

Histomorfometrija i histopatologija kamenog koralja *Cladocora caespitosa* u Jadranskom moru

Krcivoj, Sanja

Master's thesis / Diplomski 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:217:017156>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-01**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Sanja Krcivoj

**Histomorfometrija i histopatologija kamenog
koralja *Cladocora caespitosa* u Jadranskom
moru**

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Sanja Krcivoj

**Histomorphometry and histopathology of the
stone coral *Cladocora caespitosa* in the
Adriatic sea**

Master thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj rad je izrađen u Zoologijskom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Romana Gračan, te komentorstvom Pavela Ankona, mag. oecol. et prot. nat. Istraživanje je provedeno u sklopu projekta ADRICOR (IP-2019-04-3389) „Utjecaj klimatskih promjena na bioraznolikost koralja - istraživanje slučaja masovnih ugibanja u Jadranskom moru“. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

ZAHVALE I POSVETE

Želim izraziti duboku zahvalnost svojoj mentorici prof. Romani Gračan na nesebičnoj pomoći, strpljenju i stručnim savjetima tijekom pisanja ovog diplomskog rada. Vaše vodstvo i podrška bili su neizmjerni, a vaša motivacija i uvid omogućili su mi da unaprijedim svoje znanje i vještine te završim ovaj rad. Hvala vam što ste uvijek bili dostupni za savjete, poticali kritičko razmišljanje i pružali vrijedne povratne informacije.

Također, iskrene zahvale idu i komentoru Pavelu Ankonu i asistentu Silvestru Beljanu bez kojih ne bih uspjela napraviti istraživački dio rada. Hvala vam na ugodnoj i toploj atmosferi u kojoj je bilo užitak raditi.

Posebnu zahvalnost dugujem svojim roditeljima Andreji i Damiru te bratu Ivanu na bezuvjetnoj ljubavi, podršci i razumijevanju tijekom cijelog mog studiranja. Vaša vjera u mene i stalna potpora, bilo kroz savjete, motivaciju ili jednostavno prisutnost, bili su neprocjenjivi. Hvala vam što ste uvijek bili uz mene, u svim izazovima i trenucima sumnje, te što ste mi omogućili priliku za obrazovanje koje je temelj za moj daljnji napredak.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Histomorfometrija i histopatologija kamenog koralja *Cladocora caespitosa* u Jadranskom moru

Sanja Krcivoj

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Povišena temperatura mora uzrokovana klimatskim promjenama dovodi do oštećenja, nekroze, izbjeljivanja i sve češćeg odumiranja organizama kao što su koralji. Cilj ovog istraživanja bio je opisati histološko stanje zdravih, nekrotičnih i izbjeljenih polipa busenastog kamenog koralja, *Cladocora caespitosa*, te utvrditi postoje li razlike u građi tkiva i histopatološke promjene s obzirom na dvije istraživane lokacije (NP Mljet i Piranski zaljev) u Jadranskom moru. Uzorci tkiva su uklopljeni u paraplastne blokove, rezani na mikrotomu te obojeni hematoksilin-eozin metodom i metodom bojenja po Gramu. Uzorci bazalne i površinske stijenke tijela su pregledani pod svjetlosnim mikroskopom, te morfometrijski analizirani. Opisana je uredna/zdrava struktura tkiva kod zdravih polipa, te histopatološka oštećenja utvrđena kod nekrotičnih i izbjeljenih polipa. Mikroskopskom analizom histoloških preparata između dvije istraživane lokacije nisu utvrđene razlike u strukturi tkiva zdravih jedinki, niti u tipu utvrđenih lezija u nekrotičnim i izbjeljenim polipima, dok su histomorfometrijske usporedbe pokazale da postoje razlike u debljini epiderme i mezogleje unutar istih zdravstvenih stanja između dvije lokacije. S obzirom da ova vrsta izgrađuje koraljne grebene o kojem ovisi veliki broj vrsta, a podložna je utjecaju klimatskih promjena, ovakva istraživanja pridonose planiranju njene zaštite, ali i očuvanju morskih sustava u Sredozemnom moru.

Ključne riječi: izbjeljivanje, nekroza, simbiotski dinoflagelati, koraljni grebeni
(41 stranica, 19 slika, 8 tablica, 44 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Romana Gračan
Komentor: mag. oecol. et prot. nat. Pavel Ankon

Ocjenitelji:
izv. prof. dr.sc. Romana Gračan
dr. sc. Damir Sirovina, viši predavač
izv. prof. dr. sc. Nenad Judaš
Zamjena: prof. dr.sc. Mirta Rubčić

Rad prihvaćen: 7. studenog 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Histomorphometry and histopathology of the stone coral *Cladocora caespitosa* in the Adriatic sea

Sanja Krcivoj

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Increased sea temperature caused by climate change leads to damage, necrosis, bleaching and increased mortality of organisms such as corals. The aim of research was to describe histological condition of healthy, necrotic and bleached polyps of stone coral *Cladocora caespitosa* and to explore possible differences in histological structures and histopathology between the two investigated locations in the Adriatic Sea (NP Mljet and Piran Bay). Tissues were embedded in paraplast blocks, cut on a microtome and stained with the hematoxylin-eosin and the Gram staining method. Slides from the basal and surface body wall were examined under a light microscope and morphometrically analysed. Histological architecture of healthy, necrotic and bleached polyps was described. There was no difference in histological structures of healthy individuals, nor in the type of lesions recorded in necrotic and bleached polyps between two locations. However, histomorphometric comparison showed that there are differences in the thickness of the epidermis and mesoglea within the same health condition between the two locations. Since the species is a reef building coral who shapes the habitat for numerous reef-associated organisms, and susceptible to climate change, this research contributes to its protection, but also to the conservation of marine ecosystems in the Mediterranean Sea.

Keywords: bleach, necrosis, symbiotic dinoflagellates, coral reefs
(41 pages, 19 figures, 8 tables, 44 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Assoc. Prof. Romana Gračan, PhD
Co-mentor: Pavel Ankon, mag. oecol. et prot. nat

Reviewers:

Assoc. Prof. Romana Gračan, PhD
Senior lecturer Damir Sirovina, PhD
Assoc. Prof. Nenad Judaš, PhD

Substitute: prof. Mirta Rubčić, PhD

Thesis accepted: November 7, 2024.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1 Osnovne karakteristike koralja.....	1
1.2 Stanište i vanjski izgled busenastog kamenog koralja <i>Cladocora caespitosa</i>	1
1.3 Unutarnja građa busenastog kamenog koralja	2
1.4 Biološke karakteristike vrste	5
1.5 Mutualistički odnos s dinoflagelatima	6
1.6 Utjecaj klimatskih promjena na koralje	7
1.6.1 Jadransko more i rasprostranjenost vrste <i>Cladocora caespitosa</i> u Jadranu	8
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	10
3. MATERIJALI I METODE	11
3.1 Prikupljanje uzoraka	11
3.2 Histološke i histokemijske metode	12
3.2.1 Priprema histoloških preparata	12
3.2.2 Bojenje histoloških preparata.....	14
3.3 Kvantitivna histomorfometrijska i statistička obrada podataka	16
4. REZULTATI	19
4.1 Histološka građa zdravih, nekrotičnih i izbijenjenih polipa.....	22
4.2 Histomorfometrijske mjere mezogleje, epiderme i simbiotskih dinoflagelata	25
4.3 Opis i usporedba polipa između dvije istraživane lokacije	27
5. RASPRAVA	32
6. ZAKLJUČAK	36
7. LITERATURA	37
8. ŽIVOTOPIS	

1. UVOD

1.1 Osnovne karakteristike koralja

Koralji (lat. Anthozoa) su najbrojniji razred u koljenu žarnjaka (lat. Cnidaria), imaju samo polipoidnu generaciju (bez generacije meduza), nemaju izgrađene organske sustave i nastanjuju samo morska staništa. Mogu živjeti pojedinačno ili u zadrugama. Koralji su radijalno simetrični te im je takav i raspored unutarnjih struktura. Možemo ih podijeliti u dva reda: Hexacorallia i Octocorallia. Hexacorallia je red koralja koji imaju broj septi, mezentera i lovki jednak ili višekratnik broja 6, dok u red Octocorallia spadaju koralji čiji je broj mezentera, septi i lovki jednak broju 8. Red Scleractinia (hrv. kameni koralji), koji spadaju u razred Hexacorallia, obuhvaća oko 3600 vrsta koralja koji mogu biti solitarni ili zadržni, a glavna im je zajednička značajka vapnenački egzoskelet. Neki od raširenih solitarnih kamenih koralja koje možemo naći u Jadranskom moru su vrste *Leptopsammia pruvoti* Lacaze-Duthiers, 1897, *Caryophyllia (Caryophyllia) inornata* (Duncan, 1878) i *Balanophyllia (Balanophyllia) europaea* (Risso, 1827), a zadržni *Cladocora caespitosa* (Linnaeus, 1767) (Habdija i sur. 2011).

1.2 Stanište i vanjski izgled busenastog kamenog koralja *Cladocora caespitosa*

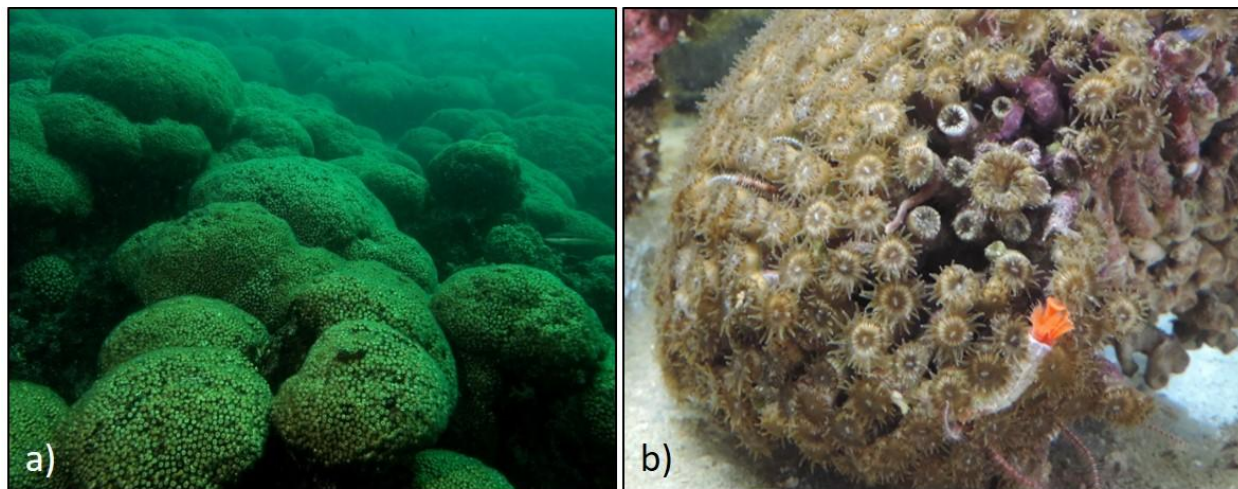
Cladocora caespitosa (Slika 1.) je busenasti kameni koralj, endemska vrsta u Sredozemnom moru, te je najrasprostranjeniji zadržni kameni koralj u Jadranskom moru (Kružić 2005).

Nastanjuje staništa različitih karakteristika: pomičnog i čvrstog dna, raspona dubine od 5 do 40 metara, u mirnim područjima kao i područjima s izraženim morskim strujama (Kružić i Benković 2008). Također može živjeti na područjima gdje nema strujanja okolne vode kao i na mjestima gdje je strujanje vode jako izraženo (Kružić 2005). U slučaju prevelike sedimentacije ova vrsta koralja može očistiti usnu ploču što im omogućava život na mekoj podlozi (Kružić 2005).

Vrsta može graditi velike kolonijalne grebene ili manje kolonije (Casado de Amezua i sur. 2015). Najveći greben kamenog koralja *C. caespitosa* u Sredozemnom moru se nalazi u Velikom jezeru na otoku Mljetu (Slika 1a.; Kružić i Požar-Domac 2003). Busen kamenog koralja je sastavljen od manjeg ili većeg broja međusobno odvojenih polipa (Slika 1b; Rodolfo-Metalpa i sur. 2005).

Polip ima cjevasto tijelo na čijem vrhu nalazimo usta. Oko usta se nalaze lovke kojima organizam hvata plijen (Kružić i Benković 2008).

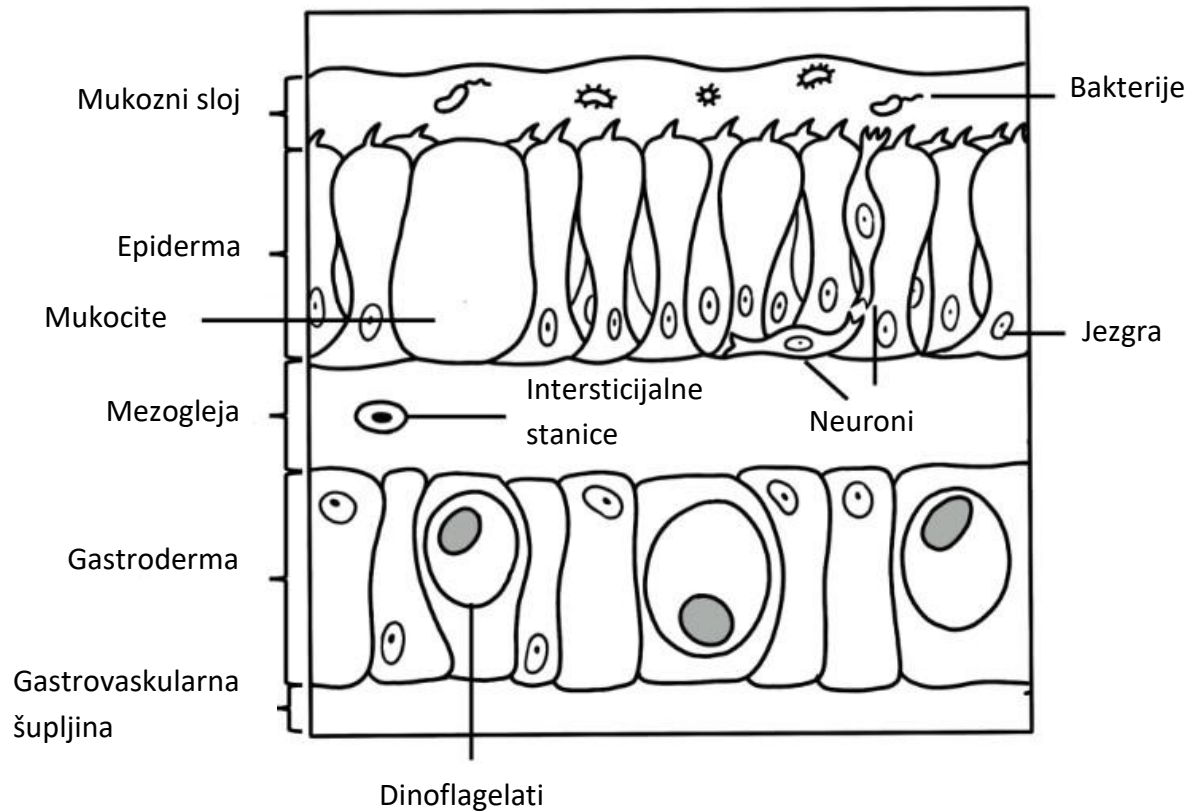
Zbog simbiotskih dinoflagelata iz roda *Symbiodinium* polipi su svijetlo zelene do smeđe boje, a ako simbionti nisu prisutni, onda je boja lovki i polipa prozirna.



