



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Geološki odsjek

Mia Knjaz

**MOLEKULARNI MEHANIZMI
FIZIOLOŠKOG ODGOVORA
EUKARIOTSKOG FITOPLANKTONA NA
PRITISKE U EKOSUSTAVU SJEVERNOG
JADRANA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025.



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Geološki odsjek

Mia Knjaz

**MOLEKULARNI MEHANIZMI
FIZIOLOŠKOG ODGOVORA
EUKARIOTSKOG FITOPLANKTONA NA
PRITISKE U EKOSUSTAVU SJEVERNOG
JADRANA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

dr.sc. Daniela Marić Pfannkuchen

dr.sc. Ana Baričević

Zagreb, 2025.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

Department of Geology

Mia Knjaz

**MOLECULAR MECHANISMS OF THE
EUKARYOTIC PHYTOPLANKTON
PHYSIOLOGICAL RESPONSE TO
STRESSORS IN THE NORTHERN
ADRIATIC ECOSYSTEM**

DOCTORAL DISSERTATION

Mentors:

dr.sc. Daniela Marić Pfannkuchen

dr.sc. Ana Baričević

Zagreb, 2025.

Ovaj doktorski rad izrađen je u sklopu dokorskog studija iz Oceanologije na Geološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u Laboratoriju za evolucijsku ekologiju Centra za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. sc. Danijele Marić Pfannkuchen i dr. sc. Ane Baričević. Istraživanje je provedeno u sklopu projekta *Molekularne životne strategije fitoplanktona u Jadranu – ADRILife*, financiranog od Hrvatske zaklade za znanost (UIP -2020-02-7868), voditeljica projekta dr. sc. Daniela Marić Pfannkuchen.

ZAHVALE

Za početak zahvaljujem cijelom Laboratoriju za Evolucijsku ekologiju Centra za istraživanje mora, mojim kolegama i prijateljima, timu bez kojeg ovaj doktorat ne bi bio moguć. Hvala Vam na pomoći oko terenskog i laboratorijskog rada, ali i savjetima i podršci koju ste mi pružili tokom izrade ovog doktorata.

Zahvaljujem svojoj mentorici Danieli Marić Pfannkuchen, što mi je pružila priliku kojoj sam se oduvijek nadala. Hvala Vam što ste vjerovali u mene, bodrili me i gurali naprijed u trenucima kada je bilo potrebno. Hvala na svim riječima podrške i hvala Vam što se i dalje borite za mene.

Zahvaljujem svojoj mentorici Ani koja me pažljivo pratila kroz ovaj proces. Hvala ti na svom znanju koje si samnom podijelila, što si bila tu u svakom trenutku, što si mi pomogla da pronađem fokus i saberem misli i najviše hvala na toplim riječima i neizmjernoj podršci koju si mi pružila.

Zahvaljujem i svojoj nepisanoj mentorici Mirti Smodlaki Tanković na znanju koje mi je prenijela i na podršci koju mi je pružala od prvog dana. Hvala ti što si me uvela svijet fiziologije i hvala ti na povjerenju koje si mi iskazala. Hvala ti što si mi bila tiha podrška od prvog dana i hvala ti što si me gurala kroz ovaj proces, što vjeruješ u mene i guraš me i dalje.

Zahvaljujem svojem drugom nepisanom mentoru Martinu Pfannkuchenu, na svim znanstvenim raspravama koje smo vodili i na idejama koje su me inspirirale, davala mi vjetar u leđa i širile mi pogled na vlastite rezultate.

Hvala mojoj dragoj kolegici i prijateljici Nataši Kužat koja mi pomogla oko izrade monoklonalnih kultura, ali još i više na svim savjetima i podršci koju mi je pružila. Hvala ti što si me znala ohrabriti kad je bilo potrebno i hvala ti što si bila uz mene u svim koracima ovog procesa.

Hvala mojem dragom kolegi i prijatelju Ivanu Vlašičeku na savjetima vezanim za programiranje i obradu podataka, ali najviše hvala na podršci i prijateljstvu. Preživjeli smo!

Veliko hvala Denisu Škalicu, Victoru Stingi Peruscu, Mariji Fornažar, Lani Grižančić, Ivanu Podolšaku, Tjaši Kogovšek i Ariani Turković na brojnim lijepim trenucima na terenima, u laboratoriju i u kuhinji za ručkom. Bilo mi je iskreno zadovoljstvo biti dijelom ovog tima.

Od srca zahvaljujem svojoj obitelji, mami i Juri, tati i Katarini, braći Tinu, Ivoru i Leu, bakama Nini i Zdenki, tetama Liviji i Tanji te prijateljima Dori, Jakši, Lauri, Iris i Ivani na bezuvjetnoj podršci, razumijevanju i strpljenju. Hvala Vam što ste oduvijek vjerovali u mene i što ste uskakali kada je god trebalo.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj mami Niki, koja mi je bila bezuvjetna podrška u svakom smislu. Hvala ti što me podupireš u svim mojim odlukama i hvala ti na svim savjetima koje si mi dala. Hvala ti što si me naučila upornosti i što me inspiriraš iz dana u dan.

Također, posebnu zahvalnost dugujem svojem partneru Danijelu koji mi je pružio neizmjernu podršku tokom ovog procesa. Hvala ti na pomoći oko malih stvari i oko velikih. Neizmjerno si mi olakšao ovaj proces. Hvala ti što si me podupirao iz dana u dan i što si imao razumijevanja i strpljenja.

Zahvaljujem svojoj baki Nini i Predragu Bejakoviću na lekturi ovog rada, na uloženom vremenu i trudu te korisnim savjetima.

Zahvaljujem svojem djedu Josipu što je od malena hranio moju ljubav prema biologiji, često vodio samnom rasprave o evoluciji u kojima se nismo uvijek slagali, ali su me naučile kako kritički razmišljati. Hvala ti što si uvijek bio ponosan na mene.

*Ovaj doktorat posvećujem svim ženama koje me svojim radom, trudom i upornošću inspiriraju iz dana u dan. **Mojoj mami Niki, bakama Nini i Zdenki, teti Liviji i Tanji, Dori, Nataši, Danieli, Ani i Mirti.** Hvala Vam!*

ŽIVOTOPISI MENTORICA

Daniela Marić Pfannkuchen viša je znanstvena suradnica zaposlena u Centru za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju. Interdisciplinarni doktorski studij Oceanologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu završila je 2013. godine s doktorskom disertacijom “*Potencijalno toksične dijatomeje roda Pseudo-nitzschia u sjevernom Jadranu: ekološke, taksonomske i molekularne značajke*”. Od 2015. godine članica je Laboratorija za evolucijsku ekologiju, a bavi se taksonomijom fitoplanktona te posjeduje iskustvo u istraživanju ekologije i fiziologije planktonskih organizama, kao i u analizama dugoročnih nizova podataka sjevernog Jadrana. Tijekom karijere radila je na brojnim projektima. Trenutačno je voditeljica HRZZ-ovog uspostavnog projekta *Molekularne životne strategije fitoplanktona Jadranskog mora* i voditeljica radnog paketa na projektu *ALIgning Efforts to control Non-indigenous species in the Adriatic Sea* - ALIENA Interreg Hrvatska-Italija. Kao ekspertica za kvalitativne i kvantitativne analize fitoplanktona za potrebe monitoringa sudjeluje na 2 projekta (Hrvatske vode, Referentni centar za more). Recenzentica je brojnih međunarodnih znanstvenih časopisa, ocjeniteljica za Hrvatsku zakladu za znanost i ocjeniteljica za Hrvatsku akreditacijsku agenciju. Autorica je 44 znanstvena rada objavljena u međunarodnim časopisima, koji su citirani više od 1200 puta s H indexom 18. Sudjelovala je na brojnim međunarodnim skupovima, i to izlaganjima, ali i kao članica organizacijskih odbora.

Ana Baričević viša je znanstvena suradnica zaposlena u Centru za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković. Na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu doktorirala je na temu karakterizacije genske porodice p53 u dagnje *Mytilus galloprovincialis*. Poslijedoktorska usavršavanja provodi na Istituto Nazionale di Oceanografia e Geofisica Sperimentale (OGS) u Italiji i Zoologische Staatssammlung München (ZSM) u Njemačkoj, gdje je sudjelovala u istraživanjima ekologije i raznolikosti morskog planktona. U matičnoj ustanovi sudjeluje u uvođenju i razvoju naprednih molekularnih tehnika i bioinformatičkih metoda u istraživanju morskog planktona. Trenutno je suradnica na više europskih (Interreg Aliena, Brigantine i Miramare) i nacionalnih projekata (HRZZ AdriLife i Spatagen), a kao voditeljica projekta i voditeljica istraživanja za Institut Ruđer Bošković sudjelovala je na projektima Interreg AdriaClim i MPA Networks. U nastavno zvanje docenta izabrana je na Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli gdje je sudjelovala u izvođenju kolegija „*Stanična i molekularna biologija*“ i „*Genetika i evolucija*“ na preddiplomskom studiju Znanost o moru. Koautorica je brojnih znanstvenih radova u prestižnim časopisima te usmenih i poster izlaganja na međunarodnim znanstvenim skupovima. Članica je Hrvatskog botaničkog društva, Federacije europskih fikoloških društava (Federation of European Phycological Societies) i Međunarodnog društva za istraživanje dijatomeja (The International Society for Diatom Research).

MOLEKULARNI MEHANIZMI FIZIOLOŠKOG ODGOVORA EUKARIOTSKOG
FITOPLANKTONA NA PRITISKE U EKOSUSTAVU SJEVERNOG JADRANA

MIA KNJAZ

Centar za istraživanje mora, Institut Ruđer Bošković

Sjeverni Jadran je dinamičan morski ekosustav u kojem brojni okolišni pritisci, a osobito ograničenje fosforom, oblikuju zajednice fitoplanktona. Ranija istraživanja uspješno su opisala godišnje obrasce sukcesije te utvrdila fiziološke odgovore pojedinih dijatomejskih vrsta na ograničenje fosforom. Ipak, istraživanja fitoplanktona sjevernog Jadrana temeljena na molekularnim metodama su malobrojna, a molekularni mehanizmi fiziološkog odgovora vrsta nedovoljno poznati. U ovom istraživanju prvi put su upotrijebljene molekularne metode temeljene na sekvenciranju RNA, transkriptomika i metatranskriptomika, u istraživanju molekularnih mehanizama fizioloških prilagodbi pojedinih vrsta kao i cjelokupnih fitoplanktonskih zajednica sjevernog Jadrana na okolišne pritiske, s naglaskom na ograničenje fosforom. Izrađena je prva javno dostupna referentna baza transkriptoma dijatomeja sjevernog Jadrana, uzgojenih u eksperimentalnim uvjetima promjenjive dostupnosti fosfora. Analizom genske ekspresije metaboličkih puteva te gena koji sudjeluju u metabolizmu fosfora opisani su specifični molekularni mehanizmi fiziološkog odgovora na ograničenje fosforom pojedinih vrsta. Jednogodišnje praćenje taksonomske i funkcionalne dinamike fitoplanktonske zajednice pokazalo je jasne sezonske obrasce potaknute okolišnim čimbenicima, osobito dostupnošću fosfora i silicija, kao i međuvrtnim interakcijama te je omogućilo identifikaciju dosad nepoznatih molekularnih mehanizama fiziološkog odgovora na različite ekološke pritiske.

(170 stranica, 58 slika, 9 tablica, 13 priloga, 237 literaturnih navoda, izvornik na hrvatskom jeziku)

Ključne riječi: fitoplankton, sjeverni Jadran, ograničenje fosforom, transkriptomika, metatranskriptomika

Mentori: dr. sc. Daniela Marić Pfannkuchen i dr. sc. Ana Baričević

Ocjenjivači: izv. prof. dr. sc. Sunčica Bosak, dr. sc. Mirta Smoldaka Tanković, dr. sc. Rade Garić

Zamjena: doc. dr. sc. Maja Mucko

Rad prihvaćen: 7.7.2025.

MOLECULAR MECHANISMS OF THE EUKARYOTIC PHYTOPLANKTON PHYSIOLOGICAL
RESPONSE TO STRESSORS IN THE NORTHERN ADRIATIC ECOSYSTEM

MIA KNJAZ

Center for marine research, Ruđer Bošković Institute

The northern Adriatic is a dynamic marine ecosystem where various environmental pressures, in particular phosphorus limitation, characterise phytoplankton communities. Previous studies have established annual succession patterns and identified physiological responses of individual diatom species to phosphorus limitation. However, research based on molecular methods remains scarce, and the molecular mechanisms underlying these physiological responses are still poorly understood. This study is the first to apply RNA sequencing-based molecular methods, transcriptomics, and metatranscriptomics, to investigate the molecular mechanisms of the physiological response of both individual species and whole phytoplankton communities of the northern Adriatic under environmental stress, with a focus on phosphorus limitation. A publicly available reference transcriptome database of northern Adriatic diatoms, grown under experimental conditions simulating variable phosphorus availability, has been established. Gene expression analyses of metabolic pathways and phosphorus-related genes revealed species-specific molecular mechanisms of adaptation to phosphorus scarcity. A one-year monitoring of the phytoplankton community taxonomic and functional dynamics uncovered clear seasonal patterns determined by environmental factors, in particular the availability of phosphorus and silicon, as well as interactions between species. These findings enabled the identification of previously unknown molecular mechanisms of phytoplankton responses to various ecological pressures.

(170 pages, 58 figures, 9 tables, 13 attachments, 237 references, original in Croatian)

Keywords: phytoplankton, northern Adriatic, phosphorus limitation, transcriptomics, metatranscriptomics

Supervisors: dr. sc. Daniela Marić Pfannkuchen i dr. sc. Ana Baričević

Reviewers: associate prof. dr. sc. Sunčica Bosak, dr. sc. Mirta Smodlaka Tanković, dr. sc. Rade Garić

Substitute: assistant prof. dr. sc. Maja Mucko

Thesis accepted: 7.7.2025.

THESIS SUMMARY

Microbial eukaryotes (protists) play a central role in the functioning of marine ecosystems, as their metabolic activity supports numerous ecosystem functions and services. Phytoplankton, a fundamental component of eukaryotic microbial communities, utilises autotrophy, i.e., photosynthesis, and also mixotrophy as trophic strategies. These communities form the basis of marine food webs, and their biological activity contributes significantly to the biogeochemical cycling of nutrients and oxygen production.

The northern Adriatic (NA) is a coastal region of the Adriatic Sea, located at the northernmost part of the Mediterranean basin. This shallow marine ecosystem, influenced by the Po River and variable circulation patterns, creates dynamic conditions for the growth and development of phytoplankton communities. The Po River is one of the largest freshwater sources for the entire Mediterranean Sea and is characterised by a significantly higher concentration of nitrogen (N) compared to phosphorus (P), often resulting in an unbalanced N:P ratio. Phytoplankton succession in the northern Adriatic has been studied for decades using light microscopy techniques. While a characteristic seasonal succession pattern has been established, variations in the occurrence and abundance of species can occur under fluctuating environmental conditions. The most extensively studied phytoplankton groups include diatoms (Bacillariophyta), dinoflagellates (Dinoflagellata), and coccolithophores (Prymnesiophyceae). Long-term studies of phytoplankton succession have confirmed that diatoms dominate the NA phytoplankton community throughout most of the year, with well-documented seasonal blooms occurring in spring and autumn. Dinoflagellates generally play a less prominent role throughout the annual cycle, with a marked increase in abundance during the summer months. The annual succession of coccolithophores is usually characterised by two abundance peaks: one in winter and another in late spring or early summer. The seasonal dynamics of other phytoplankton groups such as cryptophytes (Cryptophyceae) and green algae (Chlorophyta) remain less well understood. However, several studies have emphasised the ecological importance of small “flagellates” or “phytoflagellates” in the overall NA phytoplankton community. Recent long-term studies have revealed significant changes in the annual succession of phytoplankton. In recent years, molecular approaches based on metabarcoding have been used to study the composition and succession of marine microbial eukaryotes in the northern Adriatic.

Numerous studies have shown that phosphorus is an important limiting factor for phytoplankton growth and development in many marine ecosystems, including the northern Adriatic. Therefore, research efforts have focused on investigating the physiological responses and adaptation mechanisms of phytoplankton to varying phosphorus availability. A wide range of physiological responses have been identified that enable phytoplankton to cope with phosphorus limitation. These include, changes in the activation of membrane transporters for inorganic phosphorus (orthophosphate, PO_4^{3-}) and the acquisition of organic phosphorus compounds (Dissolved Organic Phosphorus, DOP) from the environment through the activity of alkaline phosphatase enzymes as primary physiological responses to fluctuating phosphorus availability. In addition, other adaptive strategies have been identified, including polyphosphate storage, lipid accumulation, intracellular nutrient recycling, and a shift toward phagotrophic nutrition. These responses are recognised as important adaptations to phosphorus limitation. In addition, other physiological changes have been reported, such as changes in photosynthetic activity, cell cycle, transcriptional and translational activity, as well as the formation of resting stages or the production of toxins. More recently, the application of molecular techniques, in particular next-generation sequencing, has enabled the identification of the molecular mechanisms underlying these physiological responses, revealing specific genes and proteins responsible for mediating the observed adaptive strategies.

The physiological response of the northern Adriatic phytoplankton to the fluctuating phosphorus availability has been investigated through *in situ* measurements of alkaline phosphatase enzymatic activity, *in vitro* experiments, and mesocosm studies. Long-term measurements of alkaline phosphatase activity (APA) in whole *in situ* communities or specific size fractions have shown that this is a primary strategy employed by phytoplankton under phosphorus-limiting conditions. In particular, the world's highest recorded APA has been observed in the northern Adriatic. Several studies have focussed on the physiological responses of individual diatom species under *in vitro* phosphorus-limited conditions, and have shown that different diatom taxa use different adaptation strategies. To date, research has been focused primarily on diatoms or overall activity at the community level, which limits the taxonomic resolution of the results. Most studies have addressed mechanisms related to DOP acquisition, changes in photosynthetic activity, lipid composition, or growth rate, while other potentially important physiological responses and

adaptations, previously identified in experimental model systems, have not been adequately explored.

Over the last two decades, transcriptomics has been widely used to study molecular physiological responses of marine eukaryotic phytoplankton to changing environmental conditions. The RNA-seq technique is commonly used in studies investigating physiological responses to variable phosphorus availability and other nutrient limitations as well as ecological stressors. These studies typically involve culturing monoclonal strains of different species under controlled *in vitro* conditions that simulate environmental stressors, such as imbalanced nutrient concentrations, elevated temperatures, or other stress factors, followed by sequencing of the transcriptome. This approach has provided new insights into species-specific physiological responses to environmental changes and has enabled the identification of genes and proteins involved in these adaptive processes. With advances in next-generation sequencing technologies and the development of comprehensive reference databases, metatranscriptomics has been increasingly applied to the study of marine eukaryotic phytoplankton. Metatranscriptomics involves sequencing the RNA of entire communities, providing insights not only into the physiology of individual taxa, but also into the interactions between species and the community's response to environmental factors. Research based on metatranscriptomics has significantly improved our understanding of the phytoplankton ecology in marine systems worldwide. The growing interest of the scientific community in this approach is also reflected in the numerous initiatives to develop reference databases in the form of transcriptomes and genomes. These reference resources improve the taxonomic resolution of metatranscriptomic studies and provide deeper insights into the molecular capacities and functional potential of marine organisms.

In this study, molecular methods based on RNA sequencing were used for the first time to investigate phytoplankton in the northern Adriatic. The first objective was to develop the first reference transcriptome database of diatoms isolated from the northern Adriatic, and cultured under different conditions of phosphorus availability, and to characterise their gene expression profiles. In addition, the study aimed to use metatranscriptomics to describe spatial and temporal patterns of gene expression in the eukaryotic phytoplankton communities of the northern Adriatic, and based on these patterns, to infer ecologically relevant molecular mechanisms underlying physiological responses to environmental conditions. For this purpose, three different datasets were created: northern Adriatic transcriptomes, LTRV meta, and PO meta datasets.

For transcriptome generation, six diatom strains from the monoclonal culture collection of the Centre for Marine Research were subjected to two experimental phosphorus availability conditions: F/2 medium, simulating eutrophic conditions, and P-limit medium, simulating phosphorus-limited conditions. These six species belong to the genera *Pseudo-nitzschia*, *Skeletonema*, *Chaetoceros*, and *Thalassiosira*, which are important components of the northern Adriatic phytoplankton community, with some species occasionally reaching very high abundances. The process of transcriptome generation including sampling, *in vitro* incubations, isolation and sequencing of total RNA, and subsequent bioinformatic processing, is described in detail. The resulting data have been deposited in the publicly accessible European Nucleotide Archive (ENA) under accession numbers PRJEB74140 and PRJEB87874. To assess the quality of the transcriptome, the generated data were compared with transcriptomes of the same species from the Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project (MMETSP), the largest integrated database of marine microbial eukaryotic transcriptomes. The results support the use of the northern Adriatic transcriptomes as reliable references for taxonomic annotation in metatranscriptomic studies. Ordination analyses revealed a clearer clustering of transcriptomes by species rather than by experimental condition, suggesting species-specific molecular capacities. A metabolic fingerprint of metabolic pathways involved in basic cellular processes was created to assess how general metabolism responds to phosphorus limitation. The results indicated that *Thalassiosira* sp. was positively affected, *Skeletonema marinoi* was the most negatively affected species, while species from the genus *Chaetoceros* and *Pseudo-nitzschia mannii* were the least affected by the treatment. A literature review was conducted to identify the physiological responses of marine eukaryotic phytoplankton to phosphorus limitation and the key genes underlying these responses. The most prominent molecular mechanism was the upregulation of the inorganic phosphorus transporter. The obtained SJ transcriptome dataset showed great potential for further research in which the suspected physiological response could be characterised more precisely at the molecular level. For this purpose, targeted bioinformatic protocols need to be applied in future studies.

The LTRV meta and PO meta datasets were generated from natural communities sampled during the LTRV and Po research cruises in 2021. The monthly LTRV cruises were conducted from April 2021 to March 2022. Two Po cruises were conducted in 2021, one in March and one in June, at four stations along the historical Po transect: RV001, SJ107, SJ101, and SJ108. In addition

to measuring various environmental parameters, metatranscriptomes were extracted from the collected samples. Analysing the annual patterns in the taxonomic and functional succession of the communities revealed an unexpected year-round dominance of dinoflagellates in terms of metabolic activity. The peaks in metabolic activity of other studied groups corresponded to the typical seasonal succession of species, as previously reported. In particular, the expected diatom bloom in spring was not observed, while an autumn bloom dominated by *Pseudo-nitzschia* species was consistently detected. In addition, the metabolic activity of underexplored groups in the northern Adriatic, such as cryptophytes and green algae, showed relatively high and stable contributions to the overall phytoplankton metabolic activity throughout the year, without pronounced peaks. Ordination analyses showed strong seasonal shifts driven by environmental factors, in particular the availability of phosphorus and silicon, as well as interspecies interactions. The observed changes in the activation of different metabolic pathways indicated a seasonal shift in metabolic investment, which varied depending on the taxonomic group. In dinoflagellates, spring conditions favoured rapid population growth, while the rest of the year was characterised by dominant transcriptional activity related to cellular maintenance and adaptive responses. Photosynthesis and phagotrophy proved to be important trophic strategies for all observed phytoplankton groups except diatoms. Both diatoms and dinoflagellates use a variety of strategies to adapt to phosphorus limitation. However, dinoflagellates showed a strong metabolic response to elevated concentrations of dissolved organic phosphorus (DOP) which probably explains their high abundance in summer, when the water column is characterised by low nutrient concentrations but elevated DOP levels. Diatoms showed a strong metabolic response to sudden nutrient influxes, which they exploit to form blooms.

In conclusion, the diatom transcriptomes provided the first insights into the genetic potential of northern Adriatic diatoms to cope with fluctuating phosphorus availability and revealed the molecular mechanisms underlying the physiological responses previously described. Furthermore, gene expression analyses indicated the existence of alternative physiological strategies that may serve as additional adaptive mechanisms allowing these species to survive in a dynamic ecosystem characterised by steep environmental gradients. The publicly available reference transcriptome database for northern Adriatic diatoms should improve taxonomic resolution in metatranscriptomic studies and encourage further application of molecular approaches among researchers studying Adriatic phytoplankton. The metatranscriptomes of natural

communities reflected the complex molecular responses of phytoplankton groups to changing environmental conditions, provided new insights into the metabolism of understudied phytoplankton taxa and highlighted the broader ecological changes currently taking place in the northern Adriatic ecosystem.

This doctoral dissertation consists of eight main chapters. Chapter 1 (Introduction) begins by presenting the research topic and outlining the structure of the thesis. Afterwards, it is divided into five subsections. These provide a description of the northern Adriatic ecosystem, an overview of research on phytoplankton succession in the northern Adriatic, the molecular mechanisms of phytoplankton response to phosphorus limitation identified to date and the principles of applying transcriptomics and metatranscriptomics in studies of eukaryotic phytoplankton. The last subchapter presents the research objectives and hypotheses. Chapter 2 (Materials and Methods) is divided into two sections according to the methodology used, transcriptomics and metatranscriptomics. Chapter 3 presents the results, organized into separate subsections for each generated dataset (northern Adriatic transcriptomes, LTRV meta, and Po meta). The Discussion, presented in Chapter 4, is structured into three subsections, each interpreting the results of a specific dataset. In Chapter 5 (Conclusion), the scientific contribution of the research is highlighted, and the main and additional findings are summarized. The dissertation concludes with Chapters 6 to 8, which include the References, Supplementary Information, and author's Curriculum vitae.

The results obtained from the analysis of the SJ transcriptome dataset were published in research article: Knjaz, M., Baricevic, A., Tankovic, M. S., Kuzat, N., Vlasicek, I., Grizancic, L., Podolsak, I., Pfannkuchen, M., Kogovsek, T., i Pfannkuchen, D. M. (2024). First regional reference database of northern Adriatic diatom transcriptomes. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-67043-4>

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Ekosustav sjevernog Jadrana	2
1.2. Sukcesija fitoplanktona u sjevernom Jadranu	3
1.3. Utjecaj ograničenja fosforom na fitoplankton	5
1.3.1. Fosfor	5
1.3.2. Molekularni mehanizmi prilagodbe na ograničenje fosforom	6
1.3.3. Fiziološki odgovor fitoplanktona sjevernog Jadrana na ograničenje fosforom	11
1.4. Molekularne metode temeljene na sekvenciranju RNA	12
1.4.1. Opća načela	12
1.4.2. Primjena transkriptomike i metatranskriptomike u istraživanju fitoplanktona	13
1.4.3. Referentne baze podataka	14
1.4.4. Bioinformatička obrada	16
1.5. Ciljevi istraživanja i hipoteze	21
2. MATERIJALI I METODE	22
2.1. Izrada i obrada transkriptoma	23
2.1.1. Uzorkovanje i uspostava monoklonalnih kultura	23
2.1.2. Molekularna identifikacija vrsta	25
2.1.3. In vitro eksperimentalne inkubacije	27
2.1.4. Izolacija ukupne RNA i sekvenciranje transkriptoma	27
2.1.5. Bioinformatička obrada transkriptoma	28
2.1.6. Usporedba sa transkriptomima iz baze MMETSP	29
2.1.7. Funkcionalna analiza SJ transkriptoma	30
2.2. Izrada i obrada metatranskriptoma	32
2.2.1. Uzorkovanje zajednice i prikupljanje okolišnih parametara	32
2.2.2. Izolacija ukupne RNA i sekvenciranje metatranskriptoma	35
2.2.3. Bioinformatička obrada metatranskriptoma	36
2.2.4. Dodjeljivanje taksonomske pripadnosti fitoplanktonskim grupama	36
2.2.5. Normalizacija kvantifikacije između grupa	37
2.2.6. Normalizacija kvantifikacije unutar grupa	37
2.2.7. Analize ordinacije	38

2.2.8.	Obrasci ekspresije gena i metaboličkih putovaa	39
3.	REZULTATI	41
3.1.	Skup podataka SJ transkriptomi	41
3.1.1.	Struktura skupa podataka SJ transkriptomi	41
3.1.2.	Usporedba SJ transkriptoma s transkriptomima iz baze MMETSP	45
3.1.3.	Funkcionalna analiza skupa podataka SJ dijatomeja	51
3.2.	Skup podataka LTRV meta	56
3.2.1.	Struktura skupa podataka LTRV meta	56
3.2.2.	Okolišni parametri	57
3.2.3.	Taksonomska sukcesija aktivnosti fitoplanktonske zajednice	60
3.2.4.	Funkcionalna analiza skupa podataka LTRV meta	67
3.2.5.	Obrasci ekspresije metaboličkih putova i gena	80
3.3.	Skup podataka Po meta	102
3.3.1.	Okolišni parametri	102
3.3.2.	Taksonomska raspodjela fitoplanktonske zajednice	104
3.3.3.	Obrazac ekspresije metaboličkih puteva i odabranih gena	110
4.	RASPRAVA	114
4.1.	Skup podataka SJ transkriptomi	114
4.1.1.	Opće karakteristike skupa podataka SJ transkriptoma	114
4.1.2.	Metabolički obrasci	117
4.2.	Skup podataka LTRV meta	120
4.2.1.	Godišnja sukcesija fitoplanktona	120
4.2.2.	Ordinacijski obrasci fitoplanktonske zajednice	123
4.2.3.	Metabolički obrasci grupe Dinoflagellata	124
4.2.4.	Metabolički obrasci ostalih fitoplanktonskih grupa	128
4.3.	Skup podataka Po meta	132
4.3.1.	Prostorno-vremenska karakterizacija metaboličkog obrasca fitoplanktonske zajednice	132
5.	ZAKLJUČAK	136
6.	LITERATURA	139
7.	PRILOZI	162
8.	ŽIVOTOPIS	170

1. UVOD

Mikrobni eukarioti (protisti) ključni su u funkcioniranju morskih ekosustava. Metabolička aktivnost eukariotskih mikrobnih zajednica osigurava niz funkcija i usluga ekosustava. Široki raspon trofičkih strategija ovih organizama uključuje autotrofiju, fagotrofiju i miksotrofiju kao oblik prehrane koji kombinira karakteristike autotrofije i heterotrofije unutar iste vrste (Caron i sur., 2017). Fitoplankton, sastavni dio eukariotskih mikrobnih zajednica, koristi autotrofiju, tj. fotosintezu i miksotrofiju kao trofičku strategiju (Caron i sur., 2017; K. J. Flynn i sur., 2019; K. J. Flynn i Mitra, 2009; Stoecker i sur., 2017). Fitoplanktonske zajednice čine početnu kariku u morskim hranidbenim mrežama, a njihova aktivnost značajno doprinosi biogeokemijskom kruženju hranjivih tvari i proizvodnji kisika (Caron i sur., 2012; Carradec i sur., 2018; De Vargas i sur., 2015; Falkowski i sur., 2008).

Sjeverni Jadran (SJ) je plitki obalni morski ekosustav, koji pod utjecajem rijeke Po te promjenjivih cirkulacijskih obrazaca stvara dinamične uvjete za rast fitoplanktonskih zajednica. Sukcesija fitoplanktonske zajednice sjevernog Jadrana *in situ* već se dugi niz godina proučava metodom svjetlosne mikroskopije (Aubry i sur., 2004, 2012; Cerino i sur., 2019; Godrijan i sur., 2013; Marić i sur., 2012; Mozetič i sur., 2012; Totti i sur., 2019; Vlašiček i sur., 2025), a posljednjih godina započela je i primjena molekularnih metoda, primarno metabarkodinga (engl. *metabarcoding*) za detekciju vrsta (Armeli Minicante i sur., 2019; Cordier i sur., 2019; Grižančić i sur., 2023). Uz to, aspekti fiziologije pojedinih vrsta proučavani su *in vitro*, u laboratorijskim eksperimentima (Kužat i sur., 2022; Smodlaka Tanković i sur., 2018; Vrana i sur., 2023). Utvrđena je karakteristična godišnja sukcesija fitoplanktonske zajednice (Aubry i sur., 2004) koja ipak pod utjecajem promjenjivih okolišnih uvjeta može odstupati od karakterističnog obrasca. Također, istraživanja su pokazala da je dostupnost fosfora (P) jedan od glavnih čimbenika koji oblikuju sastav i brojnost zajednica fitoplanktona u sjevernom Jadranu kao i u mnogim drugim obalnim ekosustavima (Grilli i sur., 2020; Ivančić i sur., 2021). Međutim, u posljednjih desetak godina brojna istraživanja sve češće opisuju značajnija odstupanja od karakterističnih obrazaca pojavnosti i abundancije fitoplanktonskih vrsta u sjevernom Jadranu (Cerino i sur., 2019; Mozetič i sur., 2012; Totti i sur., 2019; Vlašiček i sur., 2025).

Studije fitoplanktona sjevernog Jadrana temeljene na molekularnim metodama transkriptomike i metatranskriptomike nedostaju. Ove metode, primjenom tehnike sekvenciranja

ukupne RNA (*RNA-seq*), omogućuju uvid u ekspresiju gena, a time i bolje razumijevanje molekularnih mehanizama fiziološkog odgovora vrsta ili prirodnih zajednica na uvjete u kojima žive.

U ovom radu predstavljeno je prvo istraživanje fitoplanktona sjevernog Jadrana temeljeno na metodama transkriptomike i metatranskriptomike. U okviru istraživanja stvorena su tri skupa podataka: *SJ transkriptimi*, *LTRV meta* i *Po meta*. Skup podataka *SJ transkriptomi* izrađen je iz monoklonalnih kultura fitoplanktonskih stanica zbirke Centra za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković (CIM). Ovaj skup obuhvaća 12 transkriptoma 6 vrsta dijatomeja izoliranih iz sjevernog Jadrana, uzgojenih *in vitro*, u dva uvjeta različite dostupnosti fosfora. Skup podataka *SJ transkriptomi* korišten je za izradu prve javno dostupne regionalne referentne baze transkriptoma sjevernog Jadrana (Knjaz i sur., 2024), kao i u analizama obrazaca genske ekspresije različitih vrsta u uvjetima limitacije fosfora. Skupovi podataka *LTRV meta* i *Po meta* izrađeni su iz prirodnih zajednica uzorkovanih tijekom krstarenja LTRV i rijekom Po provedenih u 2021. godini. Skup *LTRV meta* sadrži 24 metatranskriptoma, izolirana iz uzoraka prikupljenih na dvije postaje tijekom 12 mjeseci, a korišten je za opisivanje godišnje taksonomske i funkcionalne sukcesije fitoplanktona. Skup *Po meta* sadrži 12 metatranskriptoma izoliranih iz uzoraka prikupljenih na četiri postaje duž povijesnog transketa Po tijekom dva mjeseca. Korišten je za utvrđivanje molekularnih mehanizama fiziološkog odgovora fitoplanktona na promjenjive uvjete dostupnosti fosfora u okolišu.

1.1. Ekosustav sjevernog Jadrana

Sjeverni Jadran (SJ) je obalno područje Jadranskog mora, smješteno na najsjevernijem rubu Mediteranskog bazena. Ovo poluzatvoreno, plitko more s jedinstvenim hidrogeografskim karakteristikama čini vrlo dinamičan ekosustav.

Na istočnoj obali istočna jadranska struja (engl. *Eastern Adriatic current* - EAC) unosi oligotrofnu vodu visokog saliniteta te niske koncentracije nutrijenata u sjeverni Jadran, dok na zapadnoj obali rijeka Po unosi eutrofnu vodu niskog saliniteta, bogatu hranjivim tvarima (Degobbi i sur., 2000). Rijeka Po jedan je od najvećih izvora slatke vode za cijeli Mediteran (Degobbi i Gilmartin, 1990). Osim toga, karakterizira je značajno viša koncentracija dušika (N) u usporedbi s

fosforom (P) (Cozzi i Giani, 2011), što često dovodi do neuravnoteženog omjera N:P u sjevernom Jadranu.

Sezonska hidrodinamika sjevernog Jadrana u kombinaciji s unosima iz rijeke Po snažno utječe na dostupnost hranjivih tvari ključnih za rast fitoplanktona. U proljeće, povećani riječni protok dovodi do rasta biomase fitoplanktona, osobito uz zapadnu obalu (Degobbi i sur., 2000; Socal i sur., 2008). Tijekom ljeta, stratifikacija vodenog stupca i slabljenje dotoka EAC-a u sjevernom Jadranu uzrokuju zadržavanje riječne vode u površinskom sloju, što dovodi do pada saliniteta (Socal i sur., 2008). Iako rijeka donosi hranjive tvari, fitoplankton ih brzo troši, dovodeći koncentracije hranjivih tvari tijekom ljeta na njihov godišnji minimum (Degobbi i sur., 2000). U jesen, riječni protok ponovno se povećava, a prati ga i postupno pojačanje dotoka EAC-a. Hlađenje vodenog stupca pospješuje vertikalno miješanje, što može dovesti do uzdizanja hranjivih tvari iz dubljih slojeva te pozitivno utječe na povećanje biomase fitoplanktona. Tijekom zime, riječni unos doseže svoj minimum, a EAC pokazuje svoj maksimum dok zapadna jadranska struja (engl. *Western Adriatic current* - WAC) odvodi vodu niskog saliniteta iz regije (Degobbi i sur., 2000). Miješanje vodenog stupca dovodi do formiranja izotermnog sloja (Franco i Michelato, 1992) što doprinosi podizanju hranjivih tvari iz dubljih slojeva prema površini te može uzrokovati povremene poraste biomase fitoplanktona. Sveukupno, unos rijeke Po stvara izražene prostorno vremenske ekološke gradijente u sjevernom Jadranu (Zavatarelli i sur., 1998, 2000), koji u kombinaciji s morskim strujama stvaraju dinamične ekološke uvjete za rast fitoplanktona.

1.2. Sukcesija fitoplanktona u sjevernom Jadranu

Sukcesija fitoplanktona u sjevernom Jadranu proučava se metodama svjetlosne mikroskopije već dugi niz godina. Utvrđena je karakteristična sezonska sukcesija, međutim, pod utjecajem promjenjivih okolišnih uvjeta mogu se pojaviti odstupanja od karakterističnih obrazaca u pojavnosti i brojnosti vrsta (Aubry i sur., 2004, 2012; Godrijan i sur., 2013; Marić i sur., 2012; Mozetić i sur., 2012; Totti i sur., 2019). Najopsežnije proučavane skupine fitoplanktona uključuju dijatomeje (Bacillariophyta), dinoflagelate (Dinoflagellata) i kokolitoforide (Prymnesiophyceae).

Dugogodišnje studije sukcesije pokazuju da dijatomeje dominiraju fitoplanktonskom zajednicom tijekom većeg dijela godine (Aubry i sur., 2004, 2012; Godrijan i sur., 2013; Marić i sur., 2012). Cvatanje dijatomeja u sjevernom Jadranu često imaju sezonalni karakter, te je njihova

pojavnost u sjevernom Jadranu detaljno opisana. Tako je poznato da vrste roda *Skeletonema* redovito cvjetaju zimi i u rano proljeće, što se podudara s porastom koncentracije hranjivih tvari (Aubry i sur., 2004; Marić Pfannkuchen i sur., 2018). Međutim, novija istraživanja ukazala su na smanjen intenzitet i vremenski pomak cvatnje vrsta roda *Skeletonema* (Totti i sur., 2019). Istraživanja fitoplanktona sjevernog Jadrana opisuju i karakterističnu jesensku cvatnju dijatomeja, kojom često dominiraju vrste rodova *Chaetoceros* i *Pseudo-nitzschia* (Godrijan i sur., 2013; Marić i sur., 2012; Neri i sur., 2022).

Uloga dinoflagelata u fitoplanktonskoj zajednici u većem je dijelu godine manje značajna nego uloga dijatomeja. Zabilježeni su primjetni porasti brojnosti dinoflagelata u lipnju i srpnju, nakon proljetne cvatnje dijatomeja, kada se koncentracije hranjivih tvari smanjuju (Aubry i sur., 2004). Međutim, kao i kod dijatomeja, novija istraživanja upućuju na promjene u sezonskoj dinamici dinoflagelata i njihovu povećanu prisutnost u proljeće (Totti i sur., 2019; Vlašiček i sur., 2025) uz prisutnost vrsta kao što su *Prorocentrum cordatum* i *Noctiluca scintillans* (Totti i sur., 2019).

Godišnju sukcesiju kokolitoforida u sjevernom Jadranu karakteriziraju dva perioda porasta brojnosti. Primarni period povećane brojnosti događa se zimi (prosinac – veljača), a povezan je sa zimskim miješanjem vodenog stupca. Vrsta koja tada dominira je uglavnom *Emiliania huxleyi*. Sekundarni period povećane brojnosti događa se u svibnju i lipnju, podudarajući se s povećanjem intenziteta svjetlosti i početkom sezonske stratifikacije (Cerino i sur., 2017). Sekundarni period povećane brojnosti karakteriziran je povećanjem brojnosti više različitih vrsta kokolitoforida, a izdvajaju se vrste roda *Syracosphaera* spp. (Cerino i sur., 2017). Novija istraživanja utvrdila su značajno smanjenje brojnosti kokolitoforida tijekom zime (Totti i sur., 2019). Ostale skupine fitoplanktona, poput zelenih algi (Chlorophyta) i kriptofita (Cryptophyta), koje uglavnom čine manji flagelati (pico i nano veličinska frakcija), nisu bile primarni fokus ranijih studija sukcesije temeljenih na svjetlosnoj mikroskopiji, međutim njihova prisutnost ipak je opisana. Nekoliko studija naglašava važnost malih "flagelata" ili "fitoflagelata" (engl. *Phytoflagellates*) u ukupnoj brojnosti fitoplanktona (Cerino i sur., 2017; Marić i sur., 2012).

U posljednjih nekoliko godina molekularne metode temeljene na metabarkodiranju upotrebljavane su u istraživanju sastava i sukcesije morskih mikrobnih eukariota u sjevernom Jadranu (Armeli Minicante i sur., 2019; Cordier i sur., 2019; Grižančić i sur., 2023). Istraživanja temeljena na metabarkodiranju potvrdila su dugogodišnji model dominacije dijatomeja i

dinoflagelata u fitoplanktonu sjevernog Jadrana, ali su također pružile i nove uvide u važnost dinoflagelata u fitoplanktonskim zajednicama sjevernog Jadrana.

U periodu od 1970-ih do 2010. godine, u nekoliko studija temeljenih na dugoročnim podacima, uočeno je smanjenje koncentracije klorofila *a* u sjevernom Jadranu (Colella i sur., 2016; Giani i sur., 2012; Grilli i sur., 2020; Mozetič i sur., 2010). Koncentracija klorofila *a*, mjerena kemijskim metodama ili satelitski, smatra se dobrom aproksimacijom (engl. *proxy*) za biomasu fitoplanktona. Stoga, pojedini autori bilježe smanjenje koncentracije klorofila *a* povezuju sa pretpostavljenim trendovima o smanjenju koncentracije fosfata i amonijaka, tj. s oligotrofikacijom sjevernog Jadrana. Međutim, Grilli i sur. (2020) uočavaju povećanje koncentracije klorofila *a* u sjevernom Jadranu nakon 2010. godine te naglašavaju kako je zabilježene trendove o oligotrofikaciji sjevernog Jadrana potrebno razmotriti na temelju novih oceanografskih podataka. Ipak, naglašavaju kako uočene promjene u sjevernom Jadranu od 2008-2015 godine u vidu visoko varijabilnog riječnog režima, porasta koncentracije klorofila *a*, koncentracije nitrata i ortosilikata te visoki omjer nitrata i fosfata (N:P ili Redfieldov omjer) mogu ukazivati na utjecaj klimatskih promjena na ekosustav sjevernog Jadrana. Osim toga, u studijama temeljenim na dugoročnim podacima o sastavu i abundanciji vrsta, korištenjem svjetlosne mikroskopije, uočene su značajne promjene u godišnjoj sukcesiji fitoplanktona (Totti i sur., 2019; Vlašiček i sur., 2025) i pojavnosti vrsta (Marić Pfannkuchen i sur., 2018). Dosadašnja istraživanja upućuju na to da dolazi do promjena u funkcioniranju ekosustavu sjevernog Jadrana koje utječu na fitoplanktonsku zajednicu.

1.3. *Utjecaj ograničenja fosforom na fitoplankton*

1.3.1. *Fosfor*

Fosfor (P) je esencijalni nutrijent za sva živa bića. Sastavni je dio nukleinskih kiselina (DNA i RNA) i fosfolipida (Paytan i McLaughlin, 2007). Fosfor zato ima važnu ulogu u očuvanju i replikaciji genetičkih informacija, transkripciji i translaciji proteina te održavanju integriteta stanične membrane. Također, u procesima poput staničnog disanja i fotosinteze sudjeluje u stvaranju kemijske energiju u obliku ATP-a (adenozin-trifosfat) te NADH (reducirani oblik nikotinamid adenin dinukleotida) i NADPH (reducirani oblik nikotinamid adenin dinukleotid fosfata) potrebnih za održavanje metabolizma i neophodnih za proces fiksacije ugljika (Falkowski

i Raven, 2007). Fosfor također ima ulogu u regulaciji aktivnosti proteina kroz procese fosforilacije i defosforilacije te sudjeluje u različitim signalnim putovima kroz molekule kao što su AMP (adenozin-monofosfat) ili IP3 (inositol-trifosfat) (Cooper i Adams, 2022). Najveća količina fosfora u fitoplanktonskim stanicama nalazi se u RNA molekulama, a slijede je DNA i fosfolipidi (Geider i La Roche, 2002).

1.3.2. Molekularni mehanizmi prilagodbe na ograničenje fosforom

Morski fitoplankton primarno uzima fosfor iz okoliša putem aktivnog transporta anorganskog fosfora, tj. ortofosfata (PO_4^{3-}), jer se ovaj oblik može izravno asimilirati i koristiti u staničnom metabolizmu i rastu (Falkowski i Raven, 2007). Eksperimentalno je pokazano da fitoplanktonske vrste, u promjenjivim uvjetima dostupnosti anorganskog fosfora, koriste različite membranske transportne proteine visokog ili niskog afiniteta (S. Lin i sur., 2016). Membranski transporteri niskog afiniteta djeluju kada su koncentracije anorganskog fosfora u okolišu visoke (S. Lin i sur., 2016). Suprotno tome, membranski transporteri visokog afiniteta djeluju kada su koncentracije anorganskog fosfora u okolišu niske, ali zahtijevaju veći utrošak energije (S. Lin i sur., 2016). Molekularna identifikacija nukleinskih sljedova gena koji kodiraju za membranske transportere anorganskog fosfora, otkrila je nekoliko proteinskih obitelji i tipova fosfatnih transportera kod prokariota i eukariota (S. Lin i sur., 2016; Matsui i sur., 2024). Homolozi ovih gena otkriveni su u genomima, transkriptomima i proteomima skupina dinoflagelata (S. Lin i sur., 2016), dijatomeja (Armbrust i sur., 2004; Bowler i sur., 2008), haptofita (Beszteri i sur., 2012; Dyhrman i sur., 2006a) i zelenih algi (Moseley i sur., 2006; Worden i sur., 2009).

Kod sisavaca, geni SLC34 i SLC20 kodiraju za Na^+/Pi kotransportere (Collins i sur., 2004; Magagnin i sur., 1993). SLC34 se smatra transporterom visokog afiniteta, a SLC20 transporterom niskog afiniteta. Homolozi SLC gena potvrđeni su i u transkriptomima dijatomeja (Alipanah i sur., 2018; Shih i sur., 2015; Yang i sur., 2014). Istraživanja temeljena na transkriptomici pokazala su da se razina ekspresije dvaju kandidata za Na^+/Pi kotransportere, Pt40433 i Pt47667, povećava u uvjetima ograničenja fosfata, a oba proteina su lokalizirana na plazmatskoj membrani dijatomeje *Phaeodactylum tricornutum* (Cruz de Carvalho i sur., 2016; Dell'Aquila, 2020). Dodatno, Matsui i sur. (2024), na osnovi povećane ekspresije SLC homologa kod modelnih vrsta dijatomeja *Thalassiosira pseudonanna* i *Phaeodactylum tricornutum* u uvjetima ograničenja fosfora te

lokalizacije navedenih gena, potvrđuju da su membranski transporteri anorganskog fosfata kod dijatomeja primarno SLC proteini.

