temom znanstvenih polemika.

8. Literatura

Box, A.; Capó, X.; Tejada, S.; Catanese, G.; Grau, A.; Deudero, S.; Sureda, A.; Valencia, J.M. Reduced antioxidant response of the fan mussel *Pinna nobilis* related to the presence of *Haplosporidium pinnae*. *Pathogens* 2020, 9, 932.

Cabanellas-Reboredo, M., Vázquez-Luis, M., Mourre, B., Álvarez, E., Deudero, S., Amores, Á., Addis, P., Ballesteros, E., Barrajon, A., Coppa, S., García-March, J. R., Giacobbe, S., Casalduero, F. G., Hadjioannou, L., Jiménez-Gutiérrez, S. V., Katsanevakis, S., Kersting, D., Mačić, V., Mavrič, B., ... Hendriks, I. E. (2019). Tracking a mass mortality outbreak of pen shell *Pinna nobilis* populations: A collaborative effort of scientists and citizens. *Scientific Reports*, 9

Carella F, Antuofermo E, Farina S, Salati F, Mandas D, Prado P, Panarese R, Marino F, Fiocchi E, Pretto T and De Vico G (2020) In the Wake of the Ongoing Mass Mortality Events: Co-occurrence of *Mycobacterium*, *Haplosporidium* and Other Pathogens in *Pinna nobilis* Collected in Italy and Spain (Mediterranean Sea). *Front. Mar. Sci.* 7:48.

Carella F, Prado P, De Vico G, Palic D, Villari G, García-March JR, Tena-Medialdea J, Cortes Melendreras E, Gimenez-Casalduero F, Sigovini M and Aceto S (2023) A widespread picornavirus aects the hemocytes of the noble pen shell (*Pinna nobilis*), leading to its immunosuppression. *Front. Vet. Sci.* 10:1273521.

Carella F., Aceto S., Pollaro F., Miccio A., Iaria C., Carrasco N., Prado P., De Vico G. A mycobacterial disease is associated with the silent mass mortality of the pen shell *Pinna nobilis* along the Tyrrhenian coastline of Italy. *Scientific Reports*. 2019;9(1)

Carella F., Palić D., Šarić T., Župan I., Gorgoglione B., Prado P., Andree K.B., Giantsis I.A., Michaelidis B., Lattos A., et al. Multipathogen infections and multifactorial pathogenesis involved in noble pen shell (*Pinna nobilis*) mass mortality events: Background and current pathologic approaches. *Vet. Pathol.* 2023;60:560–577.

Darriba, S., First haplosporidan parasite reported infecting a member of the Superfamily Pinnoidea (*Pinna nobilis*) during a mortality event in Alicante (Spain, Western Mediterranean), *Journal of Invertebrate Pathology* (2017)

Ertl NG, O'Connor WA, Papanicolaou A, Wiegand AN, Elizur A (2016) Transcriptome Analysis of the Sydney Rock Oyster, *Saccostrea glomerata*: Insights into Molluscan Immunity. *PLoS ONE* 11(6): e0156649

Grau A, Villalba A, Navas JI, Hansjosten B, Valencia JM, García-March JR, Prado P, Follana-Berná G, Morage T, Vázquez-Luis M, Álvarez E, Katharios P, Pavloundi C, Nebot-Colomer E, Tena-Medialdea J, Lopez-Sanmartín M, Peyran C, Čížmek H, Sarafidou G, Issaris Y, Tüney-Kizilkaya I, Deudero S, Planes S and Catanese G (2022) Wide-Geographic and Long-Term Analysis of the Role of Pathogens in the Decline of *Pinna nobilis* to Critically Endangered Species. *Front. Mar. Sci.* 9:666640.

Kitagawa W., Tamura T. (2008). Three types of antibiotics produced from *Rhodococcus erythropolis* strains. *Microbes Environ.* 23, 167–171

Lattos, A.; Bitchava, K.; Giantsis, I.A.; Theodorou, J.A.; Batargias, C.; Michaelidis, B. The Implication of *Vibrio* Bacteria in the Winter Mortalities of the Critically Endangered *Pinna nobilis*. *Microorganisms* 2021, 9, 922

Lattos, A.; Feidantsis, K.; Georgoulis, I.; Giantsis, I.A.; Karagiannis, D.; Theodorou, J.A.; Staikou, A.; Michaelidis, B. Pathophysiological Responses of *Pinna nobilis* Individuals Enlightens the Etiology of Mass Mortality Situation in the Mediterranean Populations. *Cells* 2021, 10, 2838.