Slika 1. Koraljni greben (a) busenastog kamenog koralja *Cladocora caespitosa* u NP Mljet (foto: P. Kružić) i (b) pojedinačna kuglasta kolonija s vidljivim polipima (foto: P. Ankon)

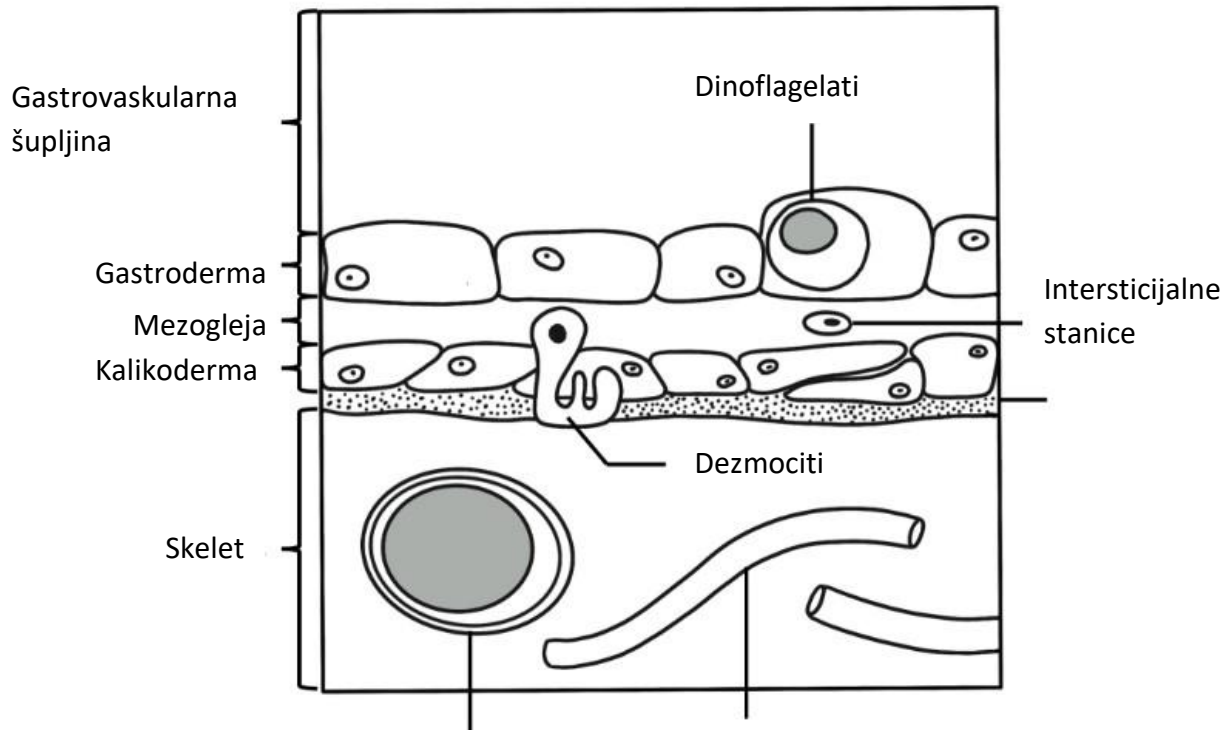
1.3 Unutarnja građa busenastog kamenog koralja

Koralji su diploblastični organizmi karakteristične tkivne organizacije s dva epitelnog monosloja (epiderme i gastroderme) između kojih se nalazi mezogleja kao homogeni vezivni sloj. Epiderma ektodermalnog podrijetla je jednoslojna, te je sastavljena od epitelnomišićnih, žarnih i intersticijalnih stanica. Mezogleja je želatinasta struktura koja se većinski sastoji od vode, ali sadrži i druge tvari kao što su proteini poput kolagena i heparina. Ona služi kao unutarnji kostur koji podupire tijelo koralja. Od stanica, u mezogleji dolaze fibroblasti koji proizvode kolagen i osnovnu tvar te amebociti koji imaju ulogu u imunom sustavu. Gastroderma endodermalnog podrijetla obuhvaća gastrovaskularnu šupljinu obloženu gastrodermalnomišićnim stanicama koje sudjeluju u prehrani koralja. Površinska stijenka tijela (Slika 2.) tvori vanjsku barijeru organizma i zadužena je za proizvodnju zaštitnog mukoznog sloja koji se nalazi na površini kolonija.



Slika 2. Prikaz površinske stijenke tijela koralja (Preuzeto i prilagođeno iz: Coral Disease & Health Consortium 2023).

Bazalna stijenka tijela (Slika 3.) ima sličnu građu kao i površinska stijenka tijela (mezogleja i gastroderm su histološki i funkcionalno isti), jedino što je djelomično izmijenjeno je vanjski epitel, umjesto epiderme, ovdje se naziva kalikoderma i zadužen je za formiranje skeleta koralja. U kalikodermi se nalaze i dezmociti, stanice koje se pružaju do mezogleje i svojim vlaknima učvršćuju polip za skelet (Coral Disease & Health Consortium 2023).



Slika 3. Prikaz bazalne stijenke tijela koralja (Preuzeto i prilagođeno od: Coral Disease & Health Consortium 2023).

Gastrovaskularna šupljina je pregradama (septama) uzdužno podijeljena u odjeljke (gastralne džepove). Pregrade izgrađuju gastrodermalne duplikature između čega se nalazi tanki sloj mezogleje. Pregrade mogu biti potpune i nepotpune. Potpune pregrade su sraštene sa ždrijelom, a kod nepotpunih unutarnji rubovi su slobodni u gastrovaskularnoj šupljini. Mogu postojati do tri reda pregrada gdje one starije dobivaju manji broj, što znači da su pregrade prvog reda starije od onih drugog reda, a pregrade drugog reda starije od onih trećeg reda (Kružić 2005).

Vanjski skelet koralja je izgrađen od vapnenca u kristalnoj modifikaciji aragonita te ga luči epiderma (kalikoderma). Skelet svakog pojedinačnog polipa zove se koralit. On je izgrađen od cilindrične tvorbe teke koju izlučuje epiderma podnožne ploče, od zrakasto raspoređenih septa koje nazivamo kostama te od stožaste kolumele koju izlučuje epiderma, a nalazi se u središtu

osnovne ploče. Polip koji se nalazi u središtu složene kamene čaške konstantno izbacuje poprečne vapnenačke ploče tabule koje slojevito dijele gastrovaskularnu šupljinu (Habdija i sur. 2011).

Rast skeleta kod vrste *Cladocora caespitosa* sastoji se od toga da se produljuje zid čaške te da se unutarnji elementi skeleta spajaju. Zbog takvog načina rasta je omogućen dugi životni vijek polipa kao i neograničen rast samog skeleta. Ova vrsta pripada hermatipičnim vrstama koralja jer gradi koraljne grebene i zato što živi u simbiotskom odnosu sa dinoflagelatima (Barnes i Lough 1993).

1.4 Biološke karakteristike vrste

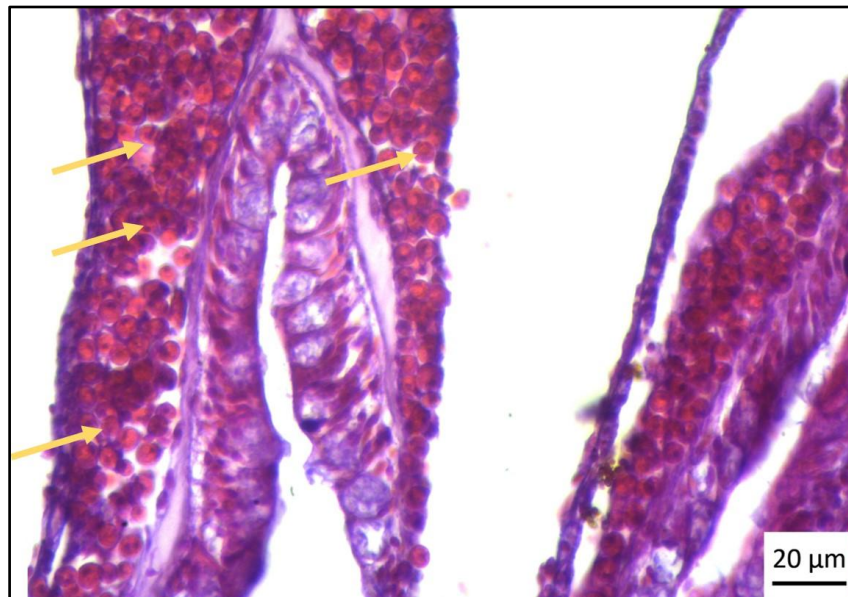
Koralji se razmnožavaju spolno ili nesporno pupanjem. Kod pupanja novi polipi čim nastanu počinju rasti usporedno s matičnim čaškama. Kod spolnog razmnožavanja je vanjska oplodnja. Muške i ženske gamete nastaju na mezenterama unutar istog polipa. Zbog toga govorimo o hermafroditnim polipima. Kod vrste *C. caespitosa* izbacivanje gameta se odvija samo ljeti (Kružić i sur. 2007). Zrele gamete u okolno more dospijevaju iz gastrovaskularne šupljine kroz usta. Iz oplođenog jajeta se razvija trepetljikava ličinka planula. Ona jedno vrijeme pliva, a zatim se pričvrsti za dno i razvija se u pojedinačni ili združni koralj (Habdija i sur. 2011).

Vrsta *C. caespitosa* se može hraniti i autotrofno i heterotrofno (Kružić 2005). Koralji svoju žrtvu uhvate lovkama, omame ju žarnicama te ju zatim progutaju. Probava se odvija u gastrovaskularnoj šupljini. Kod združnih koralja se usitnjene čestice hrane prenose do svih polipa u zdruzi. Neprobavljene ostatke koralj izbacuje kroz usta. Kod mnogih koralja simbiotski dinoflagelati omogućavaju autotrofnu prehranu (Habdija i sur. 2011).

Ovaj kameni koralj je spororastuća, dugoživuća vrsta s iznimno usporenim životnim ciklusom i smanjenom sposobnosti za oporavak. Smatra se da je vrijeme generacije oko 30 godina., a iako životni vijek nije poznat, smatra se da može živjeti duže od 100 godina (Casado de Amezua i sur. 2015). *Cladocora caespitosa* se nalazi na IUCN-ovom Crvenom popisu ugroženih vrsta u kategoriji „ugroženih“ (EN, eng. *Endangered*; Kersting i sur. 2022).

1.5 Mutualistički odnos s dinoflagelatima

Koralj *Cladocora caespitosa* kao i mnogi drugi koralji živi u mutualističkom odnosu s jednostaničnim fotosintetskim protistima iz skupine dinoflagelata (Slika 4.). Simbiotski dinoflagelati procesom fotosinteze stvaraju kisik i hranu koji su potrebni koralju, a zauzvrat koralj simbiotskim dinoflagelatima pruža fizičku zaštitu i ugljikov dioksid potreban za fotosintezu (Habdija i sur. 2011).



Slika 4. Prikaz zdravih simbiotskih dinoflagelata unutar gastrodermalnog sloja busenastog kamenog koralja *Cladocora caespitosa* (foto: R.Gračan). Žute strelice označavaju pojedinačne simbiote HE, skala: 20 mikrona

Vrsta dinoflagelata koja je najčešće u simbiotskom odnosu s koraljima pa tako i s vrstom *C. caespitosa* je *Symbiodinium microadriaticum*. Postoje dva načina na koja simbiotski dinoflagelati mogu ući u gastroderm koralja: da se spoje s ličinkom planulom u gastrovaskularnoj šupljini ili fagocitozom preko gastrovaskularne šupljine iz okolnog mora (Kružić 2005). Od 1 do 8 milijuna stanica simbiotskih dinoflagelata može sadržavati jedan kvadratni centimetar polipa koralja (Rowan i Powers 1991). Utvrđeno je da kod tropskih koralja većina energije potrebne za metabolizam dolazi od simbiotskih dinoflagelata. Ostali načini kako koralj dobiva energiju su preko heterotrofne prehrane i uzimanjem otopljenih organskih tvari iz

vode (Muscatine 1990). Koralj svaki dan mijenja populaciju simbiotskih dinoflagelata, a višak izbacuje van u okolno more (Baker i Rowan 1997). Koralji u stresnim uvjetima (poput povišene temperature mora) izbacuju veliki broj simbiotskih dinoflagelata iz tkiva. Ako takvi uvjeti traju dulje vrijeme to može dovesti do smrti koralja (Kružić 2005). Ako nepovoljni uvjeti traju kraći vremenski period onda koralj preživi i ponovno se vraća u ravnotežu kao i prije izlaganja stresnim uvjetima (Rodolfo-Metalpa i sur. 2006).