Homolozi PHO gena u kvascima i višim biljkama kodiraju za H^+/Pi ili Na^+/Pi kotransportere visokog i niskog afiniteta (Hürlimann i sur., 2009). Geni PHO84 i PHO89 kodiraju za transportere visokog afiniteta te pokazuju povećanu ekspresiju u uvjetima limitacije fosforom (Berhe i sur., 1995; Bun-ya i sur., 1991; Martinez i Persson, 1998), a PHO87 i PHO90 kodiraju za transportere niskog afiniteta te pokazuju povećanu ekspresiju u uvjetima dostatne koncentracije anorganskog fosfora (Bun-ya i sur., 1996; Ogawa i sur., 2000). Homolozi PHO gena utvrđeni su i u predstavnicima morskih mikrobnih eukariota. Primjerice, eksperimentalno je pokazana povećana ekspresija PHO transportera kod zelene alge *Tetraselmis chui* u uvjetima limitacije fosforom (Chung i sur., 2003). Također, homolozi PHO gena pronađeni su i u transkriptomima dinoflagelata *Alexandrium minutum* (S. Lin i sur., 2016) i *Prorocentrum donghaiense* (S. Lin i sur., 2016; Zhang i sur., 2019.). U transkriptomima vrsta *Primnesium parvum* (Beszteri i sur., 2012) i *Emiliania huxley* (Dyhrman i sur., 2006a) uzgojenim u uvjetima limitacije fosfata, zabilježena je povećana ekspresija fosfat permeaza visokog afiniteta (engl. *Phosphate-repressible phosphate permease*), a nekoliko homologa različitih transportera fosfata pronađeno je i u pangenomu vrste *E. huxley* (Read i sur., 2013).

Fosfor u organskim oblicima (engl. *Dissolved organic phosphorus* – DOP) zahtijeva prethodnu konverziju u anorganski oblik kako bi se mogao koristiti za stanični metabolizam i rast, što za fitoplankton podrazumijeva veći energetske utrošak (Falkowski i Raven, 2007). Međutim, istraživanja su pokazala da je DOP važan izvor fosfora za fitoplankton osobito u regijama u kojima je prisutna mala koncentracija anorganskog fosfora, a povremeno velika koncentracija DOP-a (Ivančić i sur., 2021; Mather i sur., 2008; McLaughlin i sur., 2013; Wu i sur., 2000). DOP se u morskim okolišima nalazi u nekoliko oblika od kojih 80-85% čine fosfatni esteri (fosfomonoesteri i fosfodiesteri), 5-10% fosfonata te 8-13% polifosfati (Young i Ingall, 2010).

Najvažnijim enzimom koji fitoplankton koristi za akviziciju DOP-a smatra se alkalna fosfataza koja sudjeluje u akviziciji fosfomonoestera. Brojna *in situ* istraživanja fitoplanktonske akvizicije DOP-a temeljena su na mjerenjima enzimatske aktivnosti alkalne fosfataze upotrebom fluorescentnih supstrata kao što su MUF-P (engl. *4-methylumbelliferyl-phosphate*) ili ELF97 (engl. *Enzyme-labeled fluorescence ELF-97*) (S. Lin i sur., 2016), a aktivnost enzima alkalne fosfataze smatra se dobrim indikatorom ograničenja fosforom u morskom okolišu (Dyhrman i

Ruttenberg, 2006; Lomas i sur., 2010). U usporedbi s upotrebom ovih metoda, manji je broj istraživanja bio usmjeren na otkrivanje nukleotidnih sljedova gena koji kodiraju za alkalne fosfataze (H. Y. Lin i sur., 2013; X. Lin i sur., 2011, 2012a, 2012b, 2015; Xu i sur., 2006). Molekularna identifikacija otkrila je nekoliko tipova alkalnih fosfataza kod prokariota i eukariota. To su primarno: PhoA, PhoV, PhoD i PhoX tipovi (S. Lin i sur., 2016). Istraživanja su pokazala da su alkalne fosfataze identificirane u dijatomejama, pelagofitima, dinoflagelatima i haptofitima sličnije PhoA tipu nego drugim bakterijskim alkalnim fosfatazama (X. Lin i sur., 2012a). Također ove PhoA slične alkalne fosfataze (engl. *PhoA-like alkaline phosphatases*) pronađene u dinoflagelatima, dijatomejama i kokolitoforidima (tzv. crvena linija), međusobno su sličnije nego alkalne fosfataze zelenih algi (tzv. zelena linija) (X. Lin i sur., 2012a).

Budući da alkalne fosfataze primarno ciljaju fosfomonoestere, tradicionalna mjerenja njihove aktivnosti korištenjem supstrata kao što su MUF-P ili ELF97, zanemaruju mogućnost alternativne strategije iskorištavanja fosfodiesterata. U novije vrijeme započela su istraživanja simultanog *in situ* mjerenja aktivnosti enzima, koristeći zasebne supstrate za detekciju aktivnosti monoesteraza (tj. alkalnih fosfataza) i diesteraza (K. Huang i sur., 2022; Thomson i sur., 2020; Van Wambeke i sur., 2024). Rezultati ovih istraživanja pokazali su korelaciju između ekspresije oba tipa enzima, negativnu korelaciju aktivnosti oba enzima s koncentracijama anorganskog fosfora te pozitivnu korelaciju s koncentracijama DOP-a. Ovi nalazi upućuju na to da akvizicija fosfodiesterata predstavlja važnu strategiju za iskorištavanje fosfora, međutim potrebna su daljnja istraživanja kako bi se molekularno okarakteriziralo enzime koji sudjeluju u ovom procesu.

Fosfonati predstavljaju oblik DOP-a, karakteriziran stabilnom kovalentnom vezom između ugljika i fosfora (C–P), čije je cijepanje energetski zahtjevnije u usporedbi s esterskom vezom ugljik-kisik-fosfor (C–O–P) (S. Lin i sur., 2016). U brojnim organizmima fosfonati se javljaju kao sastavni dijelovi fosfoproteina i fosfolipida staničnih membrana (Villarreal-Chiu i sur., 2012). Heterotrofni prokarioti dokazano posjeduju sposobnost metaboliziranja fosfonata (McGrath i sur., 2013), a slična sposobnost identificirana je i kod cijanobakterija (Dyhrman i sur., 2006b); Gomez-Garcia i sur., 2011; Ilikchyan i sur., 2009). U heterotrofnih prokariota utilizacija fosfonata najčešće uključuje aktivnost enzimatskih sustava C–P hidrolaze (engl. *C-P hydrolase*) ili C–P lijaze (engl. *C-P lyase*), dok cijanobakterije posjeduju isključivo sustav C–P lijaze (Dyhrman i sur., 2006b; McGrath i sur., 2013). Sposobnost morskih mikrobnih eukariota da koriste fosfonate kao izvor fosfora još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Cui i sur. (2016) u transkriptomima dinoflagelata

identificirali su gene *phnW* i *phnX*, koji kodiraju za ABC transportere (engl. *ATP-binding cassette transporter family*) fosfonata, koji su dio enzimatskog sustava C-P hidrolaze. Međutim, eksperimentalni podaci pokazuju da proučavane vrste dinoflagelata ne koriste fosfonate iz medija, a navedeni geni ne pokazuju povećanu ekspresiju. Ipak, najnovija istraživanja potvrđuju da dijatomeje *Phaeodactylum tricornutum* i *Thalassiosira pseudonana* u kulturama mogu rasti na fosfonatima kao jedinom izvorom fosfora (Shu i sur., 2022, 2024). Autori su dodatno sugerirali da *Phaeodactylum tricornutum* unosi fosfonate iz okoliša putem alternativnog mehanizma klatrin-posredovane endocitoze (engl. *Clathrin-mediated endocytosis*), pri čemu se fosfonati izravno ugrađuju u fosfolipide stanične membrane bez prethodne C–P hidrolize (Shu i sur., 2024).

Višak fosfora u stanicama fitoplankton može spremati u obliku polifosfata (PolyP) (S. Lin i sur., 2016). PolyP je linearna molekula koja se sastoji od nekoliko do nekoliko stotina molekula ortofosfata (PO_3^{4-}), povezanih stabilnom fosfoanhidridnom vezom (Kornberg i sur., 1999). U stanicama, PolyP ima ulogu rezerve fosfora, kao i rezerve energije (Achbergerová Nahálka, 2011; Kornberg i sur., 1999). Te se molekule često nakupljaju u vakuoli tijekom procesa poznatog kao „luksuzni unos“ te omogućuju fitoplanktonu da iskoristi lako dostupnu zalihu anorganskog fosfata u uvjetima kada je fosfor ograničen ili nedostatan (Sforza i sur., 2018; A. Solovchenko i sur., 2019a, 2109b). Molekularna karakterizacija otkrila je nekoliko ključnih enzima koji sudjeluju u metabolizmu PolyP. Polifosfat kinaza (engl. pop kinase – PPK) katalizira reverzibilnu reakciju stvaranja PolyP-a iz ATP-a. Pronađena je u heterotrofnim prokariotima te cijanobakterijama (Kornberg i sur., 1999; Rocap i sur., 2003), ali za sada ne i u genomima eukariota (S. Lin i sur., 2016). Prokarioti i eukarioti ipak dijele enzime poput egzofosfataze (engl. exophosphatase – PPX) i endofosfataze (engl. endophosphatase) koji kataliziraju hidrolizu PolyP-a u ortofosfat (Kornberg i sur., 1999). U kvascima i ostalim eukariotima PolyP se često nalazi u vakuolama, a njegovu formaciju kataliziraju vakuolarni transportni šaperoni 1-4 (engl. *Vacuolar transport chaperone* – VTC1-4) (Ogawa i sur., 2000). Homolozi VTC4 gena pronađeni su i u genomima dijatomeja (Armbrust i sur., 2004; Bowler i sur., 2008). Trenutačno ne postoje izravni dokazi da eukariotski fitoplankton može aktivno preuzimati PolyP iz okoliša putem specifičnih transportnih sustava.

Vrste morskih mikrobnih eukariota u uvjetima nedostatka nutrijenata akumuliraju lipide. Akumulacija lipida smatra se odgovorom na stres jer se metabolizam preusmjerava iz produkcije biomase i razmnožavanja na spremanje energije (Fields i sur., 2014). Primjerice, eksperimentalno je utvrđeno da dijatomeja *Phaeodactylum tricornutum* u uvjetima ograničenja fosforom povećava

ukupnu količinu masnih kiselina, tj. triacilglicerola (TAG) u stanicama, dok se brojnost stanica smanjuje (Alipanah i sur., 2018; Yang i sur., 2014). Također, morski mikrobni eukarioti u uvjetima ograničenja fosforom zamjenjuju fosfolipide membrana, nefosfornim lipidima (Gašparović i sur., 2013, 2014; Martin i sur., 2011; van Mooy i sur., 2009). Molekularna karakterizacija nukleotidnih sljedova gena i proteina koji sudjeluju u ovim procesima velikim dijelom ostaje nerazjašnjena. Ipak, studije temeljene na transkriptomici otkrile su nekoliko skupina gena koji sudjeluju u metabolizmu lipida te pokazuju povećanu ekspresiju u uvjetima ograničenja fosforom. Eksperimentalno je pokazano da se zamjena membranskih fosfolipida modelne biljke *Arabidopsis thaliana* u uvjetima ograničenja fosfora vežu fosfolipazama C tipa (Gaude i sur., 2008; Nakamura i sur., 2005) i D tipa (Cruz-Ramírez i sur., 2006). Slično tome, u transkriptomu dijatomeje *Phaeodactylum tricornutum* tijekom različitih faza limitacije fosforom utvrđena je povećana ekspresija nekoliko različitih fosfolipaza, točnije fosfatidil-inozitol specifičnih fosfolipaza C (PI-PLC) i ostalih fosfolipaza tipa C te fosfolipaza tipa D (Cruz de Carvalho i sur., 2016). Uz to, utvrđena je i povećana ekspresija pretpostavljenog DGTA enzima (ARF4), sulfolipidne sintaze (SQD2), te monogalaktil-diacilglicerol sintaze (MGD2) (Alipanah i sur., 2018; Cruz de Carvalho i sur., 2016).

Uz akumulaciju lipida i recikliranje fosfora remodeliranjem sastava staničnih membrana, Yang i sur. (2014) u transkriptomu dijatomeje *Phaeodactylum tricornutum* uzgojene u uvjetima ograničenja fosfora uočavaju i povećanu ekspresiju nekoliko gena za pirofosfataze. Pirofosfataze su enzimi koji hidroliziraju pirofosfat (PPi), nusprodukt brojnih staničnih procesa poput sinteze DNA i RNA. Autori predlažu da razgradnja pirofosfata predstavlja dodatnu strategiju recikliranja unutar staničnih rezervi fosfora kod ove vrste.

Heterotrofni način ishrane, indukcijom fagotrofije, karakterističan je za mnoge fotosintetske mikrobne eukariote, a pretpostavlja se da je dijelom strategije akvizicije fosfora i drugih nutrijenata u oligotrofnim okolišima (K. J. Flynn i sur., 2013; Hartmann i sur., 2012; Jeong i sur., 2010; Stoecker, 1999; Stoecker i sur., 2017). Potencijalni geni i proteini koji sudjeluju u fagotrofiji identificirani su u vrstama eukariotskog fitoplanktona. To su primjerice proteini koji sudjeluju u klatrin-posredovanoj endocitozi ili autofagiji, a eksperimentalno je pokazano da geni i proteini ovih skupina imaju povećanu ekspresiju u uvjetima ograničenja fosforom kod dinoflagelata *Karenia mikimotoi* (Lei i Lu, 2011), haptofita *Prymnesium parvum* (Beszteri i sur., 2012) i pelagofita *A. anophagefferens* (Wurch i sur., 2011). Također, u nedavnom istraživanju

zajednica dinoflagelata otvorenog oceana, temeljenom na metatranskriptomici, zabilježena je povišena ekspresija gena za katepsin, cisteinske peptidaze, kalretikulin te za komponente aktina i tubulina u mezopelagičkim zonama dok su geni uključeni u fotosintezu imali snižene ekspresije (Cohen i sur., 2021). Stoga autori ove gene povezuju sa heterotrofnim načinom istrage (Cohen i sur., 2021).

1.3.3. Fiziološki odgovor fitoplanktona sjevernog Jadrana na ograničenje fosforom

Fiziološki odgovor fitoplanktona sjevernog Jadrana na promjenjive uvjete dostupnosti fosfora istraživani su putem *in situ* mjerenja enzimatske aktivnosti alkalne fosfataze (Ivančić i sur., 2016, 2021) te *in vitro* eksperimenata na pojedinačnim vrstama (Kužat i sur., 2022; Smodlaka Tanković i sur., 2018) ili prirodnim zajednicama u mezokozmos eksperimentu (Malfatti i sur., 2014). Uz to provedena su i istraživanja lipidnog sastava u *in situ* uvjetima različite dostupnosti nutrijenata (Gašparović i sur., 2013) ili *in vitro* eksperimentu (Vrana i sur., 2023).

Dugogodišnja *in situ* mjerenja enzimatske aktivnosti alkalnih fosfataza pokazala su kako je aktivacija alkalnih fosfataza važna strategija fitoplanktona sjevernog Jadrana u uvjetima ograničene dostupnosti anorganskog fosfora (Ivančić i sur., 2016, 2021). Zanimljivo je da je najviša svjetski zabilježena aktivnost alkalne fosfataze utvrđena upravo u sjevernom Jadranu (Su i sur., 2023). Ivančić i sur. (2021) analizom dugogodišnjeg skupa podataka (2005–2013) utvrđuju sezonski ciklus aktivnosti alkalnih fosfataza, uočen i u prethodnim studijama za istraživano područje. Tijekom hladnijih mjeseci, uslijed vode visokog saliniteta i miješanja vodenog stupca, niske aktivnosti alkalne fosfataze i visoke koncentracije DOP-a ukazivale su na odsustvo stresa izazvanog nedostatkom anorganskog fosfora. S druge strane, aktivnost alkalnih fosfataza znatno se povećavala u proljeće tijekom intruzije vode niskog saliniteta iz rijeke Po, a visoke vrijednosti zadržavala je i tijekom ljeta, što je bilo popraćeno niskim koncentracijama DOP-a i gotovo potpunom potrošnjom anorganskog fosfora u površinskom sloju. Ivančić i sur. (2016) korištenjem fluorescentnog supstrata ELF97, utvrđuju i aktivaciju alkalnih fosfataza na razini pojedinačnih vrsta. Značajna aktivnost zabilježena je kod većeg broja dijatomeja, čak i izvan perioda njihovih cvjetanja, dok je kod dinoflagelata zabilježena samo kod manjeg broja ispitivanih vrsta. Autori predlažu nekoliko mogućih strategija kojima se vrste prilagođavaju uvjetima ograničene

dostupnosti fosfora: aktivaciju alkalnih fosfataza, trošenje unutarstaničnih rezervi (ponajprije PolyP-a) te simbiotske odnose s bakterijama.

Nekoliko studija fokusiralo se na fiziološke odgovore pojedinih vrsta dijatomeja u *in vitro* uvjetima ograničenja fosfora (Kužat i sur., 2022; Smodlaka Tanković i sur., 2018). U ovim istraživanjima, aktivnost alkalnih fosfataza praćena je metodom fluorescentnog supstrata MUF-P kroz vrijeme inkubacije. Lokalizacija alkalnih fosfataza unutar stanica određivana je pomoću ELF97 supstrata, a istovremeno je određivan i sastav staničnih lipida. Istraživane vrste, *Leptocylindrus aporus*, *Leptocylindrus hargravesii* i *Chaetoceros peruvianus* aktivirale su alkalne fosfataze u uvjetima ograničena fosforom, a promjene u morfologiji stanica tj. značajno produženje prevalvarne osi te dodatno produljenje i zadebljanje seta kod vrste *C. peruvianus* autori povezuju s povećanjem površine stanice kako bi se povećala površina za enzime alkalne fosfataze. Kod istraživanih vrsta nije zabilježena značajna promjena u sastavu staničnih lipida.

Dosadašnja istraživanja fiziološkog odgovora fitoplanktona sjevernog Jadrana na ograničenu dostupnost fosfora bila su primarno usmjerena na dijatomeje ili na ukupnu aktivnost alkalne fosfataze zajednice, što ograničava taksonomsku razlučivost. Osim toga, najčešće su istraživani mehanizmi vezani uz akviziciju DOP-a i promjene lipidnog sastava, dok su ostali potencijalni mehanizmi prepoznati u eksperimentalnim modelima ostali nedovoljno istraženi. Istraživanja temeljena na metagenomici i metatranskriptomici do sada potpuno nedostaju u ovom kontekstu.

1.4. Molekularne metode temeljene na sekvenciranju RNA

1.4.1. Opća načela

Sadržaj svih informacija nekog organizma zabilježen je u molekuli DNA ili genomu organizma, a izražen putem procesa transkripcije ili sinteze RNA molekula (Crick, 1970, 1958). Postoje tri glavne vrste RNA molekula: mRNA (glasnička RNA), tRNA (transportna RNA) i rRNA (ribosomalna RNA). Svaka od njih ima svoju specifičnu funkciju. Molekula mRNA služi kao međumolekula koja nosi uputu za sintezu proteina. Dodatnim procesiranjem molekule mRNA, tj. prekrajanjem RNA (engl. *Splicing*) stvara se zrela mRNA koja sudjeluje u procesu translacije i prenoseći informacije za sintezu proteina, molekula koje sudjeluju u izvršavanju svih procesa

unutar stanice. Stoga, poznajući sastav mRNA molekula možemo zaključiti koji geni su aktivirani te koji proteini će biti sintetizirani, odnosno koje procese stanica obavlja u različitim *in vitro* ili *in situ* uvjetima. Transkriptom predstavlja zbroj svih transkripata, tj. svih RNA molekula koje se nalaze u stanici u nekom trenutku, a transkriptomika je znanost koja objedinjuje tehnike proučavanja transkriptoma (Lowe i sur., 2017). Dominantne suvremene tehnike uključuju RNA-mikročipove (engl. *RNA-microarray*) i RNA-seq, a razvijene su 1990-ih i 2000-ih godina (Lowe i sur., 2017). qPCR predstavlja dodatnu tehniku koja se često koristi u validaciji prve dvije tehnike, a razvijena je 1990-ih (Lowe i sur., 2017). Termin „*RNA-Seq*“ označava tehniku prikupljanja cjelokupnog transkriptoma nekog organizma, sekvenciranjem cDNA fragmenata (komplementarne DNA), najčešće putem *Illumina* tehnologije sekvenciranja kratkih nukleotidnih sljedova (engl. *Short-read Illumina technology*) (Lowe i sur., 2017).

1.4.2. Primjena transkriptomike i metatranskriptomike u istraživanju fitoplanktona

U posljednjih dvadesetak godina transkriptomika je pronašla široku primjenu i u istraživanju molekularnog fiziološkog odgovora morskog eukariotskog fitoplanktona na promjenjive okolišne uvjete. U istraživanjima fiziološkog odgovora na promjenjivu dostupnost fosfora, ali i drugih nutrijenata te okolišnih pritisaka, često se primjenjuje RNA-seq tehnika (Cruz de Carvalho i sur., 2016; Harke i sur., 2017; Shih i sur., 2015; Yang i sur., 2014; S. F. Zhang i sur., 2016). U takvim istraživanjima monoklone kulture različitih vrsta uzgajaju se u *in vitro* uvjetima koji simuliraju okolišne pritiske, poput neuravnotežene koncentracije nutrijenata, povećane temperature ili sl., a zatim se izrađuje njihov transkriptom. Takva istraživanja omogućila su nove uvide u fiziološke odgovore vrsta na promjene u okolišu, ali i otkrivanje gena i proteina koji sudjeluju u ovim procesima (vidi poglavlje 1.3.2).

Unapređenjem tehnika sekvenciranja nove generacije i prikladnih referentnih baza, u istraživanju morskog eukariotskog fitoplanktona započela je i primjena metatranskriptomike. Metatranskriptomika je tehnika koja podrazumijeva sekvenciranje RNA cjelokupnih zajednica, tj. više vrsta istodobno. Ova metoda daje uvid u fiziologiju pojedinih taksona u zajednici, ali i u međusobne interakcije između članova zajednice te interakcije cjelokupne zajednice s okolišem (Kolody i sur., 2022). Dobiveni podaci pomažu u razjašnjavanju uloga pojedinih taksona ili

cjelokupnih zajednica u ekologiji morskog ekosustava (Cohen i sur., 2022). Osim uzorkovanja zajednica u njihovom prirodnom okolišu, tj. *in situ*, metatranskriptomika podrazumijeva i laboratorijske eksperimente u kojima je prirodna zajednica podvrgnuta različitim eksperimentalnim uvjetima (Alexander i sur., 2015; Bertrand i sur., 2015; Lampe i sur., 2018, 2019.). Prvi rad temeljen na metatranskriptomici u kontekstu morskih mikrobnih eukariotskih zajednica objavljen je 2012. godine (Marchetti i sur. 2012). U međuvremenu, molekularni resursi u vidu referentnih skupova podataka znatno su uvećani, a napredak u razvoju tehnologije sekvenciranja te bioinformatičkih alata omogućio je znatno veću taksonomsku i funkcionalnu rezoluciju metode kao i automatizaciju cjelokupnog procesa obrade (Kolody i sur., 2022).

Istraživanja morskih mikrobnih eukariota temeljena na metatranskriptomici proširila su znanja u razumijevanju njihove fiziologije u uvjetima različitih dostupnosti nutrijenata (Alexander i sur., 2015; Caputi i sur., 2019; Kolody i sur., 2019; Lampe i sur., 2018; Pearson i sur., 2015) ili trofičkih strategija (Cohen i sur., 2021; Hu i sur., 2018; Lambert i sur., 2022). Osim toga, primjena metatranskriptomike omogućila je i bolje razumijevanje ekologije morskih mikrobnih eukariota, osobito u istraživanjima dinamike cvjetanja u obalnim područjima (Gong i sur., 2017; Ji i sur., 2018; Metegnier i sur., 2020; Y. Zhang i sur., 2019; Zhuang i sur., 2015), doprinosa biogeokemijskim ciklusima u oceanima (Carradec i sur., 2018; Cohen i sur., 2021) ili simbiotskih odnosa (Bertrand i sur., 2015; Sun i sur., 2020).

1.4.3. Referentne baze podataka

Komparativni pristup u identifikaciji koji je osnova većine analiza temeljenih na nukleotidnim sljedovima zahtijeva dostupnost opsežnih referentnih baza podataka. Referentne baze podrazumijevaju taksonomski anotirane nukleotidne sljedove te poznavanje funkcije proteina za koje kodiraju. Pažljivo odabrani i funkcionalno anotirani genomi svih mikrobnih eukariota iz morskog okoliša predstavljali bi savršen referentni skup podataka za analize temeljene na metatranskriptomici u području morske mikrobne ekologije (Keeling i sur., 2014).

Broj dostupnih genoma ili nacрта genoma (engl. *Draft genome*) morskih mikrobnih eukariota (Bowler i sur., 2008; Curtis i sur., 2012; Derelle i sur., 2006; Galachyants i sur., 2015; Gobler i sur., 2011; González-Pech i sur., 2021; Lommer i sur., 2012; Mock i sur., 2017; Ogura i sur., 2018; Osuna-Cruz i sur., 2020; Palenik i sur., 2007; Read i sur., 2013; Stephens i sur., 2020;

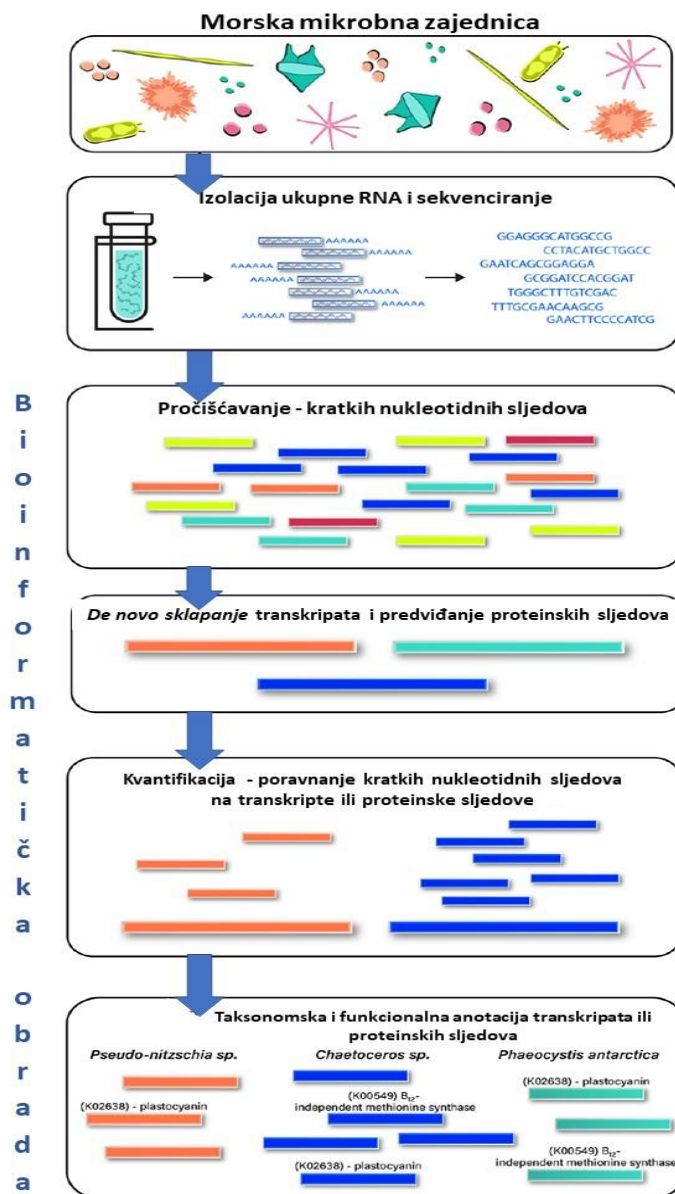
Tanaka i sur., 2015; Traller i sur., 2016; Armbrust i sur., 2004; Worden i sur., 2009) i dalje ne pokriva njihovu iznimnu taksonomsku raznolikost.

Projekt sekvenciranja transkriptoma morskih mikrobnih eukariota (engl. *Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project - MMETSP*) je 2014. godine označio veliki napredak u integraciji eukariota u ekologiju morske mikrobne zajednice stvaranjem javno dostupne baze *de novo* sastavljenih i funkcionalno anotiranih transkriptoma monoklonalnih kultura za više od 650 vrsta (Keeling i sur., 2014). Na temelju iskustva znanstvenika koji su sudjelovali na projektu odabrane su vrste i fiziološki uvjeti koji će najbolje taksonomski i funkcionalno predstavljati ovaj složeni ekosustav. MMETSP skup podataka sadrži barem jedan transkriptom iz svake značajnije taksonomske skupine morskih mikrobnih eukariota. U nekim slučajevima ovi podaci predstavljaju prvi uvid u genome nekih važnih skupina poput parazitskih haplosporida, pojedinih predstavnika skupine Amebozoa ili heterotrofnih flagelata roda *Palpitomonas*. Iako i sami autori naglašavaju kako se dostupnost anotiranih transkriptoma ne treba smatrati trajnom zamjenom za sekvencioniranje genoma (jer odsustvo nekog gena iz transkriptoma ne znači i odsustvo iz genoma), MMETSP referentna baza transkriptoma je unijela značajan napredak u metatranskriptomiku morskih mikrobnih eukariota i omogućila nove uvide u različite aspekte morske mikrobne ekologije.

Međutim, uz povećan interes znanstvene zajednice za korištenje metatranskriptoma u istraživanjima raste i broj dostupnih molekularnih resursa za taksonomsku, ali i funkcionalnu anotaciju metatranskriptoma. Tako su u tijeku projekti sekvenciranja 100 genoma dijatomeja (<https://jgi.doe.gov/csp-2021-100-diatom-genomes/>) i sekvenciranja genoma vrsta roda *Chaetoceros* (<https://jgi.doe.gov/csp-2020-most-abundant-diatom-denus-world-ocean/>). Novi molekularni resursi sekvenciranih genoma i transkriptoma zasigurno će rezultirati porastom taksonomske i funkcionalne razlučivosti u obradi metatranskriptoma. Međutim, dok veći broj potpunih genoma ne bude dostupan, transkriptomi dovoljnog broja reprezentativnih vrsta za neki okoliš pružaju dobru osnovu za analizu zajednice tog okoliša (Keeling i sur., 2014).

1.4.4. Bioinformatička obrada

Bioinformatička obrada transkriptoma i metatranskriptoma uključuje informatičke postupke obrade nukleotidnih sljedova dobivenih sekvenciranjem ukupne RNA uzoraka. U vidu računalne memorije i procesorske snage, ovaj proces ima velike zahtjeve za resursima. Stoga se bioinformatička obrada provodi u okolini za računarstvo visokih performansi (engl. *High performance Computing – HPC*). Bioinformatička obrada RNA-seq podataka podrazumijeva nekoliko osnovnih koraka: pročišćavanje, *de novo* sklapanje transkripata, kvantifikaciju te taksonomsku i funkcionalnu anotaciju (Slika 1). Obrada transkriptoma i metatranskriptoma uglavnom uključuje iste osnovne korake, teorijske koncepte i informatičke alate, uz manje razlike. Važno je istaknuti da u ovom trenutku u istraživačkoj zajednici ne postoji jedinstvena, uspostavljena praksa obrade metatranskriptoma morskih eukariotskih mikrobnih organizama, već samo preporuke koje se mogu pronaći u nedavno objavljenim metodološkim i preglednim radovima (Mukherjee i Reddy, 2020; Shakya i sur., 2019; Wilms, 2021; Cohen i sur., 2022). Kako izmjene u koracima bioinformatičke obrade mogu utjecati na konačan rezultat, potrebno je dobro poznavati teorijski koncept da bi se osigurala ispravna provedba bioinformatičke obrade u svrhu odgovora na postavljeno biološko pitanje (Cohen i sur., 2022).



Slika 1 Osnovni koraci bioinformatičke obrade RNA-seq podataka. Preuzeto i prilagođeno iz (Cohen i sur., 2022).

Prvi korak obrade transkriptoma i metatranskriptoma je pročišćavanje, tj. uklanjanje sljedova niske kvalitete i rRNA sljedova iz ukupnih kratkih nukleotidnih sljedova („sirovih podataka“) dobivenih sekvenciranjem (meta)transkriptoma. Najpoznatiji alati koji se koriste u ovom koraku su Trimmomatic (Bolger i sur., 2014) i SortMeRNA (Kopylova i sur., 2012). Pročišćeni kratki nukleotidni sljedovi se potom *de novo* sklapaju u transkripte, a najčešće korišteni

alat za provedbu ovog drugog koraka je Trinity (Grabherr i sur., 2011). Iz sklopljenih transkripata moguće je predvidjeti otvoreni okvir čitanja (engl. *Open reading frame* – ORF), tj. proteinski sljed alatom Transdecoder (<https://github.com/TransDecoder/TransDecoder>). U daljnjim koracima taksonomske i funkcionalne anotacije te kvantifikacije transkripata, moguće je koristiti transkripte ili proteinske sljedove. Transkripti ili predviđeni proteinski sljedovi potom se taksonomski i funkcionalno anotiraju uz pomoć neke od javno dostupnih referentnih baza. Taksonomska anotacija transkriptoma u sklopu bioinformatičke obrade uglavnom se ne provodi, s obzirom na to da transkriptom podrazumijeva RNA materijal jednog organizma čija je taksonomska pripadnost već poznata. Metatranskriptomi sadrže transkriptome više organizama, stoga je potrebno provesti taksonomsku anotaciju u procesu bioinformatičke obrade. Taksonomska anotacija provodi se poravnavanjem transkripata ili predviđenih proteinskih sljedova na referentne baze koje sadrže genome i transkriptome morskih mikrobnih eukariota izolirane iz staničnih kultura ili okolišnih uzoraka (Krinos i sur., 2020). Poravnanja se provode uz pomoć alata za lokalno poravnanje kao što su *BLAST* (Altschul i sur., 1990) ili *DIAMOND* (Buchfink i sur., 2021) te se na temelju e-vrijednosti (engl. *E-value*) ili BIT vrijednosti (engl. *BIT score*) određuju najuspješnija poravnanja. Taksonomska anotacija metatranskriptoma morskih mikrobnih eukariota u dosadašnjim studijama uglavnom se provodila na bazama kao što su: MMETSP (Keeling i sur., 2014), *EukProt* (Richter i sur., 2022), *EukZoo* (<https://github.com/zxl124/EukZoo-database>, <https://zenodo.org/record/1476236>), *PhyloDB* (<https://allenlab.ucsd.edu/data/>) ili *MarFERReT* (<https://github.com/armbrustlab/marferret>) koje sadrže referentne transkriptome i genome. U prosjeku, oko 40-60% transkripata moguće je taksonomski anotirati u istraživanom setu podataka (Hu i sur., 2018; Lampe i sur., 2018). *EUKulele* (Krinos i sur., 2020) je programski paket koji je posebno dizajniran za taksonomsku anotaciju morskih mikrobnih eukariotskih zajednica. Za poravnanja koristi spomenute alate. Izrazito je koristan jer ukoliko je više transkripata uspješno poravnato na istu referencu primjenjuje se algoritam za pronalaženje „zadnjeg zajedničkog pretka“ (engl. *Least Common Ancestor*) kako bi im se dodijelila anotacija na najnižoj pouzdanoj taksonomskoj razini. Za opis taksonomske pripadnosti proteina, *EUKulele* koristi taksonomske razine: supergrupa (engl. *Supergroup*), koljeno ili odjeljak (engl. *Phylum or Division*), razred (engl. *Class*), red (engl. *Order*), porodica (engl. *Family*), rod (engl. *Genus*) i vrsta (engl. *Species*).

Funkcionalna anotacija kao osnovni cilj metatranskriptomike omogućava uvid u aktivne gene u zajednici u trenutku uzorkovanja. Slično kao i za taksonomsku anotaciju, funkcionalnu

anotaciju postizemo poravnanjem transkripata ili proteinskih sljedova na funkcionalne referentne baze. Funkcionalne baze sadrže imena, klasifikaciju te nukleotidne sljedove gena i proteina za koje ti geni kodiraju. Takve baze su primjerice: *Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes (KEGG)* (Kanehisa i sur., 2016), *Eukaryotic Ortholog groups (COG)* (Tatusov i sur., 2003), *Gene Ontology (GO)* (Harris i sur., 2004) ili *Evolutionary genealogy of genes: Non-supervised orthologous groups (eggNOG)*. U navedenim bazama svakom proteinu dodijeljena je jedinstvena identifikacijska oznaka: KEGG.KO (KEGG baza), GO (GO baza) ili eggNOG kod ili opis (eggNOG baza). Navedene baze sadrže i klasifikacije proteina u šire stanične funkcije što uvelike olakšava interpretaciju rezultata. Primjerice, u KEGG bazi proteini su razvrstani u pripadajuće metaboličke putove (engl. *Pathways*), šire stanične funkcije (engl. *Brite categories*) te stanične reakcije (engl. *Modules*) u kojima sudjeluju (Kanehisa i sur., 2023). U GO bazi proteini su razvrstani prema molekularnoj funkciji (engl. *Molecular function*), staničnom odjeljku u kojem vrše svoju funkciju (engl. *Cellular Component*) ili prema biološkoj funkciji koju obavljaju (engl. *Biological Process*) (Aleksander i sur., 2023). Baza eggNOG koristi klasifikacijski sustav baze COG za šire funkcionalne kategorije (Galperin i sur., 2015.). Funkcionalnu anotaciju moguće je provesti alatom kao što je *eggNOG alat* (engl. *eggNOG mapper*) (Huerta-Cepas i sur., 2017) koji će dati identifikacijske oznake iz svih navedenih baza (KEGG.KO anotacija, GO anotacija i/ili eggNOG opis) u jednom koraku koristeći algoritme za lokalna poravnanja. Osim toga eggNOG alat koristi i algoritam za predviđanje taksonomske pripadnosti na temelju ortologije gena definirane iz sekvenciranih genoma koje baza sadrži, čime je algoritam ipak ograničen samo na skupine koje imaju dostupne sekvencirane genome pripadajućih vrsta.

Taksonomska i funkcionalna anotacija omogućavaju korisniku da unutar metatranskriptoma odabere samo podatkovni skup koji odgovara taksonima od interesa te proučava gensku ekspresiju i metaboličku aktivnost tog taksona. Primjerice, u ukupnoj zajednici morskih mikrobnih eukariota moguće je izdvojiti samo transkripte ili proteinske sljedove koji pripadaju fitoplanktonskim taksonima (npr. dijatomejama ili dinoflagelatima).

U bioinformatičkoj obradi, kvantifikacija podrazumijeva određivanje brojnosti svakog transkripta ili proteinskog slijeda u uzorku. Mjera brojnosti transkripata ili proteinskih sljedova govori o razini ekspresije gena koji su odgovorni za sintezu tih transkripata. Kvantifikacija se provodi poravnanjem pročišćenih kratkih nukleotidnih sljedova na sastavljene transkripte ili proteinske sljedove koristeći primjerice alat Salmon (Patro i sur., 2017). U svrhu uspoređivanja

rezultata kvantifikacije između različitih uzoraka transkriptoma ili metatranskriptoma potrebno je provesti normalizaciju (Love i sur., 2014). Naime, knjižnice nukleotidnih sljedova (engl. *Sequencing libraries*) stvorene u bilo kojem *RNA-seq* eksperimentu, osim biološke varijabilnosti (koju je cilj opisati), sadrže i nebiološku varijabilnost. Ona može dolaziti od različite veličine knjižnice (tj. različitog broja kratkih nukleotidnih sljedova) određenog uzorka ili različite duljine gena (Cohen i sur., 2022). Normalizacijska metoda *TPM* (engl. *Transcripts per milion*) (Wagner i sur., 2012) uklanja spomenute nebiološke varijacije u uzorcima transkriptoma i metatranskriptoma te ih čini međusobno usporedivima (K. A. Johnson i Krishnan, 2022; Zhao i sur., 2021). Već spomenuti program za utvrđivanje brojnosti transkripata *Salmon* (Patro i sur., 2017) ovu mjeru automatski računa te ju daje kao izlazni rezultat. Zbrojene vrijednosti TPM za transkripte ili proteinske sljedove pojedinog taksona mogu se koristiti za prikazivanje relativnih udjela taksona u uzorku (Hu i sur., 2018; Lampe i sur., 2019). Međutim, važno je uzeti u obzir kako metatranskriptomi sadrže transkripte više od jednog taksona čije se brojnosti u uzorcima razlikuju. Također, ne eksprimiraju svi organizmi iste niti jednak broj transkripata. Stoga usporedba ekspresije jednog taksona između više uzoraka zahtijeva organizaciju transkripata prema taksonomskoj pripadnosti taksonu te primjenu normalizacijske metode (npr. TPM) na svaki takson zasebno (Cohen i sur., 2022; Klingenberg i Meinicke, 2017). Na taj način otklanja se utjecaj taksonomske varijabilnosti u uzorcima metatranskriptoma na funkcionalnu ekspresiju (Cohen i sur., 2022; Klingenberg i Meinicke, 2017).

Konačni rezultat bioinformatičke obrade omogućava interpretaciju razlika metaboličke aktivnosti vrste uzgojene u različitim *in vitro* uvjetima iz koje su izolirani transkriptomi te razliku u taksonomskom sastavu i metaboličkoj aktivnosti prirodne zajednice i pojedinih pripadnika zajednice (taksona) iz koje su izolirani metatranskriptomi.

1.5. *Ciljevi istraživanja i hipoteze*

Opći cilj ovog istraživanja bio je opisati molekularne mehanizme fiziološkog odgovora stanica eukariotskog fitoplanktona na dinamične ekološke uvjete u pelagijalu sjevernog Jadrana koristeći pristup transkriptomike i metatranskriptomike.

Specifični ciljevi bili su:

1. Izraditi referentnu bazu transkriptoma eukariotskih fitoplanktonskih vrsta, posebice dijatomeja izoliranih iz sjevernog Jadrana;
2. Opisati gensku ekspresiju eukariotskih fitoplanktonskih vrsta u laboratorijskim kulturama podvrgnutim eksperimentalnim uvjetima limitacije fosfata;
3. Opisati promjene u prostorno-vremenskom obrascu genske ekspresije zajednica eukariotskog fitoplanktona sjevernog Jadrana;
4. Odrediti ekološki značajne molekularne mehanizme fiziološkog odgovora zajednice eukariotskog fitoplanktona sjevernog Jadrana.

U skladu s navedenim ciljevima postavljene su odgovarajuće hipoteze:

1. Obrasci genske ekspresije stanica eukariotskog fitoplanktona u eksperimentalnim uvjetima limitacije količine fosfata razlikuju se ovisno o vrsti.
2. Ukupna genska ekspresija zajednica eukariotskog fitoplanktona sjevernog Jadrana pokazuje prostorno-vremensku dinamiku, ovisno o ekološkim uvjetima.
3. Prostorno-vremenske promjene u genskoj ekspresiji eukariotskog fitoplanktona sjevernog Jadrana odražavaju ekološki značajne molekularne mehanizme fiziološkog odgovora kao što su promjene u ekspresiji gena staničnog ciklusa, fotosintetskog aparata te gena vezanih za odgovor na stresne uvjete u okolišu.

2. MATERIJALI I METODE

U istraživanju molekularnog fiziološkog odgovora eukariotskog fitoplanktona u ekosustavu sjevernog Jadrana korištena su dva komplementarna pristupa: transkriptomika i metatranskriptomika. Transkriptomika se odnosi na istraživanje *in vitro* odgovora monoklonalnih kultura fitoplanktonskih vrsta na različite uvjete limitacije količine fosfata. Metatranskriptomika se odnosi na istraživanje *in situ* odgovora eukariotskih fitoplanktonskih zajednica na promjenjive uvjete u okolišu.

U tu svrhu proizvedena su tri zasebna skupa podataka:

1. SJ transkriptomi - transkriptomi monoklonalnih kultura dijatomejskih vrsta izoliranih iz sjevernog Jadrana,
2. LTRV meta – metatranskriptomi sa krstarenja „LTRV“ (engl. *Long Term Rovinj*),
3. Po meta - metatranskriptomi s krstarenja „Po transekt“.

Za izradu transkriptoma korištene su monoklonalne kulture iz zbirke fitoplanktonskih vrsta Centra za istraživanje mora Rovinj (CIM). Za izradu metatranskriptoma korišteni su biološki uzorci prikupljeni na LTRV i Po transekt krstarenjima, provedenih u 2021. godini. Krstarenje LTRV provodi se od 2020. godine na dvije postaje, RV001 i RV004, udaljene jednu te četiri nautičke milje od obale Rovinja. Krstarenje Po provodi se od 1971., a obuhvaća uzorkovanje na više postaja duž transekta Rovinj- ušće rijeke Po.

Osnovni koraci u postupku izrade i obrade transkriptoma i metatranskriptoma obuhvaćaju: uzorkovanje, laboratorijsku obradu, bioinformatičku obradu te statističku analizu i vizualizaciju rezultata. S obzirom na to da se pojedini koraci u postupku izrade i obrade transkriptoma i metatranskriptoma razlikuju, u daljem tekstu objašnjeni su zasebno za svaki pristup.

2.1. *Izrada i obrada transkriptoma*

Skup podataka SJ transkriptoma izrađen je iz monoklonalnih kultura zbirke fitoplanktonskih vrsta CIM-a. Skup podataka sadrži 12 transkriptoma izrađenih od 6 vrsta dijatomeja izoliranih iz sjevernog Jadrana te uzgojenih u dva različita *in vitro* uvjeta dostupnosti fosfora.

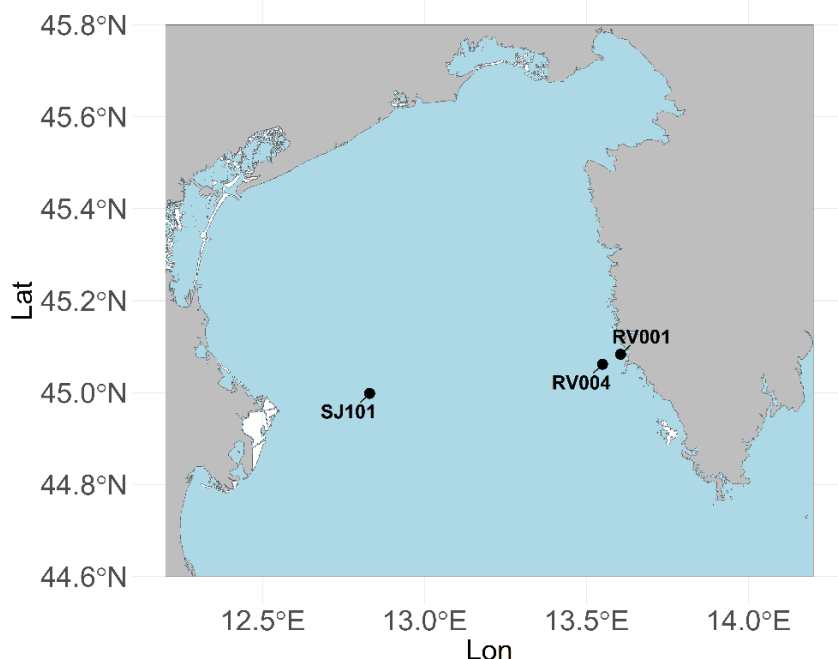
2.1.1. *Uzorkovanje i uspostava monoklonalnih kultura*

Uzorkovanje za izolaciju monoklonalnih kultura provedeno je na jednoj priobalnoj postaji (RV001) i dvije morske postaje otvorenog mora (RV004, SJ101) (Tablica 1, Slika 2) vertikalnim potezom planktonske mreže (promjer otvora 60 cm, duljina 2 m, veličina oka 50 μm) od dna do površine. Živi mrežni uzorak sačuvan je do povratka na kopno. Vrste dijatomeja iz uzorka identificirane su svjetlosnim mikroskopom (Zeiss AxioObserver, Zeiss Oberkochen, Njemačka) te su monoklonalne kulture vrsta uspostavljene izolacijom pojedinačnih ili lanaca stanica. Stanice su uzgajane u F/2 mediju (Guillard, 1975) u inkubacijskoj komori (Memmert ICH110, Njemačka) s ciklusom svjetlo - tama od 12:12 sati, u sterilnim bočicama za uzgoj organizama od 50 mL (Easy Flasks, Nunclon, Danska) na temperaturi od 16 °C i intenzitetu osvjetljenja od 75 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Uspostavljene monoklonalne kulture pridružene su zbirci kultura fitoplanktonskih vrsta Centra za istraživanje mora sa pripadajućim kodom (Tablica 1). Odabrane vrste za izolaciju i uzgoj u ovom istraživanju uobičajene su i reprezentativne vrste dijatomejske zajednice Jadrana (Slika 3). Rast i brojnost uspostavljenih kultura praćeni su svjetlosnim mikroskopom te su stanice prikupljene na filter za daljnju ekstrakciju DNA kada su dosegle eksponencijalnu fazu rasta.