- Lattos, A.; Feidantsis, K.; Giantsis, I.A.; Theodorou, J.A.; Michaelidis, B. Seasonality in Synergism with Multi-Pathogen Presence Leads to Mass Mortalities of the Highly Endangered *Pinna nobilis* in Greek Coastlines: A Pathophysiological Approach. *Microorganisms* 2023, 11, 1117
- Panarese, R., Tedesco, P., Chimienti, G., Latrofa, M. S., Quaglio, F., Passantino, G., et al. (2019). *Haplosporidium pinnae* associated with mass mortality in endangered *Pinna nobilis* fan mussels. *J. Invertebr. Pathol.* 164, 32–37.
- Rubino, F.; Fanelli, G.; Denti, G. The Queen Is Dead, Long Live the Queen: The Vanishing of *Pinna nobilis* and the Onset of the Congeneric *P. rudis* (Mollusca: Bivalvia). *Diversity* 2024, 16, 341.
- Rubino, F.; Fanelli, G.; Denti, G. The Queen Is Dead, Long Live the Queen: The Vanishing of *Pinna nobilis* and the Onset of the Congeneric *P. rudis* (Mollusca: Bivalvia). *Diversity* 2024, 16, 341.
- Salis, P. , Peyran, C. , Morage, T. , de Bernard, S. , Nourikyan, J. , Coupé, S. , Bunet, R. , & Planes, S. (2022). RNA-Seq comparative study reveals molecular effectors linked to the resistance of *Pinna nobilis* to *Haplosporidium pinnae* parasite. *Scientific Reports*, 12
- Scarpa F, Sanna D, Azzena I, Cossu P, Casu M (2021) From dark to light and back again: is *Pinna nobilis*, the largest Mediterranean shellfish, on the brink of extinction?. *Veterinaria* 70:1–14
- Scarpa, F., Sanna, D., Azzena, I., Mugetti, D., Cerutti, F., Hosseiniporgham, S., et al. (2020). Multiple non-species-specific pathogens possibly triggered the mass mortality in *Pinna nobilis*. *Life* 10:238.
- Šarić, T.; Župan, I.; Aceto, S.; Villari, G.; Palić, D.; De Vico, G.; Carella, F. Epidemiology of noble pen shell (*Pinna nobilis* L. 1758) mass mortality events in adriatic sea is characterised with rapid spreading and acute disease progression. *Pathogens* 2020, 9, 776.
- Špičić S, Duvnjak S, Papić B, Reil I, Zrnčić S, Mihaljević Ž, Naletilić Š, Zupčić IG, Kompes G, Habrun B, Mareković I and Zdelar-Tuk M (2023) Description of *Mycobacterium pinniadriaticum* sp. nov., isolated from a noble pen shell (*Pinna nobilis*) population in Croatia. *Front. Microbiol.* 14:1289182.
- Vázquez-Luis M, Álvarez E, Barrajon A, García-March JR, Grau A, Hendriks IE, Jiménez S, Kersting D, Moreno D, Pérez M, Ruiz JM, Sánchez J, Villalba A and Deudero S (2017) S.O.S. *Pinna nobilis*: A Mass Mortality Event in Western Mediterranean Sea. *Front. Mar. Sci.* 4:220.
- Vázquez-Luis, M. , Nebot-Colomer, E. , Deudero, S. , Planes, S. , & Boissin, E. (2021). Natural hybridization between pen shell species: *Pinna rudis* and the critically endangered *Pinna nobilis* may explain parasite resistance in *P. Nobilis* . *Molecular Biology Reports*, 48,

9. Životopis

Lovro Čeliković rođen je 1.8.2002 u Splitu. Pohađao je Osnovnu školu Vladimira Nazora u Rešetarima nakon čega stječe srednješkolno obrazovanje u općoj gimnaziji Gimnazija Nova Gradiška u Novoj Gradiški. Godine 2021. upisuje prijediplomski studij Biologija na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija aktivno je sudjelovao u radu Udruge studenata biologije BIUS.