1.6 Utjecaj klimatskih promjena na koralje

Koralji koji nastanjuju umjerena mora su puno podložniji promjenama temperature nego koralji u tropskim morima. Vrsta *Cladocora caespitosa* može preživjeti unutar temperaturnog raspona 10-28°C (Kružić 2005). Ako je temperatura veća ili dođe do promjene saliniteta to može poremetiti odnos između koralja i simbiotskih dinoflagelata. Takvi uvjeti su stresni za koralje (Lesser 2006). U tom slučaju koralj gubi dinoflagelate što dovodi do pojave zvane izbjeljivanje koralja (eng. "bleaching"). Ako stresni uvjeti traju dulje vrijeme to dovodi do smrti koralja (Kersting i sur. 2022). Kod koralja osim izbjeljivanja, pod utjecajem povišenih temperatura može doći i do prekomjernog razvoja dinoflagelata. S obzirom na to da je ova vrsta koralja dugoživuća, sa sporim životnim ciklusom i niskom stopom razmnožavanja, povećanje smrtnosti uzrokovano klimatskim promjenama može teško oštetiti kolonije i onemogućiti njihov oporavak (Kersting i sur. 2022). Populacije zahvaćene valovima ekstremno visokih temperatura pokazuju smanjenje biomase grebena i jako spori oporavak, a nastavak ovakvih uvjeta se očekuje s obzirom na klimatske trendove. Promjene na tkivu koralja možemo podijeliti u dvije kategorije. To su: vanjske makroskopske lezije i mikroskopske lezije. Grube vanjske lezije možemo vidjeti golim okom i one uključuju gubitak tkiva (najčešće uzrokovano od strane drugih životinja ili ljudi), promjenu boje polipa (uključuje izbjeljivanje koralja ili pojavu boje koja nije karakteristična za tu vrstu) i anomalije u rastu koralja. Mikroskopske lezije su vidljive pod mikroskopom i one uključuju bubrenje stanica, različite vrste nekroze, hiperplaziju i mnoge druge promjene (Hawthorn i sur. 2023). Dosadašnja istraživanja pokazuju da se pod utjecajem temperaturnog stresa u tkivu mogu detektirati histopatološke lezije poput promjena u strukturi

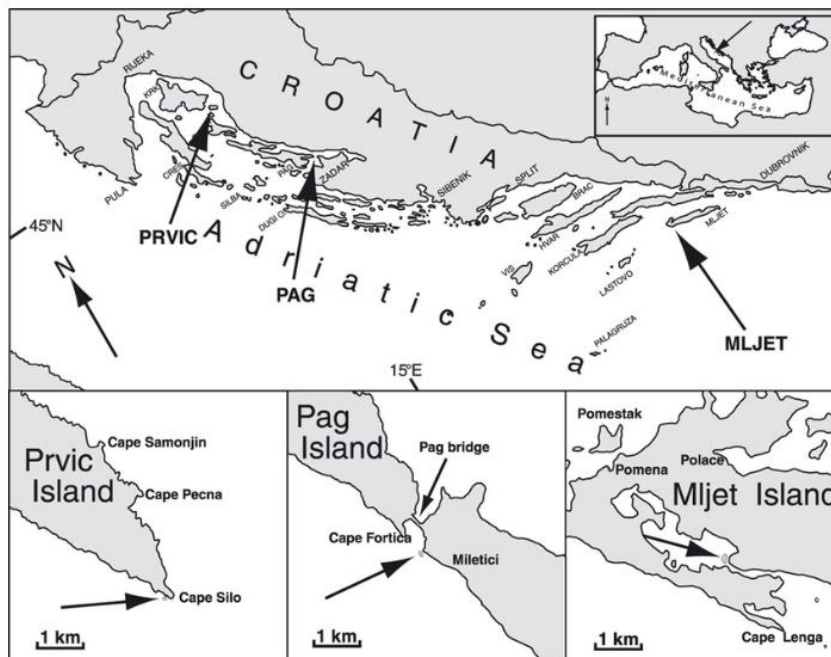
pojedinih slojeva i količini mukoznog sekreta, nekroze u epidermi i gastrodermi te promjene u obliku i gustoći simbiotskih dinoflagelata u gastrodermu (Traylor-Knowles 2019).

1.6.1 Jadransko more i rasprostranjenost vrste *Cladocora caespitosa* u Jadranu

Jadransko more je kao i Sredozemno poluzatvoreni, plitki bazen. Srednja dubina Jadranskog mora iznosi 251 m, dok su najveće dubine u Jadranu zabilježene na području Jabučke kotline (273 m) i Južnojadranske kotline (1330 m). Najveću površinu dna Jadranskog mora pokrivaju muljeviti i pjeskoviti sediment. Slanost mora se smanjuje od sjevera prema jugu i od otvorenog mora prema obali. U najdubljim dijelovima temperatura je između 11 i 12 °C. Jadransko more možemo podijeliti u tri područja: sjeverni Jadran, srednji Jadran i južni Jadran (Jardas 1996).

Kada govorimo o Jadranskom moru važno je spomenuti litoralnu zonu koju još možemo nazvati i priobalno područje koje se dijeli na tri pod zone. To su: supralitoralna zona, eulitoralna zona i sublitoralna zona. U supralitoralnoj i eulitoralnoj zoni organizmi nisu cijelo vrijeme pod morskom vodom te zbog toga mogu doći u doticaj sa slatkom vodom (kiša) što nije pogodno za koralje. Za razliku od njih sublitoralna zona je mjesto razvoja koralja zato što je tijekom cijele godine prekrivena morskom vodom i zbog toga što sunčeva svjetlost dopire do morskog dna (Encyclopaedia Britannica 2019). Za preživljavanje koralja je jako važna sunčeva svjetlost jer nju koriste simbiotski dinoflagelati u fotosintezi za stvaranje hranjivih tvari. Iz tog razloga su kolonije koralja u Jadranskom moru nađene u blizini otoka gdje imaju pristup sunčevoj svjetlosti, gdje je raspon temperature mora pogodan za njihov rast i gdje nisu toliko izraženi morskim strujama (Kružić i Benković 2008). Problem života koralja u litoralnoj zoni je jaka podložnost klimatskim promjenama, ljudskim aktivnostima i zagađenju što može negativno utjecati na opstanak koralja (Wild i sur. 2011).

Vrsta *Cladocora caespitosa* je dio litoralne zone te je rasprostranjena po različitim lokacijama duž obale Jadranskog mora. Kolonije ove vrste nađene su kod Rovinja, u blizini otoka Prvića, u blizini Paklenih otoka (Kružić 2001), u blizini otoka Paga (Kružić i Benković 2008) i u Velikom jezeru na otoku Mljetu (Kružić i Požar-Domac 2003) (Slika 5.).



Slika 5. Prikaz mjesta u Jadranskom moru gdje su pronađene kolonije vrste *Cladocora caespitosa* (Izvor: Kružić i Benković 2008)

Istraživanje je pokazalo da su temperature mora veće na jugu, nego što su u sjevernom i srednjem dijelu Jadranskog mora (Kružić i sur. 2012). Drugo istraživanje pokazuje da na svaki lokalitet u Jadranskom moru klimatske promjene drugačije utječu odnosno njihov intenzitet je drugačiji (Bonacci i sur. 2021). Ovakav primjer nam pokazuje da treba raditi još istraživanja u Jadranskom moru kako bi u potpunosti razumjeli trendovi klimatskih promjena. Promjene koje će se događati u Jadranskom moru su: povećana evaporacija (Vilibić i sur. 2013), promjene u dostupnosti nutrijenata, promjene u biološkoj produkciji (Waller i sur. 2018), promjene u cirkulaciji vodenih masa i mnoge druge (Mihanović i sur. 2021). Zbog sve izraženijeg globalnog zagrijavanja mijenja se morski ekosustav Jadranskog mora. Kako bi zaštitili morski ekosustav Jadranskog mora potrebno je kontinuirano promatrati kako bi se na vrijeme mogle uočavati promjene u ekosustavu i donijele prave odluke za spas morskog ekosustava (Vilibić i sur. 2013).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

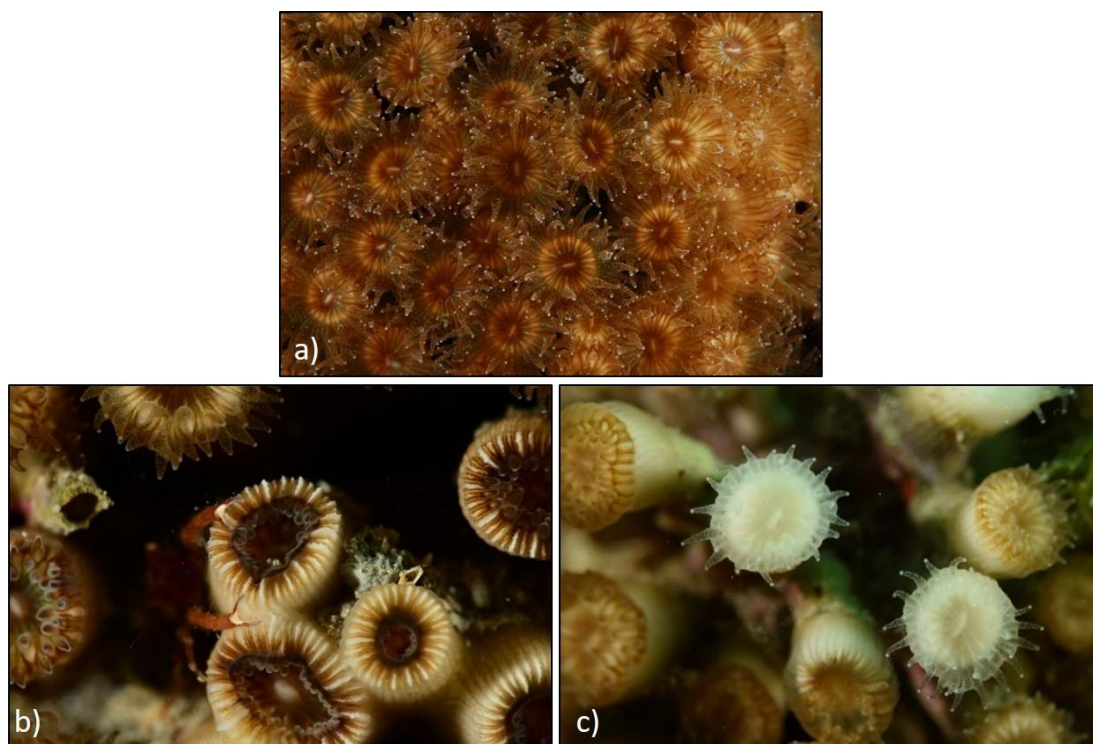
Vrsta *Cladocora caespitosa* je busenasti kameni koralj koji je spororastuća, dugoživuća vrsta s iznimno usporenim životnim ciklusom i smanjenom sposobnosti za oporavak nakon izloženosti stresnim okolišnim uvjetima. Ugrožavaju je eutrofikacija, širenja invazivnih vrsta i povišene temperature mora koje dovode do oštećenja, nekroza, izbjeljivanja i sve češćeg odumiranja većeg broja polipa. Zbog svih tih razloga je jako bitno utvrditi i opisati stanje zdravih jedinki i onih koje su zahvaćene određenim oštećenjem. Stoga su ciljevi ovog istraživanja:

1. Ocijeniti zdravstveno stanje tkiva busenastog kamenog koralja kvalitativnom i kvantitativnom procjenom histopatoloških pokazatelja na 2 odabrane lokacije u Jadranskom moru: Piranski zaljev (Slovenija) i NP Mljet (Hrvatska).
2. Opisati histološko stanje koralja kojima su utvrđene površinske nekroze i koji su u procesu izbjeljivanja.
3. Ustanoviti postoji li razlika u zastupljenosti histopatoloških promjena s obzirom na dvije istraživane lokacije.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Prikupljanje uzoraka

Uzorci tkiva koralja *Cladocora caespitosa* su prikupljeni u okviru HRZZ projekta ADRICOR „Utjecaj klimatskih promjena na bioraznolikost koralja - istraživanje slučaja masovnih ugibanja u Jadranskom moru, za koje je dobivena dozvola Ministarstva zaštite okoliša i energetike (KLASA: UP/I-612-07/16-48/103, URBROJ: 517-07-1-1-1-16-4). Uzorke koralja su metodom autonomnog ronjenja prikupili voditelj projekta prof. dr. sc. Petar Kružić i komentor ovog diplomskog rada Pavel Ankon. U ovom radu koristila sam se uzorcima vrste *C. caespitosa* koji su uzorkovani tijekom 2021. i 2022. godine na dvije lokacije u Jadranskom moru: Piranski zaljev (Slovenija) i Veliko Jezero u NP Mljet (Hrvatska). Nakon vizualnog pregleda stanja kolonija, s izabranih lokacija su uzorkovani segmenti kolonija koji su bili morfološki zdravi (kontrola) te oni koji su pokazivali nekrozu tkiva ili izbijeljene polipe (Slika 6.).



Slika 6. Prikaz morfološki (a) zdravih polipa, (b) polipa koji su pokazivali vanjsku nekrozu tkiva i (c) izbijeljenih polipa busenastog kamenog koralja *Cladocora caespitosa* u Jadranskom moru (Foto: P. Kružić)

3.2 Histološke i histokemijske metode

3.2.1 Priprema histoloških preparata

Prikupljeni uzorci su fiksirani u Z-Fixu (cink formalin, razrijeđen morskom vodom u omjeru 1:4) te pohranjeni u 70 %-tnom etanolu. Fragmente koralja sam stavila u otopinu RDO Rapid Decalcifier (Apex Engineering Products Corporation, SAD) na 24 sata na dekalifikaciju. Tkiva kamenog koralja sam dehidrirala tako što sam uzorke postepeno prebacivala iz alkohola histanola s manjim postotkom sve do 100 % alkohola etanola (Histanol 70, 80 i 96, Biognost; Ethanol absolute anhydrous, Carlo Erba reagents) i na kraju sam tkivo stavila u kloroform (Carlo Erba reagents) (Tablica 1.).

Tablica 1. Protokol dehidracije polipa kamenih busenastih koralja.

Kemikalije	Trajanje (sati)
1. 70 %-tni alkohol 1	1
2. 70 %-tni alkohol 2	1
3. 80 %-tni alkohol 1	1
4. 96 %-tni alkohol 1	1
5. 100 %-tni alkohol 1	1
6. 100 %-tni alkohol 2	1
7. kloroform	24

Nakon što su uzorci bili u kloroformu 24 sata, sljedeći je korak uklapanje tkiva u paraplastne blokove (Biowax Plus 56/58, Biognost). Cijeli proces uklapanja sam provela u termostatu (Shel Lab) na 60 °C. Smjese potrebne za uklop uzoraka sam mijenjala (Tablica 2.) provodeći dekantiranje prijašnje smjese i dolijevajući sljedeću smjesu u nizu u staklenim posudicama koje sadrže uzorke.

Tablica 2. Protokol za uklapanje tkiva u blokove paraplasta.

Smjese	Trajanje (min)
1. kloroform : paraplast (1:1)	60
2. Paraplast 1	60
3. Paraplast 2	60
4. Čisti paraplast	Ulijeva se u lađice i stavlja na sobnu temperaturu do stvrdnjavanja

U paraplastu sam uzorke orijentirala tako da kasnijim rezanjem blokova dobijem poprečni i uzdužni presjek organizama. Kako bi dobila blokove paraplasta s uzorcima, za kalup sam koristila lađice od papira. Za svaki uzorak koralja sam pripremila po 3 paraplastna bloka. Svaki paraplastni blok se sastoji od 3 do 4 polipa. Rezanjem uzoraka tkiva rotacijskim mikrotomom (Shadon Finesse 325, Thermo Fisher Scientific, Slika 7a) dobila sam histološke prereze debljine 10 mikrona. Narezani prerezi su se ravnali nekoliko minuta u vodenoj kupelji (GFL 1052, Slika 7b) na 40 °C prije stavljanja na predmetna stakalca (VitroGnost, Biognost) na koje sam prije toga nanijela tanak sloj smjese glicerina i bjelanjka kako bi služilo kao adhezivno sredstvo. Prerezi su se na predmetnom stakalcu sušili dva dana na sobnoj temperaturi na drvenom stalku u uspravnom položaju (Slika 7c.). Od svakog paraplastnog bloka s uzorkom sam napravila 5 predmetnih stakalaca s po 3 prereza.



Slika 7. Rezanje uzoraka (a) kamenog koralja *Cladocora caespitosa* pomoću mikrotoma kako bi dobili histološke prereze debljine 10 mikrometara, (b) uzorci na predmetnim stakalcima nakon ravnjanja u vodenoj kupelji, (c i d) narezani preparati na predmetnim stakalce ostavljeni da se suše na sobnoj temperaturi dva dana.

3.2.2 Bojenje histoloških preparata

Uzorke sam prije bojenja, provela kroz postupak uklanjanja paraplasta. Postupak sam provela tako da sam deparafinirala uzorke u ksilenu (BioClear, Biognost) i rehidrirala ih provođenjem uzoraka kroz padajuće koncentracije alkohola histanola (Histanol 95 i 100, Biognost) i vode prema protokolu za deparafiniranje i rehidraciju uzoraka prije bojanja iz Tablice 3.