Tablica 1 Popratni podaci za skup podataka SJ transkriptoma: transkriptoma monoklonalnih kultura. Vrsta – ime vrste dobiveno koncenzusom metoda svjetlosne mikroskopije i molekularne identifikacije. Kod – identifikacijski kod monoklonalne kulture u zbirci fitoplanktonskih vrsta Centra za istraživanje mora u Rovinju. Datum uzorkovanja – datum terenskog uzorkovanja na kojem je prikupljen uzorak za izolaciju vrste. Postaja – postaja na kojoj je prikupljen uzorak za izolaciju vrste. Lat – geografska širina. Lon - geografska dužina postaje. Eksperimentalni uvjet – eksperimentalni uvjet u kojem je uzgojena kultura za izolaciju transkriptoma.

Vrsta	Kod	Datum uzorkovanja	Postaja	Lat	Lon	Eksperimentalni uvjet
<i>Chaetoceros protuberans</i> Lauder, 1864.	CIM827	5.11.2015.	RV001	45°08N	13°61E	F/2
						P-limit
<i>Skeletonema marinoi</i> Sarno i Zingone 2005.	CIM843	6.04.2016.	SJ101	45°00N	12°83E	F/2
						P-limit
<i>Chaetoceros curvisetus</i> Cleve 1889.	CIM950	19.11.2020.	RV004	45°06N	13°55E	F/2
						P-limit
<i>Chaetoceros danicus</i> Cleve 1889.	CIM964	11.12.2020.	RV004	45°06N	13°55E	F/2
						P-limit
<i>Pseudo-nitzschia mannii</i> Amato i Montresor 2008.	CIM1008	23.7.2021.	RV001	45°08N	13°61E	F/2
						P-limit
<i>Thalassiosira</i> sp. Cleve, 1873.	CIM1063	22.12.2022.	SJ101	45°00N	12°83E	F/2
						P-limit



Slika 2 Područje uzorkovanja. Položaj postaja (RV001, RV004 i SJ10) u sjevernom Jadranu na kojima su prikupljeni uzorci za izolaciju monoklonalnih kultura.

2.1.2. Molekularna identifikacija vrsta

Za molekularnu identifikaciju vrsta korištena su tri barkoda: V4 regija male ribosomalne podjedinice (18S), D1–D3 regija velike ribosomalne podjedinice (28S) te 5'-kraj regije gena za ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilazu (*rbcL*) (**Prilog 1**). 30 mL stanične kulture filtrirano je na celulozne filtere od 1,2 µm (Merck Milipore) te su filteri pohranjeni na –80 °C do daljnje obrade. Genomska DNA izolirana je pomoću DNeasy Plant Mini kita (Qiagen) prema uputama proizvođača. PCR amplifikacija barkodova provedena je korištenjem DreamTaq DNA polimeraze (ThermoFisher Scientific). Reakcijska smjesa (25 µL) sadržavala je 10 µL H₂O, 12,5 µL DreamTaq Master Mix-a (2X), 0,75 µL svake početnice (10 µM) i 1 µL genomske DNA ($c \leq 5 \text{ ng}/\mu\text{L}$). PCR reakcije provedene su u uređaju SimpliAmp (Applied Biosystems) uz sljedeće uvjete: početna denaturacija pri 95 °C tijekom 5 minuta, zatim 33 ciklusa koji su uključivali 40 sekundi pri 95 °C, 40 sekundi pri 52 °C i 1 minutu pri 72 °C te završni korak ekstenzije od 5 minuta pri 72 °C. PCR-produkti pročišćeni su pomoću NucleoSpin Gel i PCR clean-up mini kita (Macherey–Nagel) prema

Slika 3 Filogenetsko stablo najčešćih vrsta dijatomeja u fitoplanktonu Jadrana. Vrste korištene u ovom istraživanju označene su crvenim slovima.



2.1.3. *In vitro* eksperimentalne inkubacije

Odabrane stanične kulture dijatomeja podvrgnute su eksperimentalnim inkubacijama u dva različita medija za rast koji su predstavljali uvjete različite dostupnosti fosfora. F/2 medij (F/2) simulirao je uvjete bogate nutrijentima, a P-limit medij bez dodatka natrij-hidrogen fosfata (P-limit) simulirao je uvjete ograničenja fosfora. Eksperimentalne inkubacije kultura u F/2 predstavljaju kontrolnu skupinu, dok inkubacije u P-limit predstavljaju eksperimentalnu skupinu. Eksperimentalne inkubacije su provedene prema Smoldak Tanković i sur., 2018 uz modifikacije. Ukratko, 2 mL stanične kulture je inokulirano u 200 mL odabranog medija (F/2 ili P-limit). Oba medija pripremljena su korištenjem morske vode iz sjevernog Jadrana, koja je čuvana u mraku tijekom dva mjeseca i sterilizirana dvostrukom filtracijom kroz celulozne filtere veličine pora 0,22 μm (Merck Millipore) te prokuhavanjem u mikrovalnoj pećnici. Pripremljene F/2 i P-limit kulture inkubirane su u inkubacijskoj komori (Mettler ICH110, Njemačka) s ciklusom svjetlo - tama od 12:12 sati, u sterilnim bočicama za uzgoj organizama od 250 mL (easy flasks, Nunclon, Danska) na temperaturi od 16 °C i intenzitetu osvjetljenja od 75 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Kulture su praćene svjetlosnim mikroskopom, a kada su dostigle gustoću od najmanje 10^5 stanica/L, inkubacije su prekinute. Na kraju inkubacije, između 40 i 200 mL svake kulture filtrirano je na celulozne filtere od 1,2 μm (Merck Millipore, Njemačka). Volumen filtriranih kultura prilagođen je postignutoj gustoći stanica kako bi se osiguralo da je za oba uvjeta rasta (F/2 i P-limit) prikupljen približno jednak broj stanica po filteru. Filteri su pohranjeni na –80 °C do izolacije ukupne RNA.

2.1.4. *Izolacija ukupne RNA i sekvenciranje transkriptoma*

Ukupna RNA izolirana je pomoću PureLink Mini kita (Invitrogen) uz tretman PureLink DNase (Invitrogen) DNazom izravno na koloni, prema uputama proizvođača te prilagođeno izolaciji s filtera. Filteri su uronjeni u 2,5 mL pufera za lizu stanica, a stanice su uklonjene s filtera pipetiranjem, vortexiranjem i inkubacijom na sobnoj temperaturi tijekom 5 minuta. Dobiveni lizat centrifugiran je pri 12 000×g tijekom 5 minuta. Supernatant je prebačen u sterilne epruvete te je daljnja obrada uključivala vezanje RNA na kolonu, ispiranje i eluciju. Izolirana ukupna RNA pohranjena je na –80 °C do slanja na sekvenciranje transkriptoma. Provjera kvalitete ukupne RNA,

priprema knjižnica i sekvenciranje provedeni su u servisu Macrogen Europe (Nizozemska). Kvaliteta RNA procijenjena je pomoću uređaja Agilent 2200 TapeStation System (Agilent Technologies, Sjedinjene Američke Države). Priprema knjižnica i sekvenciranje provedeni su pomoću TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep kita te tehnologije NovaSeq 6000 PE Illumina.

2.1.5. Bioinformatička obrada transkriptoma

Bioinformatička obrada sekvenciranih transkriptoma provedena je korištenjem računarstva visokih performansi (engl. *High performance computing*) na računalnim klasterima Supek (<https://wiki.srce.hr/spaces/NR/pages/121964442/Supek>) i Padobran (<https://wiki.srce.hr/spaces/NR/pages/144554737/Padobran>) Sveučilišnog računalnog centra u Zagrebu. Osnovni koraci bioinformatičke obrade transkriptoma uključivali su: pročišćavanje podataka, *de novo* sklapanje, mjerenje razine ekspresije (kvantifikaciju) te funkcionalnu anotaciju. Rezultat sekvenciranja transkriptoma („sirovi podaci“) su obostrani (engl. *pair-end*) kratki nukleotidni sljedovi veličine 150 parova baza (pb).

Početni korak pročišćavanja sirovih podataka od rRNA nukleotidnih sljedova proveden je uz pomoć računalnog alata SortMeRNA (v4.3.6) (Kopylova i sur., 2012) s datotekom `smr_v4.3_default_db.fasta` kao referencom. Pročišćavanje podataka od nukleotidnih sljedova niske kvalitete provedeno je uz pomoć alata Trimmomatic (v0.39) (Bolger i sur., 2014) uz postavke: klizni okvir 5:20 i minimalna duljina 50 pb. Pročišćeni nukleotidni sljedovi provjereni su alatima FASTQC (v0.11.8) (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) i MULTIQC (v1.13) (<https://github.com/ewels/MultiQC>).

Transkripti su *de novo* sastavljeni alatom Trinity (v2.15.0) (Grabherr i sur., 2011) uz standardne postavke. Koristeći alat TransDecoder (v5.7.0) (<https://github.com/TransDecoder/TransDecoder>) predviđen je otvoreni okvir čitanja (engl. *Open reading frame* - ORF), tj. proteinski sljed, uz standardne postavke.

Kvantifikacija proteinskih sljedova provedena je alatom Salmon (v1.9.0) (Patro i sur., 2017), s indeksom konstruiranim za proteinske sljedove svakog uzorka zasebno. Vrijednost „transkripti po milijunu“ (engl. *transcripts per milion* - TPM), dobivena Salmonovim algoritmom,

korištena je kao normalizirana vrijednost ekspresije proteinskog slijeda. Proteinski slijedovi sa TPM vrijednosti jednakom nuli filtrirani su i isključeni iz daljnje analize.

Funkcionalna anotacija proteinskih slijedova provedena je pomoću alata naziva „eggNOG-mapper“ (Huerta-Cepas i sur., 2017) (u daljnjem tekstu eggNOG-alat) putem BioBam OmicsBox softvera (OmicsBox—Bioinformatics Made Easy, BioBam Bioinformatics, March 3, 2019, <https://www.biobam.com/omicsbox>). Cilj je bio dobiti anotacije temeljene na eggNOG (Huerta-Cepas i sur., 2019), KEGG (Kanehisa i Goto, 2000) i GO (Consortium, 2004) bazama podataka. Proteinski slijedovi koji su zadovoljili pragove e-vrijednosti (engl. *e-value*) te bit-bodovanja (engl. *bitscore*) od 1×10^{-5} odnosno 50, smatrani su uspješno anotiranim.

Uz pomoć algoritma za predviđanje taksonomske pripadnosti koji je dio eggNOG-alata proteinskim slijedovima pridružena je taksonomska pripadnost. Proteinski slijedovi koji su odgovarali taksonomskoj razini Bacillariophyta (dijatomeje) korišteni su u daljnjoj funkcionalnoj analizi. U bazi eggNOG, 70% ortolognih grupa koje pripadaju dijatomejama funkcionalno su anotirane, dok ostalih 30% ortolognih grupa nema poznatu funkciju. Stoga funkcionalna anotacija temeljena na eggNOG bazi omogućava distinkciju između proteinskih slijedova poznate funkcije te proteinskih slijedova nepoznate funkcije, ali identificiranih u dostupnim genomima dijatomeja.

2.1.6. Usporedba sa transkriptomima iz baze MMETSP

U svrhu procjene kvalitete dobiveni transkriptomi uspoređeni su sa transkriptomima istih vrsta iz baze MMETSP. U ovoj analizi korištene su datoteke generirane u L. K. Johnson i sur., 2019. Sedam transkriptoma vrste *Skeletonema marinoi* (kodovi: MMETSP0319, MMETSP0320, MMETSP0918, MMETSP0920, MMETSP1039, MMETSP1040, MMETSP1428) te četiri transkriptoma vrste *Chaetoceros curvisetus* (kodovi: MMETSP0716, MMETSP0717, MMETSP0718, MMETSP0719) generiranih iz kultura uzgojenih u različitim uvjetima rasta pronađeno je u MMETSP bazi. Preuzete datoteke uključivale su: predviđene proteinske slijedove (<https://zenodo.org/records/257026>), kvantifikacijske datoteke (<https://zenodo.org/records/257145>) te datoteke s imenima kontiga (<https://zenodo.org/records/3247846>). Popratni podaci preuzeti su iz baze NCBI Biosample za projekt (engl. *Bioproject*) pod pristupnim brojem PRJNA231566 (Tablica 2). Slično transkriptomima generiranim u ovom radu, predviđeni proteinski slijedovi iz MMETSP-a

generirani su pomoću alata TransDecoder, a datoteke kvantifikacije pomoću alata Salmon (L. K. Johnson i sur., 2019). Proteinski sljedovi funkcionalno su anotirani istim bioinformatičkim postupkom kao i SJ transkriptomi, koristeći eggNOG-alat. Proteinski sljedovi sa zbrojem jednakim nuli, filtrirani su i isključeni iz daljnje analize. Transkriptomi pod kodom MMETSP0716 i MMETSP0717 isključeni su iz analize zbog nedovoljnog broja predviđenih proteinskih sljedova (6) i nedostupnosti kvantifikacijske datoteke.

Tablica 2 Popratni podaci za MMETSP skup podataka. Kod – identifikacijski kod uzorka u bazi NCBI Biosample. Vrsta – ime vrste pridruženo uzorku iz baze. Geografska regija – geografska regija iz koje je vrsta izolirana. Eksperimentalni uvjet – eksperimentalni uvjet u kojem je uzgojena kultura za izolaciju transkriptoma.

Kod	Vrsta	Geografska regija	Eksperimentalni uvjet
MMETSP0319	<i>Skeletonema marinoi</i>	Baltičko more	F/2 (-Si -Cu)
MMETSP0320	<i>Skeletonema marinoi</i>	Sjeverno more	F/2
MMETSP0918	<i>Skeletonema marinoi</i>	Atlantski ocean	F/2
MMETSP0920	<i>Skeletonema marinoi</i>	Atlantski ocean	F2 – Si
MMETSP1039	<i>Skeletonema marinoi</i>	Jadransko more	F/2 – light
MMETSP1040	<i>Skeletonema marinoi</i>	Jadransko more	F/2 + light
MMETSP1428	<i>Skeletonema marinoi</i>	Tihi ocean	Standardni Aquil
MMETSP0718	<i>Chaetoceros curvisetus</i>	Tihi ocean	ASW - NO ₃
MMETSP0719	<i>Chaetoceros curvisetus</i>	Tihi ocean	ASW + nokodazol

2.1.7. Funkcionalna analiza SJ transkriptoma

Proteinski sljedovi koji su odgovarali taksonomskoj razini Bacillariophyta (dijatomeje) izdvojeni su te je na njima provedena funkcionalna analiza u programskom jeziku R (Team, 2024). Zbog malog broja proteinskih sljedova s dodijeljenom KEGG.KO anotacijom (465) transkriptomi vrste *Chaetoceros protuberans* izostavljeni su iz funkcionalne analize. Za procjenu sličnosti u funkcionalnom sastavu transkriptoma korištena je analiza nemetričkog višedimenzionalnog skaliranja (engl. *Non-Metric Multidimensional Scaling* - *NMDS*) temeljena na Bray-Curtisovoj udaljenosti provedena u paketu “vegan” (Oksanen i sur., 2013). Za procjenu statističke značajnosti razlika u eksperimentalnom uvjetu i vrsti korištena je permutacijska multivarijatna analiza

varijance (PERMANOVA). Funkcije “vegdist” i “metaMDS” korištene su za izračunavanje Bray-Curtisove udaljenosti i provođenje NMDS analize, dok je funkcija “adonis2” korištena za PERMANOVA analizu.

TPM vrijednosti zbrojene su za jedinstvene KEGG.KO anotacije i jedinstvene KEGG metaboličke putove. Ekspresija odabranih KEGG metaboličkih puteva i gena vizualizirana je stupčastim grafikonomima u paketu ggplot2 (Wickham, 2016). Odabrani su KEGG metabolički putovi iz četiri kategorije: metabolizam (engl. *Metabolism*), obrada genetskih informacija (engl. *Genetic information processing*), obrada informacija iz okoliša (engl. *Environmental information Processing*) i stanični procesi (engl. *Cellular processes*) (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) koji predstavljaju osnovne stanične funkcije: stanično disanje, fotosintetske reakcije, stanični ciklus, transkripciju te metabolizam masnih kiselina.

Pregledom literature odabrani su geni identificirani kao ključni za prilagodbu eukariotskog fitoplanktona na uvjete ograničene dostupnosti fosfora (vidi poglavlje 1.3.2.). Među njima su geni povezani s akvizicijom organskog i anorganskog fosfora, skladištenjem PolyP-a, recikliranjem unutar staničnih rezervi kao i središnji gen uključen u klatrin-posredovanu endocitozu (Tablica 3).

Tablica 3 Geni koji sudjeluju u prilagodbi fitoplanktona na uvjete ograničenja fosforom.

Geni/proteini od interesa	Primjeri iz literature	Fiziološka prilagodba na ograničenje fosforom
Transporteri anorganskog fosfora	SLC, PHO i ostali	Akvizicija anorganskog fosfora
Alkalne fosfataze	PhoA, PhoV, PhoX, PhoD i ostali	Akvizicija organskog fosfora
Fosfodiesteraze	PLD i ostali	Akvizicija organskog fosfora
Transporteri fosfonata	phnW, phnX i ostali	Akvizicija organskog fosfora
Klatrin	klatrin i podjedinice klatrina	Klatrinom posredovana endocitoza
Egzofosfataze	PPX	Akvizicija organskog fosfora
Endofosfataze	PPN	Akvizicija organskog fosfora
Vakuolarni transportni čeperoni	VTC1-4	Akvizicija organskog fosfora
Fosfolipaze	C, D i ostale	Recikliranje unutarstaničnih rezervi fosfora
Sulfolipidna sintaza	SQD2	Recikliranje unutarstaničnih rezervi fosfora
Monogalaktozil-diacilglicerol sintaza	MGD2	Recikliranje unutarstaničnih rezervi fosfora
Anorganske pirofosfataze	razne	Recikliranje unutarstaničnih rezervi fosfora

2.2. *Izrada i obrada metatranskriptomata*

Skupovi podataka LTRV meta te Po meta izrađeni su iz prirodnih zajednica uzorkovanih na krstarenjima LTRV i Po transekt u 2021. godini. Skup podataka LTRV meta sadrži 24 metatranskriptomata izoliranih iz uzoraka prikupljenima na dvije postaje kroz 12 krstarenja istraživačkim brodom Burin. Skup podataka Po meta sadrži 12 metatranskriptomata izoliranih iz uzoraka prikupljenima na četiri postaje kroz dva krstarenja istraživačkim brodom Vila Velebita.

2.2.1. *Uzorkovanje zajednice i prikupljanje okolišnih parametara*

Mjesečna krstarenja LTRV provedena su od travnja 2021. do ožujka 2022. godine (**Tablica 4**). Uzorci su prikupljeni na jednoj obalnoj (RV001) i jednoj postaji otvorenog mora, (RV004) (**Tablica 4**,). Dva Po transekt krstarenja su provedena 2021. godine, jedno u lipnju i jedno u ožujku, a uzorkovane su četiri postaje na transektu Rovinj – ušće rijeke Po: RV001, SJ107, SJ101 te SJ108 (**Tablica 5**, **Slika 4**). Biološki uzorci prikupljeni su vertikalnim potezom planktonskom mrežom (promjer otvora 60 cm, duljina 2 m, veličina oka 50 μm) od dna do površine na svim postajama krstarenja LTRV i Po (**Tablica 4** i **Tablica 5**). Dodatno, na postaji SJ108 krstarenja Po, Niskinovim crpcima prikupljeni su biološki uzorci na dubinama 5 i 20 m (**Tablica 5**). Živi mrežni uzorci odmah po vađenju iz mora filtrirani su na celulozne filtere od 1,2 μm (Merck Milipore) do zasićenja te smrznuti u tekućem dušiku. 2,5 L uzorka morske vode iz Niskinovih crpaca filtrirano je na polikarbonatne filtere od 0,8 μm (Merck Milipore) te smrznuto u tekućem dušiku. Po dolasku na kopno filteri sa uzorcima pohranjeni su na -80 °C do izolacije ukupne RNA.

Okolišni parametri prikupljeni su na oba krstarenja na isti način. Mjerenja temperature i saliniteta provedena su pomoću CTD (engl. *conductivity–temperature–depth*) sonde SBE 25 Sealogger (Sea-Bird Electronics, Inc., Bellevue, Washington, Sjedinjene Američke Države). Koncentracije nutrijenata analizirane su spektrofotometrijskim metodama prema Ivančić i Degobbis (1984) te Parsons i sur. (1984), koristeći spektrofotometar Shimadzu UV-1800, a uključivale su: nitrat (NO_3^-), nitrit (NO_2^-), amonijak (NH_4^+), ortofosfat (PO_4^{3-}) i ortosilikat (SiO_4^-).

Analize ukupnog otopljenog fosfora (Total_P) provedene su metodom kemijske oksidacije s persulfatom (Menzel i Corwin, 1965). Koncentracija otopljenog organskog fosfora (DOP) izračunata je oduzimanjem koncentracije PO_4^{3-} od Total_P. Otopljeni anorganski dušik (DIN)

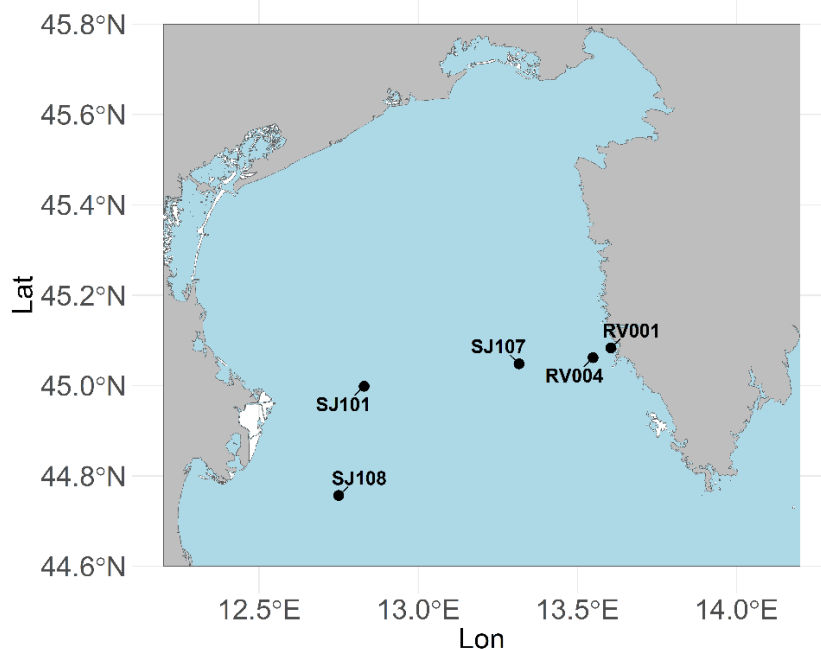
određen je kao zbroj koncentracija NO_3^- , NO_2^- i NH_4^+ . Omjer nitrata i ortofosfata ($\text{NO}_3^-:\text{PO}_4^{3-}$) izračunat je kako bi se utvrdilo prelazi li Redfieldov omjer ($\text{N:P} = 16:1$) prema opisu Redfield i sur. (1963).

Tablica 4 Popratni podaci za skup podataka LTRV meta: metatranskriptomi sa krstarenja LTRV. Uzorak – identifikacijski kod uzorka. Datum uzorkovanja – datum terenskog uzorkovanja na kojemu je prikupljen uzorak. Postaja – postaja na kojoj je prikupljen uzorak. Lat – geografska širina. Lon - geografska dužina postaje. Sezona – kalendarsko godišnje doba u kojem je prikupljen uzorak.

Uzorak	Datum uzorkovanja	Postaja	Lat	Lon	Sezona	Alat uzorkovanja
LTRV113	19.4.2021.	RV001	45°08N	13°61E	Proljeće	Planktonska mreža
LTRV114	19.4.2021.	RV004	45°06N	13°55E	Proljeće	Planktonska mreža
LTRV121	21.5.2021.	RV001	45°08N	13°61E	Proljeće	Planktonska mreža
LTRV122	21.5.2021.	RV004	45°06N	13°55E	Proljeće	Planktonska mreža
LTRV129	11.6.2021.	RV001	45°08N	13°61E	Proljeće	Planktonska mreža
LTRV130	11.6.2021.	RV004	45°06N	13°55E	Proljeće	Planktonska mreža
LTRV137	23.7.2021.	RV001	45°08N	13°61E	Ljeto	Planktonska mreža
LTRV138	23.7.2021.	RV004	45°06N	13°55E	Ljeto	Planktonska mreža
LTRV145	20.8.2021.	RV001	45°08N	13°61E	Ljeto	Planktonska mreža
LTRV146	20.8.2021.	RV004	45°06N	13°55E	Ljeto	Planktonska mreža
LTRV153	22.9.2021.	RV001	45°08N	13°61E	Ljeto	Planktonska mreža
LTRV154	22.9.2021.	RV004	45°06N	13°55E	Ljeto	Planktonska mreža
LTRV161	20.10.2021.	RV001	45°08N	13°61E	Jesen	Planktonska mreža
LTRV162	20.10.2021.	RV004	45°06N	13°55E	Jesen	Planktonska mreža
LTRV169	24.11.2021.	RV001	45°08N	13°61E	Jesen	Planktonska mreža
LTRV170	24.11.2021.	RV004	45°06N	13°55E	Jesen	Planktonska mreža
LTRV177	15.12.2021.	RV001	45°08N	13°61E	Jesen	Planktonska mreža
LTRV178	15.12.2021.	RV004	45°06N	13°55E	Jesen	Planktonska mreža
LTRV185	14.1.2022.	RV001	45°08N	13°61E	Zima	Planktonska mreža
LTRV186	14.1.2022.	RV004	45°06N	13°55E	Zima	Planktonska mreža
LTRV193	16.2.2022.	RV001	45°08N	13°61E	Zima	Planktonska mreža
LTRV194	16.2.2022.	RV004	45°06N	13°55E	Zima	Planktonska mreža
LTRV201	15.3.2022.	RV001	45°08N	13°61E	Zima	Planktonska mreža
LTRV202	15.3.2022.	RV004	45°06N	13°55E	Zima	Planktonska mreža

Tablica 5 Popratni podaci za skup podataka Po meta: metatranskriptomi sa krstarenja Po. Uzorak – identifikacijski kod uzorka. Datum uzorkovanja – datum terenskog uzorkovanja na kojemu je prikupljen uzorak. Postaja – postaja na kojoj je prikupljen uzorak. Lat – geografska širina. Lon - geografska dužina postaje. Dubina – dubina na kojoj je prikupljen uzorak. Sezona – kalendarsko godišnje doba u kojem je prikupljen uzorak.

Uzorak	Datum uzorkovanja	Postaja	Lat	Lon	Dubina	Sezona	Alat uzorkovanja
PO99	15.6.2021	RV001	45°08N	13°61E	Vertikalni potez	Proljeće	planktonska mreža
PO101	15.6.2021	SJ107	13°32N	45°05E	Vertikalni potez	Proljeće	planktonska mreža
PO103	15.6.2021	SJ101	44°99N	12°83E	Vertikalni potez	Proljeće	planktonska mreža
PO105	15.6.2021	SJ108	12°75N	44°76E	Vertikalni potez	Proljeće	planktonska mreža
PO107	15.6.2021	SJ108_5	12°75N	44°76E	5 m	Proljeće	niskinov crpac
PO108	15.6.2021	SJ108_20	12°75N	44°76E	20 m	Proljeće	niskinov crpac
PO131	13.9.2021	RV001	45°08N	13°61E	Vertikalni potez	ljet	planktonska mreža
PO133	13.9.2021	SJ107	13°32N	45°05E	Vertikalni potez	ljet	planktonska mreža
PO135	13.9.2021	SJ101	44°99E	12°83N	Vertikalni potez	ljet	planktonska mreža
PO137	13.9.2021	SJ108	12°75N	44°76E	Vertikalni potez	ljet	planktonska mreža
PO139	13.9.2021	SJ108_5	12°75N	44°76E	5 m	ljet	niskinov crpac
PO140	13.9.2021	SJ108_20	12°75N	44°76E	20 m	ljet	niskinov crpac



Slika 4 Područje uzorkovanja. Postaje RV001, RV004, SJ101, SJ107 i SJ108 na kojima su vertikalnim potezima planktonskim mrežama i/ili Niskinovim crpcima prikupljeni biološki uzorci za izolaciju metatranskriptoma te okolišni podaci. Postaje RV001 i RV004 uzorkovane su na krstarenjima LTRV. Postaje RV001, SJ107, SJ101 i SJ108 uzorkovane su na krstarenjima Po transektom.

2.2.2. Izolacija ukupne RNA i sekvenciranje metatranskriptoma

Ukupna RNA izolirana je prema istom protokolu kao i ukupna RNA za sekvenciranje transkriptoma (vidi poglavlje 4.1.4. Izolacija ukupne RNA i sekvenciranje transkriptoma). Provjera kvalitete ukupne RNA, priprema knjižnica i sekvenciranje provedeni su u servisu AllGenetics (Španjolska). Kvaliteta RNA procijenjena je pomoću uređaja Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Sjedinjene Američke Države). Priprema knjižnica i sekvenciranje provedeni su pomoću NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep kit-a te tehnologije NovaSeq PE150 Illumina.

2.2.3. Bioinformatička obrada metatranskriptoma

Bioinformatička obrada metatranskriptoma provedena je kao i za transkriptome, korištenjem računarstva visokih performansi (engl. *High performance computing*) na računalnim klasterima Supek i Padobran Sveučilišnog računalnog centra u Zagrebu. Osnovni koraci bili su isti kao i za transkriptome uz jedan dodatni korak. Osnovni koraci: pročišćavanje podataka, *de novo* sklapanje, mjerenje razine ekspresije (kvantifikaciju) provedeni su na jednak način (vidi poglavlje 2.1.5.). Korak funkcionalne anotacije uključivao je iste alate kao i za transkriptome, ali cilj je bio dobiti anotacije temeljene na bazi KEGG (Kanehisa i Goto, 2000).

Dodatni korak uključivao je taksonomsku anotaciju temeljenu na bazi MMETSP (Keeling i sur., 2014.). Taksonomska anotacija proteinskih sljedova provedena je koristeći alat EUKulele (Krinos i sur., 2020) sa standardnim postavkama. Rezultati taksonomske i funkcionalne anotacije te kvantifikacije proteinskih sljedova objedinjeni su u jedinstvenu tablicu te korišteni u daljnjoj obradi podataka. Ova tablica javno je dostupna u bazi *European Nucleotide Archive (ENA)* pod pristupnim brojem PRJEB87874 zajedno sa sirovim nukleotidnim sljedovima.

2.2.4. Dodjeljivanje taksonomske pripadnosti fitoplanktonskim grupama

Zadana taksonomija za MMETSP bazu EUKulele alata korištena je za dodjeljivanje taksonomske pripadnosti fitoplanktonskim grupama, proteinskim sljedovima. Od anotiranih koljena za analizu su odabrana samo ona koja sadrže fotosintetske i miksotrofne predstavnike. Informacije o trofičkim karakteristikama skupina prikupljene su pregledom literature. Uz opisivanje funkcionalne sukcesije fitoplanktonskih grupa cilj taksonomske anotacije bio je i opisati sukcesiju fitoplanktonske zajednice na način sličan studijama temeljenima na svjetlosnoj mikroskopiji. Odabrana koljena (engl. *Phylum*) fitoplanktona uključivala su Dinoflagellata, Ochrophyta, Haptophyta, Chlorophyta i Cryptophyta. Koljeno Ochrophyta dodatno je podijeljeno u dvije kategorije: razred Bacillariophyta (dijatomeje) i „ostali Ochrophyta“, koja je obuhvaćala razred Bolidophyceae, Chrysophyceae, Dictyophyceae, Pelagophyceae, Pinguiphyceae, Raphidophyceae, Synchromophyceae, Synurophyceae i Xanthophyceae, kako bi se omogućile zasebne rasprave.

Dobivenih šest grupa od interesa uključuju koljena: Dinoflagellata, Haptophyta, Chlorophyta i Cryptophyta te razrede koljena Ochrophyta; Bacillariophyta (dijatomeje) i sve ostale razrede objedinjene pod nazivom „ostali Ochrophyta“. Ovih šest grupa smatrano je pripadnicima fitoplanktonske zajednice, tj. u daljnjem tekstu fitoplanktonskim grupama.

Ostala identificirana koljena, koja su pretežno uključivala heterotrofne članove zajednice, svrstana su u grupu „Ostali eukarioti“, koja je obuhvaćala koljena: Apicomplexa, Cercozoa, Ciliophora, Discoba, Foraminifera, Glaucophyta, Lobosa, Opalozoa, Rhodophyta, Choanoflagellida, Conosa, Discosea, Fungi, Hacrobia, Perkinsea, Stramenopiles i Sagenista. Proteinski sljedovi koji nisu uspješno dodijeljeni nijednom MMETSP koljenu svrstani su u grupu „Neklasificirani“.

2.2.5. Normalizacija kvantifikacije između grupa

Kvantifikacija proteinskih sljedova alatom Salmon rezultirala je trima vrijednostima: duljinom proteinskog slijeda, brojem kratkih nukleotidnih sljedova povezanih sa pripadajućim proteinskim sljedovima (skraćeno: broj očitavanja) te vrijednošću transkripata po milijunu (engl. *Transcripts per milion* - TPM). Dobivene TPM vrijednosti zbrojene su na razini koljena (engl. *Phylum*), a zbroj vrijednosti (TPMSum) korišten je za usporedbu relativnih udjela u ukupnoj metaboličkoj aktivnosti zajednice ciljanih fitoplanktonskih grupa unutar uzorka i između uzoraka. U daljnjem tekstu navode se kao: TPM vrijednosti normalizirane između grupa.

2.2.6. Normalizacija kvantifikacije unutar grupa

U svrhu usporedbe metaboličke aktivnosti pojedine grupe između uzoraka TPM-normalizacija provedena je zasebno za svaku fitoplanktonsku grupu. Na taj način omogućena je usporedba metaboličke aktivnosti unutar grupe bez utjecaja ukupne zajednice, tj. ostalih grupa. Za ovaj izračun korištena je formula (Zhao i sur., 2021) :

$$TPM_i = \frac{q_i}{l_i} \times \frac{1}{\sum_j \frac{q_j}{l_j}} \times 10^6$$

gdje i predstavlja proteinski slijed od interesa, a j predstavlja uzorak; q predstavlja broj očitavanja, a l duljinu proteinskog slijeda (u kilobazama). Skalirajući faktor, $\sum_j \frac{q_j}{l_j}$, predstavlja zbroj očitavanja svih kratkih nukleotidnih sljedova koji pripadaju određenoj fitoplanktonskoj grupi u uzorku j , podijeljen sa njihovom duljinom. U ovoj jednadžbi, za duljinu proteinskog slijeda i broj očitavanja, korištene su vrijednosti generirane softverom Salmon. Izračunate TPM vrijednosti zbrojene su za proteinske sljedove iste taksonomske i funkcionalne anotacije (KEGG.KO) na razini grupe i/ili roda te korištene za usporedbu metaboličke aktivnosti jedne fitoplanktonske grupe između uzoraka. Također, ove vrijednosti korištene su kako bi se prikazala funkcionalna sukcesija metaboličkih putova i gena jedne fitoplanktonske grupe. U daljnjem tekstu navode se kao: TPM vrijednosti normalizirane unutar grupa.

2.2.7. Analize ordinacije

Sve statističke analize vezane uz ordinacije provedene su korištenjem programskog jezika R (Team, 2024) i pripadajućeg programskog paketa “vegan” (Oksanen i sur., 2013).

Za procjenu sličnosti u funkcionalnom sastavu zajednice kroz godišnja doba i postaje korištena je analiza nemetričkog višedimenzionalnog skaliranja (engl. *Non-Metric Multidimensional Scaling* - NMDS) temeljena na Bray-Curtisovoj udaljenosti. Provedene su zasebne analize za ukupnu fitoplanktonsku zajednicu te za šest ciljanih fitoplanktonskih grupa pojedinačno. U NMDS-analizi cijele fitoplanktonske zajednice TPM vrijednosti normalizirane između grupa zbrojene su na razini gena. Slično tome, za NMDS analizu pojedinačnih grupa, TPM vrijednosti normalizirane unutar grupa zbrojene su na razini gena. Za procjenu statističke značajnosti razlika u sastavu zajednice korištena je permutacijska multivarijantna analiza varijance (PERMANOVA). Funkcije “vegdist” i “metaMDS” korištene su za izračunavanje Bray-Curtisove udaljenosti i provođenje NMDS analize, dok je funkcija “adonis” korištena za PERMANOVA analizu.

Kako bi se istražila povezanost funkcionalnog sastava šest ciljanih fitoplanktonskih grupa s okolišnim parametrima, provedena je redundancijska analiza (engl. *Redundancy Analysis* - RDA). Okolišne varijable uključivale su koncentracije ukupnog anorganskog dušika (DIN), ukupnog fosfora (Total P) i ortosilikata (SiO_4^-) te temperaturu ($^{\circ}\text{C}$) i salinitet (Sal). U analizi su korištene

prosječne vrijednosti ovih varijabli izračunate na temelju mjerenja na tri dubine (0, 5 i 20 m). Kako bi se smanjio utjecaj visoko zastupljenih gena, prije analize provedena je log₂ transformacija TPM vrijednosti normaliziranih unutar grupa. RDA-analiza provedena je pomoću funkcije “rda”, dok je prilagodba okolišnih vektora izvedena pomoću funkcije “envfit”. Statistička značajnost generiranog RDA modela procijenjena je permutacijskom ANOVA analizom korištenjem funkcije “anova”, čime su identificirani ključni okolišni faktori.

2.2.8. Obrasci ekspresije gena i metaboličkih putovaa

U svrhu procjene razine ekspresije pojedinačnih gena izračunati su srednja vrijednost, varijanca i kvartili TPM vrijednosti normaliziranih unutar grupa, za jedinstvene KEGG.KO anotacije.

Za interpretaciju skupa podataka LTRV meta odabrano je 60 gena s najvišim srednjim vrijednostima. Prostorno-vremenski obrasci ekspresije ovih gena vizualizirani su pomoću toplinskih mapa (engl. *heatmaps*) generiranih korištenjem paketa “pheatmap” (Kolde, 2019) u R-u. Hijerarhijsko grupiranje primijenjeno je za grupiranje gena slične transkripcijske aktivnosti, koristeći euklidsku udaljenost kao mjeru sličnosti. Kako bi se istražio cjelokupni metabolički profil zajednice, KEGG.KO anotacijama dodijeljeni su pripadajući KEGG metabolički putevi. Potom su TPM vrijednosti normalizirane unutar grupa agregirane na temelju pripadnosti KEGG metaboličkim putovima. Odabrani su KEGG metabolički putevi iz četiri kategorije, relevantne za interpretaciju funkcionalne sukcesije eukariotskog fitoplanktona. To su kategorije: metabolizam (engl. *Metabolism*), obrada genetskih informacija (engl. *Genetic information processing*), obrada informacija iz okoliša (engl. *Environmental information Processing*) i stanični procesi (engl. *Cellular processes*) (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Obrasci ekspresije odabranih KEGG metaboličkih putovaa za skup podataka LTRV meta vizualiziran je pomoću toplinskih mapa generiranih paketom “pheatmap” (Kolde, 2019.) u R-u, bez primjene grupiranja.

Za interpretaciju skupa podataka Po meta odabrani su geni od interesa povezani s metabolizmom fosfora. Pregledom literature odabrani su geni identificirani kao ključni za prilagodbu eukariotskog fitoplanktona na uvjete ograničene dostupnosti fosfora (vidi poglavlje 1.3.2. i Tablica 3). Među njima su geni povezani s akvizicijom organskog i anorganskog fosfora,

skladištenjem PolyP-a, recikliranjem unutar staničnih rezervi kao i središnji gen uključen u klatrin-posredovanu endocitozu. Prostorno-vremenski obrasci ekspresije ovih gena vizualizirani su pomoću toplinskih mapa (engl. *heatmaps*) generiranih korištenjem paketa “pheatmap” (Kolde, 2019) u R-u. Hijerarhijsko grupiranje primijenjeno je za grupiranje gena i uzoraka slične transkripcijske aktivnosti, koristeći euklidsku udaljenost kao mjeru sličnosti.

3. REZULTATI

3.1. *Skup podataka SJ transkriptomi*

3.1.1. *Struktura skupa podataka SJ transkriptomi*

Sekvenciranje transkriptoma šest vrsta dijatomeja uzgojenih u dva *in vitro* uvjeta dostupnosti fosfora (F/2 i P-limit) rezultiralo je s u prosjeku 43.261.377 kratkih nukleotidnih sljedova po knjižnici (uzorku) (Tablica 6). Nakon pročišćavanja podataka preostalo je u prosjeku 30.431.575 kratkih mRNA nukleotidnih sljedova po uzorku, a ukupni skup podataka sadrži 365.178.904 kratkih mRNA nukleotidnih sljedova (Tablica 6). *De novo* je sklopljeno u prosjeku 64.932 transkripata po uzorku, tj. ukupni skup podataka sadrži 779.184 transkripata prosječne duljine 731 pb (Tablica 6). Algoritmom za predviđanje otvorenog okvira čitanja predviđeno je u prosjeku 35.248 proteinskih sljedova po uzorku, odnosno ukupno 422.974 proteinskih sljedova u cjelokupnom skupu podataka. Kada su otklonjeni proteinski sljedovi sa zbrojem jednakim nuli, konačni skup podataka SJ transkriptoma sadržava 106.274 proteinskih sljedova, odnosno u prosjeku 8.856 proteinskih sljedova po uzorku (Tablica 6).

Tablica 6 Pregled konačnog skupa podataka SJ transkriptoma kroz korake bioinformatičke obrade za svaku kulturu te eksperimentalni uvjet. Kod – identifikacijski kod monoklonalne kulture u zbirci fitoplanktonskih vrsta Centra za istraživanje mora u Rovinju. Vrsta – ime vrste dobiveno konsenzusom metoda svjetlosne mikroskopije i molekularne identifikacije. Eksperimentalni uvjet – eksperimentalni uvjet u kojem je uzgojena kultura za izolaciju transkriptoma. Kratki nukleotidni sljedovi – broj kratkih nukleotidnih sljedova (sirovi podaci). Pročišćeni kratki nukleotidni sljedovi (mRNA) – broj kratkih mRNA nukleotidnih sljedova nakon otklanjanja rRNA sljedova te sljedova niske kvalitete. Transkripti – broj de novo sklopljenih transkripata. Prosječna duljina transkripta (pb) – prosječna duljina transkripata u transkriptumu. Predviđeni proteinski sljedovi – broj proteinskih sljedova preostalih nakon otklanjanja onih sa zbrojem jednakim nuli.

Kod	Vrsta	Eksperimentalni uvjet	SortMeRNA i Trimmomatic		Trinity		Transdecoder
			Kratki nukleotidni sljedovi	Pročišćeni kratki nukleotidni sljedovi (mRNA)	Transkripti	Prosječna duljina transkripata (pb)	Predviđeni proteinski sljedovi
CIM827	<i>Chaetoceros protuberans</i>	F/2	43.869.248	35.892.984	4.204	971	954
		P-limit	46.060.370	19.291.546	55.259	561	6.623
CIM843	<i>Skeletonema marinoi</i>	F/2	47.142.298	43.905.102	64.544	1011	16.193
		P-limit	46.959.304	36.962.568	70.298	709	10.695
CIM950	<i>Chaetoceros curvisetus</i>	F/2	45.113.058	34.955.780	50.374	898	9.715
		P-limit	35.562.540	7.855.370	22.886	350	954
CIM964	<i>Chaetoceros danicus</i>	F/2	41.065.412	36.587.302	75.087	917	12.112
		P-limit	35.182.380	23.446.778	63.106	866	8.551
CIM1008	<i>Pseudo-nitzschia manni</i>	F/2	46.749.028	36.708.516	52.978	687	8.235
		P-limit	43.417.630	16.183.690	34.986	505	3.244
CIM1063	<i>Thalassiosira sp.</i>	F/2	38.814.556	29.241.382	108.010	492	5.677
		P-limit	49.200.702	44.147.886	177.452	807	23.321

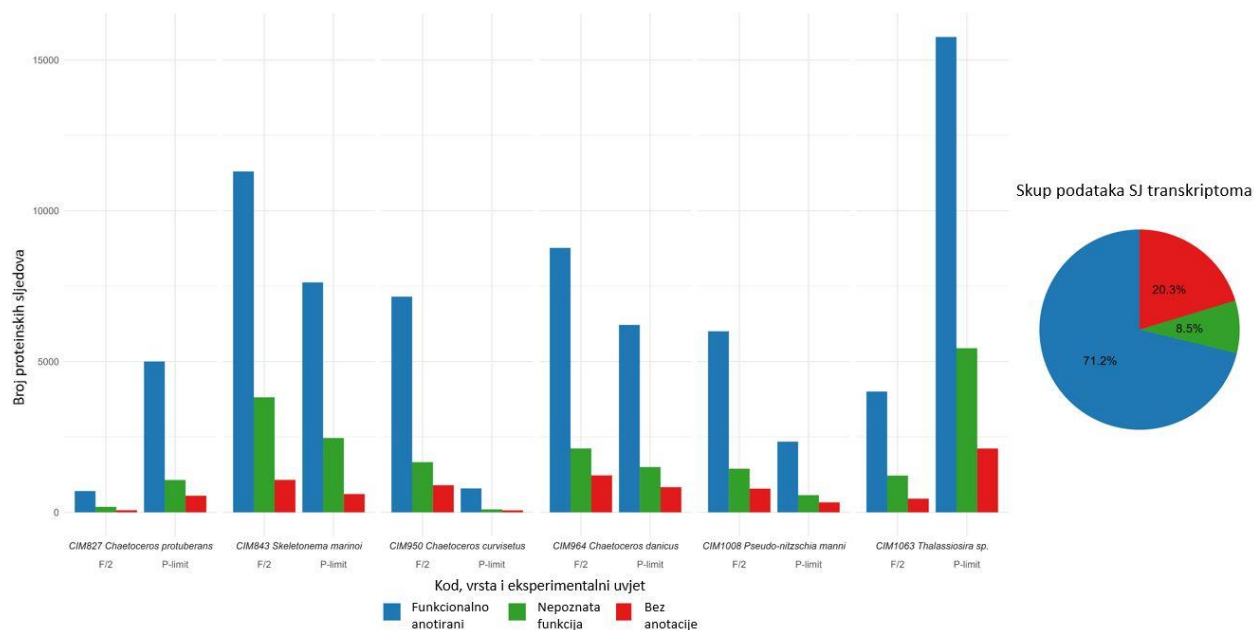
Daljnja analiza konačnog skupa podataka SJ transkriptoma uključila je funkcionalnu anotaciju kako bi se proteinskim sljedovima pridružila identifikacijska oznaka iz tri baze, tj. eggNOG opis (engl. *eggNOG description*) te GO i KEGG.KO anotacije, ali i taksonomska pripadnost. Koristeći eggNOG alat, uspješno je funkcionalno anotirano 91,5% tj., 97.271 proteinskih sljedova iz konačnog skupa podataka SJ transkriptoma. Anotirani proteinski sljedovi podijeljeni su u dvije kategorije: proteinski sljedovi poznate funkcije te proteinski sljedovi nepoznate funkcije, ali identificirani u genomima dostupnim u eggNOG bazi. Ukupno je 75.682 proteinskih sljedova (u prosjeku 6.307 po uzorku) dobilo barem jednu funkcionalnu anotaciju, dok je 21.589 proteinskih sljedova (u prosjeku 1.799 po uzorku) odgovaralo proteinima nepoznate funkcije (Slika 5).

Većina proteinskih sljedova u konačnom skupu podataka anotirana je eggNOG opisom (77,3%). Otprilike polovica proteinskih sljedova (51,5%) uz eggNOG opis povezana je i s KEGG.KO i/ili GO anotacijom. Važno je napomenuti da su mnogi proteinski sljedovi anotirani KEGG.KO i GO anotacijom dobili više od jedne anotacije, dok su eggNOG opisi bili jedinstveni za proteinski slijed. 34% proteinskih sljedova s KEGG.KO anotacijom dobilo je više od jedne anotacije, dok je 96,4% svih proteinskih sljedova s GO anotacijom dobilo više od jedne GO anotacije.

Ukupno je 75.188 proteinskih sljedova anotirano eggNOG opisom, 47.987 KEGG.KO anotacijom, a 30.081 GO anotacijom (**Tablica 7**).

Tablica 7 Pregled konačnog skupa podataka SJ transkriptoma nakon funkcionalne anotacije eggNOG alatom. Kod – identifikacijski kod monoklone kulture u zbirci fitoplanktonskih vrsta Centra za istraživanje mora u Rovinju. Vrsta – ime vrste dobiveno konsenzusom metoda svjetlosne mikroskopije i molekularne identifikacije. Eksperimentalni uvjet – eksperimentalni uvjet u kojem je uzgojena kultura za izolaciju transkriptoma. eggNOG opis – broj proteinskih sljedova anotiranih eggNOG opisom. KEGG.KO – broj proteinskih sljedova anotiranih KEGG.KO anotacijom. GO – broj proteinskih sljedova anotiranih GO anotacijom.

Kod	Vrsta	Eksperimentalni uvjet	Funkcionalna anotacija skupa podataka SJ transkriptomi		
			EggNOG opis	KEGG.KO	GO
CIM827	<i>Chaetoceros_protuberans</i>	F/2	703	465	306
		P-limit	4.972	3.515	2.381
CIM843	<i>Skeletonema_marinoi</i>	F/2	11.214	6.779	4.183
		P-limit	7.561	4.752	2.987
CIM950	<i>Chaetoceros_curvisetus</i>	F/2	7.112	4.770	3.043
		P-limit	790	639	443
CIM964	<i>Chaetoceros_danicus</i>	F/2	8.723	5.759	3.598
		P-limit	6.171	4.079	2.567
CIM1008	<i>Pseudo-nitzschia manni</i>	F/2	5.962	3.976	2.525
		P-limit	2.337	1.591	1.033
CIM1063	<i>Thalassiosira sp.</i>	F/2	3.985	2.502	1.583
		P-limit	15.658	9.160	5.432

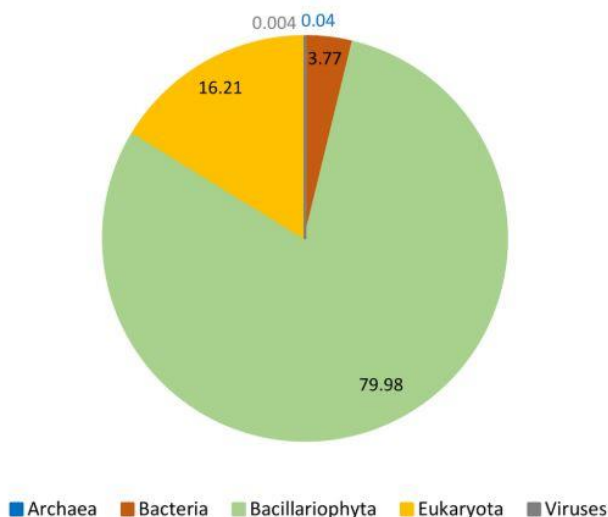


Slika 5 Prikaz broja proteinskih sljedova prema uspješnosti funkcionalne anotacije. Funkcionalno anotirani (plavo), proteinski sljedovi nepoznate funkcije, ali identificirani u genomima (zeleno) te neuspješno anotirani (crveno). Stupčasti dijagram predstavlja ukupni broj proteinskih sljedova u svakom uzorku zasebno. Tortni dijagram predstavlja postotak proteinskih sljedova u ukupnom skupu podataka SJ transkriptoma.

Najveći broj funkcionalno anotiranih proteinskih sljedova pronađen je u transkriptomu kulture CIM1063 (*Thalassiosira sp.*) uzgojene u uvjetu P-limit, a najmanji broj pronađen je u transkriptomu kulture CIM827 (*C. protuberans*) uzgojene u uvjetu F/2 (Tablica 7, Slika 5). Veći broj funkcionalno anotiranih proteinskih sljedova pronađen je u transkriptomima kultura uzgojenima u F/2 uvjetu (Tablica 7, Slika 5).

Budući da kulture SJ dijatomeja korištene za eksperimentalne inkubacije nisu bile aksenične, dio (u prosjeku 20% proteina po uzorku) anotiranih proteinskih sljedova bio je dodijeljen taksonomskim skupinama koje nisu dijatomeje (Bacillariophyta). Broj anotiranih proteinskih sljedova koji ne pripadaju dijatomejama nije se vidljivo razlikovao između vrsta ili dva uvjeta rasta. Većina takvih anotiranih proteinskih sljedova u konačnom skupu podataka bila je dodijeljena eukariotima (15.764 proteina) i bakterijama (3.666 proteina). Skupina eukariota uključivala je proteinske sljedove koji pripadaju različitim eukariotskim taksonima (npr. taksonima heterotrofnih protista), ali i one koji su na najnižoj taksonomskoj razini klasificirani kao Eukaryota. U ukupnom skupu podataka, oko 80% svih anotiranih proteinskih sljedova pripalo je dijatomejama (Bacillariophyta), dok je preostalih 20% bilo raspoređeno na eukariote (16%), bakterije (oko 4%)

i arheje (manje od 1%) (**Slika 6**). Jedina iznimka bio je transkriptom kulture CIM950 (*C. curvisetus*) uzgojene u uvjetu P-limit, u kojem je veći broj proteina bio dodijeljen bakterijama (14%) nego eukariotima (9%). Proteinski sljedovi taksonomski anotirani kao Bacillariophyta u daljnjem će tekstu biti označeni kao podskup podataka SJ dijatomeje.



Slika 6 Postotak anotiranih proteinskih sljedova u skupu podataka SJ transkriptoma koji pripadaju različitim taksonomskim grupama i razinama zadanima u bazi eggNOG (dijatomeje (*Bacillariophyta*), eukarioti (*Eukaryota*), bakterije (*Bacteria*), arheje (*Archaea*) i virusi (*Viruses*)).

3.1.2. Usporedba SJ transkriptoma s transkriptomima iz baze MMETSP

U svrhu procjene kvalitete, SJ transkriptomi uspoređeni su sa transkriptomima vrsta *S. marinoi* i *C. curvisetus* iz baze MMETSP.

De novo sklapanjem transkripata generirano je u prosjeku 31.878 transkripata po uzorku za *S. marinoi* i u prosjeku 8816 transkripata po uzorku za *C. curvisetus* transkriptomima iz MMETSP skupa podataka. Prosječna duljina transkripata bila je 815 pb za *S. marinoi* te 567 pb za *C. curvisetus* transkriptomima (Tablica 8). U usporedbi s time, SJ transkriptomi *S. marinoi* imali su u prosjeku 36.630 transkripata po uzorku s prosječnom duljinom od 860 pb, dok su SJ transkriptomi *C. curvisetus* imali u prosjeku 67.421 transkripta po uzorku s prosječnom duljinom od 624 pb (Tablica 8).

Na temelju broja sastavljenih transkripata, MMETSP i SJ transkriptomi *S. marinoi* nisu se uočljivo razlikovali. Prosječan broj sastavljenih transkripata za MMETSP transkriptome *S. marinoi* bio je 31.878 transkripata po uzorku, dok su SJ transkriptomi *S. marinoi* imali 50.374 (CIM843 F/2) i 22.886 (CIM843 P-limit) sklopljenih transkripata (Tablica 8). Duljina sklopljenih transkripata varirala je od 606 pb (MMETSP0920) do 1011 pb (CIM843 F/2), s prosječnom duljinom od 825 pb (Tablica 8).

Broj sklopljenih transkripata kod *C. curvisetus* transkriptoma, međutim, pokazao je veće razlike. Prosječan broj sklopljenih transkripata u MMETSP transkriptomima *C. curvisetus* bio je 8.816, dok su SJ transkriptomi *C. curvisetus* imali prosječno 67.421 sklopljenih transkripata (Tablica 8). Duljina transkripata varirala je od 350 bp (CIM950 P-limit) do 652 bp (MMETSP0718) (Tablica 8).

Broj predviđenih proteinskih sljedova varirao je među svim transkriptomima. Na temelju broja predviđenih proteinskih sekvenci nije uočena znatna razlika između SJ i MMETSP transkriptoma. Za sklopljene transkripte u prosjeku je predviđeno 14.539 proteinskih sljedova po uzorku u transkriptomima *S. marinoi* i 4.160 proteinskih sljedova po uzorku za *C. curvisetus* u MMETSP skupu podataka. U usporedbi s tim, SJ skup podataka sadržavao je u prosjeku 13.444 predviđenih proteinskih sljedova po uzorku za *S. marinoi* transkriptome i 5.335 predviđenih proteinskih sljedova po uzorku za *C. curvisetus* transkriptome (Tablica 8). Ove brojke odnose se na broj proteinskih sekvenci nakon eliminacije transkripata sa TPM vrijednostima jednakim nuli.

S. marinoi transkriptom s najvećim brojem predviđenih proteinskih sljedova (20.681) bio je MMETSP0918, generiran u F/2 uvjetima (Tablica 8). SJ transkriptom *S. marinoi* generiran u F/2 uvjetima (CIM843 F/2) imao je 16.193 predviđenih proteinskih sljedova (Tablica 8). *C. curvisetus* transkriptom s najvećim brojem predviđenih proteinskih sljedova (9.715) bio je CIM950 F/2, a slijedi ga MMETSP0718 (ASW -NO3) (4.934) (Tablica 8).

Općenito, transkriptom *S. marinoi* generiran u F/2 -Si (MMETSP0920) uvjetima imao je najmanji broj predviđenih proteinskih sljedova, svega 444. Iako je taj broj uočljivo manji u usporedbi s ostalim transkriptomima *S. marinoi*, čini se da prosječan broj predviđenih proteinskih sekvenci varira više između dviju vrsta nego između različitih uvjeta unutar iste vrste. Konkretno, razlika je najizraženija u broju predviđenih proteina, koji je za *S. marinoi* jedan red veličine veći u usporedbi s *C. curvisetus*.

Tablica 8 Usporedba strukture skupova podataka SJ I MMETSP transkriptoma kroz korake bioinformatičke obrade za svaku kulturu te eksperimentalni uvjet. Kod – identifikacijski kod monoklonalne kulture u zbirci fitoplanktonskih vrsta Centra za istraživanje mora u Rovinju te MMETSP baze. Vrsta – ime vrste dobiveno konsenzusom metoda svjetlosne mikroskopije i molekularne identifikacije. Eksperimentalni uvjet – eksperimentalni uvjet u kojem je uzgojena kultura za izolaciju transkriptoma. Transkripti – broj de novo sklopljenih transkripata. Prosječna duljina transkripta (pb) – prosječna duljina transkripata u transkriptomu. Predviđeni proteinski sljedovi – broj proteinskih sljedova preostalih nakon otklanjanja onih sa zbrojem jednakim nuli. Funkcionalno anotirani proteinski sljedovi – broj funkcionalno anotiranih proteinskih sljedova.

Kod	Vrsta	Eksperimentalni uvjet	Trinity		Transdecoder	EggNOG alat
			Transkripti	Prosječna duljina transkripata (pb)	Predviđeni proteinski sljedovi	Funkcionalno anotirani proteinski sljedovi
MMETSP0319	<i>S. marinoi</i>	F/2 (-Si -Cu)	33.153	962	18.699	16.898
MMETSP0320	<i>S. marinoi</i>	F/2	34.068	950	19.301	17.561
MMETSP0918	<i>S. marinoi</i>	F/2	32.428	778	20.681	18.546
MMETSP0920	<i>S. marinoi</i>	F/2 -Si	33.291	606	444	413
MMETSP1039	<i>S. marinoi</i>	F/2 -light	30.075	832	11.383	10.263
MMETSP1040	<i>S. marinoi</i>	F/2 +light	26.989	820	11.209	10.079
MMETSP1428	<i>S. marinoi</i>	Standardni Aquil	33.140	757	20.054	18.172
CIM843	<i>S. marinoi</i>	F/2	50.374	1.011	16.193	15.118
CIM843	<i>S. marinoi</i>	P-limit	22.886	709	10.695	10.089
MMETSP0718	<i>C. curvisetus</i>	ASW -NO3	9.747	652	4.934	4.260
MMETSP0719	<i>C. curvisetus</i>	ASW + nokodazol	7.884	482	3.385	3.322
CIM950	<i>C. curvisetus</i>	F/2	64.544	898	9.715	8.817
CIM950	<i>C. curvisetus</i>	P-limit	70.298	350	954	889

Nakon funkcionalne anotacije pomoću eggNOG alata postotak proteinskih sljedova s anotacijama koje su zadovoljile također se nije razlikovao pri usporedbi MMETSP i SJ transkriptoma. Kod gotovo svih uzoraka taj je postotak prelazio 90%.

Postotak proteinskih sljedova koji su dobili barem jednu funkcionalnu anotaciju (eggNOG opis, KEGG.KO, GO) u prosjeku je iznosio 75% za MMETSP i SJ transkriptome *S. marinoi*. Preostalih 25% odnosilo se na proteine nepoznate funkcije (Tablica 9). Za MMETSP i SJ transkriptome *C. curvisetus* prosječan postotak proteinskih sljedova s barem jednom funkcionalnom anotacijom iznosio je 89%, odnosno 85% (Tablica 9). Postotak proteinskih sljedova nepoznate funkcije bio je manji nego kod *S. marinoi* i iznosio je 11%, odnosno 15% (Tablica 9).

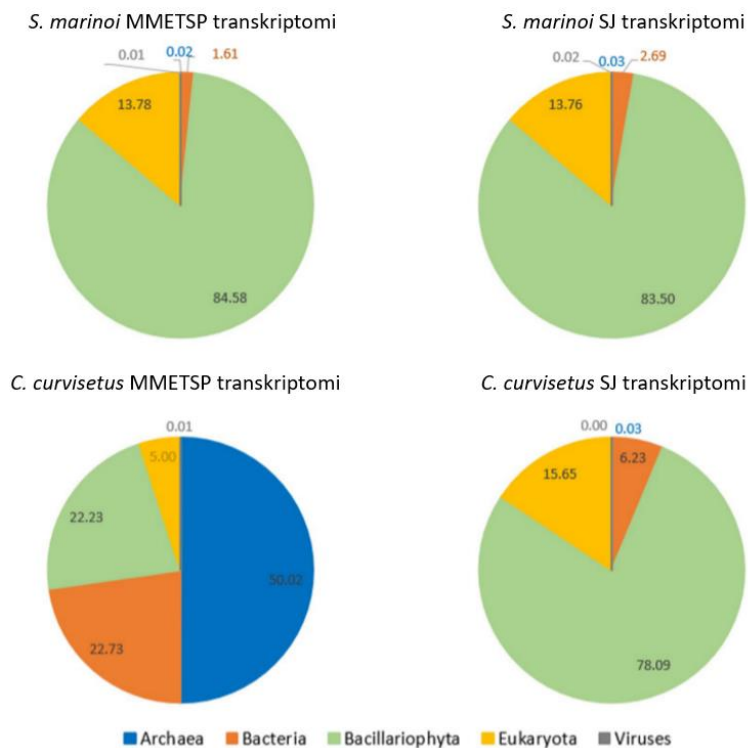
Slično kao kod SJ transkriptoma, najveći broj anotacija po uzorku temeljio se na eggNOG opisu, zatim na KEGG.KO i GO anotacijama (Tablica 9). U MMETSP i SJ transkriptomima 99% proteina s barem jednom funkcionalnom anotacijom imalo je eggNOG opis, 59–80% dobilo je KEGG.KO anotaciju, a 21–55% GO anotaciju (Tablica 9).

Tablica 9 Usporedba skupa podataka SJ transkriptomi s transkriptomima iz baze MMETSP nakon funkcionalne anotacije EggNOG alatom. Kod – identifikacijski kod monoklonalne kulture u zbirci fitoplanktonskih vrsta Centra za istraživanje mora u Rovinju. Vrsta – ime vrste dobiveno konsenzusom metoda svjetlosne mikroskopije i molekularne identifikacije. Uvjet – eksperimentalni uvjet u kojem je uzgojena kultura za izolaciju transkriptoma. Uspješna funkcionalna anotacija – broj proteinskih sljedova s barem jednom funkcionalnom anotacijom (EggNOG opis, KEGG.KO ili GO) koja je zadovoljila pragove e-vrijednosti i bit-bodovanja. Nepoznata funkcija – broj proteinskih sljedova koji su zadovoljili pragove e-vrijednosti i bit-bodovanja, ali nemaju poznatu molekularnu funkciju. eggNOG opis – broj proteinskih sljedova anotiranih eggNOG opisom. KEGG.KO – broj proteinskih sljedova anotiranih KEGG.KO anotacijom. GO – broj proteinskih sljedova anotiranih GO anotacijom.

Kod	Vrsta	Uvjet	Uspješna funkcionalna anotacija	Nepoznata funkcija	EggNOG opis	KEGG.KO	GO
MMETSP0319	<i>Skeletonema marinoi</i>	F/2 (-Si -Cu)	12,766	4,132	12,680	7,671	4,349
MMETSP0320	<i>Skeletonema marinoi</i>	F/2	13,204	4,601	13,105	7,841	4,413
MMETSP0918	<i>Skeletonema marinoi</i>	F/2	13,987	4,559	13,876	8,405	4,476
MMETSP0920	<i>Skeletonema marinoi</i>	F/2 -Si	309	104	306	198	108
MMETSP1039	<i>Skeletonema marinoi</i>	F/2 -light	7,680	2,583	7,619	4,733	2,699
MMETSP1040	<i>Skeletonema marinoi</i>	F/2 +light	7,499	2,580	7,439	4,687	2,676
MMETSP1428	<i>Skeletonema marinoi</i>	Standard Aquil	13,760	4,412	13,671	8,439	4,578
CIM843	<i>Skeletonema marinoi</i>	F/2	11,304	3,814	11,214	6,779	4,183
CIM843	<i>Skeletonema marinoi</i>	P-limit	7,624	2,465	7,561	4,752	2,987
MMETSP0718	<i>Chaetoceros curvisetus</i>	ASW -NO3	3,569	691	3,560	2,464	1,477
MMETSP0719	<i>Chaetoceros curvisetus</i>	ASW +nocodazole	3,150	172	3,149	2,517	678
CIM950	<i>Chaetoceros curvisetus</i>	F/2	7,152	1,665	7,112	4,770	3,043
CIM950	<i>Chaetoceros curvisetus</i>	P-limit	792	97	790	639	443

Uz pomoć algoritma za predviđanje taksonomske pripadnosti eggNOG alata funkcionalno anotiranim proteinskim sljedovima dodijeljena je taksonomska pripadnost. Transkriptomi vrste *S. marinoi* imali su 83–85% proteinskih sljedova dodijeljenih diatomejama (Bacillariophyta), 12–14% dodijeljenih eukariotima (Eukaryota), 1–3% dodijeljenih bakterijama (Bacteria) i manje od 1% dodijeljenih arhejama (Archaea) i virusima (Viruses) (Slika 7).

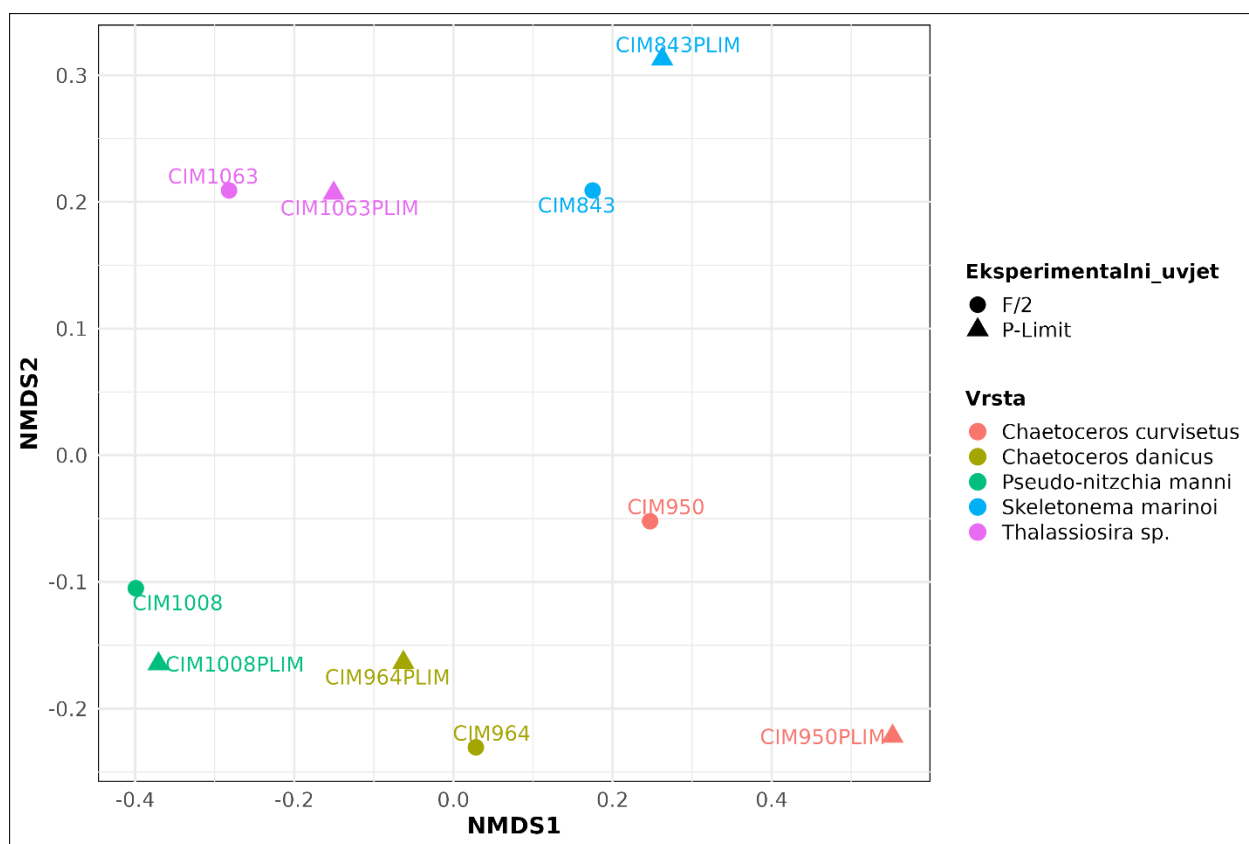
U transkriptomu *C. curvisetus* za oba skupa podataka identificiran je nešto manji udio proteinskih sljedova dijatomeja, 76–78% za uzorke MMETSP0718, CIM950 F/2 i CIM950 P-limit. Ovi rezultati su u skladu s rezultatima SJ transkriptomima gdje je udio proteinskih sljedova dijatomeja varirao između 77 i 84% po uzorku. Transkriptom MMETSP0719 imao je najmanji udio proteinskih sekvenci dijatomeja, samo 22%. Najveći udio proteina u tom uzorku bio je dodijeljen arhejama. Ovaj uzorak bio je tretiran nokodazolom, poznatim inhibitorom mikrotubula, koji je mogao negativno utjecati na rast i metaboličku aktivnost dijatomeja.



Slika 7 Postotak anotiranih proteinskih sljedova u SJ i MMETSP transkriptomima vrsta *S. marinoi* i *C. curvisetus* koji pripadaju različitim taksonomskim grupama i razinama zadanim u bazi eggNOG (dijatomeje (Bacillariophyta), eukarioti (Eukariota), bakterije (Bacteria), arheje (Archaea) i virusi (Viruses)).

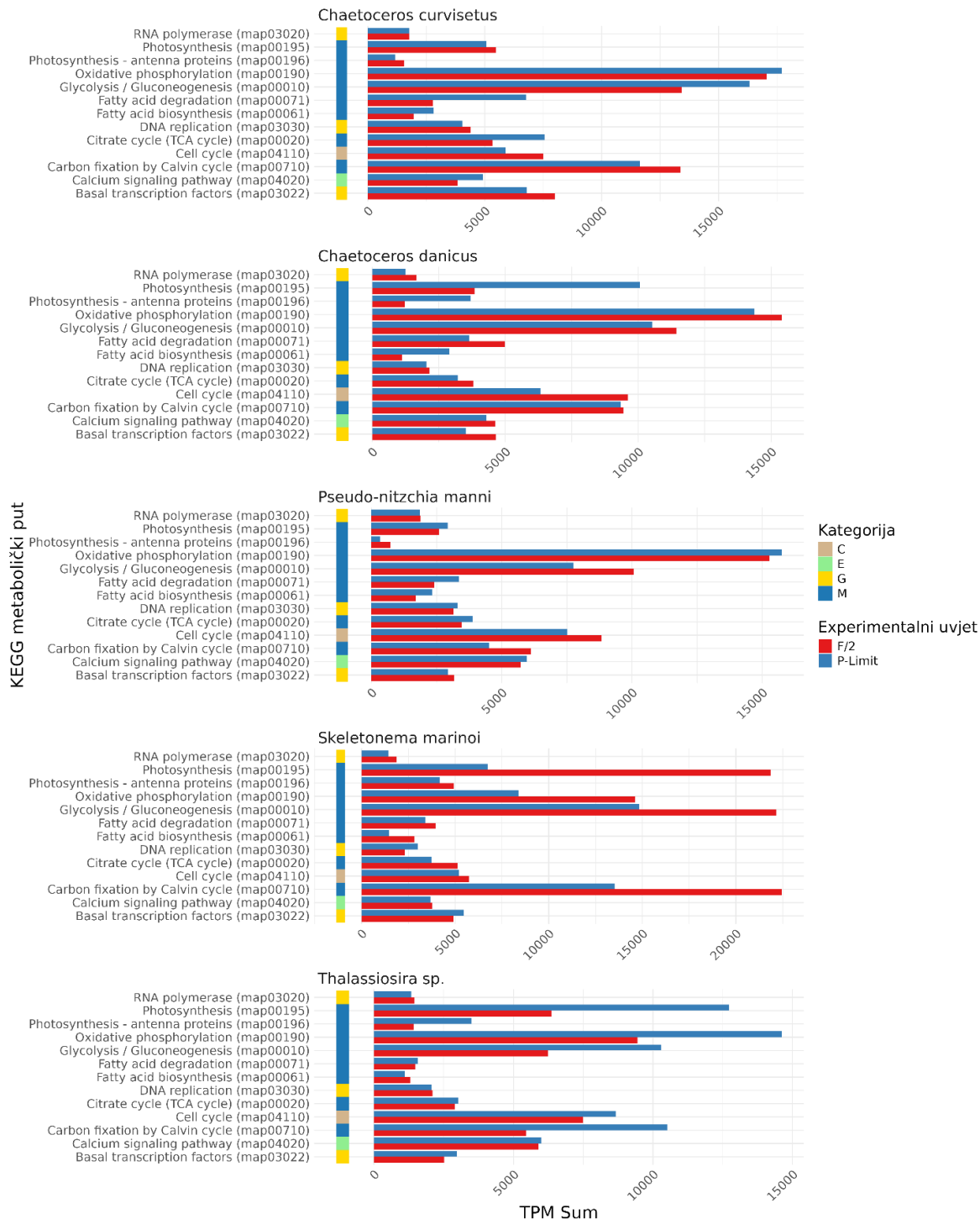
3.1.3. Funkcionalna analiza skupa podataka SJ dijatomeja

NMDS analiza funkcionalnog sastava pokazala je grupaciju uzoraka na temelju pripadnosti vrsti. 81% varijance ($R^2 = 0,81$, $F = 5,47$) među uzorcima objašnjeno je pripadnošću vrsti (P vrijednost = 0,002) (Slika 8, Prilog 2), dok je eksperimentalni uvjet imao vrlo ograničen ($R^2 = 0,03$, $F = 0,27$) utjecaj i nije bio značajan (P vrijednost = 0,97) na ordinaciju uzoraka (Slika 8, Prilog 3). Transkriptomi vrsta *S. marinoi* i *Thalassiosira* sp. činili su jednu grupu, a transkriptomi vrsta *C. curvisetus*, *C. danicus* i *P. mannii* drugu grupu prema osi NMDS2.



Slika 8 Rezultati NMDS analize funkcionalnog sastava uzoraka transkriptoma temeljeni na Bray-Curtisovoj udaljenosti. Točke predstavljaju uzorke obojane prema pripadnosti vrsti te oblikovane prema eksperimentalnom uvjetu. Oznake iznad točaka prikazuju kod uzorka.

Promatrajući obrasce ekspresije metaboličkih putovaa koji predstavljaju osnovne stanične procese, najizraženije razlike između eksperimentalnih uvjeta zabilježene su kod vrsta *S. marinoi* i *Thalassiosira* sp. (**Slika 9**). Kod vrste *S. marinoi* u P-limit uvjetu zabilježena je smanjena ekspresija putovaa staničnog disanja (glikoliza/glukoneogeneza (map00010) i oksidativna fosforilacija (map00190)) kao i fotosintetska reakcija (fiksacija ugljika Calvinovim ciklusom (map00710) i fotosinteza (map00195)). Suprotan obrazac zabilježen je kod vrste *Thalassiosira* sp. gdje su navedeni putovi pokazali višu razinu ekspresije u P-limit uvjetu. Vrste roda *Chaetoceros* i vrsta *P. mannii* pokazale su međusobno vrlo slične obrasce ekspresije izdvojenih procesa/metaboličkih putovaa i bez razlika u razini ekspresije između eksperimentalnih uvjeta za svaki od procesa. Uočena je tek znatnija razlika između ekspresije puta fotosinteze (map00195) povećane u P-limit uvjetu u odnosu na F/2 kod vrste *C. danicus*. Za sve ostale izdvojene metaboličke putovee (RNA polimeraza (map03020), biosinteza masnih kiselina (map00061), razgradnja masnih kiselina (map00071), replikacija DNA (map03030), stanični ciklus (map00020), stanični ciklus kvasaca (00710), signalni put kalcija (map04020) i osnovni transkripcijski faktori (03022)) nisu uočene znatnije razlike između eksperimentalnih uvjeta za nijednu od istraživanih dijatomejskih vrsta.

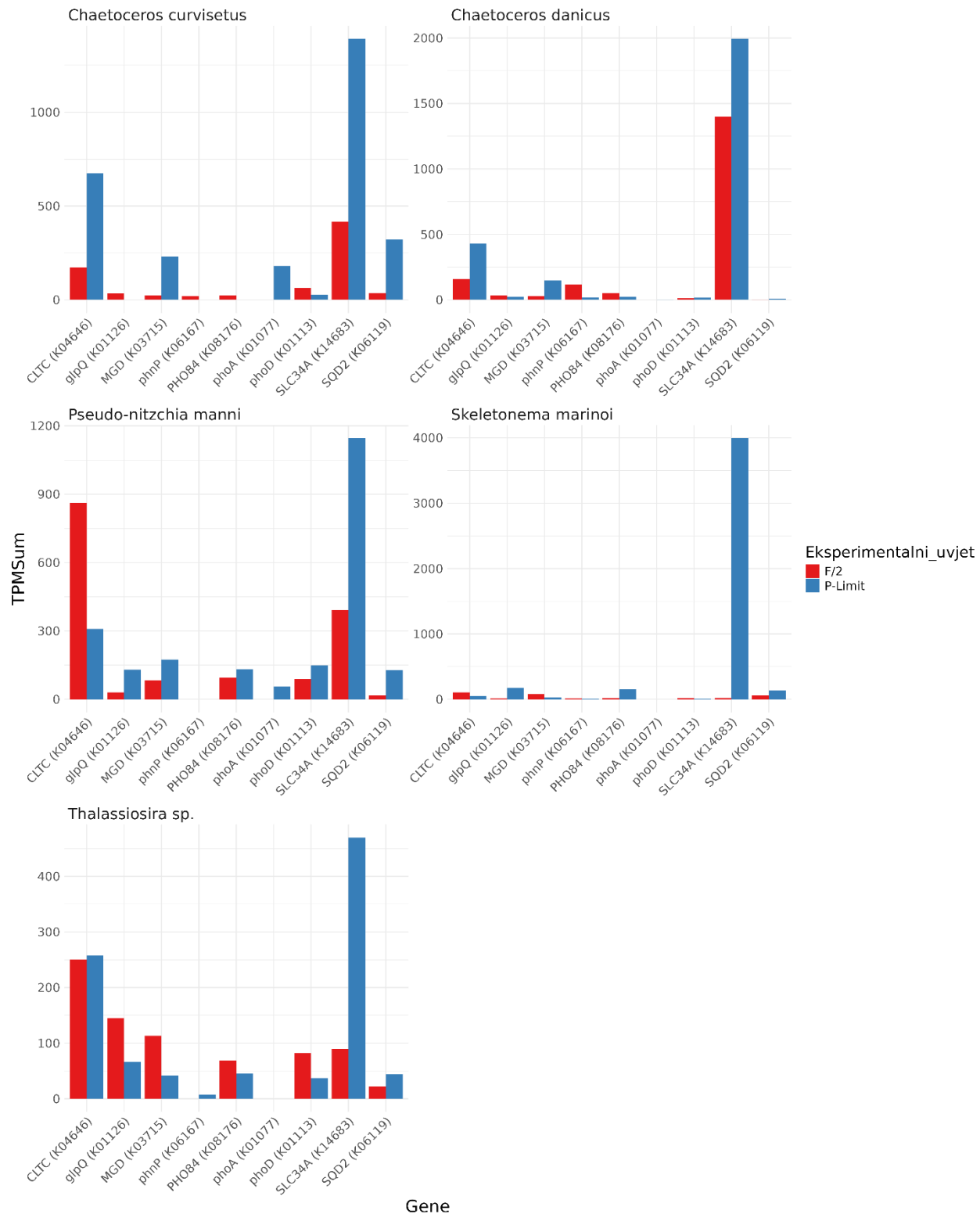


Slika 9 Obrasci ekspresije metaboličkih putova koji sudjeluju u osnovnim staničnim procesima. x-os prikazuje odabrane KEGG metaboličke putove i pripadajuće kategorije: M – metabolizam (engl. Metabolism), G – obrada genetskih informacija (engl. Genetic information processing), E – obrada informacija iz okoliša (engl. Environmental information processing), C – stanični procesi (engl. Cellular processes). y-os prikazuje zbrojene TPM vrijednosti ekspresije metaboličkih putova.

U analiziranim transkriptomima identificirano je devet gena od interesa, povezanih s prilagodbom fitoplanktona na uvjete ograničenja fosforom. Među njima su dva gena za alkalne fosfataze prethodno opisane u genomima morskih mikrobnih eukariota: PhoA-tip (K01077) i PhoD-tip (K01113). Uz njih identificirana su dva transmembranska transportera anorganskog fosfora: PHO84 (K08176) i SLC34A (K14683). Nije detektiran niti jedan gen povezan sa skladištenjem pol.. Također, identificirane su dvije fosfodiesteraze: fosfodiesteraza tipa phnP (K06167), uključena u put razgradnje fosfonata putem C–P lijaze te fosfodiesteraza tipa glpQ koja sudjeluje u razgradnji glicerofosfodiester. Također nije zabilježena prisutnost niti jednog gena za fosfolipaze (A, B, C ili D tipa) koji se povezuje s recikliranjem unutar staničnih rezervi fosfora. Međutim, pronađeni su geni SQD2 (K06119) i MGD (K03715) koji sudjeluju u remodeliranju stanične membrane. Također, kod svih vrsta identificiran je gen za klatrin CLTC (K04646), središnji gen za stanični proces endocitoze posredovane klatrinom (Slika 10).

Neki od ovih gena nisu bili identificirani kod svih vrsta. Gen za transporter anorganskog fosfora PHO84 (K08176) nije identificiran u transkriptomima vrste *C. curvisetus*, a gen za fosfodiesterazu tipa phnP (K06167) nije identificiran u transkriptomima vrste *P. mannii* (Slika 10). Gen za PhoA-tip alkalne fosfataze (K01077) nije pronađen u transkriptomima vrsta *C. danicus*, *S. marinoi* i *Thalassiosira* sp., a kod vrsta *C. curvisetus* i *P. mannii* pronađen je samo u transkriptomu iz P-limit eksperimentalnog uvjeta (Slika 10). Suprotno tome gen za PhoD-tip alkalne fosfataze (K01113) pronađen je kod svih vrsta (Slika 10).

Ekspresijski obrasci navedenih gena ključnih za prilagodbu eukariotskog fitoplanktona na uvjete ograničene dostupnosti fosfora pokazuju da su sve vrste imale znatno veću ekspresiju SLC34A (K14683) transportera u P-limit uvjetu (Slika 10). Također, povećana ekspresija gena za klatrin CLTC (K04646), središnjeg gena endocitoze posredovane klatrinom, imao je znatno veću ekspresiju u P-limit uvjetu kod vrsta roda *Chaetoceros* (Slika 10).



Slika 10 Obrasci ekspresije ključnih gena koji sudjeluju u prilagodbi fitoplanktona na uvjete ograničene dostupnosti fosfora. X-os prikazuje odabrane KEGG gene. y-os prikazuje zbrojene TPM vrijednosti ekspresije odabranih gena.

3.2. Skup podataka LTRV meta

3.2.1. Struktura skupa podataka LTRV meta

Sekvenciranjem metatranskriptomata generirano je 957.107.872 kratkih nukleotidnih sljedova za 24 knjižnice koje predstavljaju 24 uzorka prikupljana mjesečno na dvije postaje (RV001 i RV004) u razdoblju od travnja 2021. do ožujka 2022. godine. *De novo* je sklopljeno ukupno 12.603.917 transkripata, od kojih je predviđeno 4.872.492 proteinskih sljedova. Nakon eliminacije proteinskih sljedova s TPM vrijednošću jednakom nuli preostalo je ukupno 4.609.173 proteinskih sljedova za skup podataka LTRV meta.

Koristeći MMETSP bazu transkriptomata morskih mikrobnih eukariota, uspješno je taksonomski anotirano 2.102.068 proteinskih sljedova (45,6%) na razini koljena. Identificirana su 22 eukariotska koljena. Fotosintetski i miksotrofni protisti, odabrani za predstavljanje fitoplanktonske zajednice, uključivali su koljena: Dinoflagellata, Ochrophyta (koljeno podijeljeno na Bacillariophyta ?/(dijatomeje)/ i ostale Ochrophyta), Haptophyta, Chlorophyta i Cryptophyta. Ostali eukarioti (grupa "Ostali eukarioti") pronađeni u skupu podataka LTRV meta uključivali su koljena: Apicomplexa, Cercozoa, Ciliophora, Discoba, Foraminifera, Glaucophyta, Lobosa, Opalozoa, Rhodophyta, Choanoflagellida, Conosa, Discosea, Fungi, Hacrobia, Perkinsea, Stramenopiles i Sagenista.

Skup podataka šest fitoplanktonskih grupa odabranih kako bi predstavljali fitoplanktonsku zajednicu sastojao se od 1.059.949 proteinskih sljedova, od kojih je 837.676 uspješno funkcionalno anotirano KEGG.KO anotacijama. Identificirano je 7.765 jedinstvenih anotacija. Najveći broj jedinstvenih anotacija zabilježen je za koljena Dinoflagellata (6.534) i Chlorophyta (4.301). Sva ostala koljena imala su manje od 4.000 jedinstvenih anotacija. Koljenu Bacillariophyta pripao je najmanji broj jedinstvenih anotacija (3.189). Svega 1.200 jedinstvenih anotacija bilo je zajedničko kod svih šest fitoplanktonskih koljena.

3.2.2. Okolišni parametri

Tijekom jednogodišnjeg razdoblja uzorkovanja vrijednosti temperatura mora bile su u rasponu od 10,4 do 26,5 °C. Najviša temperatura zabilježena je u kolovozu 2021. godine na postaji RV004 na 0 i 5 m dubine, a najniža u ožujku na postaji RV004 na 20 m dubine. Tijekom ljeta visoke temperature bile su prisutne u cijelom vodenom stupcu (Slika 11). Razlika u temperaturi između površinskog i pridnenog sloja u kolovozu je bila manja od 5 °C. Vrijednosti saliniteta zabilježene su u rasponu od 35,3 do 38,84. Naviše vrijednosti saliniteta zabilježene su u ožujku 2022. godine. Tada je salinitet na sve tri promatrane dubine na postaji RV001 iznosio 38,8, a na postaji RV004, 38,84. Od kasnog proljeća do ljeta zabilježeno je zamjetno smanjenje saliniteta površinskog sloja koje ukazuje na prodor slatke vode rijeke Po te uspostavu zatvorenog obrasca cirkulacije sjevernog Jadrana (Slika 11). Također, razlike u salinitetu između 0 i 5 m dubine te 20 m dubine ukazuju na stratifikaciju vodenog stupca u ovom periodu (Slika 11).

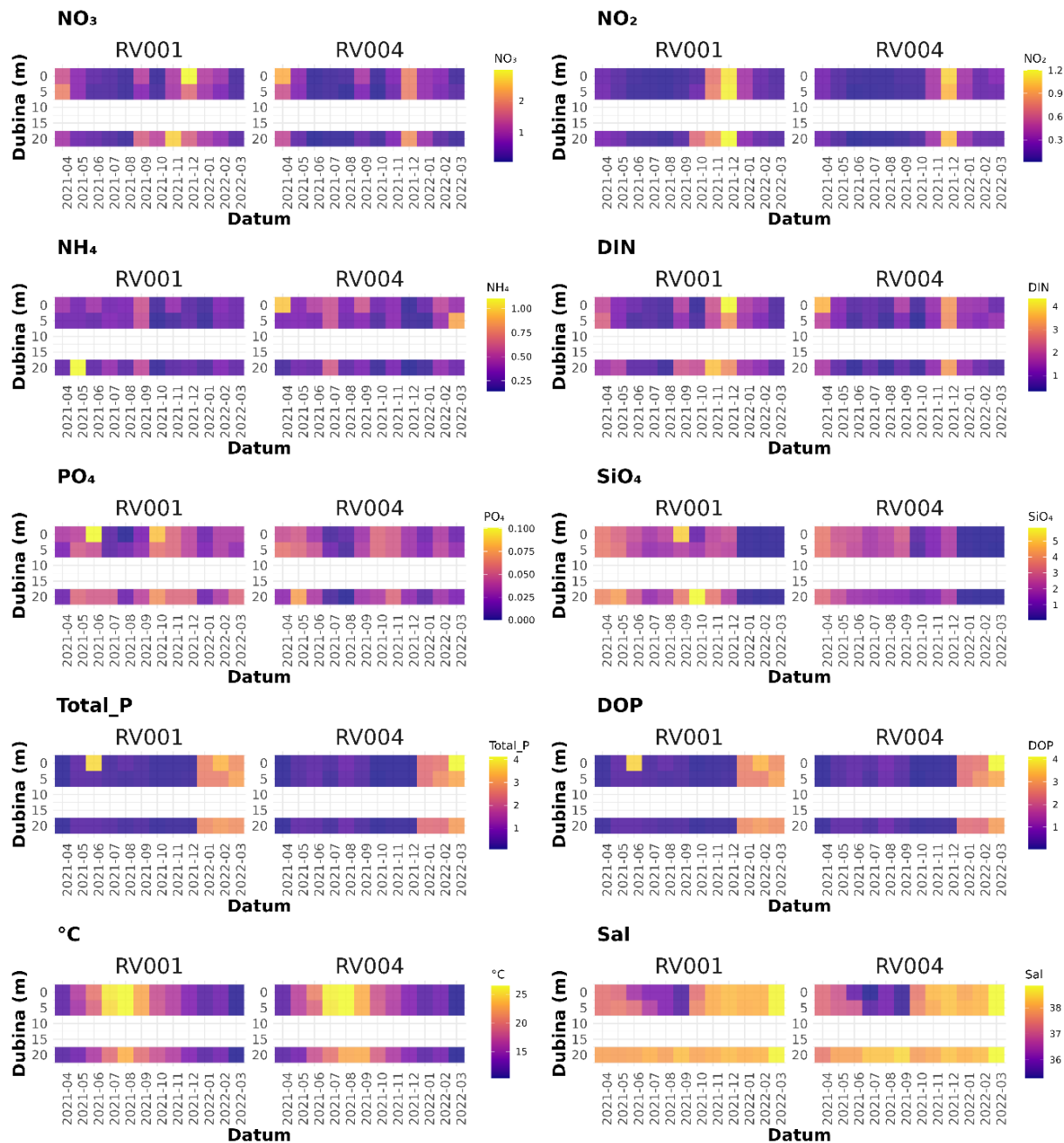
Najviša vrijednost koncentracije ukupnog fosfora (Total_P) zabilježena je u površinskom sloju, na postaji RV001 u lipnju (Slika 11). Tada su koncentracije ortofosfata (PO_4^{3-}) i otopljenog organskog fosfora (DOP) imale visoke vrijednosti, i to 0,1 $\mu\text{mol/L}$ odnosno 3,7 $\mu\text{mol/L}$.

Tijekom ostatka ljeta, ukupni otopljeni fosfor (Total_P) i otopljeni anorganski dušika (DIN) bili su gotovo iscrpljeni u cijelom vodenom stupcu na obje postaje (Slika 11).

Koncentracije nutrijenata počele su se regenerirati u vodenom stupcu tijekom jeseni (Slika 11). Najviše vrijednosti koncentracije otopljenog anorganskog dušika (DIN) zabilježene su u studenom i prosincu na obje postaje ($>3 \mu\text{mol/L}$).

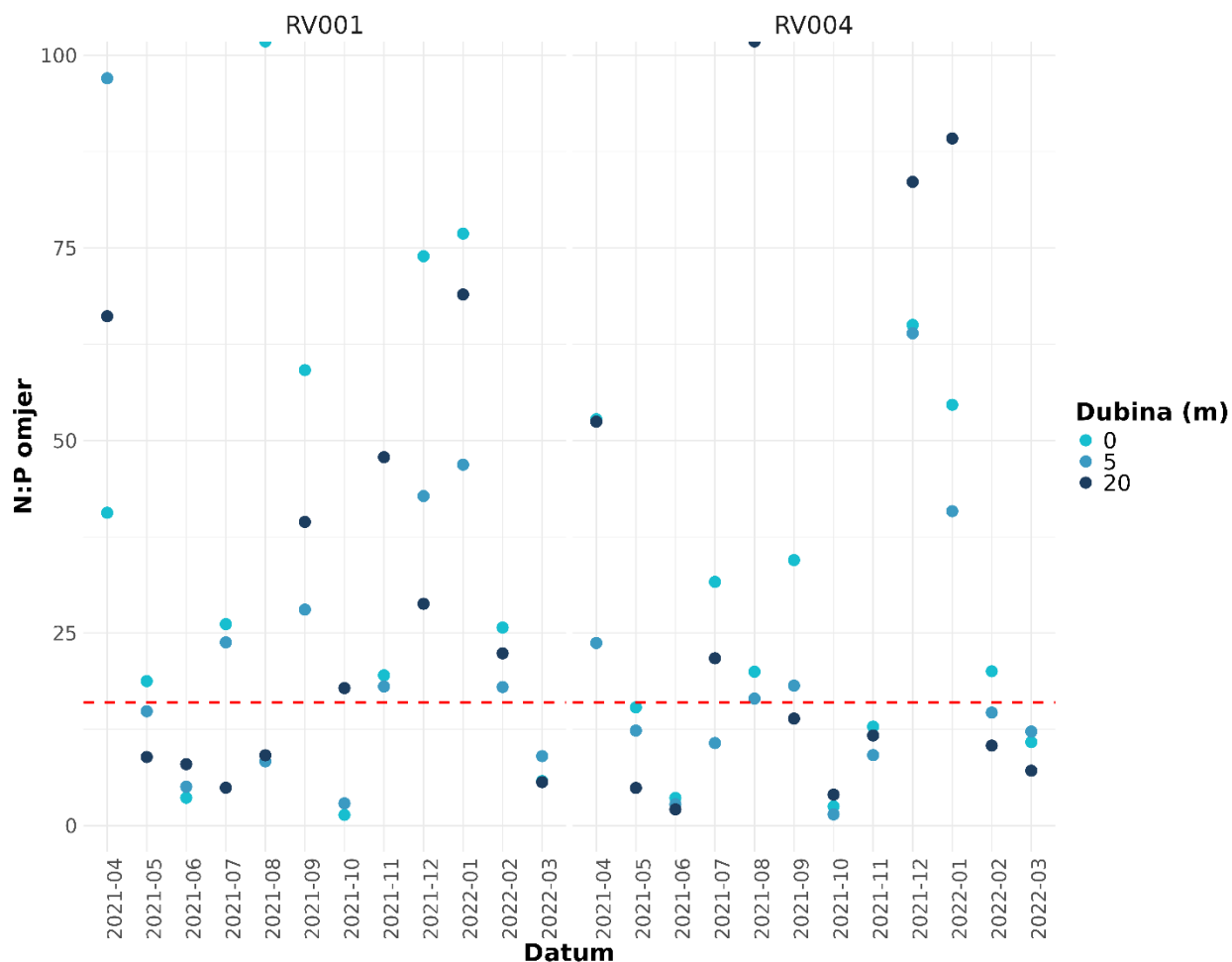
Koncentracija ortosilikata (SiO_4^-) bila je generalno viša u jesenskim i zimskim mjesecima (Slika 11), a najviše vrijednosti zabilježene su u jesen na postaji RV001: 5,2 $\mu\text{mol/L}$ u rujnu i 5,8 $\mu\text{mol/L}$ u listopadu. Nakon listopada koncentracija ortosilikata (SiO_4^-) bila je u padu, dosegnuvši vrijednosti $<0,2 \mu\text{mol/L}$ tijekom zime.