Tablica 3. Protokol za deparaplastiranje i rehidraciju uzoraka tkiva polipa hematoksilin-eozin metodom.

Kemikalije	Trajanje(min)
1. Ksilen 1	2
2. Ksilen 2	2
3. Ksilen 3	2
4. 100 %-tni alkohol 1	5
5. 100 %-tni alkohol 2	3
6. 95 %-tni alkohol 1	2
7. Destilirana voda	2

Dva seta uzoraka tkivnih prereza sam bojala mješavinom hematoksilina (bazična boja) i eozina (kisela boja) (Slika 8.) prema BioGnostovom protokolu (2021) (Tablica 4.). Uzorke sam prvo uronila u Hematoksilin H boju (Biognost), a zatim pod mlazom tekuće vode. Nakon toga sam uronila u destiliranu vodu te u 95 %-tni alkohol. Zatim sam uzorke uronila u kontrastnu otopinu 0,5 %-tnog Eozina Y (Biognost) te sam uzorke isprala pod mlazom tekuće vode.

Tablica 4. Protokol za bojanje uzoraka tkiva polipa hematoksilin-eozin metodom.

Kemikalije	Trajanje
1. Hematoksilin	3 minute
2. Mlaz tekuće vode	3 minute
3. Destilirana voda	5 sekundi
4. 95 %-tni alkohol	30 sekundi
5. Eozin	1 minuta i 30 sekundi
6. Mlaz tekuće vode	2 minute



Slika 8. Histološki prerezi polipa busenastog kamenog koralja nakon bojanja hematoksilin-eozin metodom.

Dva seta uzoraka tkivnih prereza sam bojala s četiri reagensa za identifikaciju bakterija prema Gramu (Slika 9.) prema BioGnostovom protokolu (2019) (Tablica 5.).

Tablica 5. Protokol za bojanje uzoraka polipa busenastog kamenog koralja metodom bojenja po Gramu.

Kemikalije	Trajanje
1. Nakapati Gram Crystal Violet 1% otopinu	1 minuta
2. Nakapati stabiliziranu Gram Lugolovu otopinu	1 minuta
3. Isprati preparat destiliranom vodom	5 sekundi
4. Nakapati Gram Dekolorizator otopinu 2	10-15 sekundi
5. Isprati preparat destiliranom vodom	5 sekundi
6. Nakapati Gram Safranin otopinu	1 minuta
7. Isprati preparat destiliranom vodom	5 sekundi



Slika 9. Histološki prerezi nakon bojanja po Gramu.

Sve setove sam nakon bojenja dehidrirala u rastućim koncentracijama alkohola (Histanol 95 i 100, Biognost) i prosvijetlila u ksilenu (Bioclear, Biognost) prema protokolu za dehidraciju iz Tablice 6. Kako bih preparate mogla gledati pod svjetlosnim mikroskopom izradila sam trajne preparate na način da sam nakapavala kanadski balzam (BioMount C, Biognost) na obojani tkivni preparat i na njega stavila pokrovno stakalce (Biognost).

Tablica 6. Protokol za dehidraciju uzoraka u rastućim koncentracijama alkohola i čišćenje u ksilenu

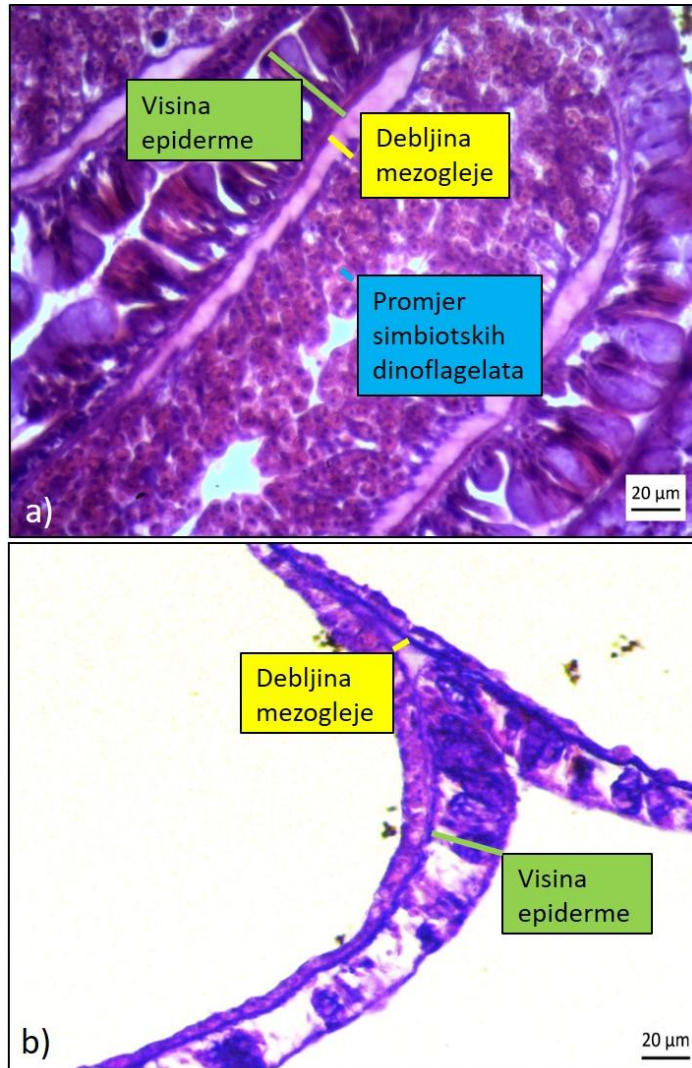
Kemikalije	Trajanje
1. 95 %-tni alkohol 1	10-15 urona
2. 95 %-tni alkohol 2	10-15 urona
3. 100 %-tni alkohol 1	10-15 urona
4. 100 %-tni alkohol 2	10-15 urona
5. Ksilen 1	2 minute
6. Ksilen 2	2 minute

3.3 Kvantitivna histomorfometrijska i statistička obrada podataka

Sve uzorke sam pregledala pomoću svjetlosnog mikroskopa (Nikon Eclipse E600) i fotografirala digitalnom kamerom (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany). Slike uzoraka sam analizirala i odredila morfometrijske veličine pomoću ZEN2 Lite programa (Carl Zeiss) te utvrdila debljinu pojedinih slojeva i veličinu simbiotskih dinoflagelata. Izrađeni histološki preparati su mikroskopski pregledani i opisani, te su histomorfometrijski parametri mjereni u dvije reprezentativne regije: površinska/oralna stijenka tijela i bazalna/aboralna stijenka tijela. U svakoj regiji su odabrana 2 testna polja, a svaka mjera je izmjerena po 3 puta unutar svakoga

testnog polja. Odabrani histomorfometrijski parametri su bili debljina sloja mezogleje i debljina epiderme, te promjer simbiotskih dinoflagelata u sloju gastroderme (Slika 10.).

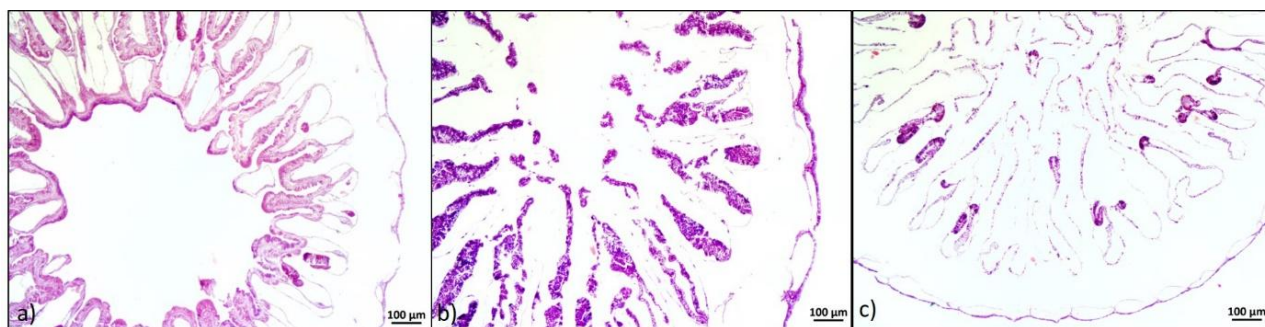
Sve izmjerene vrijednosti prikazane su kao prosječna vrijednost (srv), standardna devijacija (st dev) te minimumi (min) i maksimumi (maks) vrijednosti. Tip raspodjele podataka testiran je Kolmogorov-Smirnov testom. S obzirom da raspodjela podataka nije slijedila normalnu distribuciju (Kolmogorov – Smirnov test $p < 0,05$) u daljnjim statističkim analizama koristila sam neparametrijske testove. Postojanje razlika u morfometrijski mjerenim promjerima slojeva od interesa i simbiotskih dinoflagelata između zdravstvenih stanja (zdravi, nekroza, izbijeljeni) te dvije lokacije uzorkovanja (Piranski zaljev, Slovenija i Veliko jezero NP Mljet) testirane su pomoću Kruskal-Wallis testa. U slučajevima kad su rezultati bili statistički značajni ($p < 0,05$), dodatno je korišten *post-hoc* Mann – Whitney U test (Dytham 2003). Svi grafovi i tablice napravljeni su u softverskom programu Excel (Microsoft Office 365, SAD). Sve statističke analize rađene su u programu SPSS 17.0 za Windows (SPSS Inc., SAD).



Slika 10. Prikaz dvije regije od interesa: a) površinske stijenke tijela i b) bazalne stijenke, te mjerenih parametara unutar svake regije u histološkim preparatima busenastog kamenog koralja *Cladocora caespitosa* (foto: R. Gračan i S. Krcivoj) HE, skala: 20 mikrona

4. REZULTATI

U ovom radu ukupno je prikupljeno i obrađeno 87 uzoraka busenastog kamenog koralja, pri čemu je 45 uzoraka prikupljeno u Piranskom zaljevu u Sloveniji, a 42 uzorka su prikupljena u Velikom Jezeru u NP Mljet u Hrvatskoj. Nadalje, 47 uzoraka je prikupljeno tijekom 2021. godine, a 40 uzoraka tijekom 2022. godine. Pri uzorkovanju iz mora 22 uzorka su makroskopski procijenjena kao zdrava, 41 uzorak kao polipi zahvaćeni nekrozom te 24 uzorka koja su bila izbijeljena (Tablica 7.). Dio polipa koji su makroskopski svrstani i uzorkovani kao zdravi je nakon histopatološke obrade pokazao drukčiju sliku. Dva uzorka koja su makroskopski bila kategorizirana kao izbijeljena su nakon histološke analize procijenjena kao zdrava jer nisu pokazivali nikakve patološke pokazatelje i bili su uredno strukturirani. Preostali dio izbijeljenih polipa je potvrđen kao izbijeljeno tkivo, te je prvenstveno pokazivao smanjeni udio gastrodermalnog tkiva. Zaključno, nakon detaljne histološke analize pod svjetlosnim mikroskopom utvrdila sam da je 14 uzoraka bez lezija (zdravo tkivo; Slika 11a), 51 uzorak ima tkivo zahvaćeno različitim stupnjevima histopatoloških lezija (Slika 11b), dok sam preostalih 22 uzorka procijenila kao izbijeljeni polipi s difuznim manjim lezijama (Slika 11c)(Tablica 7.).



Slika 11. Reprezentativni primjerci tri identificirana zdravstvena stanja busenastog kamenog koralja *Cladocora caespitosa*: a) zdravi polip; b) tkivo polipa u nekrozi; c) izbijeljeni polip. HE, skala: 100 mikrona

Tablica 7. Popis analiziranih uzoraka, lokacija i godina uzorkovanja te makroskopske prvotne procjene stanja polipa i naknadne revidirane ocjene zdravstvenog stanja temeljem mikroskopske analize (zdrav polip, nekroza, izbijejen polip).

Rd.br.	Oznaka uzorka	lokacija	godina uzorkovanja	Prvotna procjena stanja (zdrava, nekroticna, izbijejena)	Finalna procjena stanja (zdrava, nekroticna, izbijejena)
1	HAS 1AA	Piranski zaljev	2021	zdrava	nekroza
2	HAS 1BB	Piranski zaljev	2021	zdrava	nekroza
3	HAS 1CC	Piranski zaljev	2021	zdrava	zdrava
4	HAS 1A	Piranski zaljev	2021	zdrava	nekroza
5	HAS 1B	Piranski zaljev	2021	zdrava	nekroza
6	HAS 1C	Piranski zaljev	2021	zdrava	zdrava
7	HAS 2A	Piranski zaljev	2021	nekroza	nekroza
8	HAS 2B	Piranski zaljev	2021	nekroza	nekroza
9	HAS 2C	Piranski zaljev	2021	nekroza	nekroza
10	HAS 13A	Piranski zaljev	2021	nekroza	nekroza
11	HAS 13B	Piranski zaljev	2021	nekroza	nekroza
12	HAS 13C	Piranski zaljev	2021	nekroza	nekroza
13	HAS 2AA	Piranski zaljev	2021	nekroza	nekroza
14	HAS 2BB	Piranski zaljev	2021	nekroza	nekroza
15	HAS 2CC	Piranski zaljev	2021	nekroza	nekroza
16	HAS 13A	Piranski zaljev	2021	nekroza	nekroza
17	HAS 13B	Piranski zaljev	2021	nekroza	nekroza
18	HAS 13C	Piranski zaljev	2021	nekroza	nekroza
19	HAS 3A	Piranski zaljev	2021	izbijejena	izbijejena
20	HAS 3AA	Piranski zaljev	2021	izbijejena	izbijejena
21	HAS 3B	Piranski zaljev	2021	izbijejena	izbijejena
22	HAS 3C	Piranski zaljev	2021	izbijejena	izbijejena
23	HAS 3AA	Piranski zaljev	2021	izbijejena	izbijejena
24	HAS 3BB	Piranski zaljev	2021	izbijejena	izbijejena
25	HAS 3CC	Piranski zaljev	2021	izbijejena	izbijejena
26	HAS 4A	NP Mljet	2021	zdrava	zdrava
27	HAS 4B	NP Mljet	2021	zdrava	zdrava
28	HAS 4C	NP Mljet	2021	zdrava	zdrava
29	HAS 4AA	NP Mljet	2021	zdrava	zdrava
30	HAS 4BB	NP Mljet	2021	zdrava	zdrava
31	HAS 4CC	NP Mljet	2021	zdrava	zdrava
32	HAS 5A	NP Mljet	2021	nekroza	zdrava
33	HAS 5B	NP Mljet	2021	nekroza	nekroza
34	HAS 5C	NP Mljet	2021	nekroza	nekroza

Tablica 7. nastavak

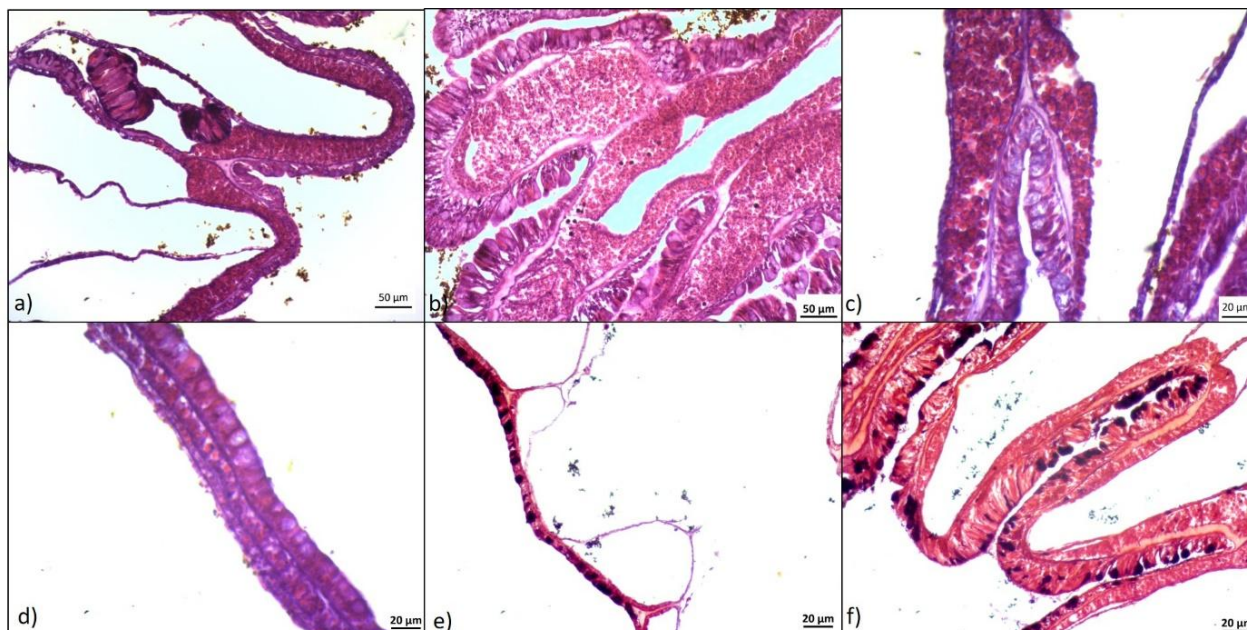
35	HAS16A	NP Mljet	2021	nekroza	nekroza
36	HAS16B	NP Mljet	2021	nekroza	nekroza
37	HAS 16C	NP Mljet	2021	nekroza	nekroza
38	HAS 5AA	NP Mljet	2021	nekroza	zdrava
39	HAS 5BB	NP Mljet	2021	nekroza	nekroza
40	HAS 5CC	NP Mljet	2021	nekroza	nekroza
41	HAS16AA	NP Mljet	2021	nekroza	nekroza
42	HAS16BB	NP Mljet	2021	nekroza	nekroza
43	HAS 16CC	NP Mljet	2021	nekroza	nekroza
44	HAS 6A	NP Mljet	2021	izbijeljena	izbijeljena
45	HAS 6C	NP Mljet	2021	izbijeljena	izbijeljena
46	HAS 6AA	NP Mljet	2021	izbijeljena	izbijeljena
47	HAS 6CC	NP Mljet	2021	izbijeljena	izbijeljena
48	HAS 7A	Piranski zaljev	2022	izbijeljena	zdrava
49	HAS 7B	Piranski zaljev	2022	izbijeljena	izbijeljena
50	HAS 7C	Piranski zaljev	2022	izbijeljena	izbijeljena
51	HAS 7AA	Piranski zaljev	2022	izbijeljena	zdrava
52	HAS 7BB	Piranski zaljev	2022	izbijeljena	izbijeljena
53	HAS 7CC	Piranski zaljev	2022	izbijeljena	izbijeljena
54	HAS 8A	Piranski zaljev	2022	zdrava	nekroza
55	HAS 8B	Piranski zaljev	2022	zdrava	zdrava
56	HAS 8C	Piranski zaljev	2022	zdrava	nekroza
57	HAS 8AA	Piranski zaljev	2022	zdrava	nekroza
58	HAS 8BB	Piranski zaljev	2022	zdrava	zdrava
59	HAS 8CC	Piranski zaljev	2022	zdrava	nekroza
60	HAS 9A	Piranski zaljev	2022	nekroza	nekroza
61	HAS 9B	Piranski zaljev	2022	nekroza	nekroza
62	HAS 9C	Piranski zaljev	2022	nekroza	nekroza
63	HAS 14B	Piranski zaljev	2022	nekroza	nekroza
64	HAS 9AA	Piranski zaljev	2022	nekroza	nekroza
65	HAS 9BB	Piranski zaljev	2022	nekroza	nekroza
66	HAS 9CC	Piranski zaljev	2022	nekroza	nekroza
67	HAS 14BB	Piranski zaljev	2022	nekroza	nekroza
68	HAS 10A	NP Mljet	2022	zdrava	nekroza
69	HAS 10B	NP Mljet	2022	zdrava	nekroza
70	HAS 10AA	NP Mljet	2022	zdrava	nekroza
71	HAS 10BB	NP Mljet	2022	zdrava	nekroza
72	HAS 11B	NP Mljet	2022	nekroza	nekroza
73	HAS 11C	NP Mljet	2022	nekroza	nekroza
74	HAS 11D	NP Mljet	2022	nekroza	nekroza
75	HAS 15A	NP Mljet	2022	nekroza	nekroza

Tablica 7. nastavak

76	HAS 15B	NP Mljet	2022	nekroza	nekroza
77	HAS 15C	NP Mljet	2022	nekroza	nekroza
78	HAS 15AA	NP Mljet	2022	nekroza	nekroza
79	HAS 15BB	NP Mljet	2022	nekroza	nekroza
80	HAS 15CC	NP Mljet	2022	nekroza	nekroza
81	HAS 12A	NP Mljet	2022	izbijeljena	izbijeljena
82	HAS 12B	NP Mljet	2022	izbijeljena	izbijeljena
83	HAS 12C	NP Mljet	2022	izbijeljena	izbijeljena
84	HAS 12BB	NP Mljet	2022	izbijeljena	izbijeljena
85	HAS 12AA	NP Mljet	2022	izbijeljena	izbijeljena
86	HAS 12BBB	NP Mljet	2022	izbijeljena	izbijeljena
87	HAS 12CCC	NP Mljet	2022	izbijeljena	izbijeljena

4.1 Histološka građa zdravih, nekrotičnih i izbijeljenih polipa

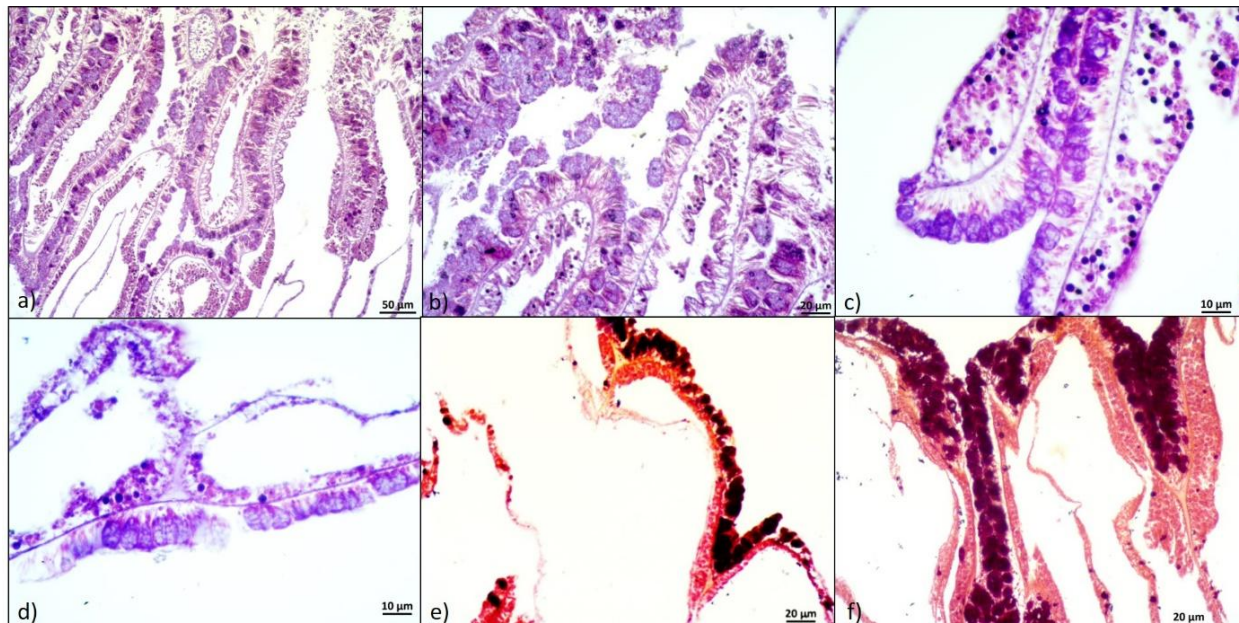
Polipi koji su mikroskopski pokazivali urednu strukturu, bez znakova patoloških stanja su kategorizirani kao zdravi. Sloj epiderme je bio vidljiv kao specijalizirani stanični sloj s jednoslojnim, cilindričnim epitelnim stanicama između kojih se nalaze pojedinačno umetnute stanice mukocita (koji proizvode mukus) i knidociti koji nose žarnice. Mezogleja je pokazivala homogenost i bila čvrsto prislonjena na dva stanična sloja koja je okružuju (Slika 12a i 12b). U gastrodermu su bili vidljivi simbiotski dinoflagelati koji su bili kružnog oblika s dobro vidljivim staničnim elementima te se povremeno mogao uočiti i kromatin (Slika 12c). U bazalnoj stijenci svi slojevi su bili vidljivi, kontinuirani i međusobno čvrsto povezani (Slika 12d). Gram bojanje za bakterije pokazalo je umjerenu prisutnost bakterija u bazalnom (Slika 12e) i u površinskom (Slika 12f) epidermalnom sloju. Od 22 uzorka koja su makroskopski identificirani kao zdrava, 54% polipa imalo je tkiva zahvaćena s nekim oblikom patoloških promjena, pri čemu su 23% uzoraka pokazala teške patološke promjene u >75% tkiva, a 15% uzoraka srednje teške lezije koje su zahvaćale 25-75% tkiva.



Slika 12. Histološka građa zdravih polipa busenastog kamenog koralja *Cladocora caespitosa* u površinskoj stijenci tijela (a-c i f) te bazalnoj stijenci (d i e). HE (slike a-d) i Gram bojanje (e i f).

Polipi zahvaćeni nekrozom koja je makroskopski vidljiva su pokazali veći stupanj oštećenja u površinskoj stijenci tijela u odnosu na bazalnu stijenkku. Epiderma u površinskom sloju je često bila oštećena i stanice nisu bile međusobno povezane te su se odvajale od bazalne membrane (Slika 13a). Kod manjih oštećenja, bila je vidljiva proliferacija mukocita i cilindričnih stanica (Slika 13b), iako je u dijelu uzoraka uz proliferaciju zabilježena i redukcija u visini epidermalnog sloja. Mezogleja je bila povremeno zadebljala i također povremeno odvojena od okolnih staničnih slojeva. U dijelu uzoraka su u gastrodermu zabilježene značajne nekrotične zone koje su dovele do razaranja i gubitka strukture unutar tog sloja (Slika 13c). Simbiotski dinoflagelati u gastrodermi su često bili smanjenog promjera i promijenjene smeđe boje (Slika 13c). Polipi zahvaćeni nekrozama su imali smanjeni broj mezenterijskih filamenata te su u uzorcima izostajale spolne stanice. Bazalna stijenska tijela je također pokazala oštećenja, prvenstveno u epidermi, te povremeno u gastrodermi, dok je mezogleja uglavnom zadržala strukturiranost (Slika 13d). Gram bojanje za bakterije pokazalo je povećanu prisutnost bakterija prvenstveno u sloju epiderme, u obje istraživane regije (Slika 13e i 13f), te je čak povremeno zabilježena manja

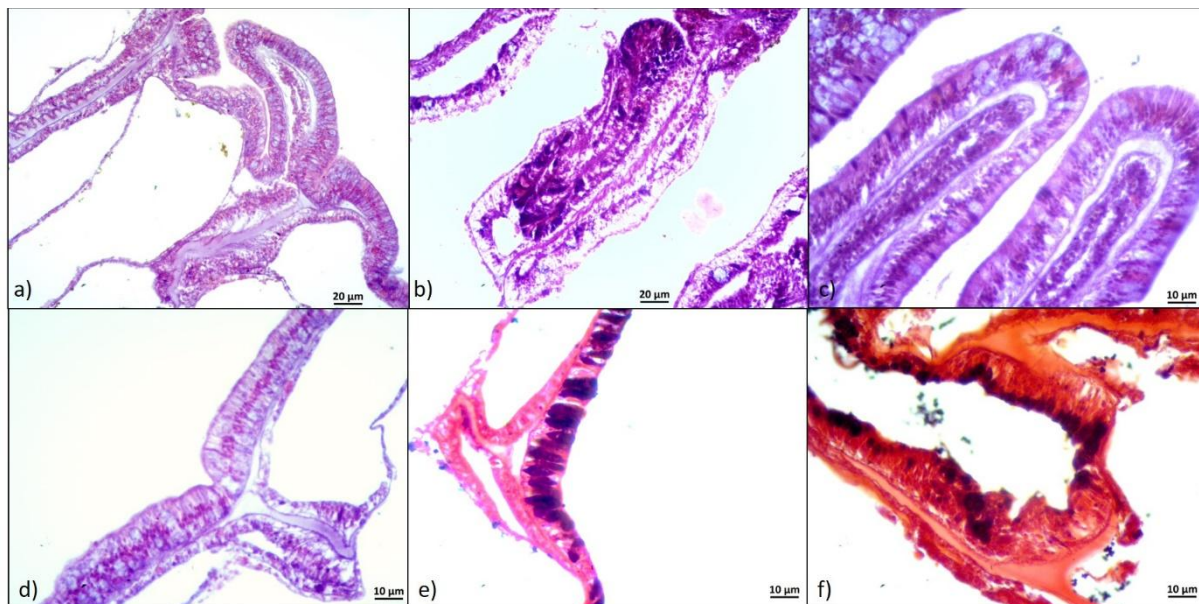
prisutnost bakterija u gastrodermi. Od makroskopski kategoriziranih nekrotičnih uzoraka, njih 80% je histološki pokazalo očekivane patološke promjene u 25-75% tkiva dok samo jedan uzorak nije pokazao značajne promjene i klasificiran je kao zdravo tkivo.



Slika 13. Histološka građa nekrotičnih polipa busenastog kamenog koralja *Cladocora caespitosa* u površinskoj stijenci tijela (a-c i f) te bazalnoj stijenci (d i e). HE (slike a-d) i Gram bojanje (e i f).