Tijekom zimskih mjeseci koncentracija otopljenog organskog fosfora (DOP) bila je viša u usporedbi s ostatkom godine (Slika 11), a raspon vrijednosti kretao se od 2,3 $\mu\text{mol/L}$ do 4,1 $\mu\text{mol/L}$.



Slika 11 Godišnja raspodjela okolišnih parametara na postajama RV001 i RV004 na tri dubine (0, 5 i 20 m). Kratice na grafikonu: NO_3 (nitrat (NO_3^-)), NO_2 (nitrit (NO_2^-)), NH_4 (amonijak (NH_4^+)), DIN (otopljeni anorganski dušik (zbroj (NO_3^-), (NO_2^-) i (NH_4^+))), PO_4 (ortofosfat (PO_4^{3-})), SiO_4 (ortosilikat (SiO_4^{4-})), Total_P (ukupni otopljeni fosfor), DOP (otopljeni organski fosfor (zbroj Total_P i (PO_4^{3-}))), °C (temperatura), Sal (salinitet).

Omjer dušika i fosfora (N:P) tijekom većeg djela godine bio je neuravnotežen ($N:P > 16$) u korist nitrata (NO_3^-) (Slika 12). Na obje postaje i na sve tri promatrane dubine omjer N:P bio je < 16 samo u lipnju i ožujku (Slika 12). Na postaji RV004, omjer N:P < 16 također je zabilježen na sve tri mjerene dubine u svibnju, listopadu i studenom (Slika 12).



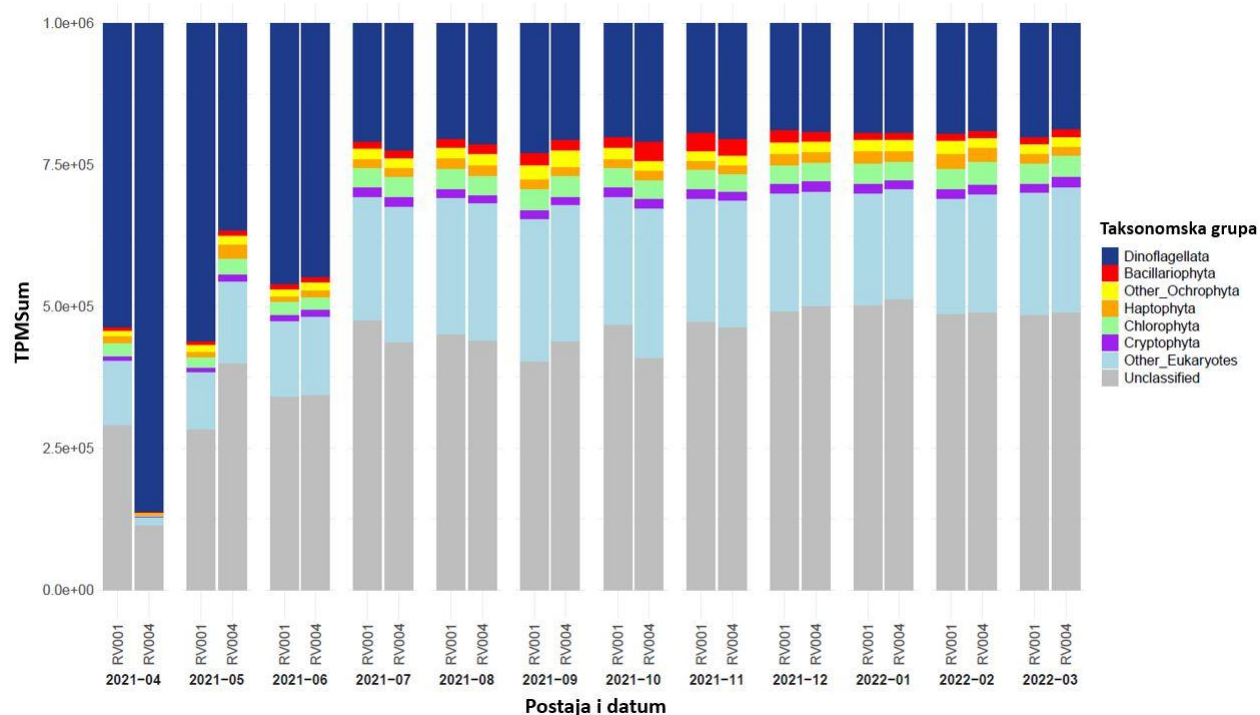
Slika 12 Godišnja raspodjela omjera N:P (nitrata (NO_3^-)/ ortofosfata (PO_4^{3-})). Crvena isprekidana linija prikazuje omjer N:P = 16.

3.2.3. Taksonomska sukcesija aktivnosti fitoplanktonske zajednice

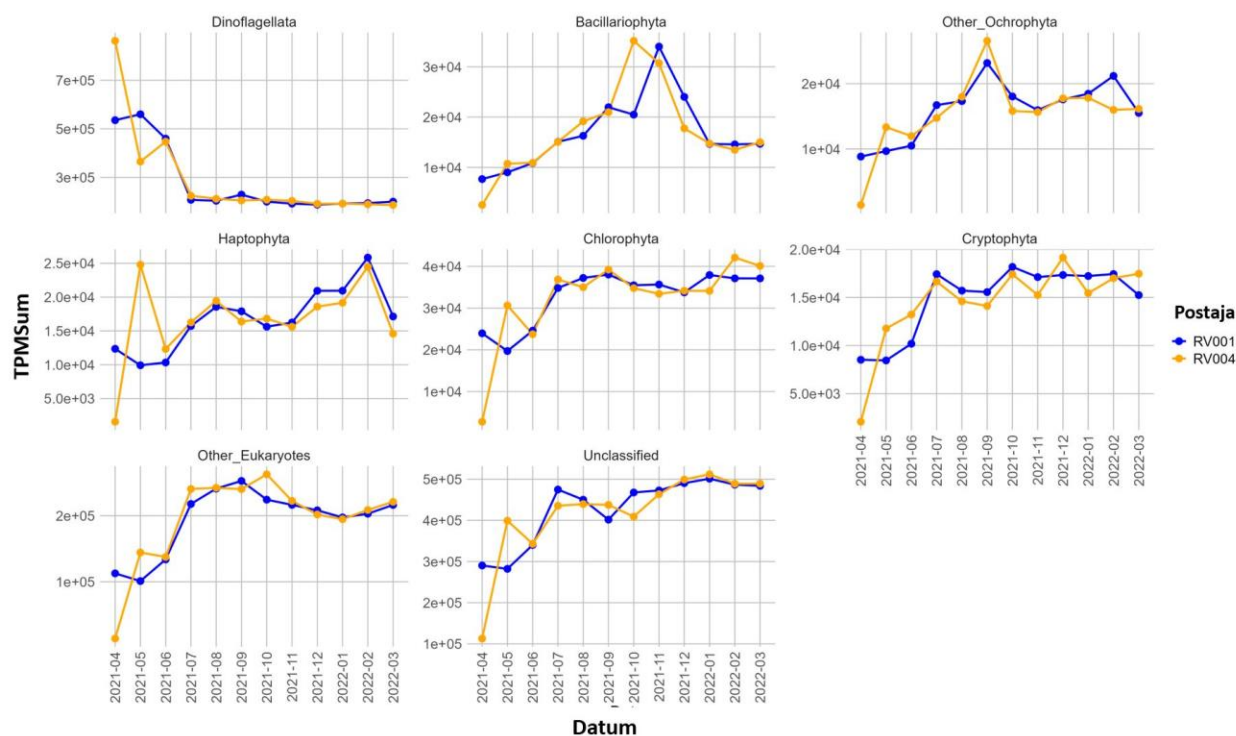
Relativni udjeli svake pojedine fitoplanktonske grupe u ukupnoj metaboličkoj aktivnosti zajednice predstavljeni su zbrojem TPM vrijednosti svih proteinskih sljedova normaliziranih između grupa (Slika 13). Na taj način omogućena je međusobna usporedba fitoplanktonskih grupa u kontekstu razine metaboličke aktivnosti tijekom jednogodišnjeg istraživanog razdoblja.

Nasuprot tome, izdvajanje svake pojedine grupe u zasebne prikaze metaboličke aktivnosti tijekom godine (Slika 14) omogućilo je jasnije uočavanje razdoblja niske i visoke aktivnosti svake pojedine grupe tijekom istraživanog razdoblja.

Od fitoplanktonskih grupa, najveće relativne udjele u metaboličkoj aktivnosti kroz cijelu godinu imali su dinoflagelati (Dinoflagellata). Njihov doprinos tijekom godine gotovo je jednak doprinosu grupe „ostali eukarioti“ kojoj je u istraživanom razdoblju pripadao najveći udio taksonomski anotiranih proteinskih sljedova u uzorcima (Slika 13).



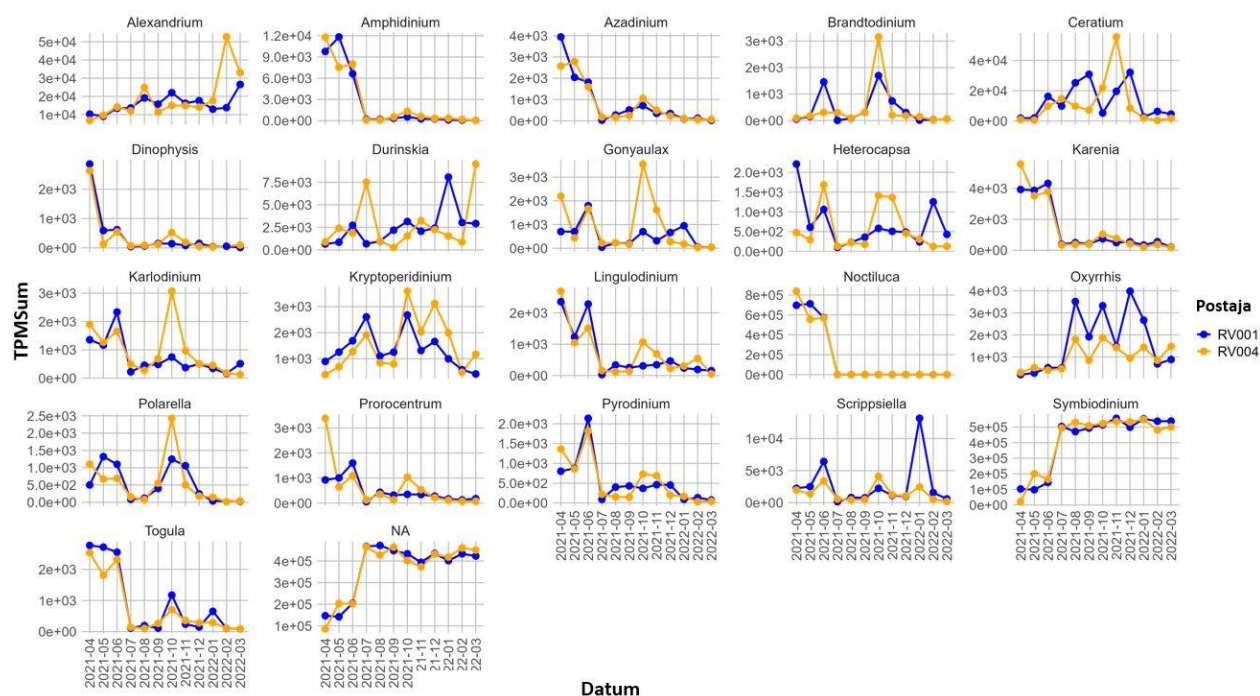
Slika 13 Relativni udjeli grupa u ukupnoj metaboličkoj aktivnosti cjelokupne zajednice, temeljeni na zbroju TPM vrijednosti normaliziranih između grupa. x-os predstavlja postaje (RV001 i RV004) te 12 vremenskih točaka uzorkovanja. y-os predstavlja zbroj TPM vrijednosti normaliziranih između grupa, svih proteinskih sljedova koji su pripali određenoj taksonomskoj grupi.



Slika 14 Promjene u metaboličkoj aktivnosti tijekom istraživanog razdoblja (travanj 2021. – ožujak 2022.) na postajama RV001 i RV004, zabilježenih fitoplanktonskih grupa (*Dinoflagellata*, *Bacillariophyta*, ostalih *Ochrophyta*, *Haptophyta*, *Chlorophyta* i *Cryptophyta*) te skupina “ostali Eukarioti” i “neklasificirani”. Aktivnosti su izražene kao zbroj TPM vrijednosti svih proteinskih sljedova, normaliziranih između grupa.

Grupa *Dinoflagellata* je u proljeće imala najveći udio u ukupnoj metaboličkoj aktivnosti zajednice, nadmašujući čak i grupe „ostali eukarioti“ i „neklasificirani“ (Slika 13). Analiza na razini roda istaknula je rod *Noctiluca* kao metabolički najaktivniji rod dinoflagelata kroz cijelo proljeće, s najvećim vrijednostima u travnju na postaji RV004 (TPMSum > 800.000) (Slika 15). Metabolička aktivnost roda *Noctiluca* smanjivala se tijekom ostatka proljeća, a najmanje vrijednosti zabilježene su u srpnju, nakon čega prisutnost ovog roda u zajednici više nije detektirana (Slika 15). Uz rod *Noctiluca* i drugi rodovi dinoflagelata kao što su *Amphidinium* (TPMSum > 12.000), *Azadinium* (TPMSum > 4.000), *Dinophysis* (TPMSum > 2.500), *Heterocapsa* (TPMSum > 2 000), *Karenia* (TPMSum > 5.000), *Lingulodinium* (TPMSum > 2.500), *Prorocentrum* (TPMSum > 3.000), *Pyrodinium* (TPMSum > 2.000) i *Togula* (TPMSum > 3.000) imali su povišenu metaboličku aktivnost u proljeće naspram ostatka godine (Slika 15). Dinoflagelati su tijekom ostatka godine nastavili dominirati fitoplanktonskom zajednicom, uz stabilne relativne udjele u ukupnoj metaboličkoj aktivnosti zajednice (Slika 13). Međutim, sastav

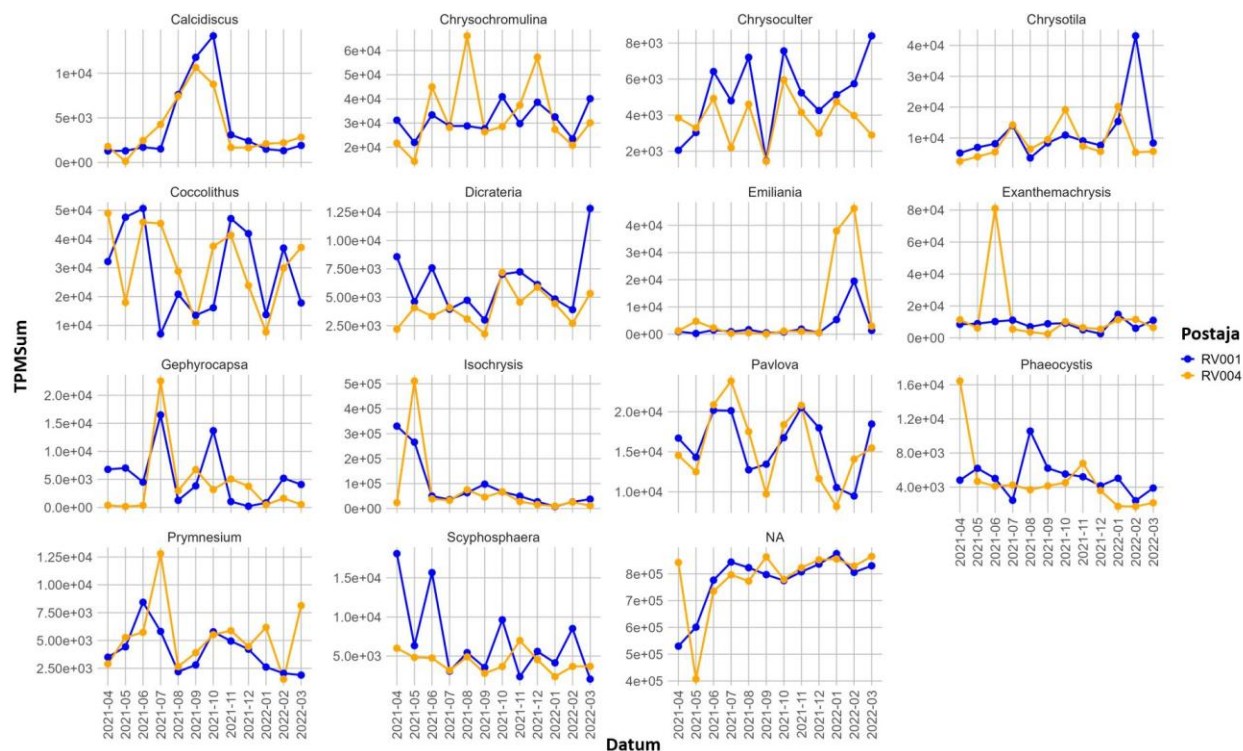
rodova koji su pridonosili visokim relativnim udjelima grupe Dinoflagellata razlikovao se kroz ostatak godine u usporedbi s proljetnim razdobljem (Slika 15). Posebno se ističe rod *Symbiodinium*, skupina endosimbiontskih dinoflagelata, čija je metabolička aktivnost počela rasti u srpnju (Slika 15). Metabolička aktivnost roda *Symbiodinium* (TPMSum > 500.000) zadržala je stabilne i visoke vrijednosti i u ostatku godine (Slika 15). Nekoliko drugih rodova dinoflagelata pokazalo je povećanu metaboličku aktivnost nakon proljetne dominacije roda *Noctiluca*. Tako je za rod *Ceratium* uočeno nekoliko izraženih maksimalnih vrijednosti aktivnosti krajem ljeta (TPMSum > 30.000) i u jesen (TPMSum > 50.000), a za rod *Alexandrium* u zimskom razdoblju (TPMSum > 50.000) (Slika 15).



Slika 15 Promjene u metaboličkoj aktivnosti rodova grupe Dinoflagellata tijekom istraživnog razdoblja (travanj 2021. – ožujak 2022.) na postajama RV001 i RV004. Aktivnosti su izražene kao zbroj TPM vrijednosti svih proteinskih sljedova, normaliziranih unutar grupe Dinoflagellata. Grafikon NA predstavlja TPMSum vrijednosti proteinskih sljedova grupe Dinoflagellata koji nisu uspješno anotirani na razini roda.

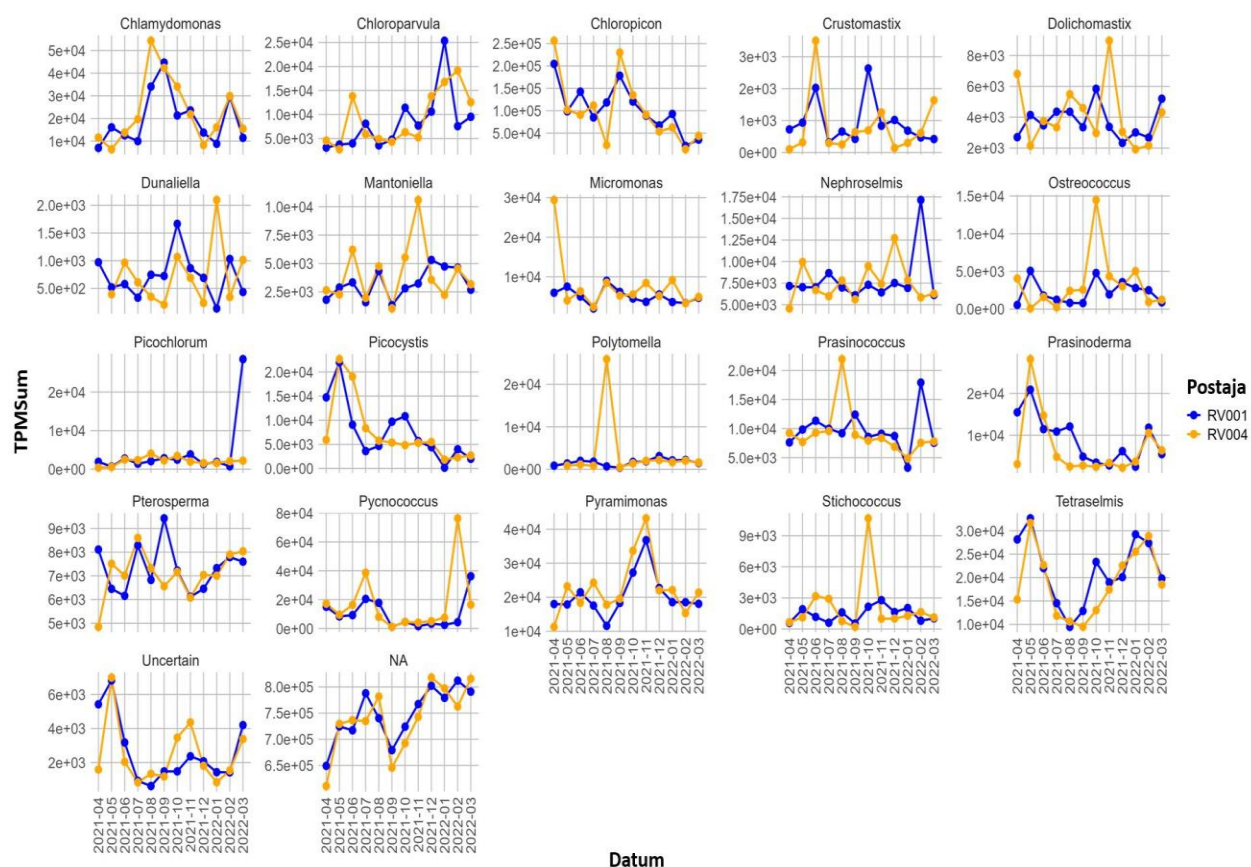
Većina ostalih fitoplanktonskih grupa (Bacillariophyta, ostali Ochrophyta, Chlorophyta i Cryptophyta) imala je najmanje udjele u ukupnoj metaboličkoj aktivnosti zajednice tijekom proljetnih mjeseci (Slika 13).

Samo je za grupu Haptophyta u svibnju na postaji RV004 zabilježena povišena metabolička aktivnost u odnosu na ostatak godine (Slika 14). Analiza rodova odgovornih za ovu aktivnost Haptophyta otkrila je visoke udjele roda *Isochrysis* (TPMSum > 500.000) (Slika 16). Ipak, najviše metaboličke aktivnosti za grupu Haptophyta zabilježene su tijekom zimskih mjeseci s maksimalnim vrijednostima u veljači na obje istraživačke postaje (Slika 14). Rodovi koji su najviše doprinijeli ovom porastu bili su *Chrysotila* (TPMSum > 40.000) na RV001 i *Emiliania* (TPMSum > 40.000) na RV004 (Slika 16). Najviše vrijednosti ekspresije grupe Haptophyta kroz veći dio godine i na obje postaje zabilježene su za proteinske sljedove koji nisu uspješno taksonomski anotirani na razini roda.

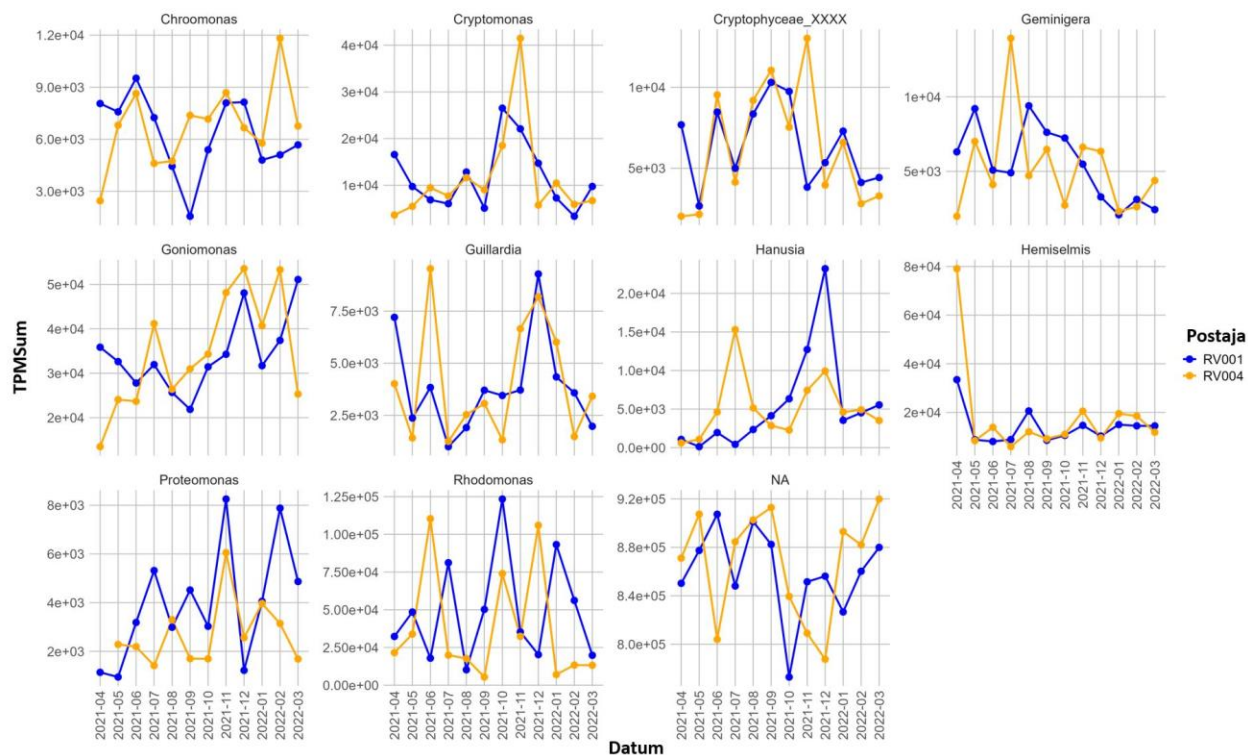


Slika 16 Promjene u metaboličkoj aktivnosti rodova grupe Haptophyta tijekom istraživanog razdoblja (travanj 2021. – ožujak 2022.) na postajama RV001 i RV004. Aktivnosti su izražene kao zbroj TPM vrijednosti svih proteinskih sljedova normaliziranih unutar grupe Haptophyta. Grafikon NA predstavlja TPMSum vrijednosti proteinskih sljedova grupe Haptophyta koji nisu uspješno anotirani na razini roda.

Porast metaboličke aktivnosti grupa Chlorophyta i Cryptophyta unutar fitoplanktonske zajednice zabilježena je u kasno proljeće i ljeto, nakon završetka cvjetanja roda *Noctiluca* (Slika 14). Relativni udjeli ovih grupa ostali su visoki i stabilni tijekom ostatka godine (Slika 13). Analiza na razini roda pokazala je da su proteinski sljedovi koji nisu uspješno anotirani na razini roda najviše doprinijeli (TPMSum > 800.000) povišenim metaboličkim aktivnostima grupa Chlorophyta i Cryptophyta u ukupnoj zajednici kroz veći dio godine na obje postaje (Slika 17 i Slika 18).



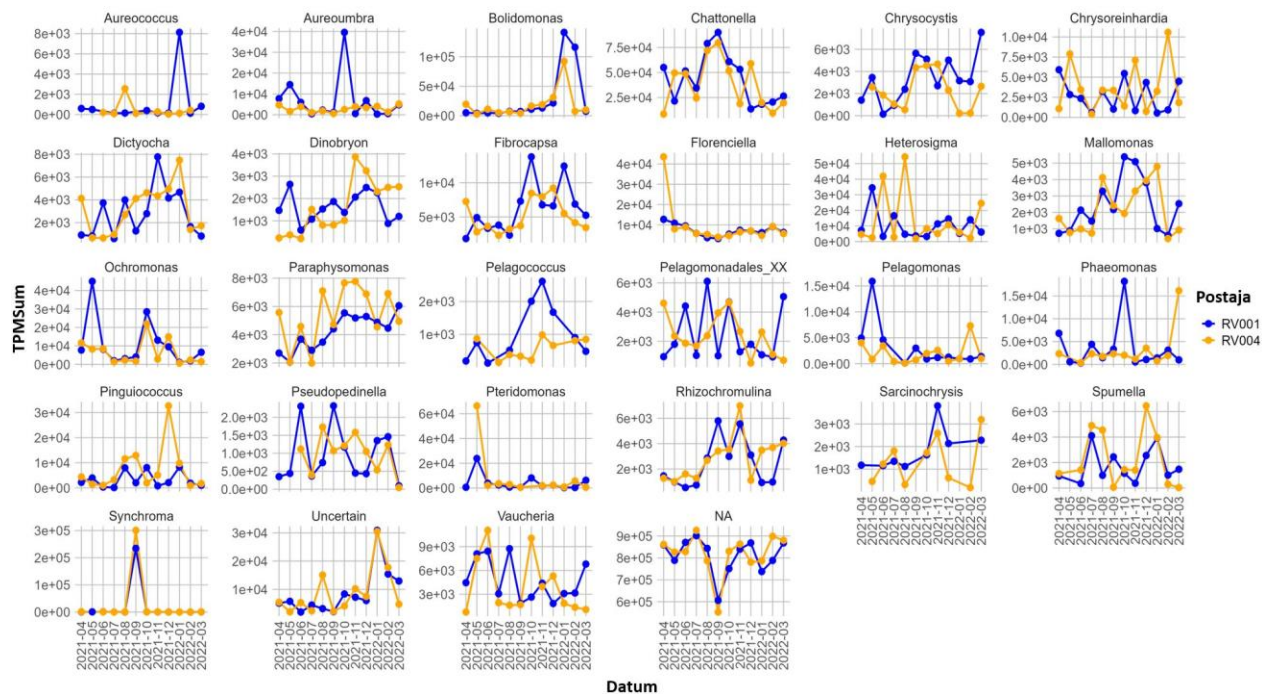
Slika 17 Promjene u metaboličkoj aktivnosti rodova grupe Chlorophyta tijekom istraživanog razdoblja (travanj 2021. – ožujak 2022.) na postajama RV001 i RV004. Aktivnosti su izražene kao zbroj TPM vrijednosti svih proteinskih sljedova normaliziranih unutar grupe Chlorophyta. Grafikon NA predstavlja TPMSum vrijednosti proteinskih sljedova grupe Chlorophyta koji nisu uspješno anotirani na razini roda.



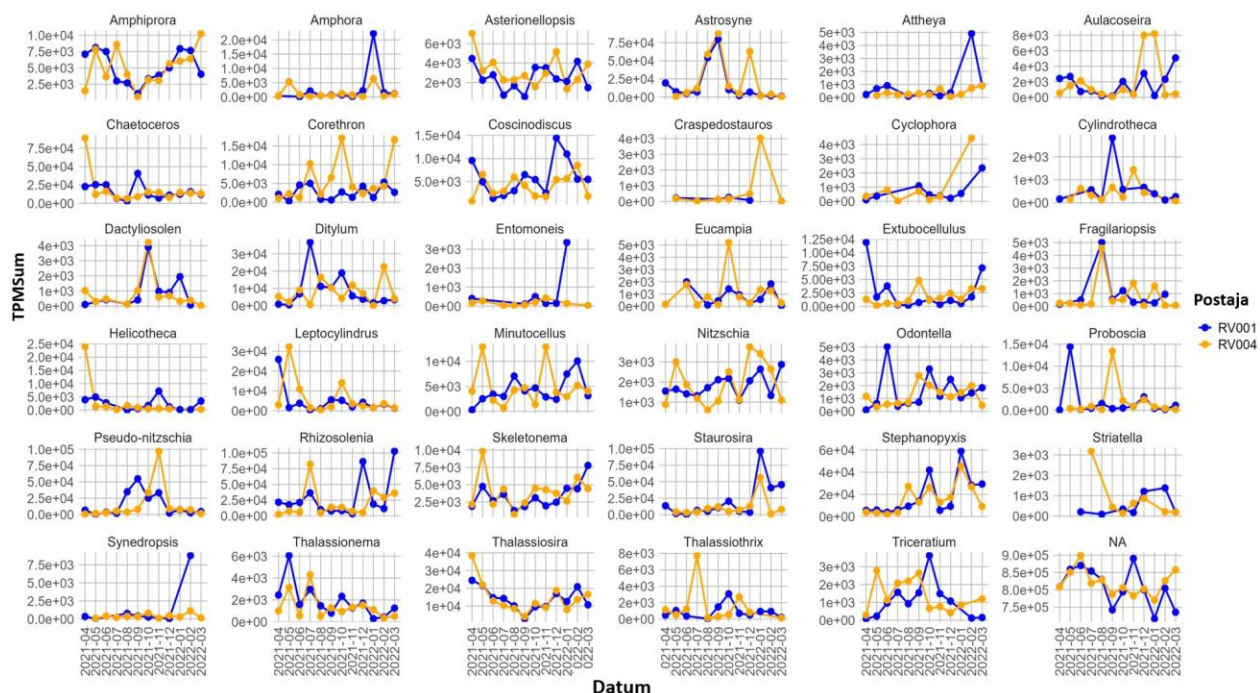
Slika 18 Promjene u aktivnosti rodova grupe *Cryptophyta* tijekom istraživnog razdoblja (travanj 2021. – ožujak 2022.) na postajama RV001 i RV004. Aktivnosti su izražene kao zbroj TPM vrijednosti svih proteinskih sljedova, normaliziranih unutar grupe *Cryptophyta*. Grafikon NA predstavlja TPMSum vrijednosti proteinskih sljedova grupe *Cryptophyta* koji nisu uspješno anotirani na razini roda.

Metabolička aktivnost grupa „ostali Ochrophyta“ i Bacillariophyta postupno je rasla tijekom ljeta (Slika 14). Grupa „ostali Ochrophyta“ imala je najizraženiji maksimum aktivnosti krajem ljeta na obje postaje (Slika 14), kojem je najviše doprinio rod *Synchroma* (TPMSum > 300.000) i „ostali Ochrophyta“ koji nisu anotirani na razini roda (TPMSum ~ 600.000) (Slika 19). Najviše vrijednosti metaboličke aktivnosti za grupu Bacillariophyta zabilježene su u jesen, i to na obje postaje (Slika 14). Vrijednost relativnog udjela grupe Bacillariophyta najprije se povećala na postaji RV004 u listopadu, a visoke vrijednosti nastavile su se i kroz studeni, dok je na postaji RV001 najviša vrijednost zabilježena kasnije, u studenom (Slika 14). Rod koji je najviše pridonio jesenskom porastu relativnih udjela grupe Bacillariophyta bio je *Pseudo-nitzschia* (Slika 20) i Bacillariophyta koji nisu anotirani na razini roda. Tijekom zime, metabolička aktivnost grupa Ochrophyta i Bacillariophyta smanjila se u usporedbi s vrijednostima u jesen, ali je i dalje ostala viša nego u proljeće (Slika 14). Kroz cijelu godinu najveći doprinos aktivnosti za obje grupe

(TPMSum > 600.000) imali su transkripti koji nisu uspješno anotirani na razini roda (Slika 19 i Slika 20) .



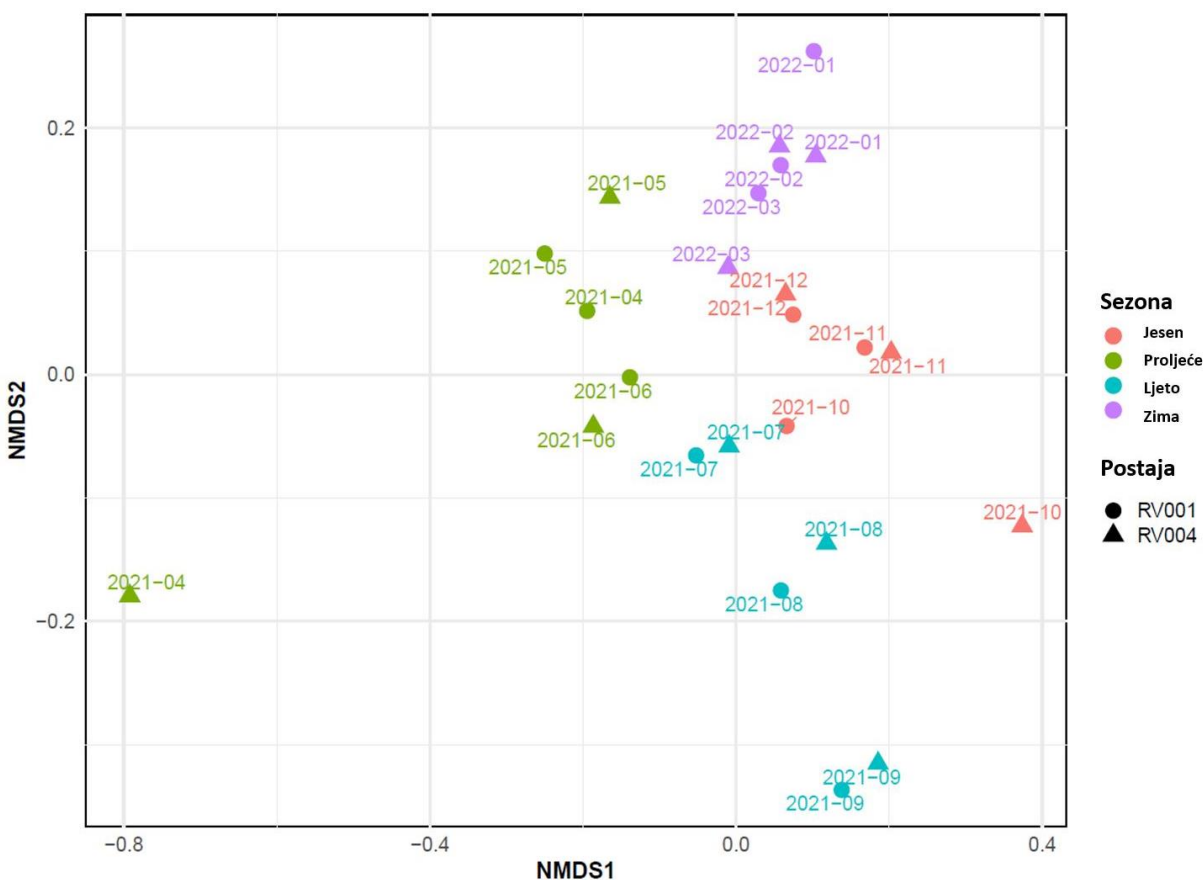
Slika 19 Promjene u aktivnosti rodova grupe ostali Ochrophyta tijekom istraživnog razdoblja (travanj 20.1. – ožujak 2022.) na postajama RV001 i RV004. Aktivnosti su izražene kao zbroj TPM vrijednosti svih proteinskih sljedova normaliziranih unutar grupe ostali Ochrophyta. Grafikon NA predstavlja TPMSum vrijednosti proteinskih sljedova grupe ostali Ochrophyta koji nisu uspješno anotirani na razini roda.



Slika 20 Promjene u aktivnosti rodova grupe Bacillariophyta tijekom istraživnog razdoblja (travanj 2021. – ožujak 2022.) na postajama RV001 i RV004. Aktivnosti su izražene kao zbroj TPM vrijednosti svih proteinskih sljedova normaliziranih unutar grupe Bacillariophyta. Grafikon NA predstavlja TPMSum vrijednosti proteinskih sljedova grupe Bacillariophyta koji nisu uspješno anotirani na razini roda.

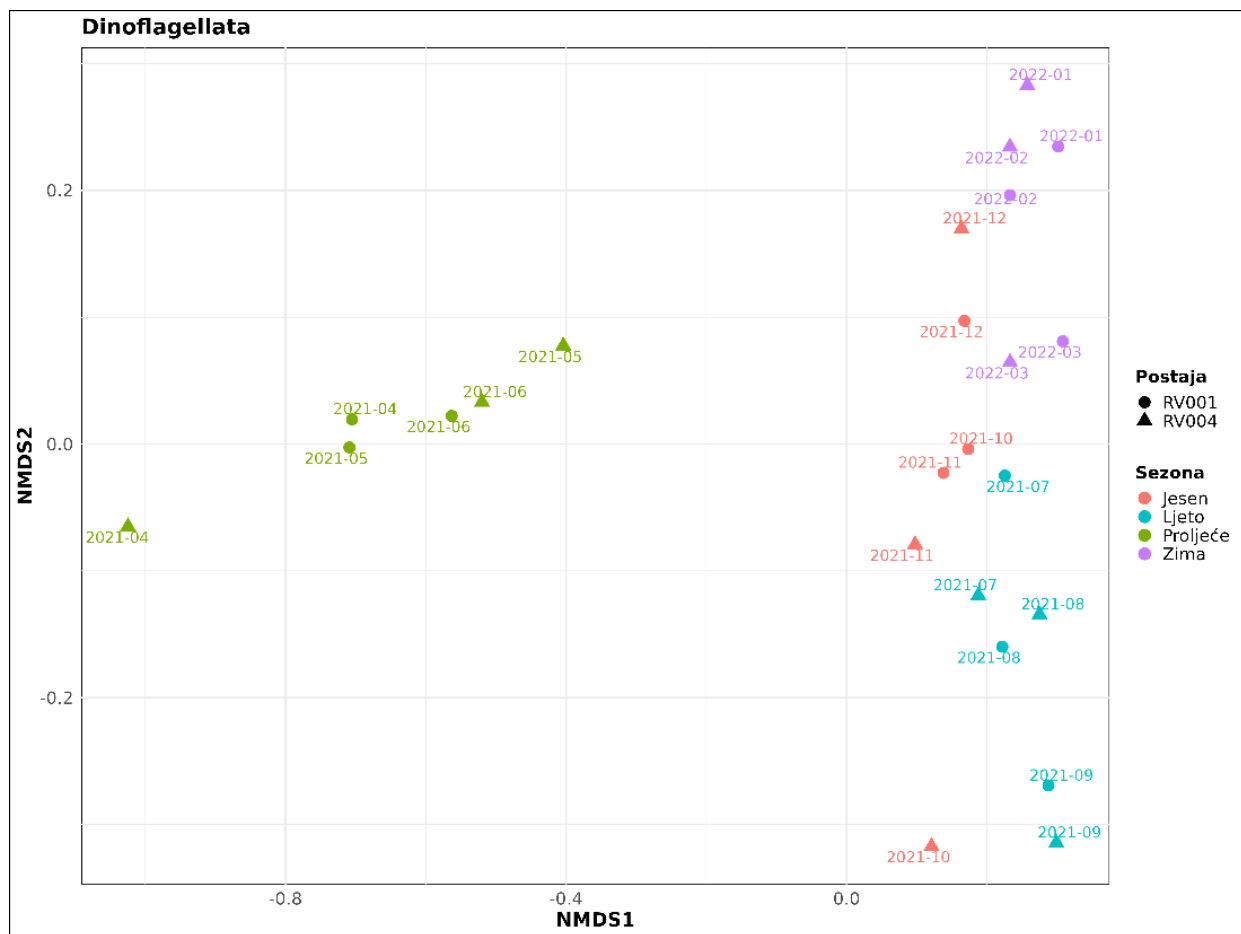
3.2.4. Funkcionalna analiza skupa podataka LTRV meta

Ordinacijska analiza LTRV meta skupa podataka na temelju funkcionalnog sastava fitoplanktonske zajednice pokazala je sezonski obrazac grupiranja uzoraka, pri čemu je 43% varijance ($R^2 = 0,43$, $F = 5,05$) među uzorcima objašnjeno parametrom sezone (P vrijednost = 0,001) (Slika 21, Prilog 4). Parametar postaje imao je samo ograničen utjecaj na ordinaciju uzoraka ($R^2 = 0,02$, P vrijednost = 0,999) (Slika 21, Prilog 5). Proljetni, jesenski i zimski uzorci formirali su relativno zbijenu grupu, pri čemu su samo uzorci sa postaje RV004 (travanj i listopad) odvojili od ostalih uzoraka. Ljetni uzorci formirali su najmanje zbijenu grupu u ordinaciji (Slika 21).

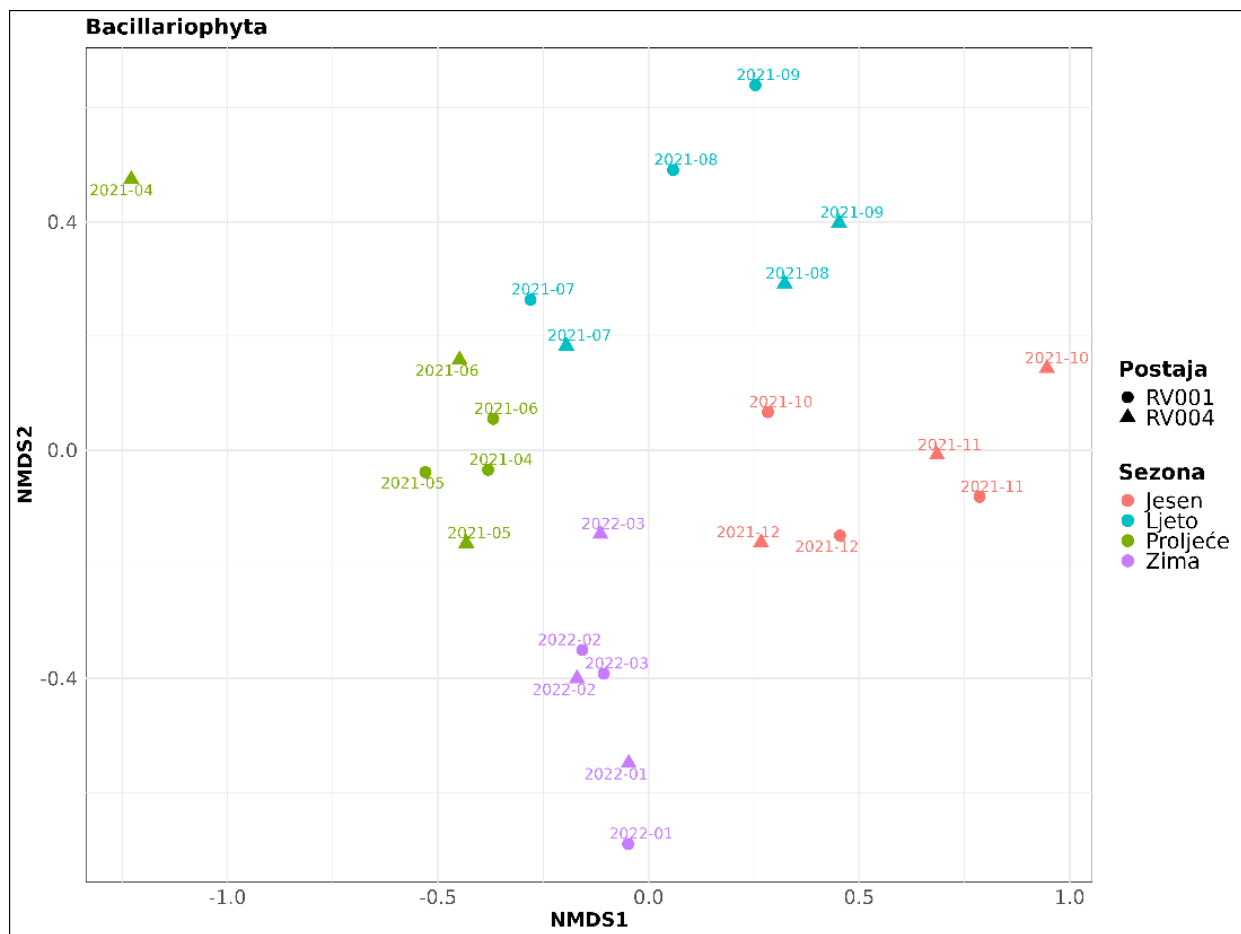


Slika 21 NMDS prikaz ordinacije fitoplanktonske zajednice na temelju funkcionalnog sastava LTRV meta seta podataka korištenjem Bray-Curtis mjere udaljenosti između uzoraka. Točke predstavljaju uzorke obojane prema sezoni i oblikovane prema postaji uzorkovanja. Oznake iznad točaka prikazuju vrijeme uzorkovanja.

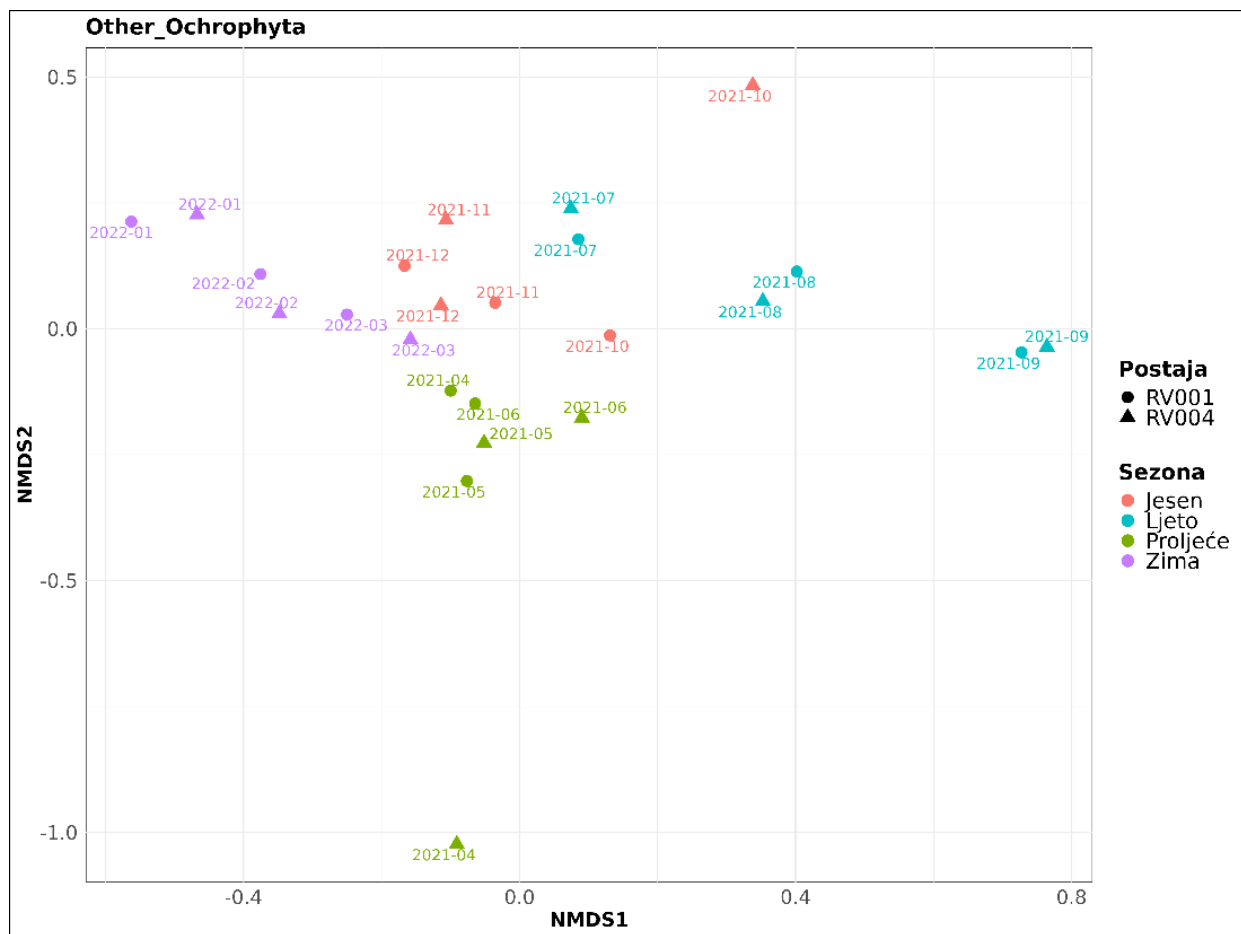
Ordinacijske analize provedene zasebno za svaku fitoplanktonsku grupu također su pokazale izraženi sezonski obrazac grupiranja uzoraka kod svih grupa (P vrijednost $< 0,05$), dok je parametar postaje imao samo ograničen utjecaj na grupaciju uzoraka (P vrijednost $> 0,05$) (Slika 22, Slika 23, Slika 24, Slika 25, Slika 26, Slika 27, Prilog 4 i Prilog 5). Udjel varijance objašnjen sezonskim parametrom kretao se između 33–73% (Prilog 4). Kod Dinoflagellata ($R^2 = 0,73$, $F = 18,13$) i Bacillariophyta ($R^2 = 0,43$, $F = 5,92$) udio varijance objašnjen sezonom bio je najveći (Prilog 4). Sve ostale grupe imale su manje od 35% varijance objašnjene sezonskim parametrom ($R^2 < 0,35$, $F < 4$) (Prilog 4). Za sve grupe osim Bacillariophyta uzorci s postaje RV004 za travanj i listopad u ordinacijama su udaljeni od svojih pripadajućih sezonskih grupa (Slika 22, Slika 23, Slika 24, Slika 25, Slika 26 i Slika 27).



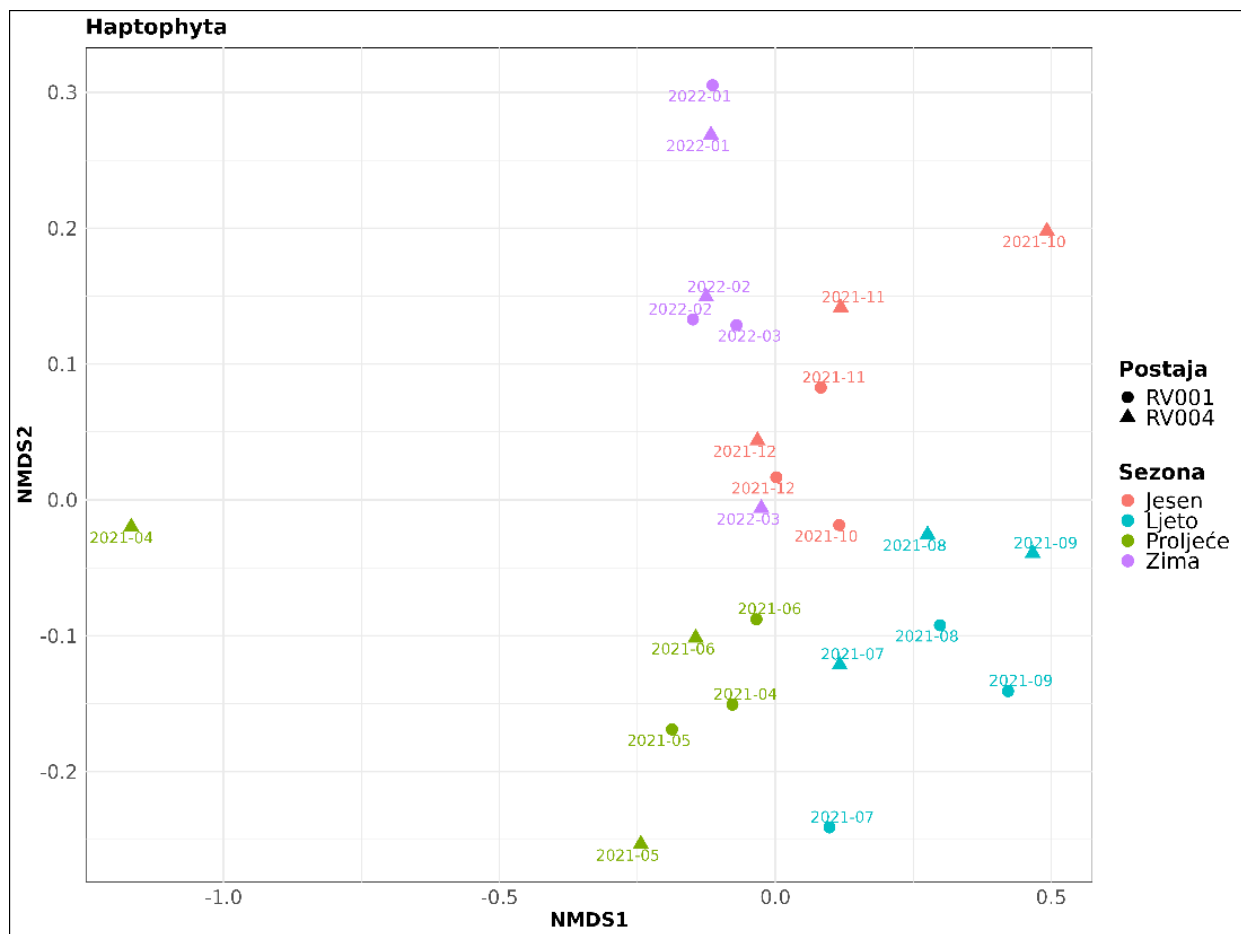
Slika 22 NMDS prikaz ordinacije grupe *Dinoflagellata* na temelju funkcionalnog sastava LTRV meta seta podataka korištenjem Bray-Curtis mjere udaljenosti između uzoraka. Točke predstavljaju uzorke obojane prema sezoni i oblikovane prema postaji uzorkovanja. Oznake iznad točaka prikazuju vrijeme uzorkovanja.



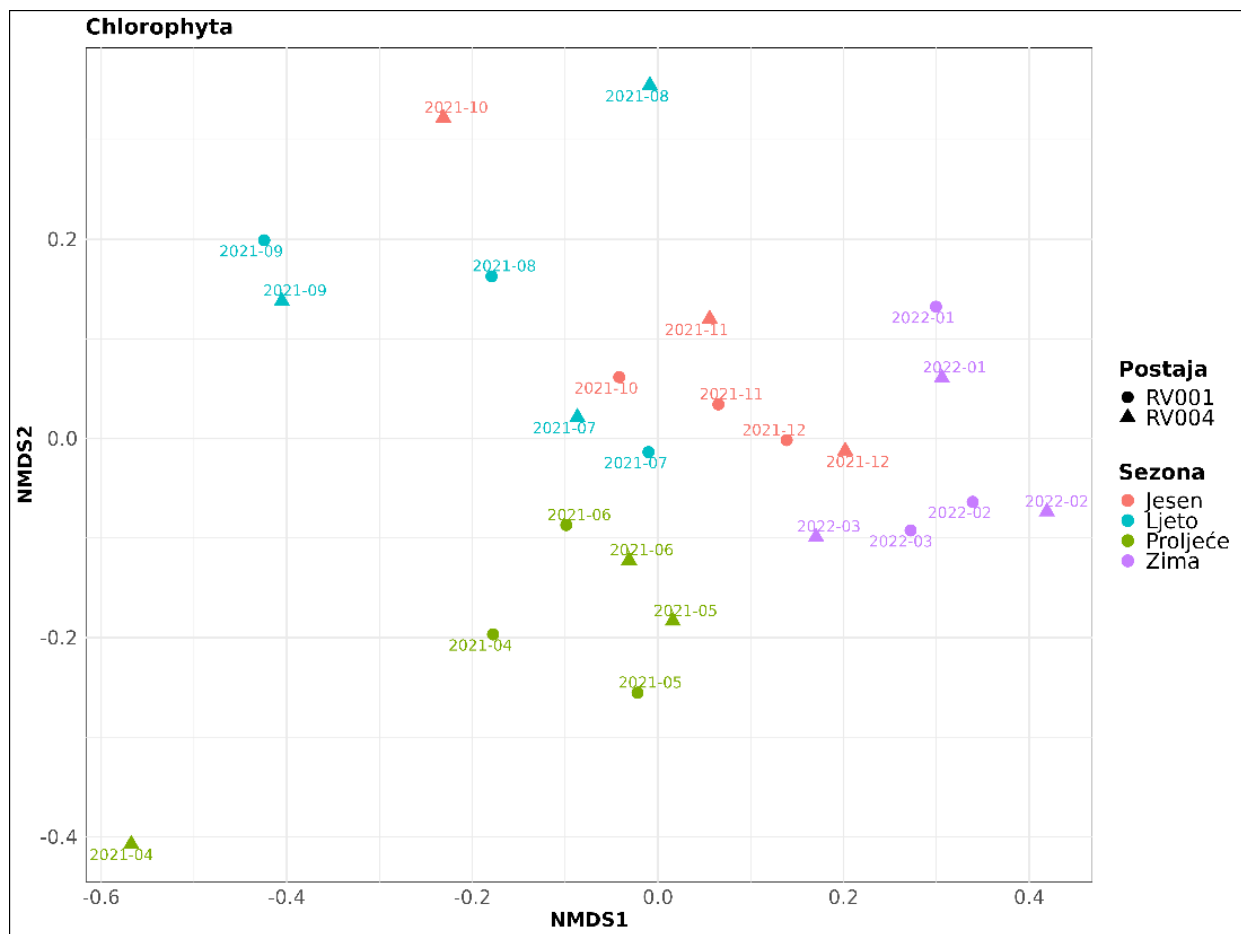
Slika 23 NMDS prikaz ordinacije grupe Bacillariophyta na temelju funkcionalnog sastava LTRV meta seta podataka korištenjem Bray-Curtis mjere udaljenosti između uzoraka. Točke predstavljaju uzorke obojane prema sezoni i oblikovane prema postaji uzorkovanja. Oznake iznad točaka prikazuju vrijeme uzorkovanja.



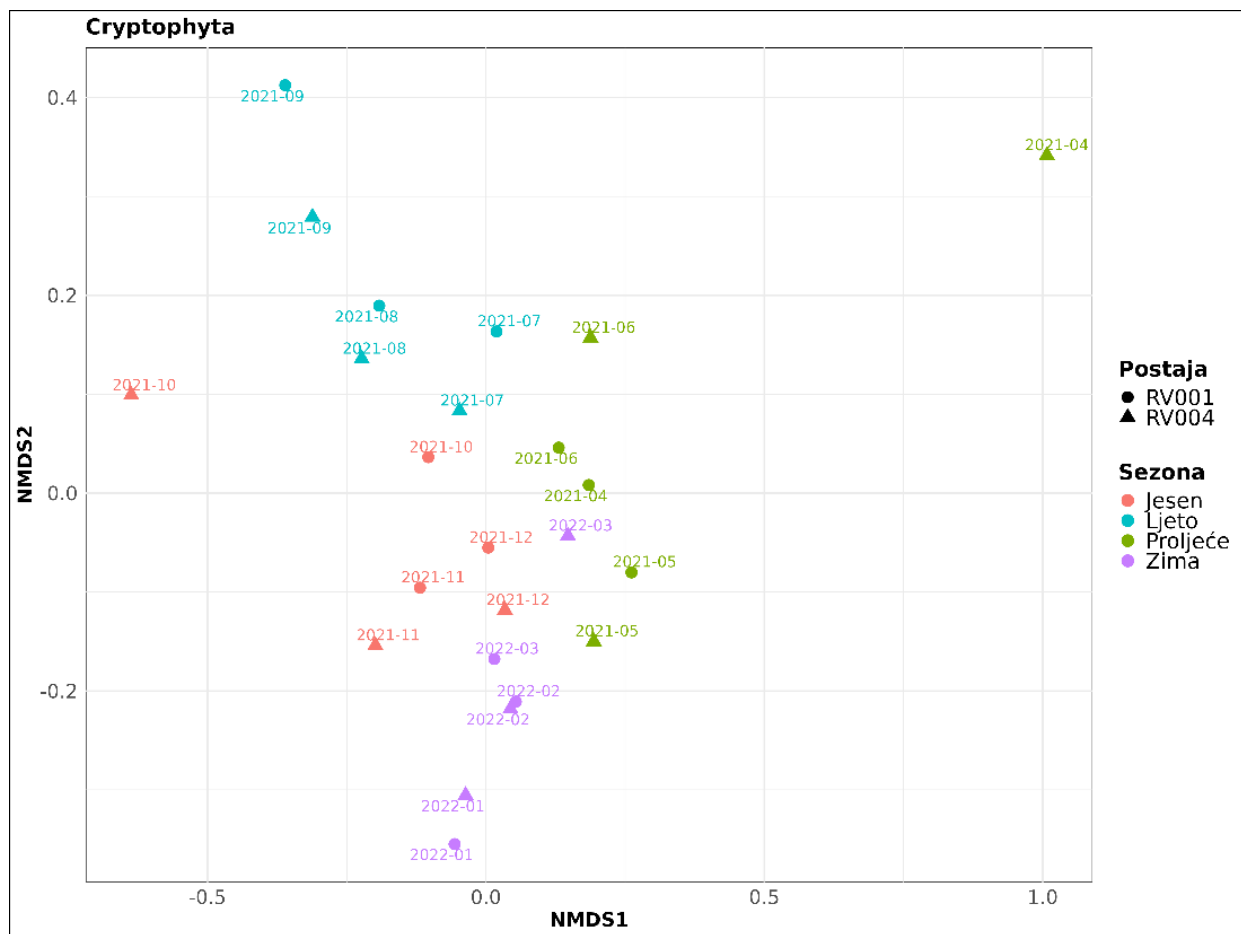
Slika 24 NMDS prikaz ordinacije grupe „ostali Ochrophyta“ na temelju funkcionalnog sastava LTRV meta seta podataka korištenjem Bray-Curtis mjere udaljenosti između uzoraka. Točke predstavljaju uzorke obojane prema sezoni i oblikovane prema postaji uzorkovanja. Oznake iznad točaka prikazuju vrijeme uzorkovanja.



Slika 25 NMDS prikaz ordinacije grupe Haptophyta na temelju funkcionalnog sastava LTRV meta seta podataka korištenjem Bray-Curtis mjere udaljenosti između uzoraka. Točke predstavljaju uzorke obojane prema sezoni i oblikovane prema postaji uzorkovanja. Oznake iznad točaka prikazuju vrijeme uzorkovanja.



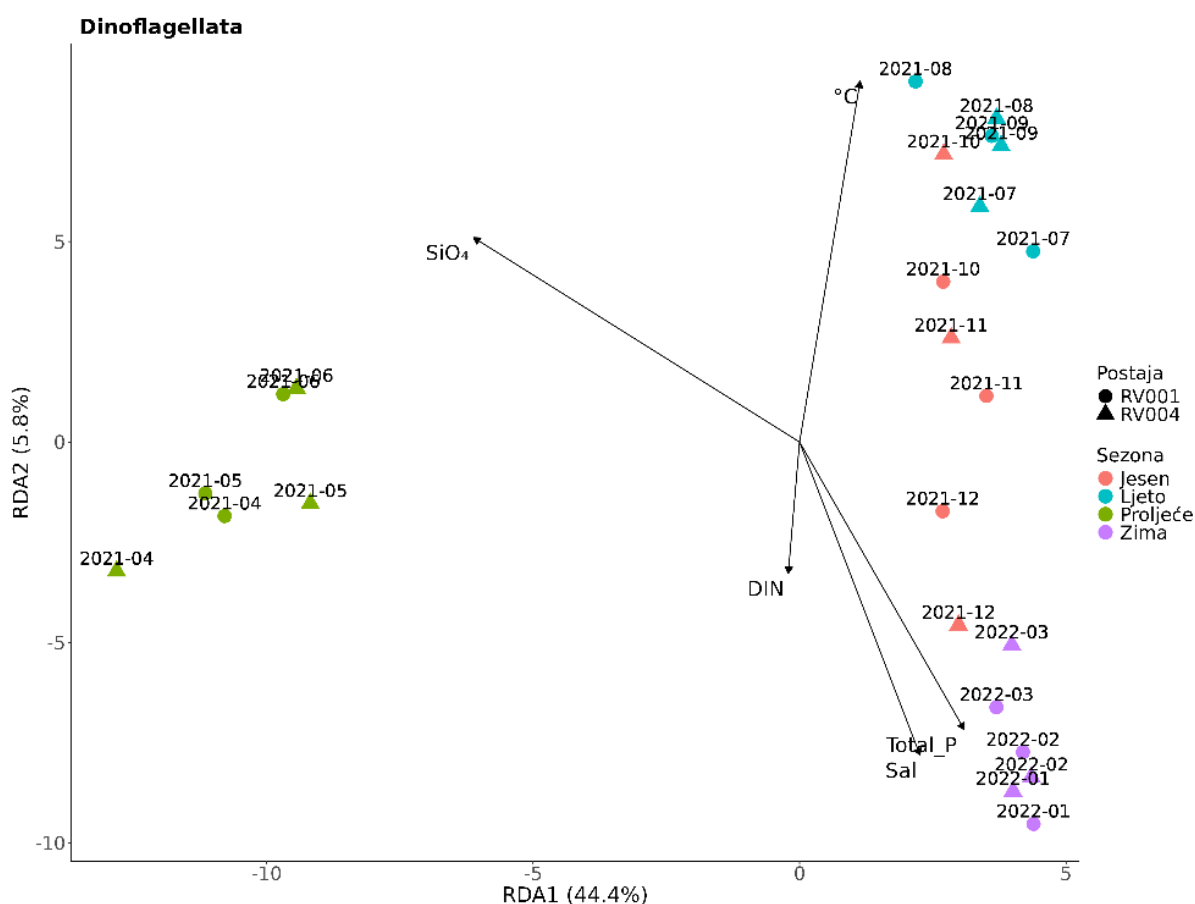
Slika 26 NMDS prikaz ordinacije grupe *Chlorophyta* na temelju funkcionalnog sastava LTRV meta seta podataka korištenjem Bray-Curtis mjere udaljenosti između uzoraka. Točke predstavljaju uzorke obojane prema sezoni i oblikovane prema postaji uzorkovanja. Oznake iznad točaka prikazuju vrijeme uzorkovanja.



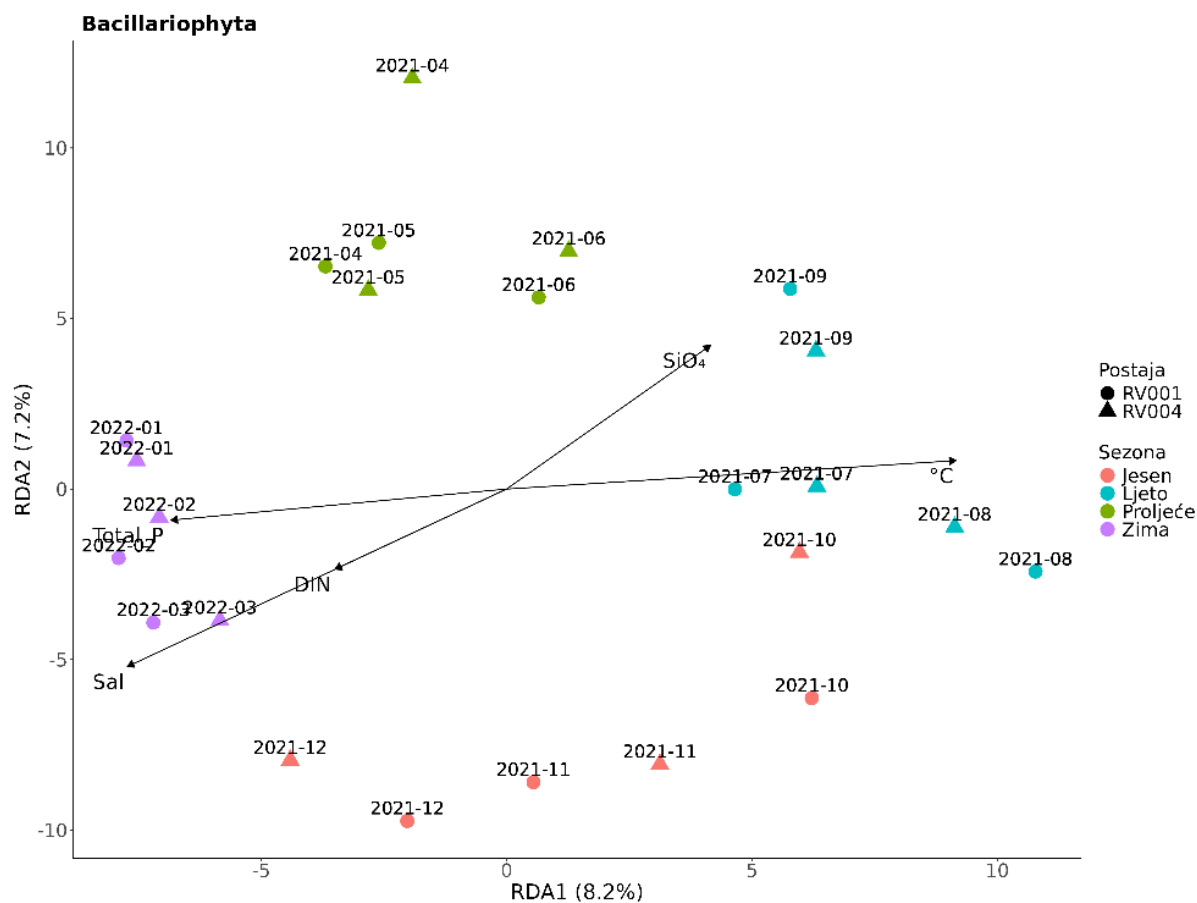
Slika 27 NMDS prikaz ordinacije grupe Cryptophyta na temelju funkcionalnog sastava LTRV meta seta podataka korištenjem Bray-Curtis mjere udaljenosti između uzoraka. Točke predstavljaju uzorke obojane prema sezoni i oblikovane prema postaji uzorkovanja. Oznake iznad točaka prikazuju vrijeme uzorkovanja.

Redundancijska analiza povezanosti funkcionalnog sastava fitoplanktonskih grupa s okolišnim parametrima potvrdila je značajan utjecaj okolišnih parametara na funkcionalni sastav svih fitoplanktonskih grupa (p vrijednost = 0,001) (Prilog 6). Među njima, grupa Dinoflagellata pokazala je najjači odgovor na model s najvećim udjelom objašnjene varijance ($F = 4,8216$) (Prilog 6). Grupe Bacillariophyta, „ostali Ochrophyta“, Haptophyta, Chlorophyta i Cryptophyta također su pokazale značajne (p vrijednost = 0,001), ali niže F -vrijednosti (od 1,4731 do 1,6808) (Prilog 6). Svi ispitani okolišni parametri osim ukupnog otopljenog anorganskog dušika (DIN) (p vrijednost $> 0,05$) pokazali su značajan utjecaj na RDA modele za sve grupe (Prilog 7). Ortosilikat (SiO_4^-) bio je značajni čimbenik (p vrijednost $\leq 0,001$) za sve grupe (Prilog 7). Ukupni otopljeni fosfor (Total_P) i temperatura ($^{\circ}\text{C}$) također su imali značajne učinke na sve grupe (p vrijednost $<$

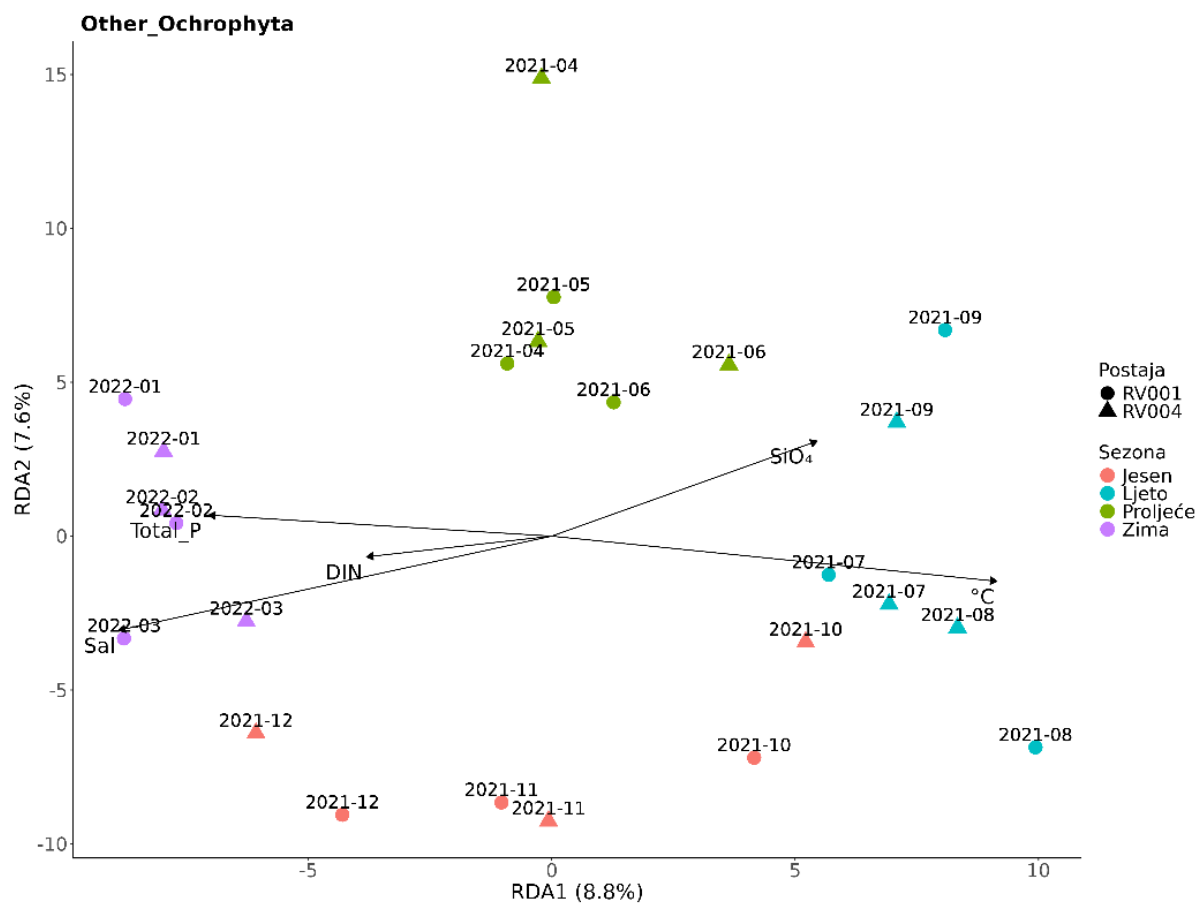
0,05) (Prilog 7). Salinitet (Sal) je značajno utjecao na sve grupe (p vrijednost $< 0,05$), osim na grupu Dinoflagellata (p vrijednost = 0,07) (Prilog 7). U RDA modelima fitoplanktonskih skupina (Slika 28, Slika 29, Slika 30, Slika 31, Slika 32, Slika 33) vektori koji predstavljaju ukupni otopljeni anorganski dušik (DIN), ukupni otopljeni fosfor (Total_P) i salinitet (Sal) usmjereni su u istom smjeru, poravnati sa zimskim uzorcima. Suprotno tome, vektor koji predstavlja ortosilikat (SiO_4^-) usmjeren je prema uzorcima kasnog ljeta, dok je vektor koji predstavlja temperaturu ($^{\circ}\text{C}$) usmjeren prema ljetnim uzorcima. Niti jedan okolišni parametar ne pokazuje snažnu usmjerenost prema proljetnim i jesenskim uzorcima.



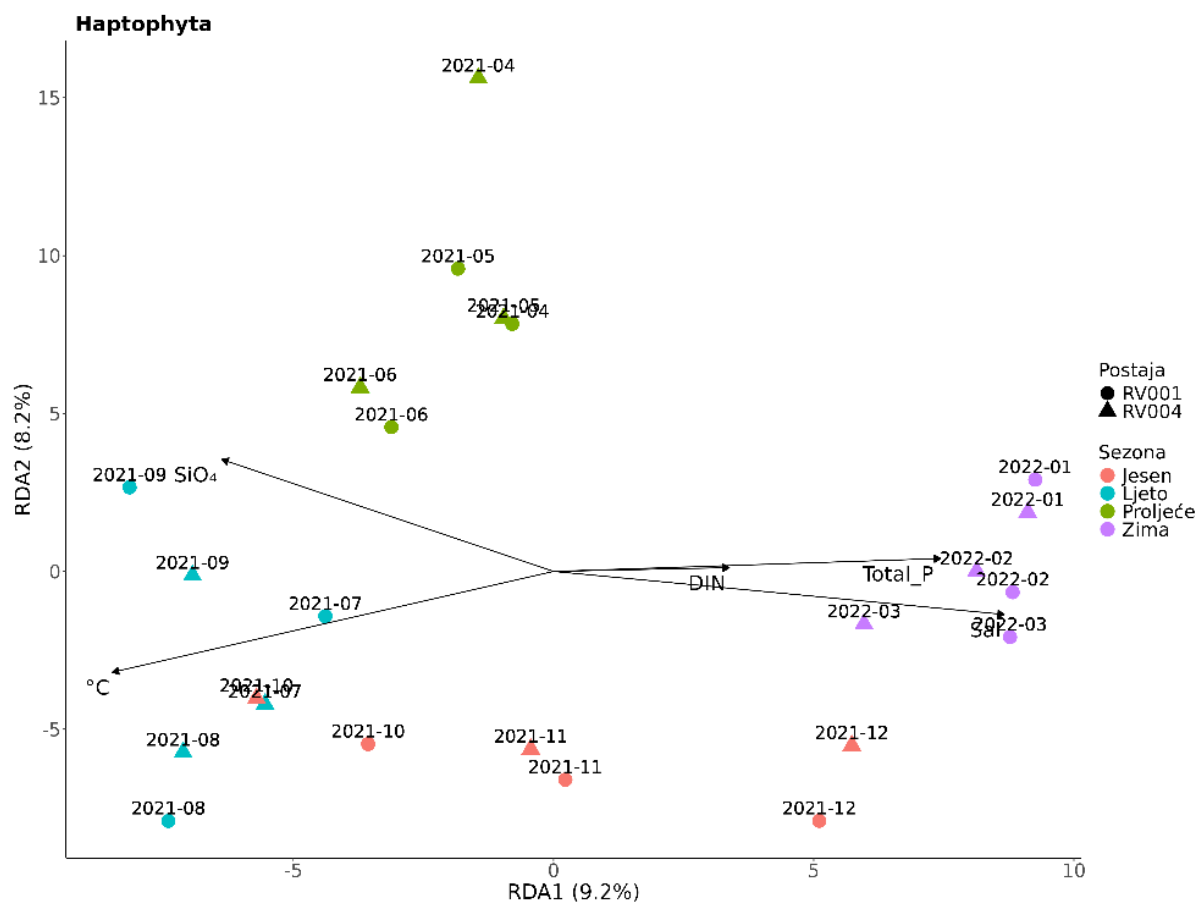
Slika 28 RDA prikaz odnosa između okolišnih parametara i funkcionalnog sastava grupe Dinoflagellata. Točke predstavljaju uzorke obojene prema sezoni i oblikovane prema postaji uzorkovanja. Oznake iznad točaka označavaju vrijeme uzorkovanja. Strelice prikazuju okolišne varijable koje utječu na sastav zajednice, uključujući temperaturu ($^{\circ}\text{C}$), koncentraciju otopljenog anorganskog dušika (DIN), koncentraciju ortosilikata (SiO_4), salinitet (Sal) i ukupnu koncentraciju fosfora (Total_P). Duljina i smjer strelica predstavljaju snagu i korelaciju svake varijable s RDA osima. Postoci u zagradama označuju udio varijance objašnjen RDA1 i RDA2 osima.



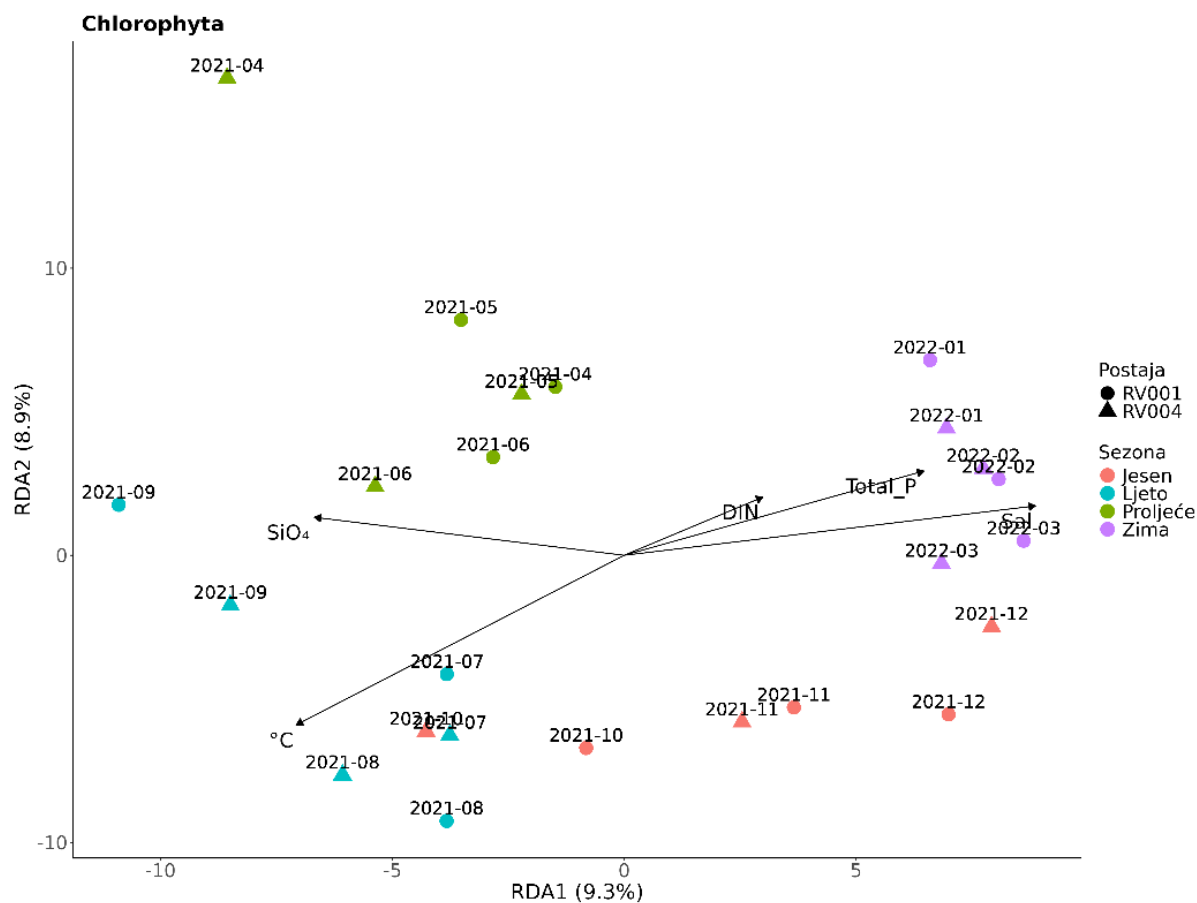
Slika 29 RDA prikaz odnosa između okolišnih parametara i funkcionalnog sastava grupe *Bacillariophyta*. Točke predstavljaju uzorke obojene prema sezoni i oblikovane prema postaji uzorkovanja. Oznake iznad točaka označavaju vrijeme uzorkovanja. Strelice prikazuju okolišne varijable koje utječu na sastav zajednice, uključujući temperaturu ($^{\circ}\text{C}$), koncentraciju otopljenog anorganskog dušika (DIN), koncentraciju ortosilikata (SiO_4), salinitet (Sal) i ukupnu koncentraciju fosfora (Total_P). Duljina i smjer strelica predstavljaju snagu i korelaciju svake varijable s RDA osima. Postoci u zagradama označuju udio varijance objašnjen RDA1 i RDA2 osima.



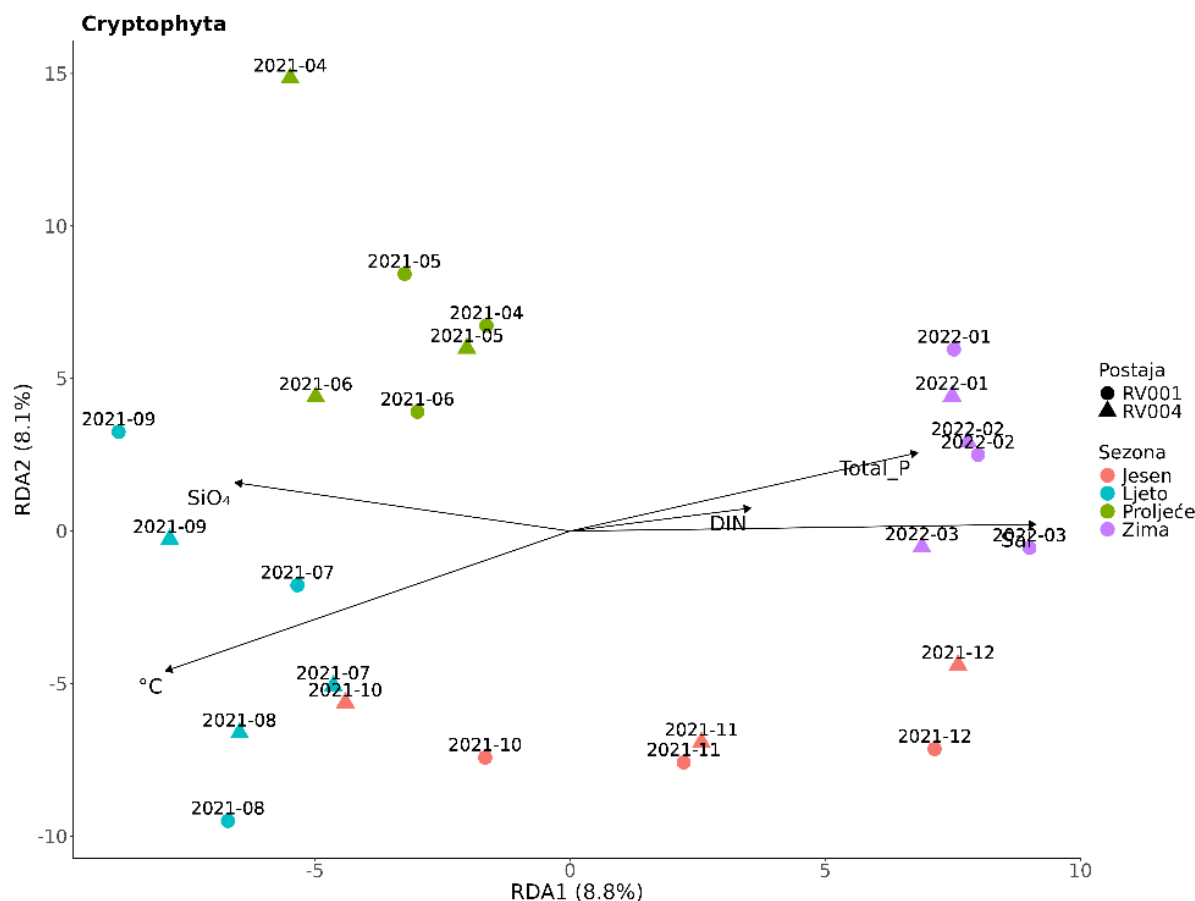
Slika 30 RDA prikaz odnosa između okolišnih parametara i funkcionalnog sastava grupe ostali Ochrophyta. Točke predstavljaju uzorke obojene prema sezoni i oblikovane prema postaji uzorkovanja. Oznake iznad točaka označavaju vrijeme uzorkovanja. Strelice prikazuju okolišne varijable koje utječu na sastav zajednice, uključujući temperaturu ($^{\circ}\text{C}$), koncentraciju otopljenog anorganskog dušika (DIN), koncentraciju ortosilikata (SiO_4), salinitet (Sal) i ukupnu koncentraciju fosfora (Total_P). Duljina i smjer strelica predstavljaju snagu i korelaciju svake varijable s RDA osima. Postoci u zagradama označuju udio varijance objašnjen RDA1 i RDA2 osima.



Slika 31 RDA prikaz odnosa između okolišnih parametara i funkcionalnog sastava grupe Haptophyta. Točke predstavljaju uzorke obojene prema sezoni i oblikovane prema postaji uzorkovanja. Oznake iznad točaka označavaju vrijeme uzorkovanja. Strelice prikazuju okolišne varijable koje utječu na sastav zajednice, uključujući temperaturu (°C), koncentraciju otopljenog anorganskog dušika (DIN), koncentraciju ortosilikata (SiO₄), salinitet (Sal) i ukupnu koncentraciju fosfora (Total_P). Duljina i smjer strelica predstavljaju snagu i korelaciju svake varijable s RDA osima. Postoci u zagradama označuju udio varijance objašnjen RDA1 i RDA2 osima.



Slika 32 RDA prikaz odnosa između okolišnih parametara i funkcionalnog sastava grupe *Chlorophyta*. Točke predstavljaju uzorke obojene prema sezoni i oblikovane prema postaji uzorkovanja. Oznake iznad točaka označavaju vrijeme uzorkovanja. Strelice prikazuju okolišne varijable koje utječu na sastav zajednice, uključujući temperaturu ($^{\circ}\text{C}$), koncentraciju otopljenog anorganskog dušika (DIN), koncentraciju ortosilikata (SiO_4), salinitet (Sal) i ukupnu koncentraciju fosfora (Total_P). Duljina i smjer strelica predstavljaju snagu i korelaciju svake varijable s RDA osima. Postoci u zagradama označuju udio varijance objašnjen RDA1 i RDA2 osima.



Slika 33 **RDA prikaz odnosa između okolišnih parametara i funkcionalnog sastava grupe Cryptophyta.** Točke predstavljaju uzorke obojene prema sezoni i oblikovane prema postaji uzorkovanja. Oznake iznad točaka označavaju vrijeme uzorkovanja. Strelice prikazuju okolišne varijable koje utječu na sastav zajednice, uključujući temperaturu ($^{\circ}\text{C}$), koncentraciju otopljenog anorganskog dušika (DIN), koncentraciju ortosilikata (SiO_4), salinitet (Sal) i ukupnu koncentraciju fosfora (Total_P). Duljina i smjer strelica predstavljaju snagu i korelaciju svake varijable s RDA osima. Postoci u zagradama označuju udio varijance objašnjen RDA1 i RDA2 osima.

3.2.5. Obrasci ekspresije metaboličkih putova i gena

Za svaku fitoplanktonsku grupu zasebno uspješno su opisani obrasci ekspresije metaboličkih putova (Slika 34, Slika 36, Slika 38, Slika 40, Slika 42, Slika 44), pri čemu su metabolički putovi grupirani unutar viših kategorija: metabolizam (engl. *Metabolism*), obrada genetskih informacija (engl. *Genetic information processing*), obrada informacija iz okoliša (engl. *Environmental information processing*) te stanični procesi (engl. *Cellular processes*). Kod grupe Dinoflagellata uočene su najjasnije razlike u metaboličkom otisku između sezona. Uz ekspresije

metaboličkih putova ekspresije 60 gena sa najvišim srednjim TPM vrijednostima normaliziranim unutar grupe također su pokazali karakteristične obrasce za svaku od fitoplanktonskih grupa (Slika 35, Slika 37, Slika 39, Slika 41, Slika 43, Slika 45). Većina od 60 odabranih gena predstavlja gene za osnovne stanične funkcije, međutim pojedini geni ipak se ističu ukazujući na specifične strategije preživljavanja pojedinih grupa.

3.2.5.1. Grupa *Dinoflagellata*

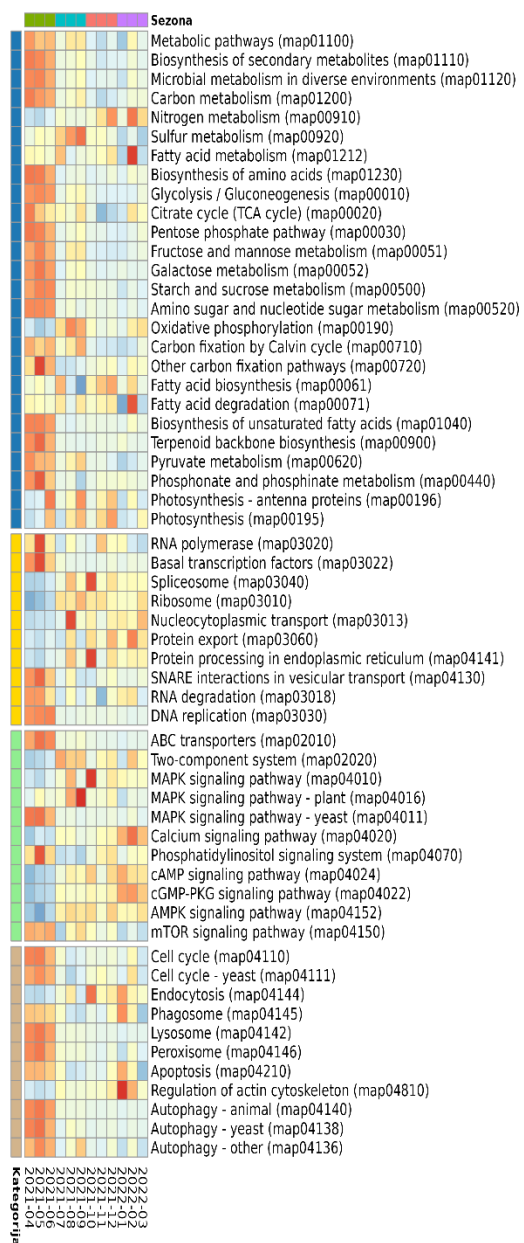
Obrasci ekspresije metaboličkih putova grupe *Dinoflagellata* jasno su se razlikovali u proljeće, razdoblju dominacije roda *Noctiluca*, u odnosu na ostatak godine (Slika 34). Za većinu metaboličkih putova kategorija metabolizam i stanični procesi zabilježena je viša razina ekspresije tijekom proljeća nego tijekom ostatka godine. Unutar kategorije metabolizam, putovi povezani sa proizvodnjom energije, poput glikolize/glukoneogeneze (ko0010), TCA ciklusa (ko00020) i metabolizma piruvata (ko00620), imali su povišenu ekspresiju. Također visoku ekspresiju tijekom proljeća imali su i putovi metabolizma ugljikohidrata, poput metabolizma fruktoze i manoze (ko00051), galaktoze (ko00052) te škroba i saharoze (ko00500). Metabolički put fiksacije ugljika Calvinovim ciklusom (ko00710), koji uglavnom uključuje gene za fotosintetske reakcije u tami, imao je visoku ekspresiju u proljeće i ljeto. Nasuprot tome, putovi povezani s fotosintetskim reakcijama na svjetlu kao što su fotosinteza (ko00195) i fotosinteza – antenski proteini (ko00196) imali su najnižu ekspresiju u proljeće, a najvišu tijekom ljeta i jeseni. Za metabolički put oksidativne fosforilacije (ko00190) uočena je povišena ekspresija zimi, ali ipak najviše vrijednosti ekspresije za ovaj metabolički put zabilježene su ljeti. Metabolički put metabolizma fosfonata i fosfinata (ko00440) pokazao je povišenu razinu ekspresije u proljeće, a metabolizam sumpora (ko00920) i metabolizam dušika (ko00910) ljeti, odnosno zimi. Unutar kategorije stanični procesi putovi povezani s proliferacijom stanica, poput staničnog ciklusa (ko04110) i staničnog ciklusa – kvasac (ko04111), imali su najvišu ekspresiju u proljeće. Najviše vrijednosti u proljeće imali su i putovi uključeni u heterotrofno hranjenje, uključujući fagosom (ko04145), lizozom (ko04142) i peroksisom (ko04146), kao i apoptozu (ko04210) te autofagiju kod životinja (ko04140), kvasaca (ko04138) i ostalih organizama (ko04136). Međutim, ekspresija fagosoma ostala je visoka i zimi, zajedno s ostalim putovima povezanim s heterotrofnim hranjenjem: endocitozom (ko04144) i regulacijom aktinskog citoskeleta (ko04810).