Izbijeljeni polipi su također pokazali veće poremećaje u strukturi u odnosu na zdrave polipe. Oko 50% izbijeljenih polipa nije pokazalo promjene u mezogleji, dok je u ostalima bilo uočljivo povremeno zadebljanje mezogleje (Slika 14a i 14d). Samo zadebljanje mezogleje je bilo još istaknutije u odnosu na sloj gastroderme koji je bio osjetno reduciran u odnosu na zdrave polipe. Samim time je i broj simbiotskih dinoflagelata bio smanjen, a izgled simbionata je varirao te su u pojedinim uzorcima simbiotske vakuole bile degradirane, smanjenog volumena i s promjenama u strukturi i obojenju (Slika 14b). Veće promjene su zabilježene u površinskoj stijenci polipa (Slika 14c) u odnosu na bazalnu stijenu tijela polipa (Slika 14d). U površinskoj epidermi uočena je povećana produkcija mukocita, njihova proliferacija i djelomični gubitak integriteta sloja (Slika 14a i 14c). Gram bojanje za bakterije pokazalo je umjerenu prisutnost bakterija kako u bazalnom (Slika 14e) tako i u površinskom (Slika 14f) epitelu. Iako je sam integritet većine slojeva bio zadržan i nisu zamijećene veće nekrotične zone, zbog zabilježenih

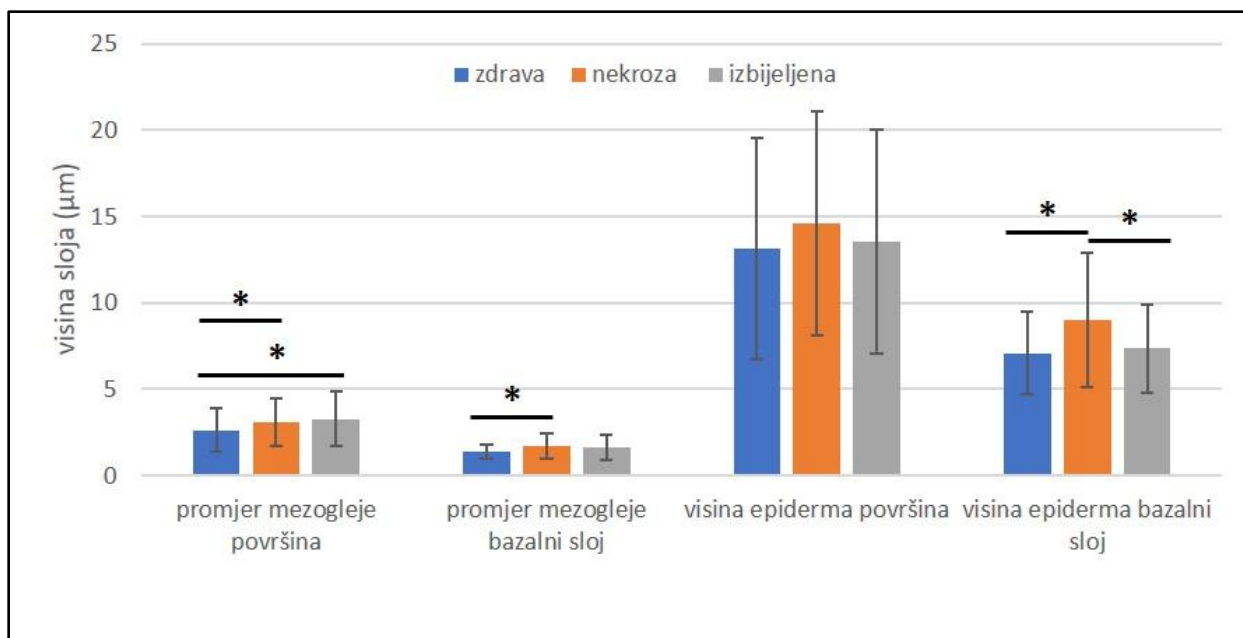
strukturnih promjena 44% uzoraka je imalo promjene u 25-75% tkiva, 22% u više od 75% tkiva, 22% u manje od 25% tkiva, a 1 uzorak je kategoriziran kao zdrav (Dodatak 1).



Slika 14. Histološka građa izbijeljenih polipa busenastog kamenog koralja *Cladocora caespitosa* u površinskoj stijenci tijela (a-c i f) te bazalnoj stijenci (d i e). HE (slike a-d) i Gram bojanje (e i f).

4.2 Histomorfometrijske mjere mezogleje, epiderme i simbiotskih dinoflagelata

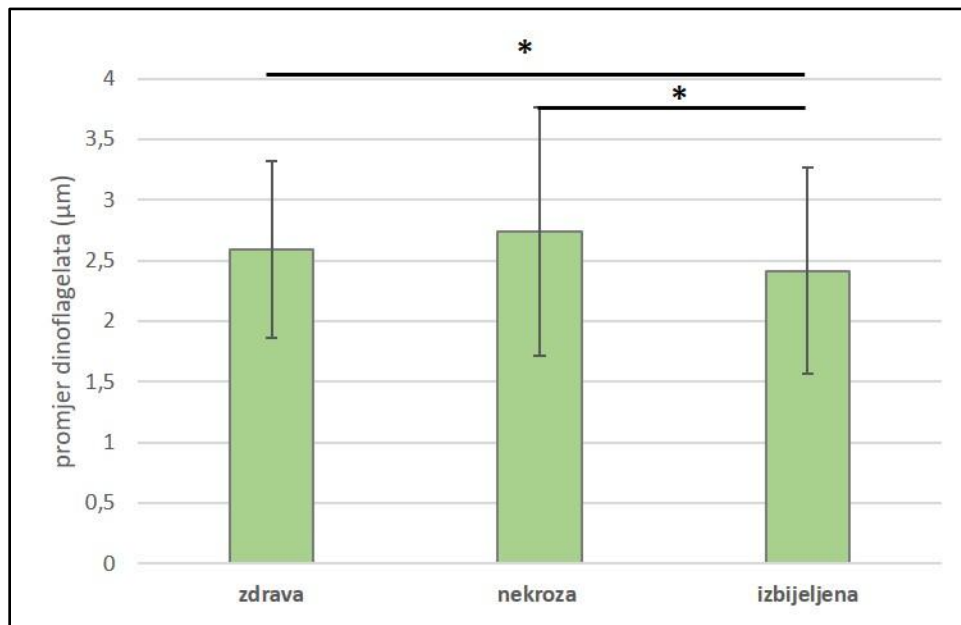
Kada su grupno analizirani izmjereni histomorfometrijski parametri, bez obzira na godinu i lokaciju, zamjetno je da je visina površinskog epidermalnog sloja veća u odnosu na epidermu (kalikodermu) bazalnog sloja (Slika 15). Promjer mezogleje u površinskom sloju je također bio veći u odnosu na mezogleju u bazalnom sloju. Statistički značajne razlike su zabilježene u promjeru mezogleje u površinskom sloju između zdravih i nekrotičnih polipa (Mann-Whitney U = 8932,0, $p=0,003$), te između zdravih i izbijeljenih polipa (Mann-Whitney U = 3833,5, $p=0,004$). Statistički značajna razlika u debljini mezogleje u bazalnom dijelu stijenke je zabilježena samo između zdravih i nekrotičnih polipa (Mann-Whitney U = 7799,5, $p=0,001$).



Slika 15. Izmjerene vrijednosti visine epiderme i promjera mezogleje u površinskoj i bazalnoj stijenci polipa busenastog kamenog koralja *Cladocora caespitosa* u Jadranskom moru. Zvezdica (*) označava statistički značajnu razliku između 3 promatrane zdravstvene skupine polipa (zdravi, nekroza, izbijeljeni).

Iako je visina epiderme u površinskom sloju bila najviša kod nekrotičnih polipa u odnosu na izbijeljene i kontrolne zdrave uzorke, ta razlika nije bila statistički značajna ($p > 0,05$). S druge strane, visina epiderme u bazalnoj stijenci tijela je pokazala značajna odstupanja u odnosu na druga dva utvrđena zdravstvena stanja, pa je visina epiderme nekrotičnih polipa bila značajno viša u odnosu na zdrave polipe (Mann-Whitney $U = 7306,5$, $p < 0,001$), te je također nekrotična epiderma bila značajno viša u odnosu na izbijeljene polipe (Mann-Whitney $U = 12891,5$, $p = 0,001$).

U morfolometrijskim mjerama simbiotskih dinoflagelata koji su se nalazili u gastrodermu, najveće odstupanje je zabilježeno u izbijeljenim polipima koji su pokazivali statistički značajno manje veličine u promjeru simbiotskih vakuola u odnosu na simbiote u zdravim polipima (Slika 16; Mann-Whitney $U = 11112,5$, $p = 0,026$), te također u odnosu na simbiote koji su se nalazili u nekrotičnim polipima (Mann-Whitney $U = 39463,0$, $p < 0,001$).

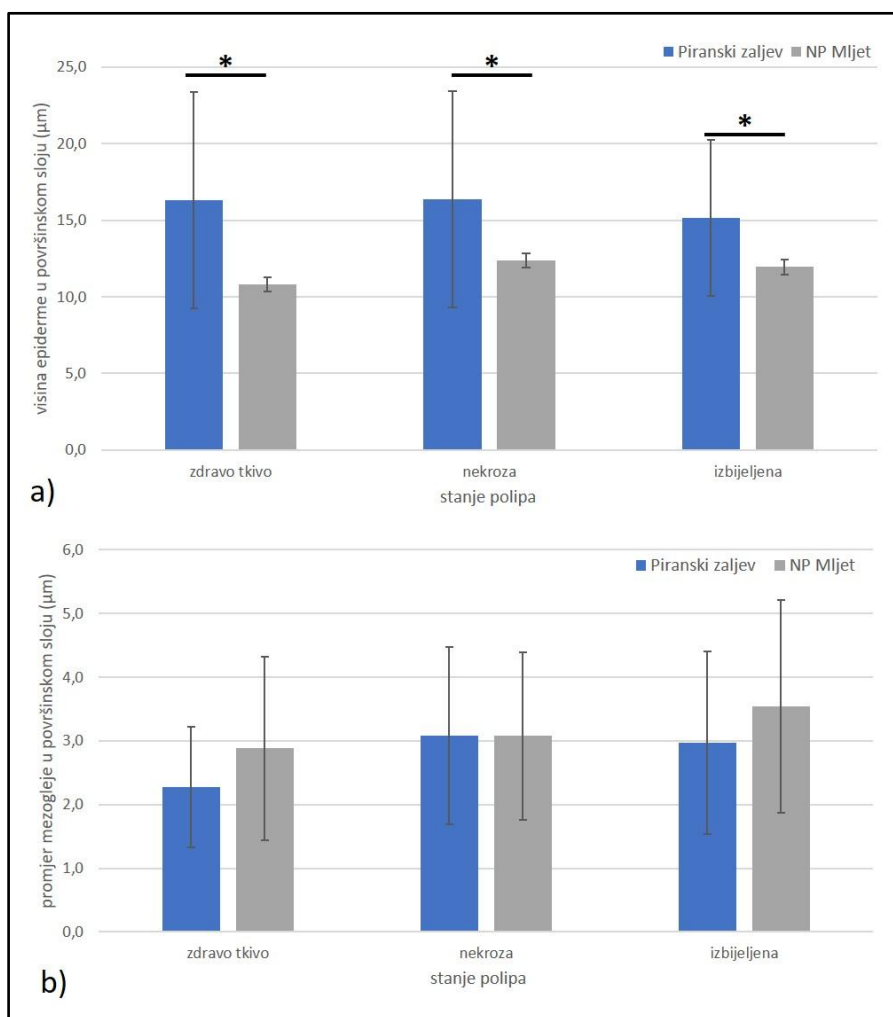


Slika 16. Promjer simbiotskih dinoflagelata u gastrodermu analiziranih polipa busenastog kamenog koralja *Cladocora caespitosa* u Jadranskom moru. Zvezdica (*) označava statistički značajnu razliku između tri promatrane zdravstvene skupine polipa (zdravi, nekroza, izbijeljeni).

4.3 Opis i usporedba polipa između dvije istraživane lokacije

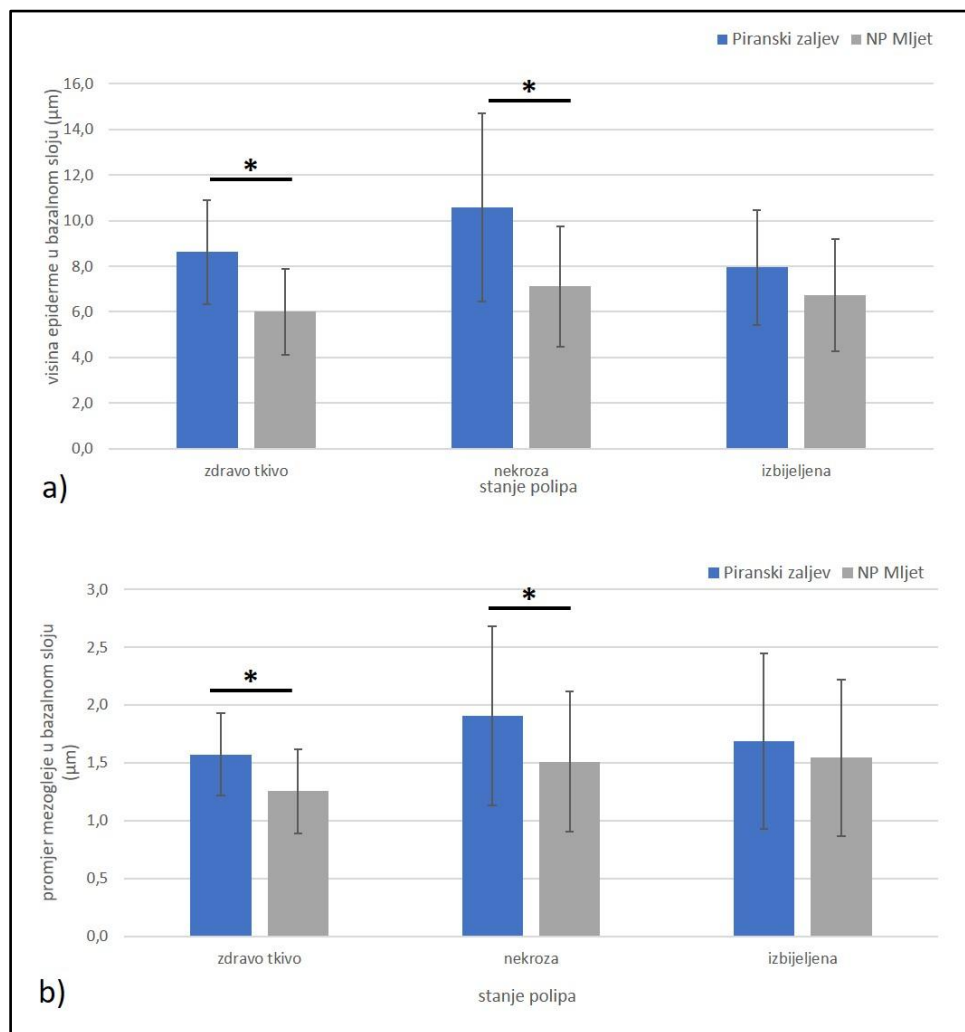
Kada su se mikroskopski analizirali histološki preparati izrađeni iz zdravih, nekrotičnih i izbijeljenih polipa između 2 analizirane lokacije nisu utvrđene razlike u strukturi zdravih jedinki, niti u obliku lezija koje su zabilježene u nekrotičnim i izbijeljenim polipima. Na obje lokacije su zabilježeni nekrotični polipi, i najčešće je taj stupanj nekroze bio srednje jak i obuhvaćao je 25-75% tkiva. Nadalje, izbijeljeni polipi su također pokazivali određene histopatološke lezije, s tim da su izbijeljeni polipi prikupljeni u Piranskom zaljevu pokazali nešto veća oštećenja u odnosu na polipe prikupljene u NP Mljet. Svi analizirani izbijeljeni polipi iz Piranskog zaljeva su imali srednje jaka (60% uzoraka; 25-75% tkiva zahvaćeno promjenama) i velika oštećenja tkiva (40% uzoraka; >75% zahvaćeno promjenama), dok su izbijeljeni polipi iz NP Mljet pokazivali slabija oštećenja (50% uzoraka; <25% tkiva zahvaćeno promjenama) i srednje jaka oštećenja (50% uzoraka; 25-75% tkiva zahvaćeno promjenama).