Većina metaboličkih putova kategorije obrada genetičkih informacija također je pokazala izražene sezonske obrasce za grupu Dinoflagellata (Slika 34). Tijekom proljeća visoku ekspresiju imali su putovi: RNA polimeraza (ko03020), bazalni transkripcijski faktori (ko03022), SNARE interakcije u vezikularnom transportu (ko04130), degradacija RNA (ko03018) i replikacija DNA (ko03030). Nasuprot tome, tijekom ostatka godine povećanu ekspresiju pokazivali su putovi: izrezivanje introna (ko03040), ribosom (ko03010), nukleocitoplazmatski transport (ko03013), eksport proteina (ko03060) i obrada proteina u endoplazmatskom retikulumu (ko04141). Metabolički putovi unutar kategorije obrade informacija iz okoliša također su pokazali izražene sezonske obrasce (Slika 34). Tijekom proljeća većina puteva iz te kategorije imala je najnižu ekspresiju, uz iznimku puteva: ABC transporteri (ko02010), MAPK signalni put – kvasac (ko04011), fosfatidilinozitol signalni sustav (ko04070) i mTOR signalni put (ko04150), koji su pokazivali povišenu ekspresiju. Svi ostali putovi iz kategorije obrade informacija iz okoliša bili su eksprimirani na višim razinama tijekom ostatka godine. To uključuje: dvokomponentni sustav (ko02020), MAPK signalni put (ko04010) i MAPK signalni put biljaka (ko04016) tijekom ljeta i rane jeseni. Tijekom kasne jeseni i zime najvišu ekspresiju unutar ove kategorije imali su: signalni put kalcija (ko04020), cAMP (ko04024) i cGMP-PKG signalni put (ko04022).

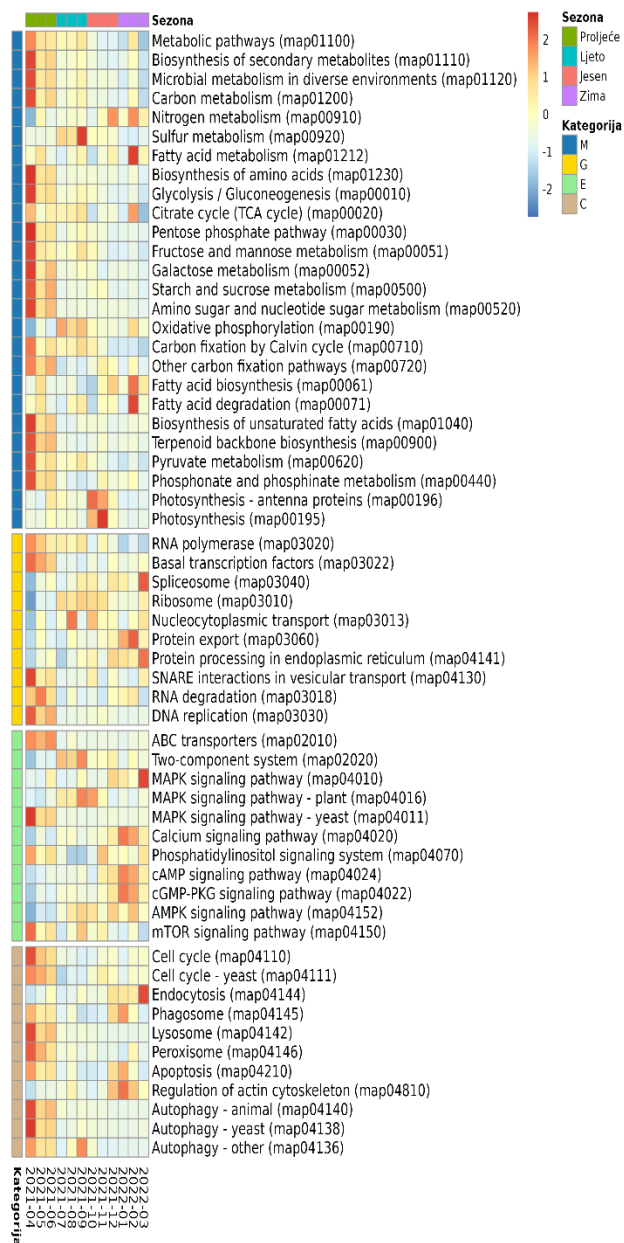
Klaster analiza odabranih 60 gena s najvišim srednjim TPM vrijednostima unutar grupe Dinoflagellata otkrila je tri jasno razdvojena klastera (Slika 35). Prvi klaster obuhvaćao je gene s visokom razinom ekspresije u proljeće, dok je drugi uključivao gene s povišenom razinom ekspresije tijekom ljeta i ranog jesenskog razdoblja. Treći klaster sastojao se od gena čija je ekspresija bila najveća u kasnoj jeseni i zimi. U proljetnom klasteru zabilježena je visoka ekspresija gena povezanih s fagotrofijom, a među njima su se isticala tri gena za kathepsine: kathepsin L (K01365), B (K01363) i D (K01379) te geni za cisteinsku endopeptidazu s KDEL repom (K16292) i kalretikulin (K08057). Drugi klaster karakteriziran je visokom razinom ekspresije gena uključenih u oksidacijsku fosforilaciju: podjedinice ATP-sintaze (F-tip ATPaza; K02130, K02132, K02133, K02136), podjedinice citokrom c oksidaze (K02264, K02266) te komponente transporta elektrona, uključujući citokrom c (K08738) i protein ionskog kanala ovisnog o naponu (K15040). Treći klaster sadržavao je najveći broj gena (28) i pokazao je najveću funkcionalnu raznolikost (Slika 35). U ovom klasteru u kasnoj jeseni i zimi zabilježeno je izraženo povećanje transkripcije komponenti citoskeleta, ponajviše gena povezanih s aktinom (K05699 i K05692), tubulinom (K07375 i K07374) i miozinom (K12749, K12757 i K10352). Među 60 gena s najvišim srednjim

TPM vrijednostima normaliziranim unutar grupe nije detektiran nijedan ključan gen koji kodira za osnovne procese fotosinteze. Međutim, gen za α -karbonsku anhidrazu (K01672), uključen u mehanizme koncentracije ugljika (CCM), imao je povišenu ekspresiju tijekom ostatka godine u usporedbi s proljećem. Također, kalmodulin (K02183), gen uključen u nekoliko puteva povezanih s obradom informacija iz okoliša, pokazivao je višu ekspresiju u kasnoj jeseni i zimi. Dva gena koja kodiraju za molekularne čaperone iz obitelji HSP identificirana su s povećanom ekspresijom u ranoj jeseni te kasnoj zimi (Slika 35).

a) RV001



b) RV004



Slika 34 Godišnji obrasci ekspresije metaboličkih puteva grupe *Dinoflagellata* prikazani za postaje RV001 (a) i RV004 (b). Na rubovima toplinske mape označene su za svaki uzorak/ mjesec uzorkovanja sezona (proljeće, ljeto, jesen, zima), a za svaki metabolički put pripadajuća KEGG kategorija: M – metabolizam (engl. Metabolism), G – obrada genetskih informacija (engl. Genetic information processing), E – obrada informacija iz okoliša (engl. Environmental information processing) i C – stanični procesi (engl. Cellular processes).



Slika 35 Godišnja sukcesija 60 gena s najvišim srednjim vrijednostima TPM normaliziranih unutar grupe Dinoflagellata. Na rubovima toplinske mape označeni su datum, postaja i sezona za svaki uzorak i stablo hijerarhijskog klasteriranja gena temeljem euklidijskih udaljenosti. Nazivi gena navedeni su prema nazivima u KEGG bazi te uključuju: skraćeno ime gena; puno ime gena; kod enzima (ukoliko postoji) te KEGG KO pristupni broj.

3.2.5.2. *Grupa Bacillariophyta*

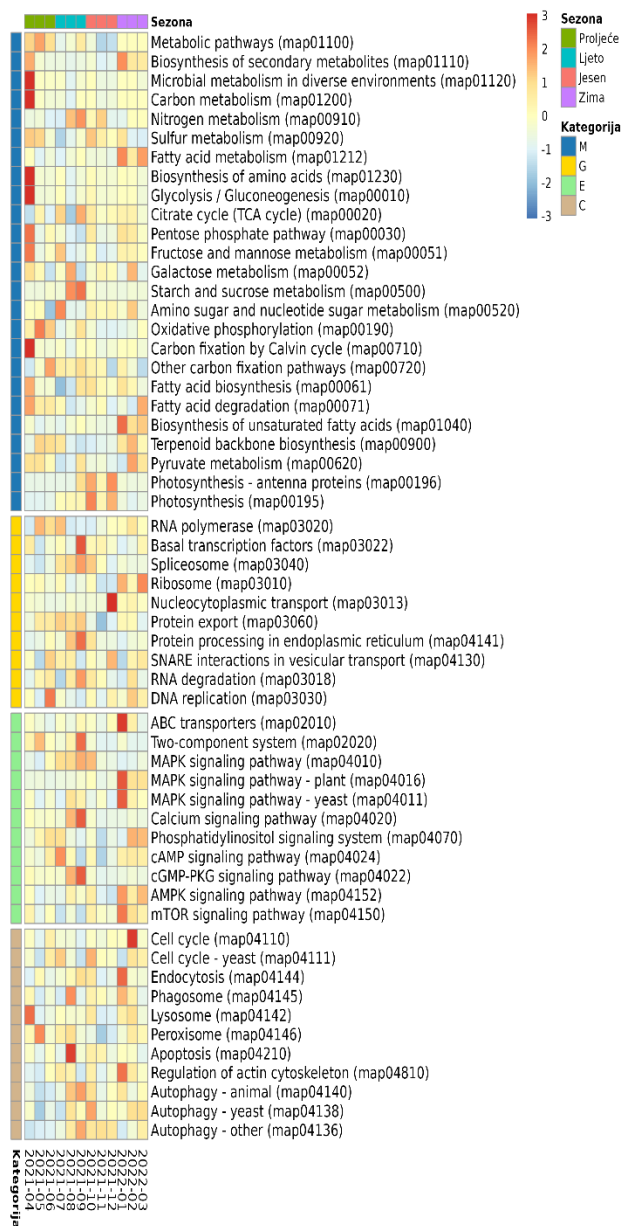
Grupa Bacillariophyta je u proljeće, za vrijeme dominacije roda *Noctiluca* u ekspresiji ukupne fitoplanktonske zajednice, imala niže razine ekspresije metaboličkih puteva kategorija obrada genetičkih informacija, obrada podataka iz okoliša te stanični procesi, uz pojedine puteve kao iznimke. Tako je na postaji RV001 zabilježena povećana ekspresija puteva lizosom (map04142) i peroksisom (map04146) kategorije stanični procesi. Na postaji RV004 zabilježena je povećana ekspresija puteva iz kategorije obrada informacija iz okoliša: ABC transporteri (map02010), dvokomponentni sustav (map02020) te AMPK signalni put (map04152). Međutim, na obje postaje u prvom dijelu proljeća zabilježena je visoka ekspresija puteva iz kategorije metabolizam: metabolički putevi (map01100), sinteza sekundarnih metabolita (map01110), mikrobni metabolizam u različitim okolišima (map01120), biosinteza aminoisolina (map01230), glikoliza/glukogeneza (map00010), fiksacija ugljika Calvinovim ciklusom (map00710) i oksidativna fosforilacija (map00190) (Slika 36).

Grupa Bacillariophyta imala je najveći udio u ukupnoj metaboličkoj aktivnosti zajednice u jesen, točnije u listopadu na postaji RV001 i u studenom na postaji RV004. Također, najveća ekspresija puta fotosinteza (map00195) u odnosu na ostatak godine bila je u jesen. Na obje postaje u kasno ljeto više razine ekspresije imali su putevi kategorije obrada okolišnih podataka: signalizacija kalcijem (map04020) i cGMP-PKG signalni put (map04022). Na obje se postaje zimi većom razinom ekspresije u odnosu na ostatak godine istaknuo put endocitoze (map04144) kategorije stanični procesi. Također, zimi je zabilježen i blagi porast ekspresije puteva stanični ciklus (map04110) i stanični ciklus kvasaca (map04111).

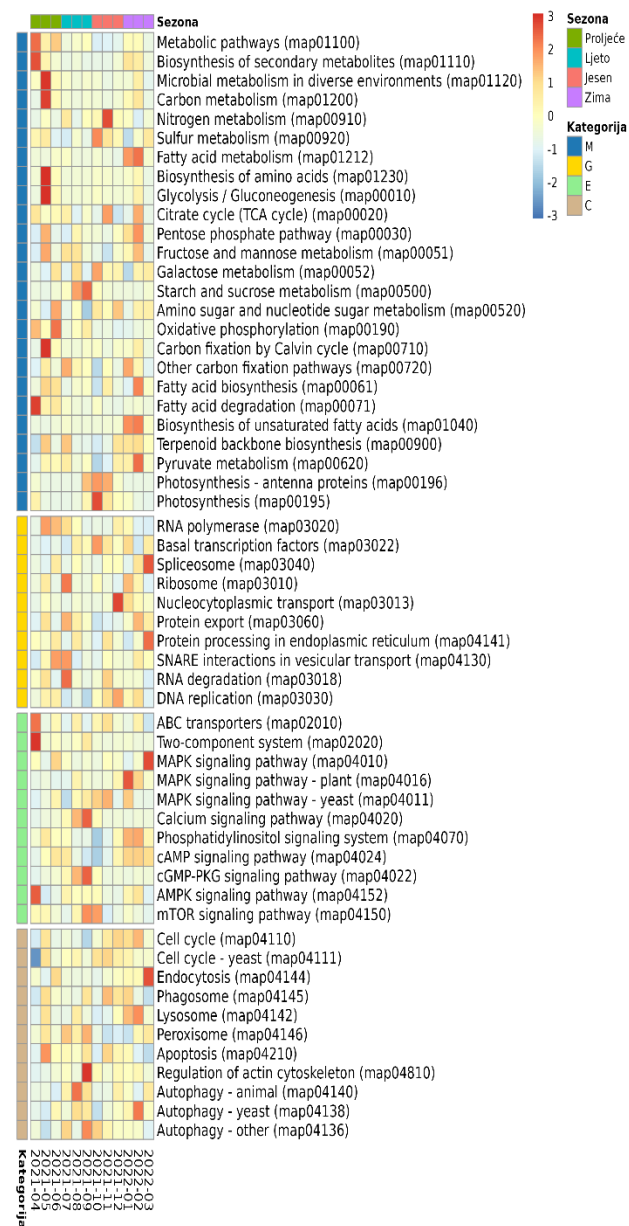
Klaster analizom 60 gena s najvećim srednjim TPM vrijednostima normaliziranim unutar grupe nisu detektirani jasni sezonski klasteri (Slika 37). Ipak, pojedini geni koji bi mogli ukazivati na specifične životne strategije istaknuli su se u grupi Bacillariophyta. Iako među 60 gena s najvišim srednjim TPM vrijednostima normaliziranim unutar grupe nije detektiran nijedan ključni gen koji kodira za osnovne procese fotosinteze, gen za malat dehidrogenazu (K00029), uključen u mehanizme koncentracije ugljika (CCM), imao je više vrijednosti ekspresije u proljeće i u zimi u odnosu na jesen (Slika 37). Osim toga, kod grupe Bacillariophyta nije pronađen niti jedan gen povezan s fagotrofnim načinom ishrane. Nekoliko gena (kalmodulin (K02183), inozitol-polifosfat multikinaza (K00915), kalcij-ovisna proteinska kinaza (K13412), serin/treonin kinaza (K04372) i

cGMP-ovisna proteinska kinaza 1 (K07376) koji sudjeluju u obradi informacija iz okoliša bilo je među 60 gena s najvećim srednjim vrijednostima ekspresije koji su imali povišene vrijednosti ekspresije u različitim sezonama. Nekoliko gena povezanih sa odgovorima na stres (geni koji kodiraju za serinske protease, tripsin (K01312) i kimotripsin (K01310)) također je uspješno detektirano za grupu Bacillariophyta te su njihove vrijednosti ekspresije bile povišene tijekom cijelog istraživnog razdoblja, osim u jesen (Slika 37). Uz odgovor na stres detektirana je ekspresija i gena povezanih s metabolizmom glutaciona: glutation peroksidaza (K00432) i glutation S-transferaza te gen iz HSP obitelji (K03283). Kod Bacillariophyta detektirani geni uključeni u metabolizam fosfora bili su: natrij-ovisni transporter fosfata niskog afiniteta (K14640), pripadnik SLC20 obitelji i fosfolipaza D1/2 (K01115), a imali su povišene vrijednosti ekspresije tijekom cijelog istraživnog razdoblja osim u jesen.

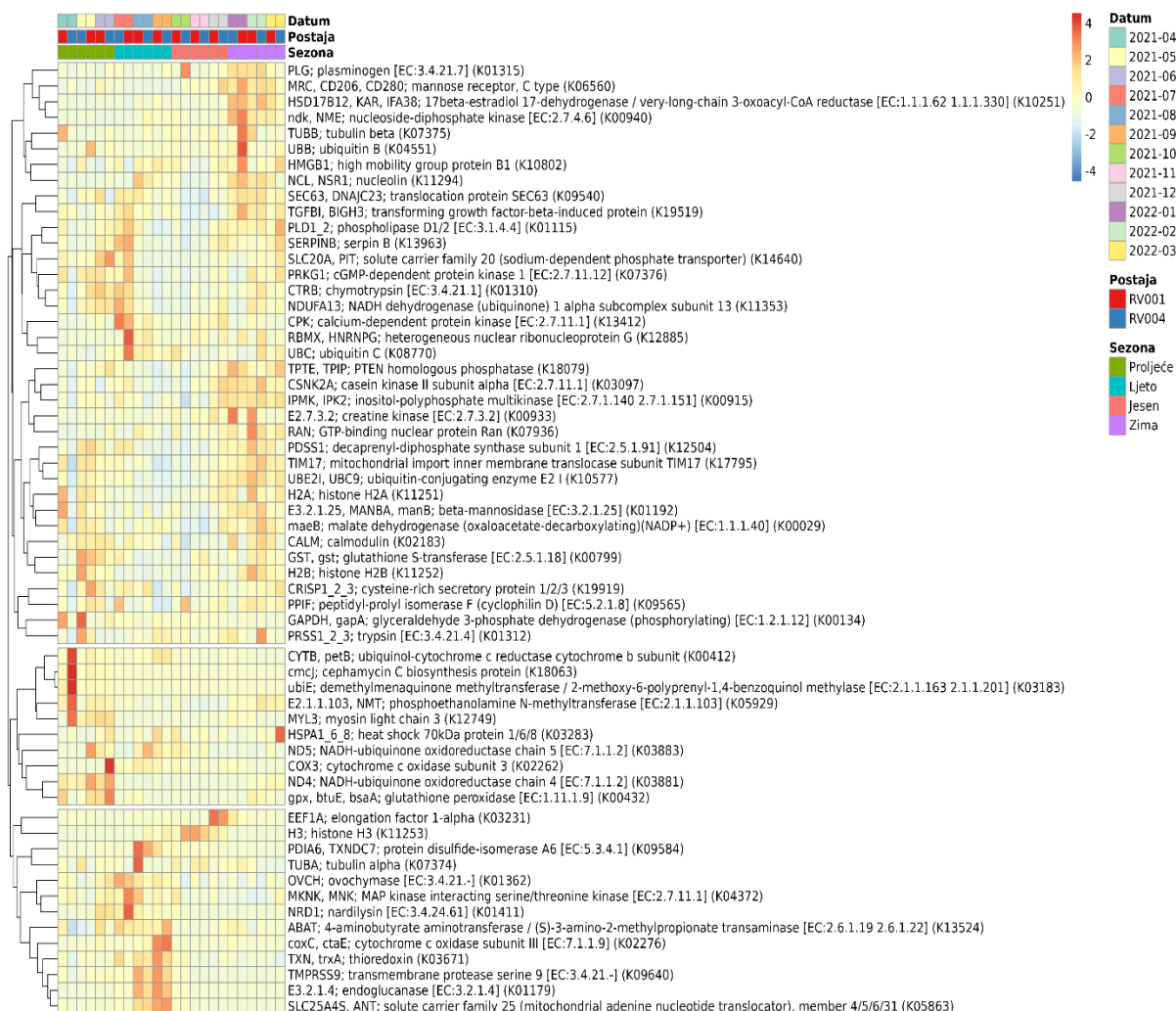
a) RV001



b) RV004



Slika 36 Godišnji obrasci ekspresije metaboličkih puteva grupe *Bacillariophyta* prikazani za postaje RV001 (a) i RV004 (b). Oznake iznad stupaca prikazuju sezonu, a oznake ispod stupaca mjesec uzorkovanja. Oznake redaka prikazuju četiri KEGG kategorije metaboličkih puteva: M – metabolizam (engl. Metabolism), G – obrada genetskih informacija (engl. Genetic information processing), E – obrada informacija iz okoliša (engl. Environmental information processing) i C – Sstanični procesi (engl. Cellular processes).



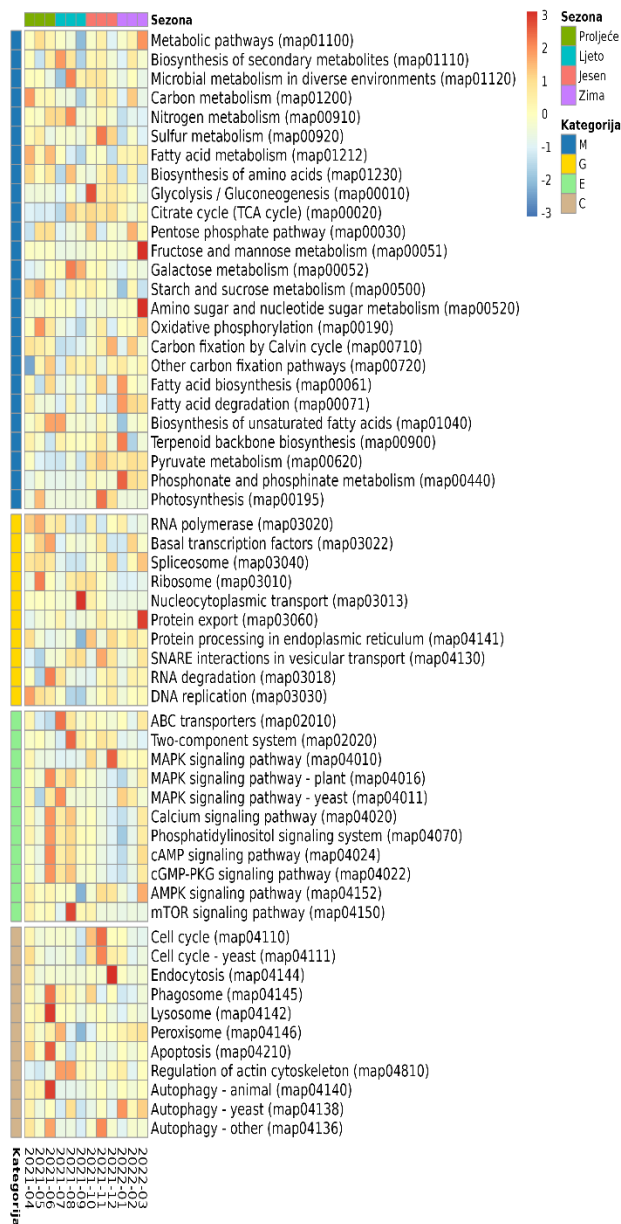
Slika 37 Godišnja sukcesija 60 gena snajvećim srednjim vrijednostima TPM normaliziranih unutar grupe Bacillariophyta. Na kolonama označeni su datum, postaja i sezona. Redci prikazuju originalna imena gena iz KEGG baze, tj. ustaljenu skraćenicu; puno ime gena; kod enzima (ukoliko postoji) te KEGG KO pristupni broj. Redci su hijerarhijski klasterirani temeljem euklidijskih udaljenosti.

3.2.5.3. *Grupa ostali Ochrophyta*

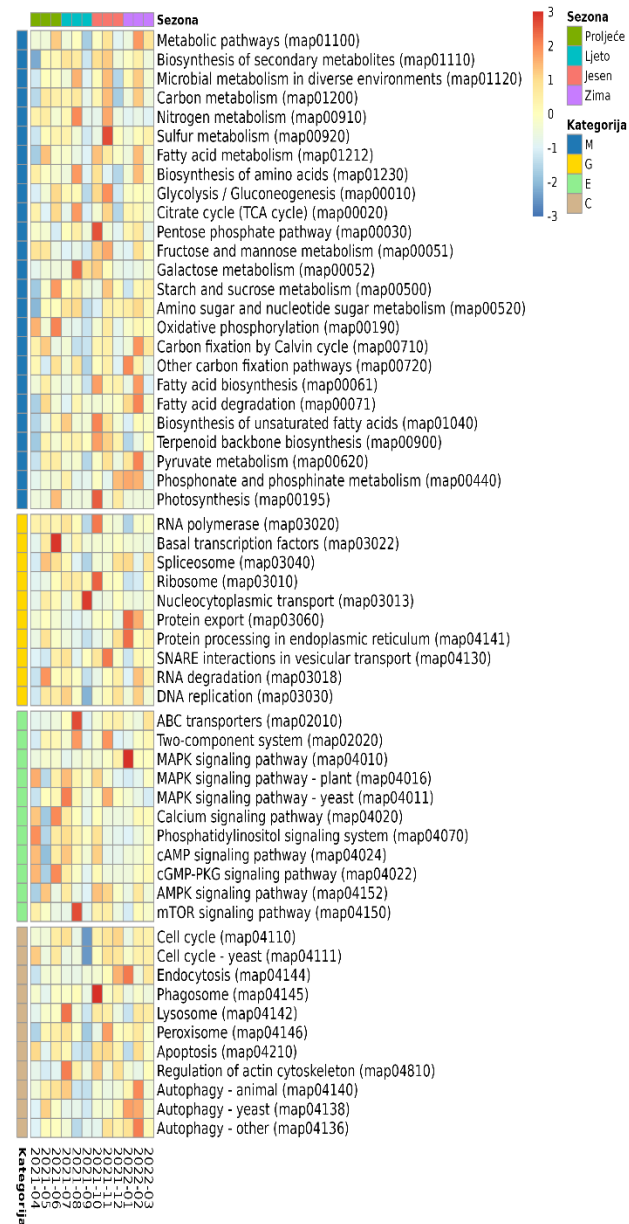
Grupa ostali Ochrophyta također je imala najmanji relativni udio u ukupnoj metaboličkoj aktivnosti zajednice u proljeće. Većina metaboličkih puteva tada je imala nisku ekspresiju (Slika 38). Ipak, u kasno proljeće na postaji RV001, povećanom aktivnošću istaknuli su se putovi iz kategorije staničnih procesa, konkretnije: fagosom (map04145), lizosom (map04142), apoptoza (map04210) te autofagija životinja (map04140). Na postaji RV004 istaknuo se samo put osnovni transkripcijski faktori (map03022) iz kategorije obrada genetskih informacija. Grupa ostali Ochrophyta imala je najveći udio u ukupnoj metaboličkoj aktivnosti zajednice u kasno ljeto, točnije u rujnu na obje postaje, što se podudara s povećanom aktivnošću dva metabolička puta. To su bili metabolizam galaktoze (map00052) iz kategorije metabolizam te nukleoplazmatski transport (map03013) iz kategorije obrade genetičkih informacija. Razina ekspresije puta fotosinteze (map00195) na obje postaje bila je najveća u jesen. Slično kao i za grupu Bacillariophyta na obje se postaje u zimi većom razinom ekspresije u odnosu na ostatak godine istaknuo put endocitoze (map04144) iz kategorije stanični procesi. Putovi stanični ciklus (map04110) i stanični ciklus kvasaca (map04111) imali su povećanu ekspresiju u studenom na postaji RV001.

Analiza 60 gena s najvećim srednjim TPM vrijednostima normaliziranim unutar grupe nije otkrila klastere koji su se jasno razlikovali po sezonama (Slika 35). Također, unutar ove skupine nije detektiran nijedan ključni gen koji kodira za osnovne procese fotosinteze niti mehanizme koncentracije ugljika (CCM). Međutim, pronađeno je nekoliko gena koji kodiraju za peptidase. To su bili: katepsin L (K01365) te tri gena za karboksipeptidaze A, A2 i B (K01290, K01298 i K01291). Od gena koji sudjeluju u obradi informacija iz okoliša, pronađen je kalmodulin (K02183), a od gena koji se povezuju s odgovorom na stres, pronađen je jedan gen iz HSP obitelji (K03283).

a) RV001



b) RV004



Slika 38 Godišnji obrasci ekspresije metaboličkih puteva grupe ostali Ochrophyta prikazani za postaje RV001 (a) i RV004 (b). Oznake iznad stupaca prikazuju sezonu, a oznake ispod stupaca mjesec uzorkovanja. Oznake redaka prikazuju četiri KEGG kategorije metaboličkih puteva: M – metabolizam (engl. Metabolism), G – obrada genetskih informacija (engl. Genetic information processing), E – obrada informacija iz okoliša (engl. Environmental information processing) i C – Stanični procesi (engl. Cellular processes).



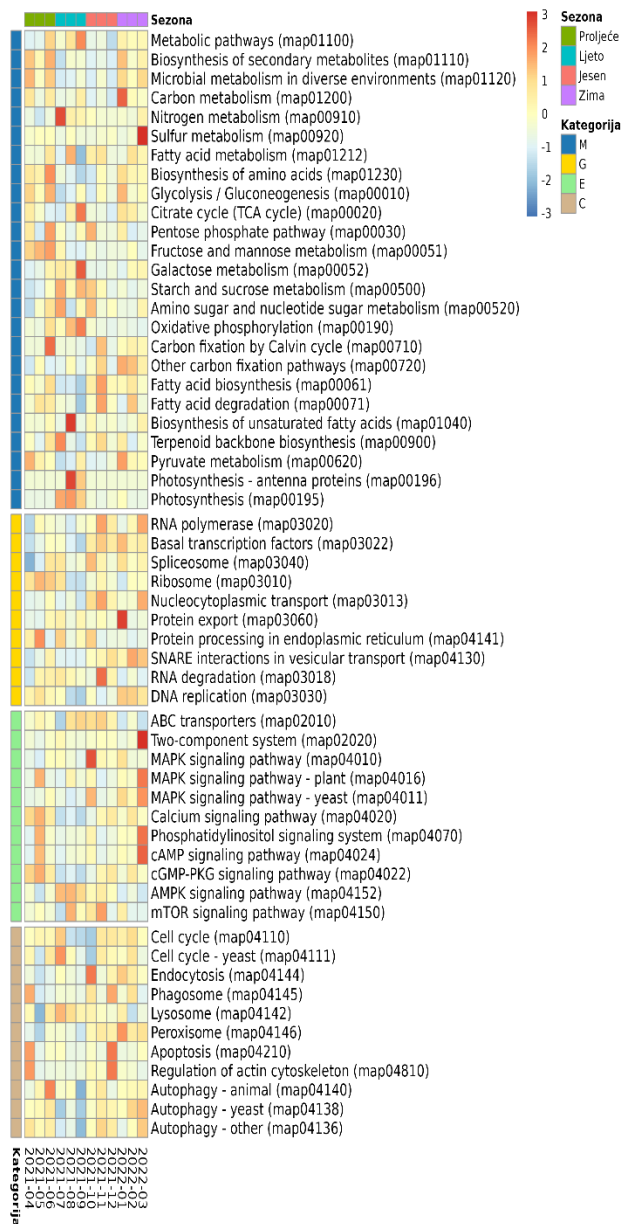
Slika 39 Godišnja sukcesija 60 gena s najvećim srednjim vrijednostima TPM normaliziranih unutar grupe ostali Ochrophyta. Na kolonama označeni su datum, postaja i sezona. Redci prikazuju originalna imena gena iz KEGG baze, tj. ustaljenu skraćenicu; puno ime gena; kod enzima (ukoliko postoji) te KEGG KO pristupni broj. Redci su hijerarhijski klasterirani temeljem euklidijskih udaljenosti.

3.2.5.4. *Grupa Haptophyta*

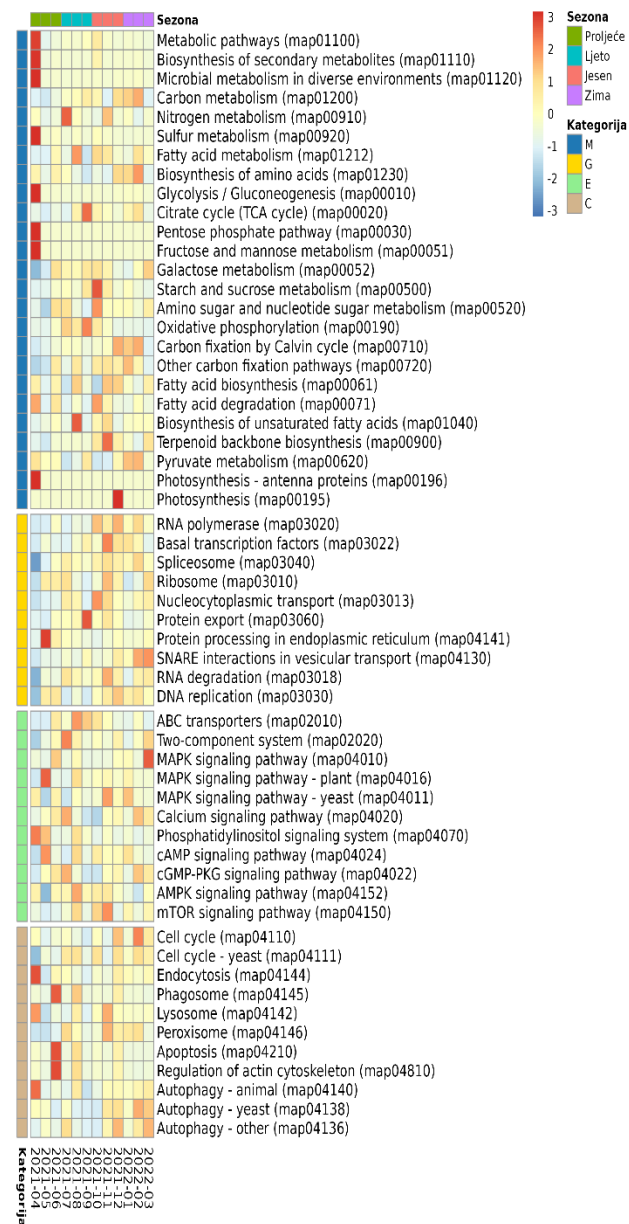
Grupa Haptophyta bila je jedina fitoplanktonska grupa koja je imala dva vrhunca u kontekstu povećanih relativnih udjela u ukupnoj metaboličkoj aktivnosti zajednice. Prvi je uočen u svibnju na postaji RV004, a drugi u veljači na obje postaje. Mjesec prije prvog vrhunca, u travnju na postaji RV004, povećanom aktivnošću istaknuli su se putovi iz dvije kategorije (Slika 40). Iz kategorije metabolizam to su bili: metabolički putovi (map01100), biosinteza sekundarnih metabolita (map 01110), mikrobni metabolizam u različitim okolišima (map01120), metabolizam sumpora (map00920), put pentoza-fosfata (map00030) te metabolizam fruktoze i manoze (map00051). Iz kategorije stanični procesi to su bili: endocitoza (map04144), lizosom (map04142), te autofagija životinja (map04140). U lipnju dodatni putovi iz ove kategorije imali su povećanu ekspresiju u odnosu na ostatak godine, konkretnije: fagosom (map04145), apoptoza (map04210) te regulacija aktinskog citoskeleta (map04810). Put fotosinteze (map00195) imao je kontinuiranu visoku ekspresiju u ljeto na postaji RV001, a na postaji RV004 istaknuo se samo u studenom. Ipak, u ožujku, na postaji RV001 ističe se povećana aktivnost nekoliko puteva iz kategorije obrada okolišnih podataka, konkretnije: dvokomponentni sustav (map02020), MAPK signalni putovi biljaka (map04016) i kvasaca (map04011), fosfatidil inozitol signalni put (map04070) te cAMP signalni put (map04024). Na postaji RV001 istaknuo se samo MAPK signalni put (map04010).

Analiza 60 gena s najvećim srednjim TPM vrijednostima normaliziranim unutar grupe nije otkrila klastere koji su se jasno razlikovali po sezonama (Slika 41). Također, unutar ove skupine nije detektiran nijedan ključni gen koji kodira za osnovne procese fotosinteze niti mehanizme koncentracije ugljika (CCM). Međutim, pronađeno je nekoliko gena koji se povezuju s fagotrofnim načinom ishrane. To su bili: klatrin (teški lanac) (K04646) te klaretikulin (K08057). Od gena koji sudjeluju u obradi informacija iz okoliša pronađen je kalmodulin (K02183). Pronađen je jedan gen koji kodira za transporter fosfata, točnije natrij-ovisni kotransporter fosfata (K14683) iz SLC34 obitelji. Također, pronađena su dva gena povezana s odgovorom na stres. To su bila dva gena koji kodiraju za serinske proteaze, tripsin (K01312) i kimotripsin (K01310) s povećanom ekspresijom u ljeto i kasno proljeće.

a) RV001



b) RV004



Slika 40 Godišnji obrasci ekspresije metaboličkih puteva grupe ostali Haptophyta prikazani za postaje RV001 (a) i RV004 (b). Oznake iznad stupaca prikazuju sezonu, a oznake ispod stupaca mjesec uzorkovanja. Oznake redaka prikazuju četiri KEGG kategorije metaboličkih puteva: M – metabolizam (engl. Metabolism), G – obrada genetskih informacija (engl. Genetic information processing), E – obrada informacija iz okoliša (engl. Environmental information processing) i C – stanični procesi (engl. Cellular processes).



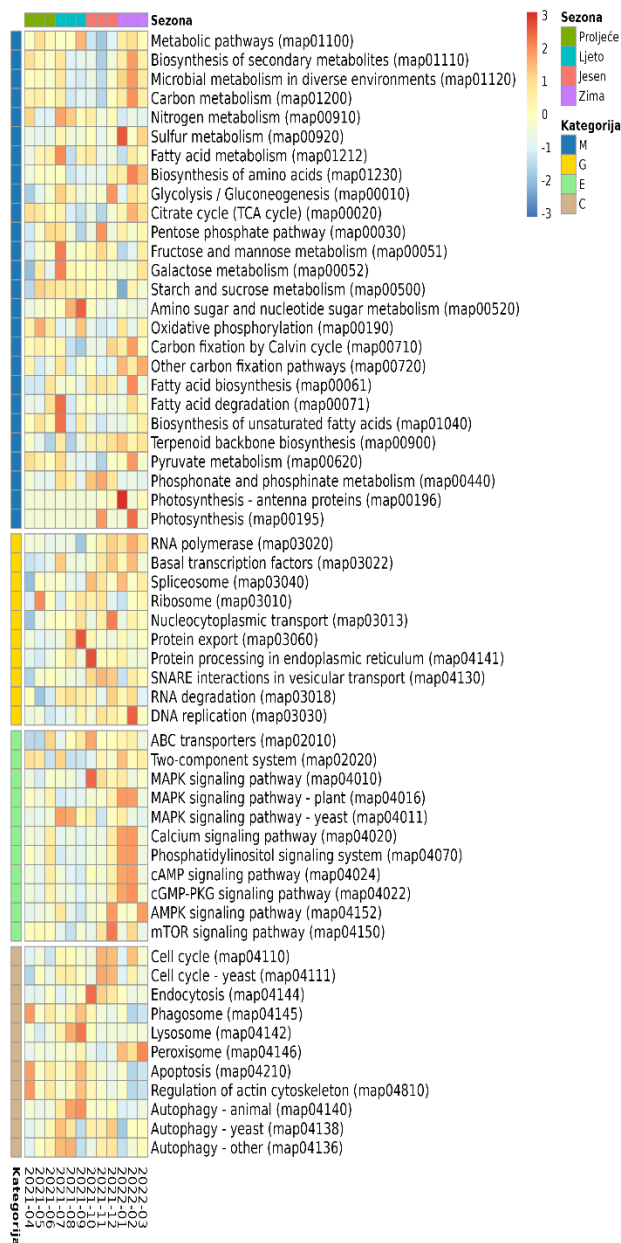
Slika 41 Godišnja sukcesija 60 gena s najvećim srednjim vrijednostima TPM normaliziranih unutar grupe Haptophyta. Na kolonama označeni su datum, postaja i sezona. Redci prikazuju originalna imena gena iz KEGG baze tj. ustaljenu skraćenicu; puno ime gena; kod enzima (ukoliko postoji) te KEGG KO pristupni broj. Redci su hijerarhijski klasterirani temeljem euklidijskih udaljenosti.

3.2.5.5. *Grupa Chlorophyta*

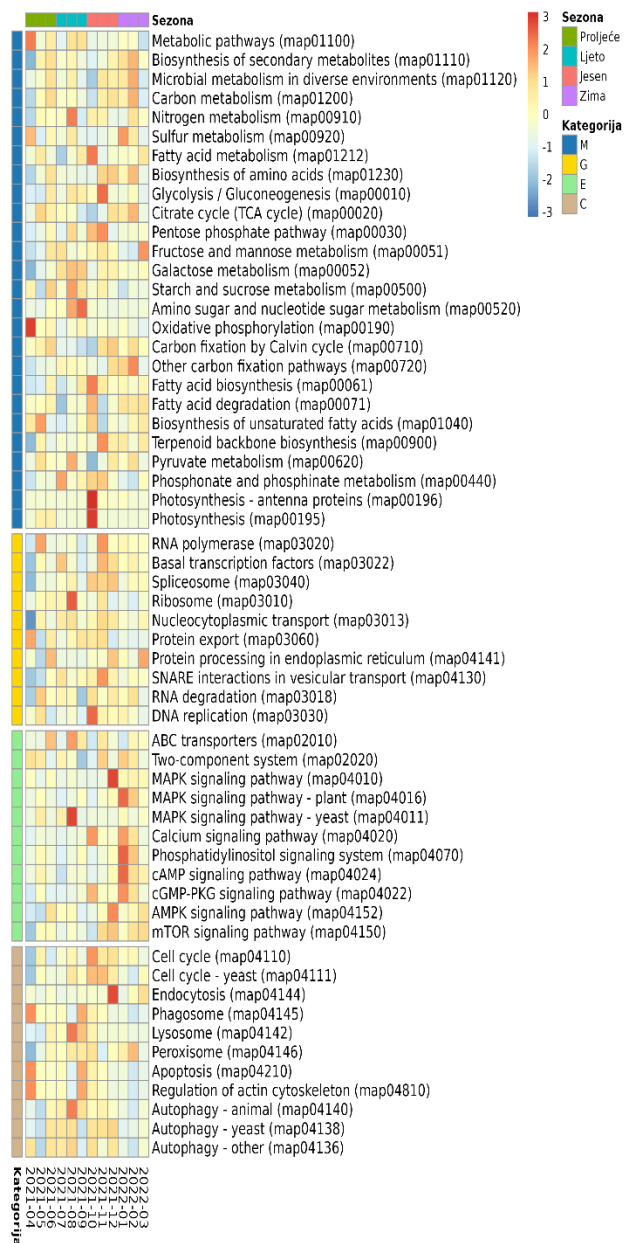
Za grupu Chlorophyta, kao i za većinu grupa, proljeće je bilo razdoblje najmanjeg relativnog udjela u ukupnoj metaboličkoj aktivnosti zajednice. Ipak, u travnju se na obje postaje istaknula povećana aktivnost nekoliko puteva iz kategorije stanični procesi, konkretnije: fagosom (map04145), apoptoza (map04210) te regulacija aktinskog citoskeleta (map04810) (Slika 42). Dodatno, na postaji RV004 ističe se povećana aktivnost puta oksidativne fosforilacije (map00190) iz kategorije metabolizam. Nakon proljeća, relativni udio grupe Chlorophyta u ukupnom metabolizmu zajednice se povećao te ostao relativno stabilan kroz ostatak godine. Većina putova pokazuje više vrijednosti ekspresije u drugom djelu godine. Primjerice, to su putovi fotosinteze (map00195) ili pak endocitoze (map04144). Osnovni putovi za akviziciju energije kao što su glikoliza/glukogeneza (map00010), TCA ciklus (map00020), ali i ostali putovi iz kategorije metabolizam kao što su biosinteza sekundarnih metabolita (map01110), mikrobni metabolizam u različitim okolišima (map01120), metabolizam ugljika (map01200) i biosinteza aminokiselina (map01230) pokazuju povećanu ekspresiju krajem jeseni i kroz zimu. Također, u zimi se ističe i povećana aktivnost većine puteva iz kategorije obrada okolišnih podataka.

Analiza 60 gena s najvećim srednjim TPM vrijednostima normaliziranim unutar grupe nije otkrila klastere koji su se jasno razlikovali po sezonama (Slika 43). Također, unutar ove skupine nisu detektirani ključni geni koji kodiraju za osnovne procese fotosinteze, mehanizme koncentracije ugljika (CCM) niti geni koji se povezuju s fagotrofnim načinom ishrane. Od gena koji sudjeluju u obradi informacija iz okoliša, pronađen je kalmodulin (K02183). Također pronađeno je nekoliko gena povezanih s odgovorom na stres. To su bili geni povezani s metabolizmom glutationa: glutation S-transferaza (K00799) i glutation peroksidaza (K00432) te nekoliko gena iz HSP obitelji (K04079, K09485 i K03283).