Histomorfometrijske mjere su također pokazale statistički značajnu razliku u građi pojedinih slojeva pa su zdrave jedinice pokazale značajnu razliku u građi površinske epiderme (Mann-Whitney U = 440,0, $p < 0,001$) te epiderme (Mann-Whitney U = 228,0, $p < 0,001$) i mezogleje (Mann-Whitney U = 331,0, $p = 0,001$) u bazalnoj stijenci polipa, pri čemu su uzorci iz Piranskog zaljeva imali deblje slojeve (Slika 17 i 18; Tablica 8.).



Slika 17. Usporedba izmjerenih visina epiderme i promjera mezogleje u površinskoj stijenci tijela polipa busenastog kamenog koralja *Cladocora caespitosa* između uzoraka prikupljenih u Piranskom zaljevu u Sloveniji i Velikom jezeru u NP Mljet u Hrvatskoj. Zvezdica (*) označava statistički značajnu razliku između dvije istraživane lokacije.

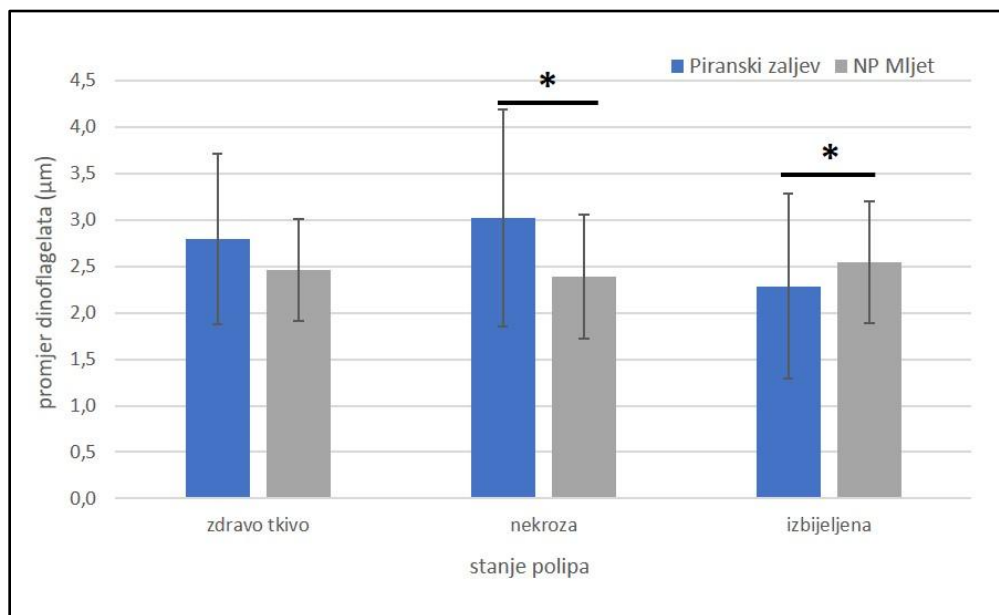
Slična razlika je zabilježena i u morfometrijski obrađenim nekrotičnim polipima, pa su uzorci iz Piranskog zaljeva imali značajno višu površinsku (Mann-Whitney U = 5652,0, $p < 0,001$) i bazalnu epidermu (Mann-Whitney U = 5140,5, $p < 0,001$), te značajno deblji promjer mezogleje bazalnog sloja (Mann-Whitney U = 7158,5, $p < 0,001$) u odnosu na analizirane nekrotične uzorke iz NP Mljet. Što se tiče izbijejenih polipa, značajna statistička razlika između lokacija je detektirana samo u visini površinskog sloja epiderme (Mann-Whitney U = 1193,0, $p = 0,001$), dok je zamijećeno i povećanje u debljini mezogleje u površinskom sloju u uzorcima s NP Mljet iako ta razlika nije bila statistički značajna (Mann-Whitney U = 1472,0, $p = 0,085$; Slika 17b).



Slika 18. Usporedba izmjerenih visina epiderme i promjera mezogleje u bazalnoj stijenci tijela polipa busenastog kamenog koralja *Cladocora caespitosa* između uzoraka prikupljenih u

Piranskom zaljevu u Sloveniji i Velikom jezeru u NP Mljet u Hrvatskoj. Zvezdica (*) označava statistički značajnu razliku između dvije istraživane lokacije.

Promjeri simbiotskih dinoflagelata koji su mjereni u gastrodermalnom sloju nisu bili statistički značajno različiti kada su se usporedila zdrava tkiva između lokacija, ali je razlika zabilježena u veličini dinoflagelata u slučaju nekrotičkih tkiva (Mann-Whitney U = 21089,0, $p < 0,001$) kada su bile veće simbiotske vakuole iz uzoraka u Piranskom zaljevu, dok je kod izbijenjenih polipa situacija bila obrnuta pa su značajno veće simbiotske vakuole zabilježene u uzorcima iz NP Mljet (Mann-Whitney U = 3693,5, $p = 0,001$).



Slika 19. Usporedba izmjerenih promjera simbiotskih dinoflagelata u gastrodermi polipa busenastog kamenog koralja *Cladocora caespitosa* između uzoraka prikupljenih u Piranskom zaljevu u Sloveniji i Velikom jezeru u NP Mljet u Hrvatskoj. Zvezdica (*) označava statistički značajnu razliku između dvije istraživane lokacije.

Tablica 8. Prosječne vrijednosti (P.V.), standardna devijacija (S.D.), minimum (MIN) i maksimum (MAKS) za izmjerene morfometrijske parametre u površinskoj i bazalnoj stijenci tijela polipa na histološkim uzorcima busenastog kamenog koralja (*Cladocora caespitosae*) između dvije istraživane lokacije.

		promjer mezogleje (μm) SRV \pm ST DEV (MIN-MAKS)		promjer epidermisa (μm) SRV \pm ST DEV (MIN-MAKS)		promjer symbiontskih algi (μm) SRV \pm ST DEV (MIN-MAKS)
		površinski sloj	bazalni sloj	površinki	bazalni sloj	
zdrava	Piranski zaljev	2,27 \pm 0,94 (0,94-4,46)	1,57 \pm 0,35 (0,94-2,6)	16,32 \pm 7,04 (4,09-31,88)	8,62 \pm 2,29 (5,04-12,99)	2,79 \pm 0,92 (1,39-5,33)
	NP Mljet	2,88 \pm 1,44 (0,56-7,14)	1,25 \pm 0,36 (0,64-1,99)	10,8 \pm 4,72 (3,45-21,29)	6,01 \pm 1,88 (3,72-10,22)	2,46 \pm 0,55 (1,29-3,51)
nekroza	Piranski zaljev	3,08 \pm 1,4 (0,41-6,78)	1,91 \pm 0,77 (0,69-4,47)	16,38 \pm 7,06 (2,48-39,57)	10,57 \pm 4,11 (2,92-24,53)	3,02 \pm 1,17 (1,24-9,21)
	NP Mljet	3,08 \pm 1,32 (0,91-6,41)	1,51 \pm 0,61 (0,69-3,66)	12,39 \pm 4,84 (3,71-27,32)	7,11 \pm 2,63 (2,13-14,45)	2,39 \pm 0,67 (0,87-4,1)
izbijeljena	Piranski zaljev	2,96 \pm 1,44 (0,74-6,68)	1,69 \pm 0,76 (0,67-4,04)	15,13 \pm 5,09 (7,54-28,25)	7,95 \pm 2,51 (3,89-14,29)	2,28 \pm 0,99 (0,89-5,68)
	NP Mljet	3,54 \pm 1,67 (1,3-8,19)	1,55 \pm 0,68 (0,74-4,81)	11,94 \pm 4,35 (3,51-21,64)	6,73 \pm 2,47 (1,29-12,13)	2,55 \pm 0,66 (1,31-4,33)

5. RASPRAVA

Ovaj diplomski rad predstavlja prvo istraživanje koje opisuje osnovnu histološku građu zdravih polipa te polipa zahvaćenih nekrozom ili izbijeljivanjem (gubitkom simbiotskih dinoflagelata). Dosadašnji radovi koji opisuju zdravstveno stanje kolonijalnog endemičnog kamenog koralja *Cladocora caespitosa* obuhvaćaju eksperimentalno izlaganje povišenim temperaturama i određivanje temperaturne tolerancije vrste i njenih simbionata praćenjem makroskopskih promjena (Rodolfo-Metalpa i sur. 2006, 2008, 2010) ili praćenje stanja populacija na istraživanim lokalitetima kroz kvantifikaciju odumrlih i izbijeljenih dijelova kolonija (Kružić i sur. 2014). Tijekom eksperimenata koji pokazuju utjecaj visokih temperature na polipe, pokazano je da kratkotrajno izlaganje (do 48 sati) ne ostavlja trajna oštećenja (Rodolfo-Metalpa i sur. 2006) dok duža izloženost (do 4 tjedna) uzrokuje gubitak gotovo svih simbionata i izbjeljivanje polipa (Kružić i sur. 2014). Jedini rad koji koristi mikroskopsku anatomiju i histološke analize u proučavanju vrste *C. caespitosa* opisuje njene reproduktivni ciklus u području zapadnog Sredozemnog mora (Kersting i sur. 2013). Većina dosadašnjih istraživanja potvrđuje ovu vrstu kao ključnu za morske ekosustave zbog njene uloge u izgradnji koraljnih grebena i oblikovanju staništa, a time i utjecaja na bioraznolikost i veliki broj vrsta koje su povezane s koraljnim grebenima (Pitacco i sur. 2019). Nadalje, utvrđeno je da je vrsta posebno osjetljiva na visoke temperature, odnosno na izražene temperaturne anomalije (morski toplinski valovi; *marine heath waves*, Hobday i sur. 2016) koji se pojavljuju tijekom ljetne sezone u moru, a čija se učestalost i intenzitet povećavaju (Kersting i sur. 2022). S obzirom da je vrsta kolonijalni simbiotski koralj koji živi u moru umjerene temperature, povećana učestalost morskih toplinskih valova uzrokovala je povećanu smrtnost ove vrste u Sredozemnom moru (Rodolfo-Metalpa i sur. 2005; Garrabou i sur. 2009; Kersting i sur. 2013; Kružić i sur. 2014) te je uključena

u Crvenu listu ugroženih vrsta (*Red List of Threatened Species*) kao ugrožena vrsta (Kersting i sur. 2022).

Kao jedan od glavnih razloga za uspješno osvajanje staništa i raznolikost kamenih koralja navodi se njihova simbioza s dionflagelatima iz porodice Symbiodiniaceae (LaJeunesse i sur. 2018). Ova simbioza omogućuje brzi rast koralju i process kalcifikacije u plitkim vodenim okolišima koji nisu uvijek bogati s nutrijentima (Stanley 2006). Stoga dinoflagelati koji se nalaze u gastrodermi koralja proizvode ugljik te iskorištavaju CO₂ i otpadne tvari iz metabolizma koralja (Stanley 2006). Ukoliko dođe do prekida simbiotskog odnosa između koralja i simbionata, dolazi do smanjenja količine simbionata (i njihovih pigmenata) te izbjeljivanja koralja i promjene u boji tkiva koralja. Dok manji postotak izbijeljenosti može biti reverzibilan proces i smanjiti primarnu produkciju i kalcifikaciju te utjecati na kruženja tvari u ekosustavu, veća količina izbijeljenih koralja dovodi do smrti koralja i dugotrajnih promjena u pridnenim zajednicama (Wild i sur. 2011; De'ath i sur. 2012).

Istraživanje provedeno na *C. caespitosa* u području Velikog jezera u NP Mljet gdje se nalazi najveći koraljni greben u Sredozemnom moru pokazuje da se temperaturni prag koji pokreće gubitak simbionata i izbjeljivanje nalazi na oko 26–27 °C (Kružić i sur. 2014). Velika smrtnost je zabilježena tijekom 1997. godine kada je nakon 93 uzastopna dana na temperaturi >28 °C utvrđeno 269 izbijeljenih kolonija i 119 mrtvih kolonija te ponovno 2003. godine kada je nakon 89 uzastopnih dana na temperaturi >28 °C utvrđeno 426 izbijeljenih i 133 mrtve kolonije (Kružić i sur. 2014). Baker i sur. (2008) su uočili da različite vrste koralja imaju različitu sposobnost oporavka kao i otpornost na izbjeljivanje. Hughes i sur. (2017) su pokazali da ako se izbjeljivanje odnosno gubitak simbiotskih dinoflagelata dogodi nekoliko puta u kratkom razdoblju da se mogućnost oporavka smanjuje jer koralji nemaju dovoljno vremena za oporavak prije sljedećeg stresnog događaja. Zanimljivo istraživanje proveli su Kersting i Linares (2019) kada su pokazali

da postoji dosad nezabilježena strategija za preživljavanje vrste *C. caespitosa* koja uključuje povlačenje i drastičnu redukciju tkiva polipa iz originalnog skeleta (kaliksa) a zatim nakon perioda mirovanja pomlađeni polip prerasta originalni skelet te polako rekolonizira odumrlu koloniju.

S obzirom da histološki pregled lezija za sredozemne koralje ne postoji, možemo usporediti pronađene lezije s izbijeljenim tropskim vrstama kamenih koralja također uzrokovanih povišenim temperaturama. Tropske vrste su također pokazale sličan histološki odgovor koji se očitovao u smanjenju simbionata i njihovoj nekrozi, gubitku strukture i integriteta epiderme i gastroderme, nekrozama tkiva i upalnim procesima, te sekundarnim+ infekcijama s algama i gljivama (Vargas-Ángel i sur. 2007; Work i sur. 2014). Iako u ovom radu nisu utvrđene gljive u analiziranim uzorcima, uočena je povećana količina bakterija i u površinskoj i u bazalnoj stijenci tijela kod nekrotičnih polipa, što se i može očekivati s obzirom da gubitak strukture epiderme olakšava prolaz i infekciju većeg broja bakterija iz okoliša. Također, u ovom radu su uočene značajne promjene u debljini slojeva mezogleje i epiderme. S obzirom da je uloga mezogleje mehanička potpora, osiguravanje elastičnosti, pružanje strukture, skladištenje hranjivih tvari i prijenos plinova između slojeva, moguće je da u stresnim uvjetima mezogleja može zadebljati kao obrambeni odgovor za jačanje strukturnog integriteta koralja i smanjenje osjetljivosti na vanjska oštećenja (Coral Disease & Health Consortium 2023). Nadalje, epiderma je vanjski sloj koralja koji sadrži stanice koje izlučuju mukozni sekret koji pomaže u obrani od parazita i patogena, štiti od sedimentacije i pomaže koralju pri hranjenju. Povišeni epitel i povećana količina mukocita upućuju na povećanu produkciju mukusa koji može biti znak stresnih uvjeta u kojima se koralj nalazi kao što su bolest, zagađenje vode te povišena temperatura mora (Coral Disease & Health Consortium 2023).

Iz ovog istraživanja smo mogli zaključiti kako se izgled polipa neke vrste koralja razlikuje ovisno o geografskom mjestu rasta samog koralja odnosno okoliša u kojem se nalazi. Okolišni uvjeti koji mogu utjecati na rast i izgled koralja su: izgled grebena, morsko dno, morska struja ,protok vode i drugi čimbenici iz okoliša. Iz rezultata morfometrije se može zaključiti da su polipi iz Piranskog zaljeva veći odnosno da su pojedini slojevi deblji nego oni kod polipa uzorkovanih u NP Mljetu, bez obzira na zdravstveno stanje koralja.

Ovaj diplomski rad doprinosi boljem razumijevanju kako klimatske promjene utječu na histologiju i morfometriju koralja u Jadranskom moru. Daljnja istraživanja bi trebala ići u smjeru uzorkovanja drugih vrsta iz Jadranskog mora kako bi se dobiveni rezultati usporedili i kako bi se vidjelo kako na različite vrste koralja utječu klimatske promjene. Također se mogu ponovno uzeti uzorci vrste *Cladocora caespitosa* radi usporedbe stanja koralja iz 2022. godine i 2024. godine.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja na vrsti *Cladocora caespitosa* u Jadranskom moru moguće je doći do sljedećih zaključaka:

- Makroskopski izgled polipa ne mora biti isti kao mikroskopski izgled polipa (zdravi koralj pod svjetlosnim mikroskopom može imati nekrotično tkivo).
- Zdravi polipi su mikroskopski pokazivali urednu strukturu, dok su nekrotični i izbijeljeni polipi pokazivali oštećenja i odvajanja pojedinih slojeva.
- Simbiotski dinoflagelati su kod polipa zahvaćenih nekrozom bili manjeg promjera nego kod zdravih polipa te je došlo do promjene boje u smeđu, dok je kod izbijeljenih polipa izgled simbiotskih dinoflagelata varirao i bio smanjen.
- Mikroskopskom analizom histoloških preparata između dvije analizirane lokacije nisu utvrđene razlike u strukturi zdravih jedinki, niti u obliku lezija koje su zabilježene u nekrotičnim i izbijeljenim polipima. Na obje lokacije su zabilježeni nekrotični polipi, i najčešće je taj stupanj nekroze bio srednje jak.
- Ovaj rad po prvi puta opisuje osnovne histološke karakteristike i histopatološke promjene u endemičnom busenastom kamenom koralju u Jadranskom moru, koje su važne za razumijevanje plastičnosti i mogućnosti adaptacije i preživljavanja ove vrste u morskom okolišu

7. LITERATURA

Baker, A.C., Rowan, R. (1997) Diversity of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae) in scleractinian corals of the Caribbean and Eastern Pacific, *Proceedings of the 8th International Coral Reef Symposium*, 2, 1301-1306.

Baker, A.C., Glynn, P.W., Riegl, B. (2008) Climate change and coral reef bleaching: An ecological assessment of longer-term impacts, recovery trends and future outlook, *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 80, 435-471.

Barnes, D.J., Lough, J.M. (1993) On the nature and causes of density banding in massive coral skeletons, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 167, 91-108.

BioGnost (2021) Hematoksilin H, Modificirani hematoksilin po Harrisu za bojenje jezgre. Reagens za snažno, regresivno bojenje u histopatologiji, BioGnost, dostupno na: <https://www.biognost.com/wp-content/uploads/2019/12/Hematoksilin-H-UPUTA-V16.pdf> (pristupljeno 25.7.2024.).

BioGnost (2019) 4 komplet, Komplet od četiri reagensa za identifikaciju bakterija prema Gramu. Za diferencijaciju Gram pozitivnih od Gram negativnih bakterija, BioGnost, dostupno na: https://www.biognost.com/wp-content/uploads/2020/01/BioGram-4-komplet_UPUTA-V12.pdf (pristupljeno 25.7.2024.).

Bonacci, O., Ljubenkov, I., Roje-Bonacci, T. (2021) Different climate changes at two locations on a Small Karst Island Korčula (Adriatic sea, Croatia), *Naše More*, 68 (1), 1-13.

Casado-Amezúa, P., Kersting, D.K., Linares, C., Bo, M., Caroselli, E. (2015) *Cladocora caespitosa*, The IUCN Red List of Threatened Species, dostupno na: https://www.researchgate.net/publication/366965496_Cladocora_caespitosa_The_IUCN_Red_List_of_Threatened_Species_2022_eT133142A165739749 (pristupljeno 27.7.2024.).

Coral Disease & Health Consortium (2023) Microscopic Anatomy - Coral Disease & Health Consortium, dostupno na: <https://cdhc.noaa.gov/coral-biology/microscopic-anatomy/> (pristupljeno 25.7.2024.).

De'ath, G., Lough, J.M. and Fabricius, K.E. (2009) Declining coral calcification on the Great Barrier Reef, *Science*, 323, 116–119. doi: 10.1126/science.1165283.

Dytham, C. (2003) *Choosing and Using Statistics: A Biologist's Guide*. Wiley-Blackwell.

Encyclopaedia Britannica (2019) *Littoral zone*. Encyclopaedia Britannica, dostupno na: <https://www.britannica.com/science/littoral-zone> (pristupljeno 9.11.2024)

Garrabou, J., Coma, R., Bensoussan, N., Bally, M., Chevaldonné, P., Cigliano, M., Diaz, D., Harmelin, J.G., Gambi, M.C., Kersting, D.K., Lejeusne, C., Linares, C., Marschal, C., Pérez, T., Ribes, M., Romano, J.C., Serrano, E., Teixidó, N., Torrents, O., Zabala, M., Zuberer, F., Cerrano, C. (2009) Mass mortality in Northwestern Mediterranean rocky benthic communities: effects of the 2003 heat wave, *Global Change Biology*, 15, 1090–1103.

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

Hawthorn, A., Berzins, I., Dennis, M., Kiupel, M., Newton, A., Peters, E., Reyes, V., Work, T. (2023) An introduction to lesions and histology of scleractinian corals, *Veterinary Pathology*, 60(5), 1-19.

Hobday, A.J., Alexander, L.V., Perkins, S.E., Smale, D.A., Straub, S.C., Oliver, E.C.J., Benthuisen, J.A., Burrows, M.T., Donat, M.G., Feng, M., Holbrook, N.J., Moore, P.J., Scannell, H.A., Sen Gupta, A., Wernberg, T. (2016) A hierarchical approach to defining marine heatwaves, *Progress in Oceanography*, 141, 227–238. doi: 10.1016/j.pocean.2015.12.014.

Hughes, T.P., Kerry, J.T., Álvarez-Noriega, M., Álvarez-Romero, J.G., Anderson, K.D., Baird, A.H., i sur. (2017) Global warming and recurrent mass bleaching of corals, *Nature*, 543, 373-377.

Jardas, I. (1996) *Jadranska ihtiofauna, Školska knjiga*, Zagreb.

Kersting, D., Linares, C. (2019) Living evidence of a fossil survival strategy raises hope for warming-affected corals, *Science Advances*, 5. doi: 10.1126/sciadv.aax2950.

Kersting, D., Casado de Amezua, P., Goffredo, S. (2022) *Cladocora caespitosa*, The IUCN Red List of Threatened Species 2022: e.T133142A165739749, dostupno na: https://www.researchgate.net/publication/366965496_Cladocora_caespitosa_The_IUCN_Red_List_of_Threatened_Species_2022_eT133142A165739749 (pristupljeno 21.5.2024.).

Kersting, D., Casado, C., Lopez-Legentil, S., Linares, C. (2013) Unexpected patterns in the sexual reproduction of the Mediterranean scleractinian coral *Cladocora caespitosa*, *Marine Ecology Progress Series*, 486, 165–171. doi: 10.3354/meps10356.

Kružić, P. (2001) Grebenaste tvorbe vrste *Cladocora caespitosa* (Linnaeus, 1767) (Anthozoa, Scleractinia) u Jadranskom moru. Magistarski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovnomatematički fakultet.

Kružić, P. (2005) Ekologija vrste kamenog koralja *Cladocora caespitosa* (Linnaeus 1767) i njegove grebenaste tvorbe u Jadranskom moru. Doktorski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovnomatematički fakultet.

Kružić, P., Požar-Domac, A. (2003) Banks of the coral *Cladocora caespitosa* (Anthozoa, Scleractinia) in the Adriatic Sea, *Coral Reefs*, 22(4), 536.

Kružić, P., Benković, L. (2008) Bioconstructional features of the coral *Cladocora caespitosa* (Anthozoa, Scleractinia) in the Adriatic Sea (Croatia), *Marine Ecology*, 29, 125-139.

Kružić, P., Žuljević, A., Nikolić, V. (2007) Spawning of the colonial coral *Cladocora caespitosa* (Anthozoa, Scleractinia) in the Southern Adriatic Sea, *Coral Reefs*, 27, 337-341.

Kružić, P., Sršen, P., Benković, L. (2012) The impact of seawater temperature on coral growth parameters of the colonial coral *Cladocora caespitosa* (Anthozoa, Scleractinia) in the eastern Adriatic Sea, *Facies*, 58(4), 477-491.

Kružić, P., Lipej, L., Mavrič, B., Rodić, P. (2014) Impact of bleaching on the coral *Cladocora caespitosa* in the eastern Adriatic Sea, *Marine Ecology Progress Series*, 509, 193–202. doi: 10.3354/meps10962.

LaJeunesse, T.C., Parkinson, J., Gabrielson, P., Jeong, H.J., Reimer, J.D., Voolstar, C.R., Santos, S.R. (2018) Systematic revision of Symbiodiniaceae highlights the antiquity and diversity of coral endosymbionts, *Current Biology*, 28, 2570–2580.

Lesser, M.P. (2006) Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and physiological ecology, *Annual Review of Physiology*, 68, 253-278.

Mihanović, H., Vilibić, I., Šepić, J., Matić, F., Ljubešić, Z., Mauri, E., Gerin, R., Notarstefano, G., Poulain, P.M. (2021) Observation, Preconditioning and Recurrence of Exceptionally High Salinities in the Adriatic Sea, *Frontiers in Marine Science*, 8, 1-22.

Muscatine, L. (1990) The role of symbiotic algae in carbon and energy flux in reef corals, u Dubinsky, Z. (ur.), *Ecosystems of the world: 25 – Coral Reefs*, Elsevier, Amsterdam, 75-87.

Pitacco, V., Mistri, M., Lipej, L. (2019) Species-Area Relationship (SAR) models as tools for estimating faunal biodiversity associated with habitat builder species in sensitive areas: the case of the Mediterranean stony coral (*Cladocora caespitosa*), *Marine Environmental Research*, 149, 27–39. doi: 10.1016/j.marenvres.2019.05.016.

Rodolfo-Metalpa, R., Bianchi, C.N., Peirano, A., Morri, C. (2005) Tissue necrosis and mortality of the temperate coral *Cladocora caespitosa*, *Italian Journal of Zoology*, 72(4), 271-276.

Rodolfo-Metalpa, R., Richard, C., Allemand, D., Bianchi, C.N., Morri, C., Ferrier-Pagès, C. (2006) Response of zooxanthellae in symbiosis with the Mediterranean corals *Cladocora caespitosa* and *Oculina patagonica* to elevated temperatures, *Marine Biology*, 150, 45-55.

Rodolfo-Metalpa, R., Peirano, A., Houlbrèque, F., Abbate, M., Ferrier-Pagès, C. (2008) Effects of temperature, light and heterotrophy on the growth rate and budding of the temperate coral *Cladocora caespitosa*, *Coral Reefs*, 27, 17–25.

Rodolfo-Metalpa, R., Martin, S., Ferrier-Pagès, C., Gattuso, J.P. (2010) Response of the temperate coral *Cladocora caespitosa* to mid- and long-term exposure to pCO₂ and temperature levels projected for the year 2100 AD, *Biogeosciences*, 7(1), 289–300.

Rowan, R., Powers, D.A. (1991) Molecular genetic identification of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae), *Marine Ecology Progress Series*, 71, 65-73.

Stanley, G.D. Jr. (2006) Photosymbiosis and the evolution of modern coral reefs, *Science*, 312(5775), 857–858.

Traylor-Knowles, N. (2019) Heat stress compromises epithelial integrity in the coral, *Acropora hyacinthus*, *PeerJ Life and Environment*, 7, e6510.

Vargas-Ángel, B., Peters, E.C., Kramarsky-Winter, E., Gilliam, D.S. and Dodge, R.E. (2007) Cellular reactions to sedimentation and temperature stress in the Caribbean coral *Montastraea cavernosa*, *Journal of Invertebrate Pathology*, 95, 140-145. doi: 10.1016/j.jip.2007.01.003.

Vilibić, I., Šepić, J., Proust, N. (2013) Weakening thermohaline circulation in the Adriatic Sea, *Climate Research*, 55(3), 217-225.

Waller, S.J., Knighton, L.E., Crabtree, L.M., Perkins, A.L., Reitzel, A.M., Truman, A.W. (2018) Characterizing functional differences in sea anemone Hsp70 isoforms using budding yeast, *Cell Stress and Chaperones*, 23(5), 933-941.

Wild, C., Hoegh-Guldberg, O., Naumann, M., Colombo-Pallotta, M., Ateweberhan, M., Fitt, W., Iglesias-Prieto, R., Palmer, C., Bythell, J., Ortiz, J.C., Loya, Y. and Van Woesik, R. (2011) Climate change impedes scleractinian corals as primary reef ecosystem engineers, *Marine and Freshwater Research*, 62, 205-215. doi: 10.1071/MF10254.

Work, T.M., Aeby, G.S., Lasne, G. and Tribollet, A. (2014) Gross and microscopic pathology of hard and soft corals in New Caledonia, *Journal of Invertebrate Pathology*, 120, 50–58. doi: 10.1016/j.jip.2014.05.007.

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 17. ožujka 2000. godine u Zagrebu. Svoje obrazovanje započela sam u Osnovnoj školi Ksaver Šandor Gjalski u Zagrebu. Osnovnu školu sam završila 2014. godine kada upisujem Privatnu klasičnu gimnaziju. Srednju školu sam završila 2018. godine kada upisujem Sveučilišni integrirani prijediplomski i diplomski studij biologije i kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Prisustvovala sam na znanstveno-popularnoj manifestaciji „Dan i noć na PMF-u“ i položila sam CMAS tečaj ronjenja, R1 kategorija.