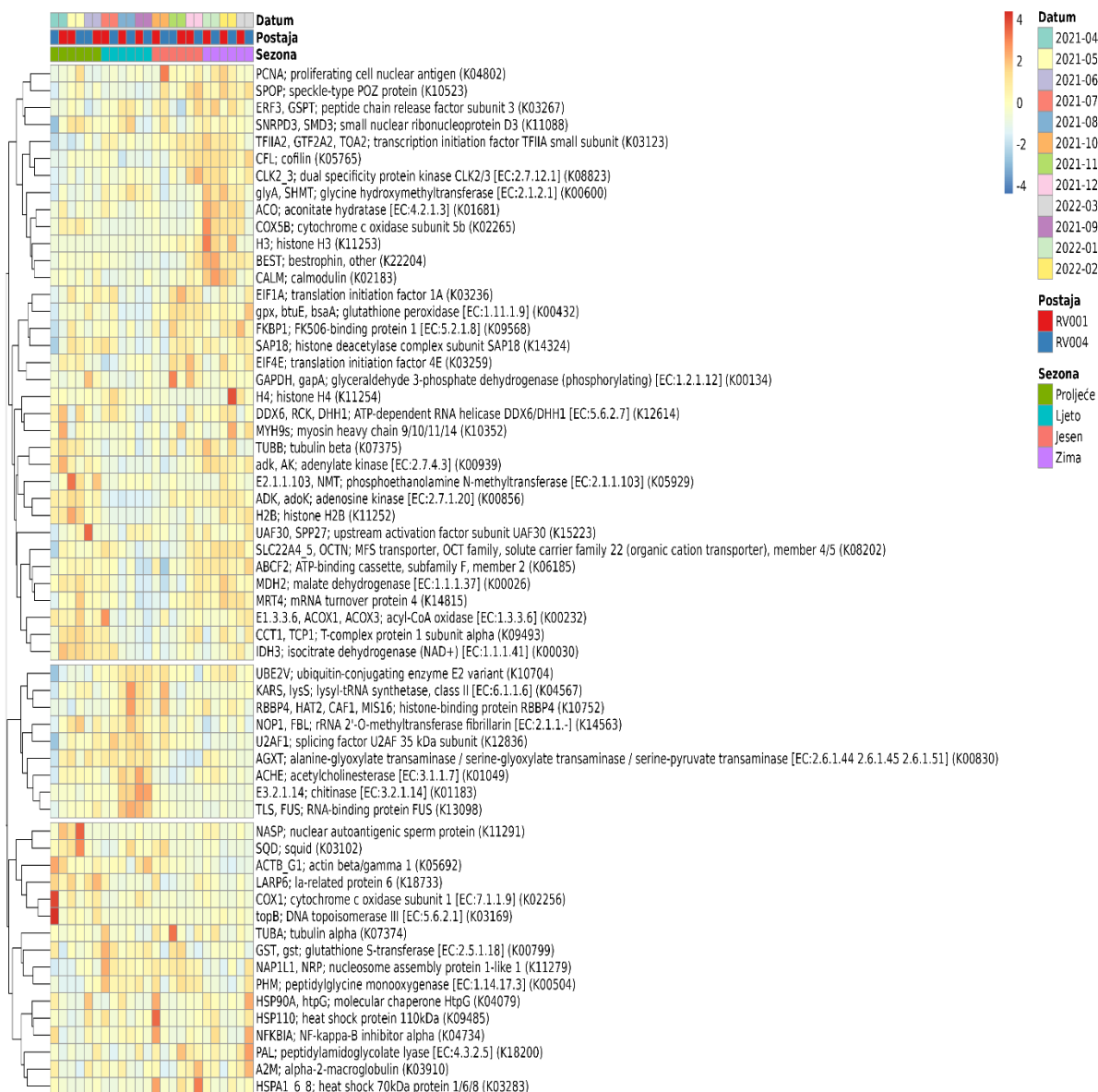
a) RV001



b) RV004



Slika 42 Godišnji obrasci ekspresije metaboličkih puteva grupe *Chlorophyta* prikazani za postaje RV001 (a) i RV004 (b). Oznake iznad stupaca prikazuju sezonu, a oznake ispod stupaca mjesec uzorkovanja. Oznake redaka prikazuju četiri KEGG kategorije metaboličkih puteva: M – metabolizam (engl. Metabolism), G – obrada genetskih informacija (engl. Genetic information processing), E – obrada informacija iz okoliša (engl. Environmental information processing) i C – stanični procesi (engl. Cellular processes).



Slika 43 Godišnja sukcesija 60 gena s najvećim srednjim vrijednostima TPM normaliziranih unutar grupe Chlorophyta. Na kolonama označeni su datum, postaja i sezona. Redci prikazuju originalna imena gena iz KEGG baze tj. ustaljenu skraćenicu; puno ime gena; kod enzima (ukoliko postoji) te KEGG KO pristupni broj. Redci su hijerarhijski hlasterirani temeljem euklidiskih udaljenosti.

3.2.5.6. *Grupa Cryptophyta*

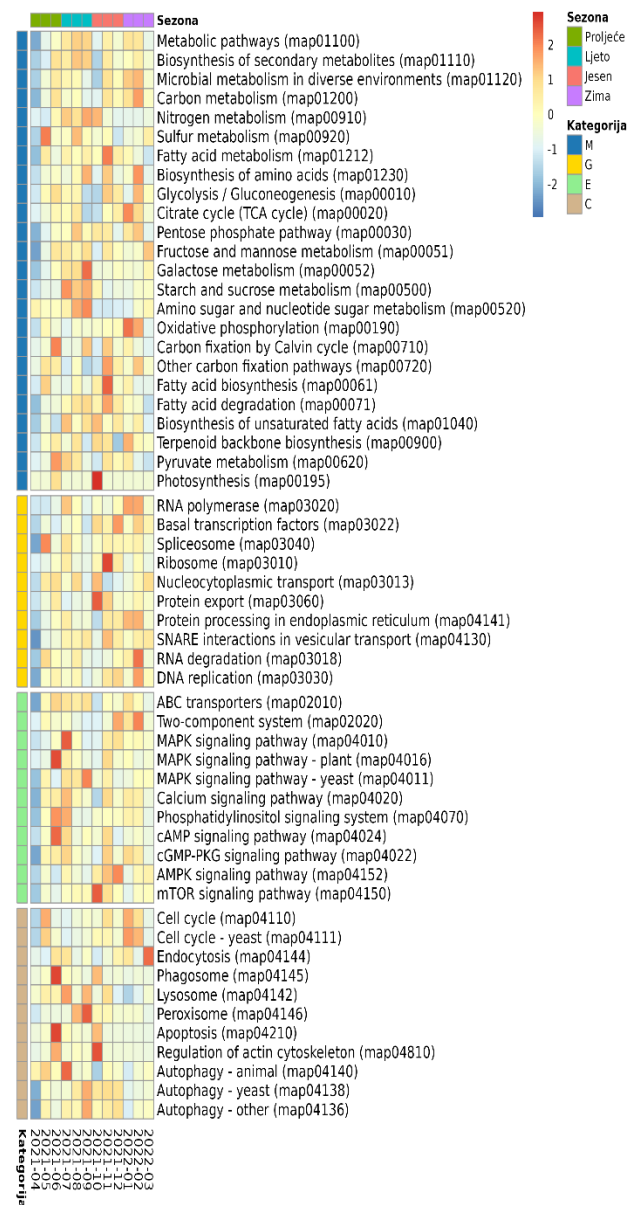
Grupa Cryptophyta pokazuje vrlo sličan obrazac kretanja relativnih udjela u ukupnoj metaboličkoj aktivnosti zajednice kao i grupa Chlorophyta, sa minimumom u proljeće te porastom i stabilnim razinama kroz ostatak godine. U travnju, na postaji RV004 ističe se vrlo niska razina ekspresije svih metaboličkih puteva, dok su na postaju RV001 neki metabolički putovi ipak imali povećanu razinu ekspresije (Slika 44). To su bili put pentoza-fosfata (map00030) i metabolizam fruktoze i manoze (map00051) iz kategorije metabolizam, ali i neki putovi iz kategorije obrada informacija iz okoliša, primjerice MAPK signalni put biljaka (map04016), signalni put kalcija (map04020), fosfatilil-inozitol signalni put te cAMP (map04024) i cGMP signalni put (map04022) čije ekspresije nastavljaju biti visoke i kroz ostatak proljeća na obje postaje. Na postaji RV001 u travnju ističe se i ekspresija puteva iz kategorije stanični procesi, konkretno put lizosom (map04142) i autofagija životinja (map04140). Put fotosinteze (map00195) nije uočen na postaji RV001, a na postaji RV004 ističe se jedino u listopadu. Ostali putovi iz kategorija metabolizam imali su povećanu ekspresiju u drugom dijelu godine. Putovi stanični ciklus te stanični ciklus kvasaca na obje postaje imaju povećanu ekspresiju u zimi.

Analiza 60 gena s najvećim srednjim TPM vrijednostima normaliziranim unutar grupe nije otkrila klastere koji su se jasno razlikovali po sezonama (Slika 45). Također, unutar ove skupine nisu detektirani ključni geni koji kodiraju za osnovne procese fotosinteze, ali detektiran je gen za alfa-karboanhidrazu (K01622) koji sudjeluje u mehanizmu koncentracije ugljika (CCM). Međutim, pronađeno je koji se nešto fali?gen povezuje s fagotrofnim načinom ishrane kod protista. To su bili: katepsin L (K01365) i karbopeptidaza b (K01291). Od gena koji sudjeluju u obradi informacija iz okoliša pronađen je kalmodulin (K02183). A pronađena su i dva gena koja sudjeluju u odgovoru na stres: glutathion S-transferaza (K00799) te HSP gen (K03283).

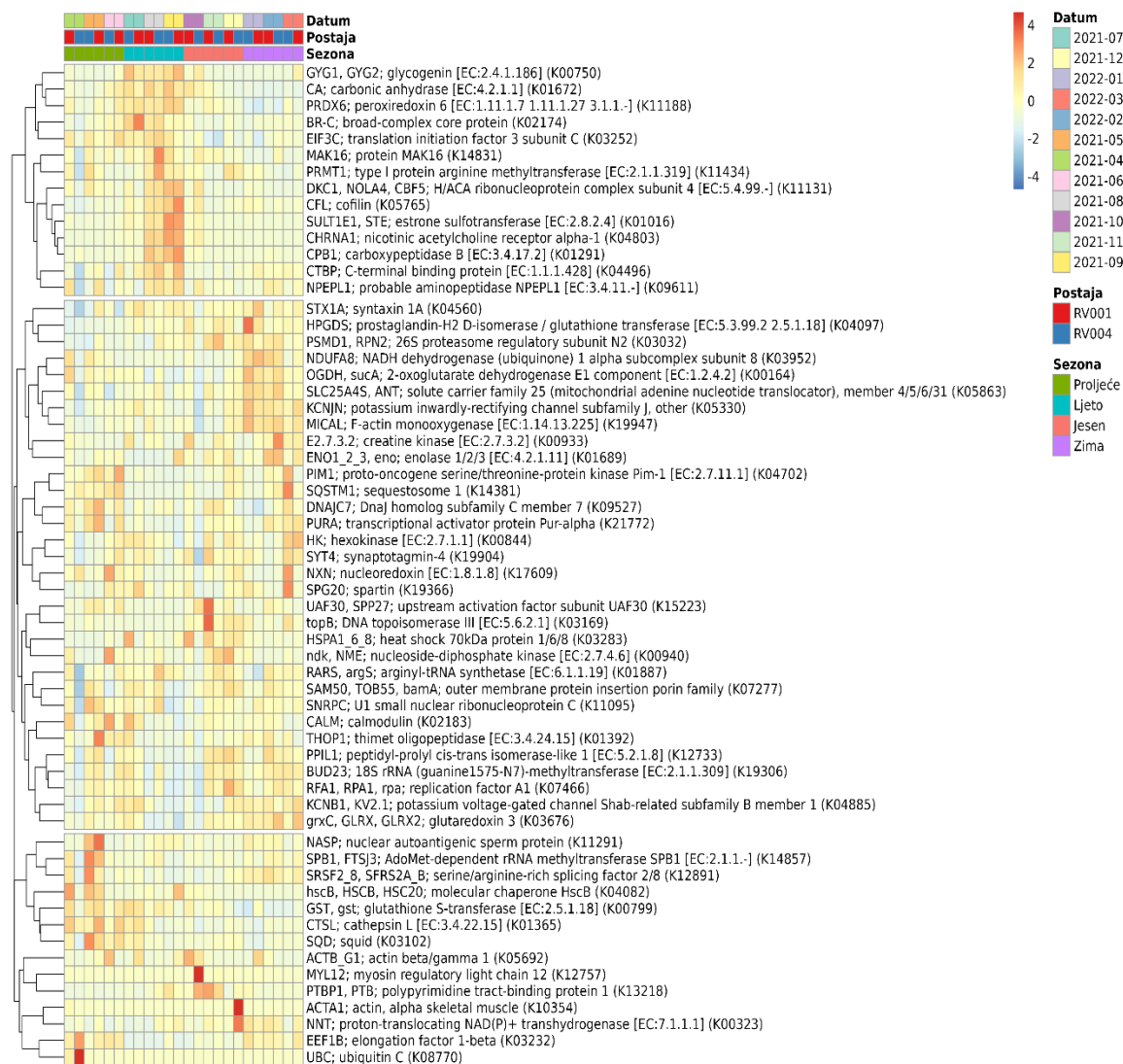
a) RV001



b) RV004



Slika 44 Godišnji obrasci ekspresije metaboličkih puteva grupe Cryptophyta prikazani za postaje RV001 (a) i RV004 (b). Oznake iznad stupaca prikazuju sezonu, a oznake ispod stupaca mjesec uzorkovanja. Oznake redaka prikazuju četiri KEGG kategorije metaboličkih puteva: M – metabolizam (engl. Metabolism), G – obrada genetskih informacija (engl. Genetic information processing), E – obrada informacija iz okoliša (engl. Environmental information processing) i C – stanični procesi (engl. Cellular processes).



Slika 45 Godišnja sukcesija 60 gena s najvećim srednjim vrijednostima TPM normaliziranih unutar grupe Cryptophyta. Na kolonama označeni su datum, postaja i sezona. Redci prikazuju originalna imena gena iz KEGG baze, tj. ustaljenu skraćenicu; puno ime gena; kod enzima (ukoliko postoji) te KEGG KO pristupni broj. Redci su hijerarhijski klasterirani temeljem euklidjjskih udaljenosti.

3.3. *Skup podataka Po meta*

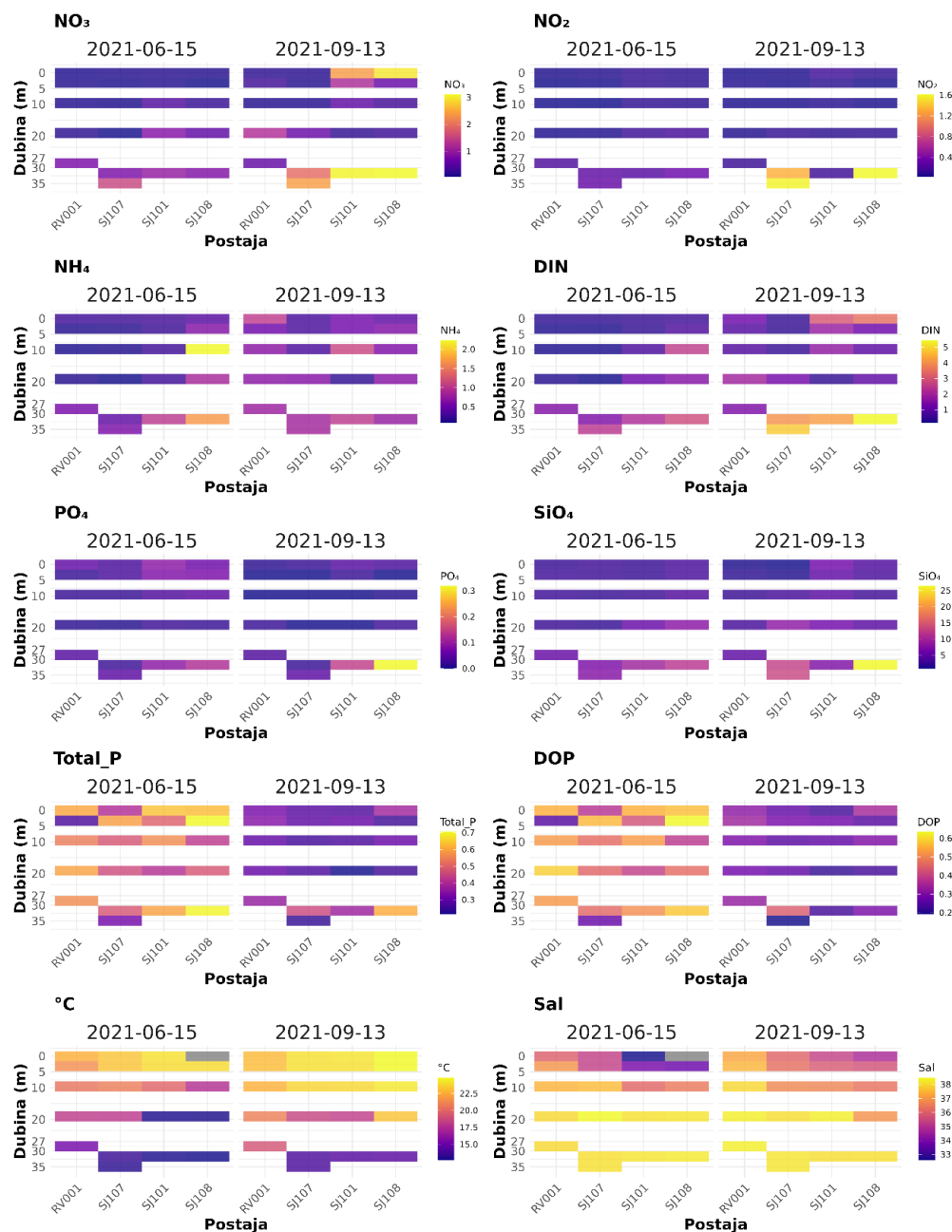
3.3.1. *Okolišni parametri*

Na uzorkovanjima Po transektu provedenima u lipnju i rujnu vrijednosti temperature i saliniteta ukazuju na stratifikaciju vodenog stupca (Slika 46). U lipnju je temperatura na 0 i 5 m dubine na svim postajama bila veća od 21 °C, a na mjerenim dubinama većim od 20 m temperatura nije prelazila 16 °C. Najveća izmjerena temperatura u lipnju bila je na postaji SJ101 na 0 m dubine, a iznosila je 24,07 °C. Na istoj postaji na 30 m dubine izmjerena je najniža temperatura tog mjeseca - 12,66 °C. U rujnu je temperatura na dubinama 0, 5 i 10 m prelazila 21 °C, a na postaji SJ108 i na 20 m. Na 20 m dubina temperature su se na postajama kretale od 23,16 do 18,11 °C, a tek su na dubinama od 30 i 35 m izmjerene temperature bile niže od 16 °C. Najveća izmjerena temperatura u rujnu bila je na postaji SJ108 na 0 m dubine, a iznosila je 24,82 °C. Na postaji SJ107 na 35 m dubine izmjerena je najniža temperatura tog mjeseca (13,91 °C).

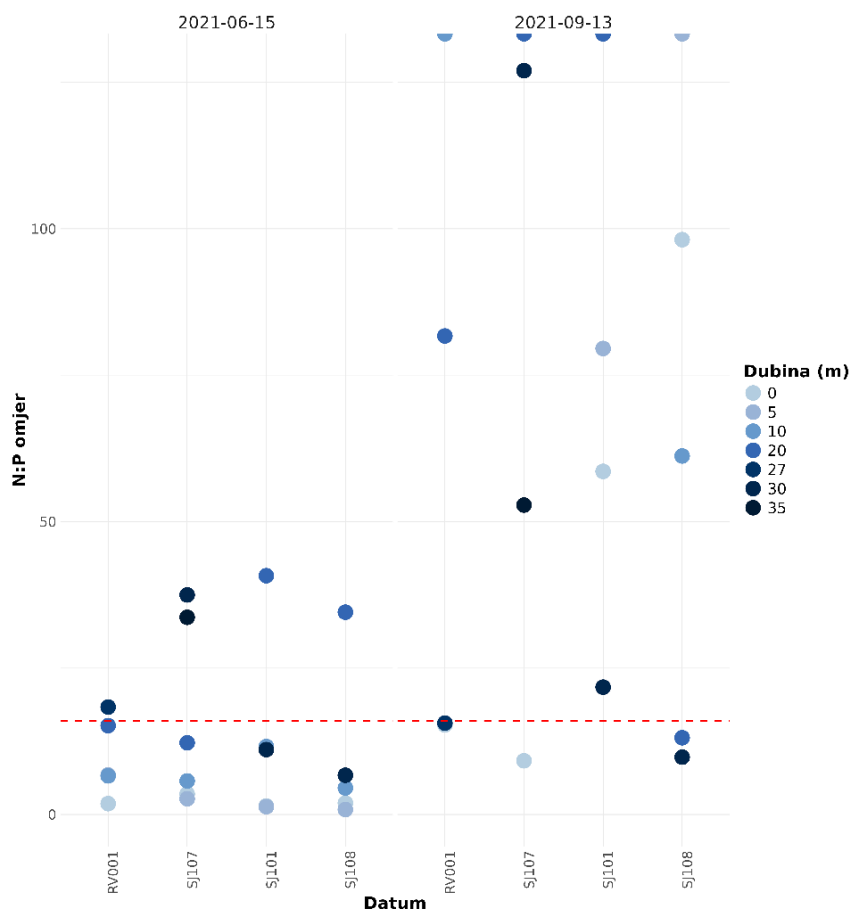
Vrijednosti saliniteta bile su niže u površinskim slojevima, nego pri dnu i u lipnju i u rujnu (Slika 46). U površinskom sloju (0 m) zabilježen je prostorni gradijent saliniteta; vrijednosti su se smanjivale u smjeru istok-zapad, odnosno od postaje RV001 prema postaji SJ108 (Slika 46). Te vrijednosti kretale su se od 35,98 do 32,60 (RV001-SJ101) u lipnju i od 37,21 do 34,77 (RV001-SJ108) u rujnu. Smanjeni salinitet u površinskom sloju ukazuje na dotok slatke vode iz rijeke Po te zatvoreni obrazac cirkulacije u području sjevernog Jadrana.

U lipnju su zabilježene više vrijednosti ukupnog fosfora (Total_P) u vodenom stupcu nego u rujnu (Slika 46). Najviše vrijednosti koncentracije ukupnog fosfora zabilježene su na postaji SJ108 na 5 i 35 m (0,7 µmol/L) u lipnju. Najniže vrijednosti koncentracije ukupnog fosfora (Total_P) zabilježene su na postajama SJ101 na 20 m (0,21 µmol/L) te na postaji SJ107 na 35 m (0,23 µmol/L) u rujnu. Više koncentracije ukupnog fosfora (Total_P) mogu se pripisati povišenim koncentracijama otopljenog organskog fosfora (DOP), dok su koncentracije ortofosfata (PO_4^{3-}) bile niže (Slika 46). Zbog istodobno niskih koncentracija nitrata (NO_3^-) omjeri N:P u većem dijelu vodenog stupca bili su manji od 16, dok su vrijednosti veće od 16 zabilježene tek na većim dubinama (Slika 46 i Slika 47). U rujnu su, kroz veći dio vodenog stupca, bile prisutne niske koncentracije ortofosfata (PO_4^{3-}) i DOP-a, a na pojedinim postajama i dubinama ortofosfat bio je u potpunosti iscrpljen. Ipak, na postaji SJ108 uočen je početak uzdizanja nutrijenata iz dubljih

slojeva (Slika 46), pri čemu su na dubini od 30 m zabilježene najviše koncentracije ortofosfata ($0,3 \mu\text{mol/L}$). Tijekom rujna omjeri N:P uglavnom su prelazili vrijednost 16 (Slika 47).



Slika 46 Prostorna raspodjela okolišnih parametara na dva uzorkovanja PO transektu (lipanj i rujna). Kratice na grafikonu: NO_3 (nitrat (NO_3^-)), NO_2 (nitrit (NO_2^-)), NH_4 (amonijak (NH_4^+)), DIN (otopljeni anorganski dušik (zbroj (NO_3^-), (NO_2^-) i (NH_4^+))), PO_4 (ortofosfat (PO_4^{3-})), SiO_4 (ortosilikat (SiO_4^{4-})), Total_P (ukupni otopljeni fosfor), DOP (otopljeni organski fosfor (zbroj Total_P i (PO_4^{3-}))), °C (temperatura), Sal (salinitet).



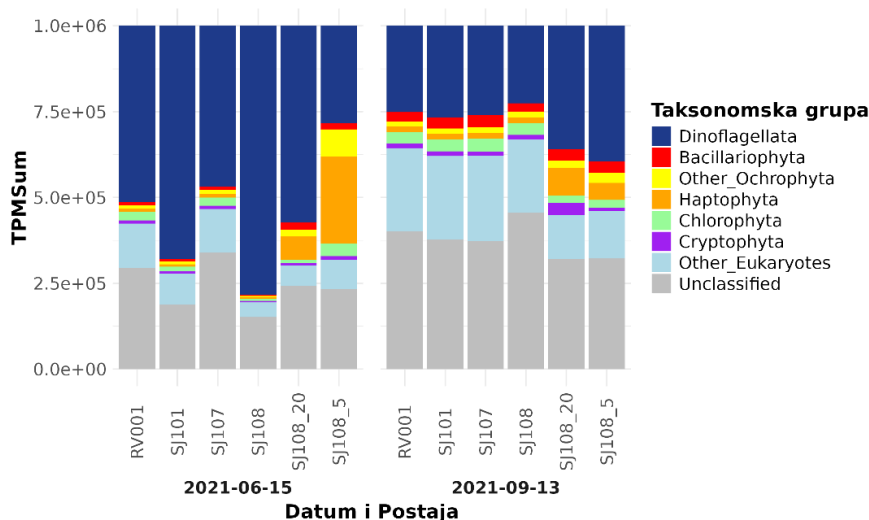
Slika 47 Prostorna raspodjela omjera N:P (nitrat (NO_3^-)/ ortofosfat (PO_4^{3-}) na dva uzorkovanja Po transektu (lipanj i rujan). Crvena isprekidana linija prikazuje omjer N:P = 16.

3.3.2. Taksonomska raspodjela fitoplanktonske zajednice

Relativni udjeli svake fitoplanktonske grupe u ukupnoj metaboličkoj aktivnosti cjelokupne zajednice predstavljeni su zbrojem TPM vrijednosti normaliziranih između grupa. Tijekom oba uzorkovanja na Po transektu grupa Dinoflagellata imala je najveće relativne udjele u ukupnoj metaboličkoj aktivnosti zajednice, uz iznimku uzorka uzorkovanog Niskinovim crpcem na 20 m dubine u lipnju, kada je i skupina Haptophyta imala visoke metaboličke udjele (Slika 48). Relativni udjeli grupe Dinoflagellata na svim su postajama bili veći u lipnju u odnosu na rujan (Slika 48). Suprotno tome, ostale fitoplanktonske grupe uglavnom su imale veće relativne udjele u rujnu (Slika 48).

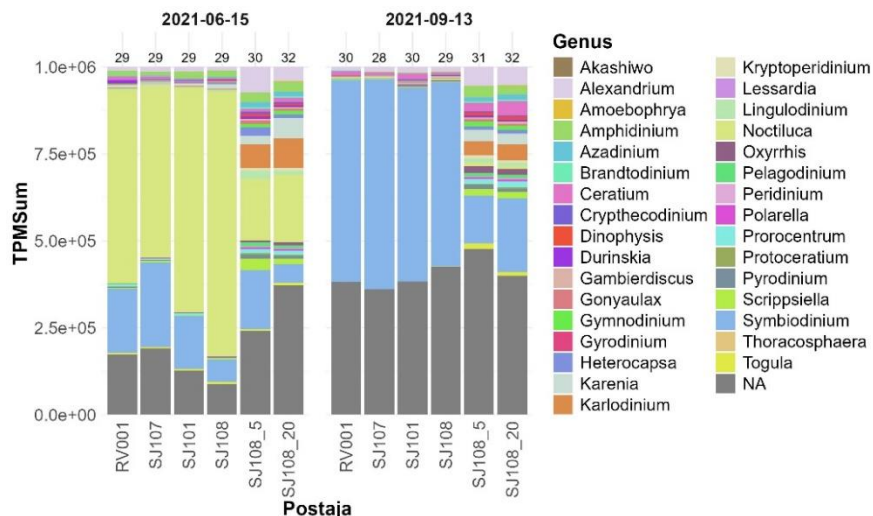
Uočene su i razlike u relativnim udjelima ovisno o načinu uzorkovanja planktonskom mrežom naspram Niskinovog crpca. Uzorkovanjem crpcima zabilježen je veći relativni udio grupe

Haptophyta na obje analizirane dubine (5 i 20 m) u usporedbi s uzorcima iz cijelog vodenog stupca prikupljenima planktonskom mrežom na postaji SJ108. Ta je razlika bila osobito izražena u lipnju na dubini od 5 metara, kada su grupe Haptophyta i ostali Ochrophyta pokazale povećane relativne udjele u odnosu na uzorak iz cijelog vodenog stupca prikupljenog na istoj postaji (Slika 48). Dodatno, uočena je razlika u broju jedinstvenih KEGG.KO anotacija između metatranskriptoma dobivenih uzorkovanjem planktonskom mrežom i Niskinovim crpcem na postaji SJ108. Uspoređujući broj jedinstvenih anotacija između metatranskriptoma sa postaje SJ108 (mrežni potez, 5 m i 20 m) u lipnju i rujnu, dosljedno je najveći broj jedinstvenih anotacija kod svih fitoplanktonskih grupa zabilježen u metatranskriptomima uzorkovanim Niskinovim crpcima (Prilog 8, Prilog 9, Prilog 10, Prilog 11, Prilog 12 i Prilog 13). Kod grupa Dinoflagellata, Bacillariophyta, ostali Ochrophyta i Chlorophyta najveći broj jedinstvenih KEGG.KO anotacija pronađen je u metatranskriptomima uzorkovanim Niskinovim crpcima na 20 m dubine za lipanj i rujanj (Prilog 8, Prilog 9, Prilog 10 i Prilog 12). Kod grupa Haptophyta i Cryptophyta najveći broj jedinstvenih KEGG.KO anotacija pronađen je u metatranskriptomu uzorkovanom Niskinovim crpcem na 5 m dubine u lipnju, a u rujnu je najveći broj anotacija pronađen u metatranskriptomu uzorkovanom Niskinovim crpcem na 20 m dubine (Prilog 11 i Prilog 13).

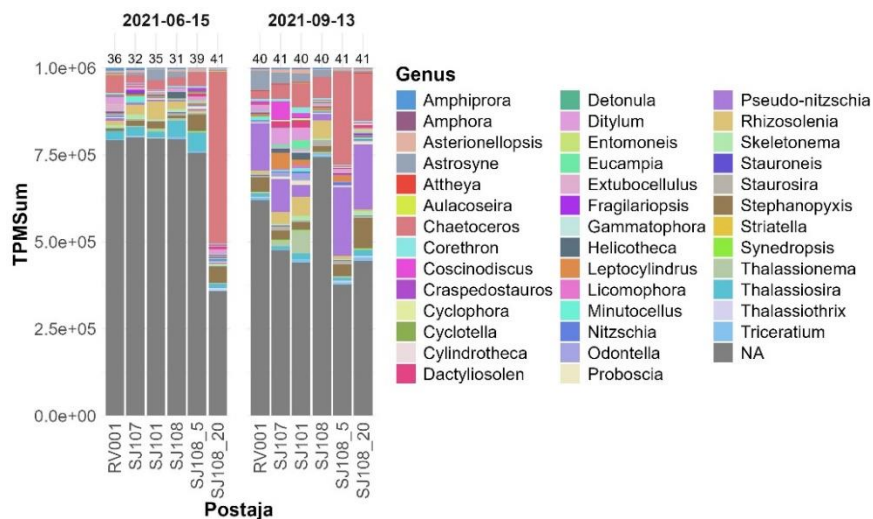


Slika 48 Relativni udjeli grupa u ukupnoj metaboličkoj aktivnosti cjelokupne zajednice na postajama Po transektu u lipnju i rujnu temeljeni na zbroju TPM vrijednosti normaliziranih između grupa. Pritom x-os predstavlja postaje na kojima je uzet vertikalni potez fitoplanktonskom mrežom (RV001, SJ101, SJ107 i SJ108) i postaje i dubinu na kojoj je uzorak uzet Niskinovim crpcem (SJ108_5 i SJ108_20). y-os predstavlja zbroj TPM vrijednosti normaliziranih između grupa svih proteinskih sljedova koji su pripali određenoj taksonomskoj grupi.

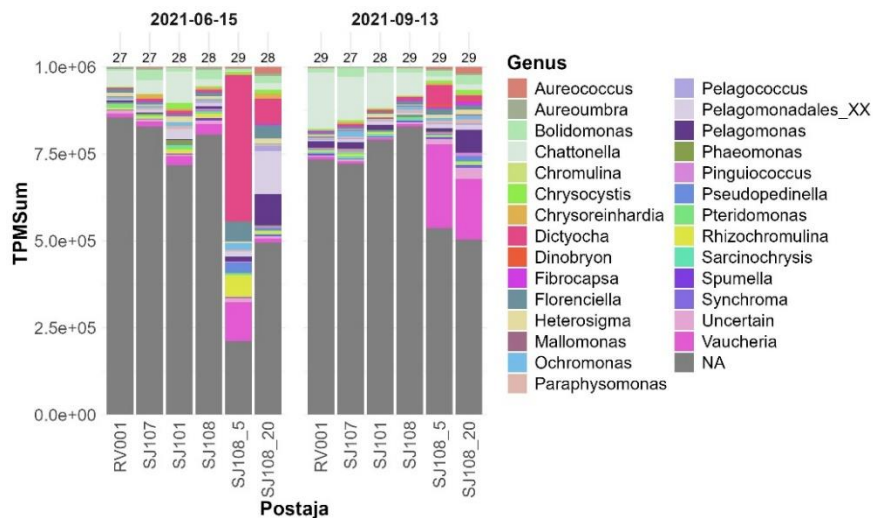
Taksonomskom anotacijom na razini roda identificirano je ukupno 32 roda grupe Dinoflagellata, 40 rodova grupe Bacillariophyta, 28 rodova grupe ostali Ochrophyta, 14 rodova grupe Haptophyta, 22 roda grupe Chlorophyta te 10 rodova grupe Cryptophyta. U većini uzoraka zabilježena je prisutnost gotovo svih identificiranih rodova unutar pojedine grupe, no njihovi relativni udjeli varirali su među uzorcima (Slika 49, Slika 50, Slika 51, Slika 52, Slika 53 i Slika 54). Primjerice, unutar grupe Dinoflagellata najveći relativni udio u lipnju imao je rod *Noctiluca*, dok je u rujnu dominirao rod *Symbiodinium* (Slika 49). Uočeno je da su relativni udjeli ovih dominantnih rodova bili niži u uzorcima prikupljenima Niskinovim crpcem u usporedbi s uzorcima prikupljenima planktonskom mrežom na postaji SJ108 (Slika 49). Kod ostalih skupina dominacija pojedinih rodova bila je izražena samo u pojedinim uzorcima (Slika 50, Slika 51, Slika 52, Slika 53 i Slika 54). Primjerice, kod skupine Bacillariophyta u uzorku prikupljenom Niskinovim crpcem s dubine od 20 metara u lipnju, rod *Chaetoceros* imao je vrlo visok relativni udio (Slika 50). U rujanskim uzorcima prikupljenima Niskinovim crpcem najveći relativni udjeli pripadali su rodovima *Chaetoceros* i *Pseudo-nitzschia* (Slika 50). U skupini ostali Ochrophyta, rod *Dictyocha* je u lipanjskom uzorku s dubine od 5 metara imao visoki relativni udio, dok je u rujanskim uzorcima prikupljenima Niskinovim crpcem dominirao rod *Vaucheria* (Slika 51). U skupini Haptophyta, rod *Chrysocromulina* bio je dominantan u uzorcima Niskinovog crpca tijekom oba uzorkovana razdoblja, tj. u lipnju i u rujnu (Slika 52).



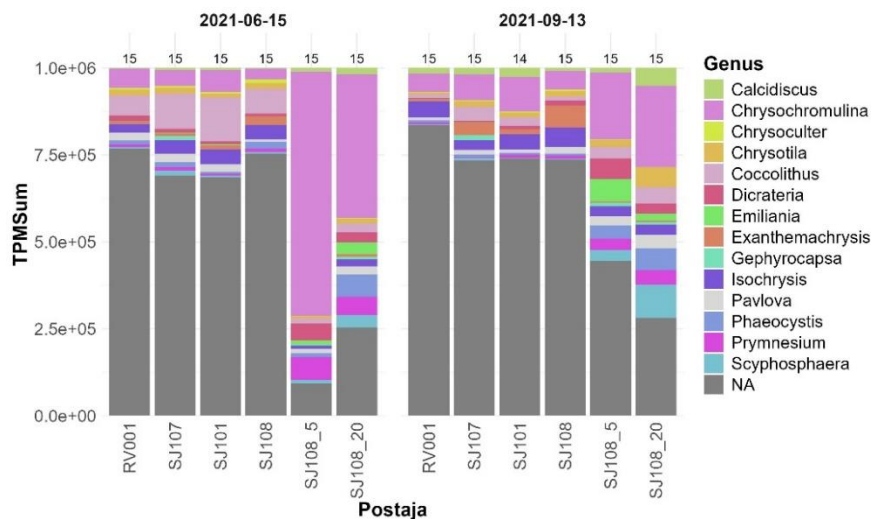
Slika 49 Relativni udjeli rodova grupe Dinoflagellata identificirani na postajama Po transektu u lipnju i rujnu. Pritom x-os predstavlja postaje na kojima je uzet vertikalni potez fitoplanktonskom mrežom (RV001, SJ101, SJ107 i SJ108) i postaje i dubinu na kojoj je uzorak uzet Niskinovim crpcem (SJ108_5 i SJ108_20). y-os predstavlja zbroj TPM vrijednosti normaliziranih unutar grupe Dinoflagellata. Oznaka "NA" odnosi se na proteinske sljedove unutar grupa Dinoflagellata koji nisu uspješno anotirani na razini roda. Na vrhu svakog stupca prikazan je broj rodova identificiranih u uzorku. Na vrhu svakog stupca naznačen je broj rodova identificiran u uzorku.



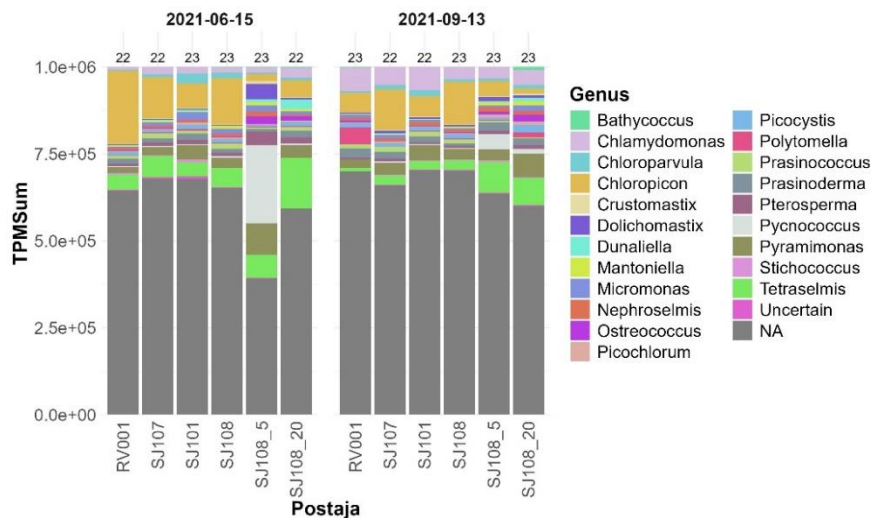
Slika 50 Relativni udjeli rodova grupe Bacillariophyta identificirani na postajama Po transektu u lipnju i rujnu. Pritom x-os predstavlja postaje na kojima je uzet vertikalni potez fitoplanktonskom mrežom (RV001, SJ101, SJ107 i SJ108) i postaje i dubinu na kojoj je uzorak uzet Niskinovim crpcem (SJ108_5 i SJ108_20); y-os predstavlja zbroj TPM vrijednosti normaliziranih unutar grupe Bacillariophyta. Oznaka "NA" odnosi se na proteinske sljedove unutar grupe Bacillariophyta koji nisu uspješno anotirani na razini roda. Na vrhu svakog stupca prikazan je broj rodova identificiranih u uzorku. Na vrhu svakog stupca naznačen je broj rodova identificiran u uzorku.



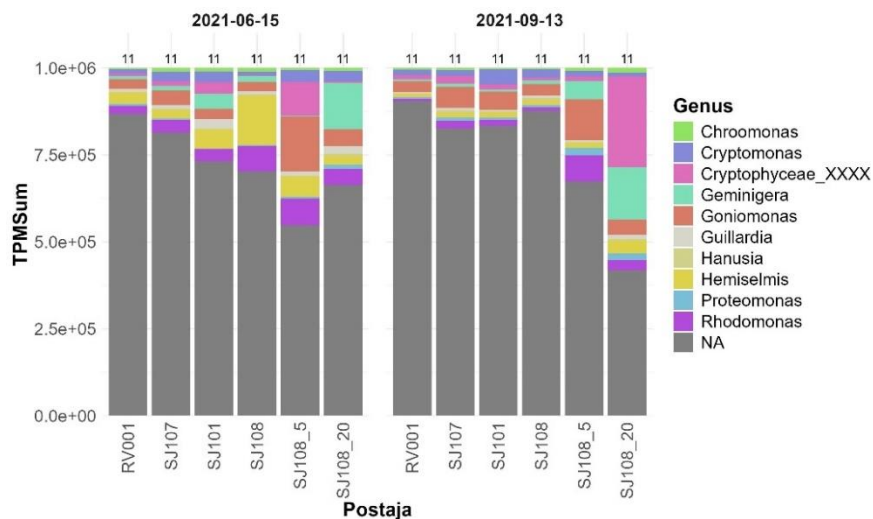
Slika 51 Relativni udjeli rodova grupe ostali Ochrophyta identificirani na postajama Po transektu u lipnju i rujnu. Pritom x-os predstavlja postaje na kojima je uzet vertikalni potez fitoplanktonskom mrežom (RV001, SJ101, SJ107 i SJ108) i postaje i dubinu na kojoj je uzorak uzet Niskinovim crpcem (SJ108_5 i SJ108_20); y-os predstavlja zbroj TPM vrijednosti normaliziranih unutar grupe ostali Ochrophyta. Oznaka "NA" odnosi se na proteinske sljedove unutar grupe ostali Ochrophyta koji nisu uspješno anotirani na razini roda. Na vrhu svakog stupca prikazan je broj rodova identificiranih u uzorku. Na vrhu svakog stupca naznačen je broj rodova identificiran u uzorku.



Slika 52 Relativni udjeli rodova grupe Haptophyta identificirani na postajama Po transektu u lipnju i rujnu. Pritom x-os predstavlja postaje na kojima je uzet vertikalni potez fitoplanktonskom mrežom (RV001, SJ101, SJ107 i SJ108) i postaje i dubinu na kojoj je uzorak uzet Niskinovim crpcem (SJ108_5 i SJ108_20). y-os predstavlja zbroj TPM vrijednosti normaliziranih unutar grupe Haptophyta. Oznaka "NA" odnosi se na proteinske sljedove unutar grupe Haptophyta koji nisu uspješno anotirani na razini roda. Na vrhu svakog stupca prikazan je broj rodova identificiranih u uzorku. Na vrhu svakog stupca naznačen je broj rodova identificiran u uzorku.



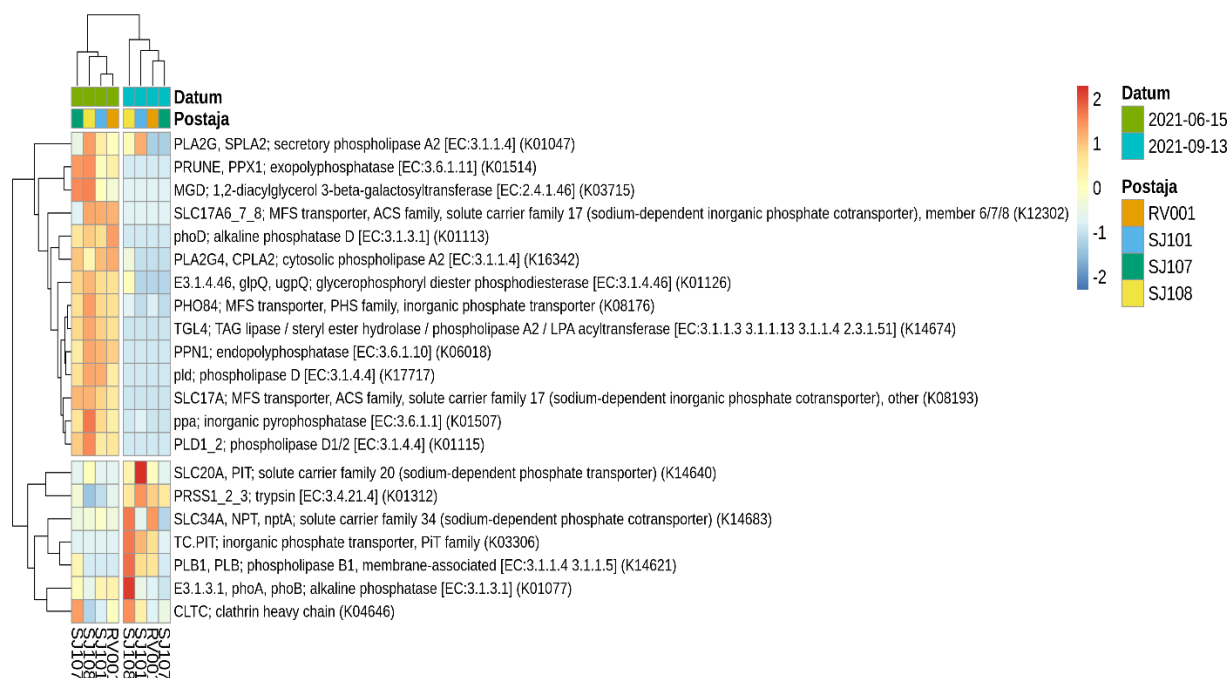
Slika 53 Relativni udjeli rodova grupe Chlorophyta identificirani na postajama Po transektu u lipnju i rujnu. Pritom x-os predstavlja postaje na kojima je uzet vertikalni potez fitoplanktonskom mrežom (RV001, SJ101, SJ107 i SJ108) i postaje i dubinu na kojoj je uzorak uzet Niskinovim crpcem (SJ108_5 i SJ108_20; y-os predstavlja zbroj TPM vrijednosti normaliziranih unutar grupe Chlorophyta. Oznaka "NA" odnosi se na proteinske sljedove unutar grupe Chlorophyta koji nisu uspješno anotirani na razini roda. Na vrhu svakog stupca prikazan je broj rodova identificiranih u uzorku. Na vrhu svakog stupca naznačen je broj rodova identificiran u uzorku.



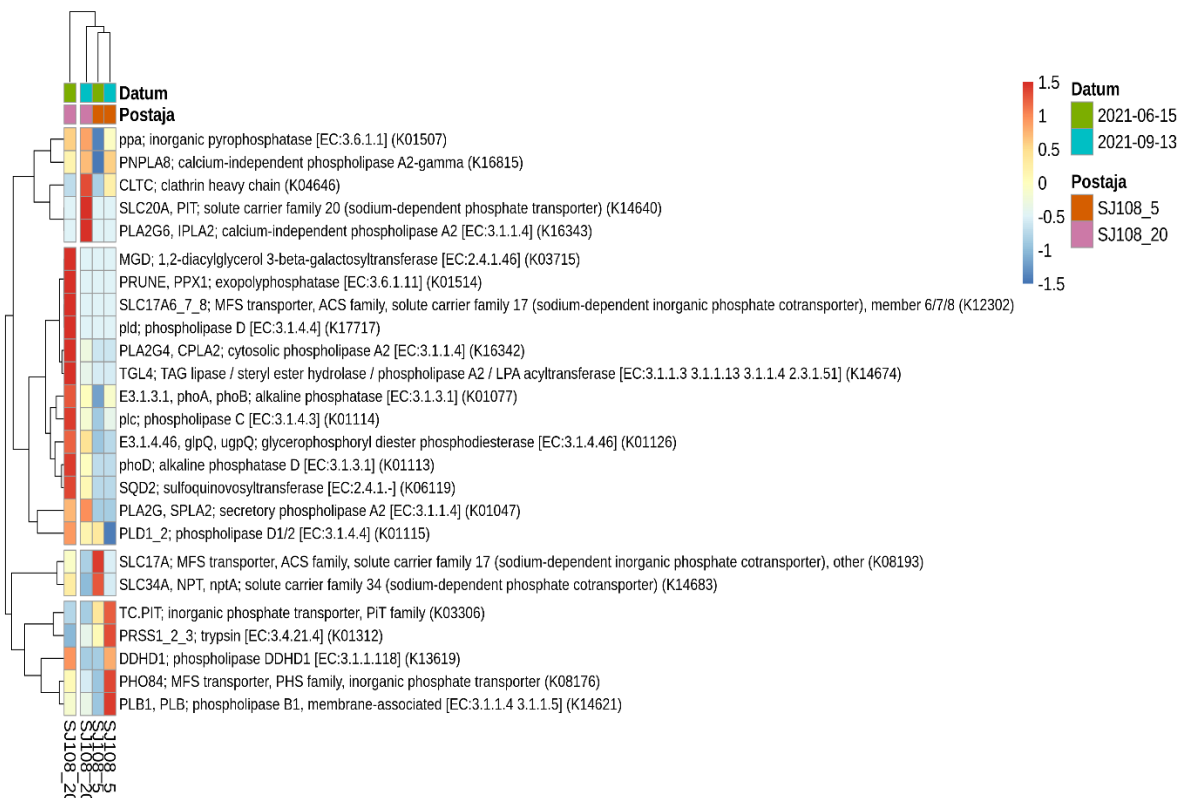
Slika 54 Relativni udjeli rodova grupe Cryptophyta identificirani na postajama Po transektu u lipnju i rujnu. Pritom x-os predstavlja postaje na kojima je uzet vertikalni potez fitoplanktonskom mrežom (RV001, SJ101, SJ107 i SJ108) i postaje i dubinu na kojoj je uzorak uzet Niskinovim crpcem (SJ108_5 i SJ108_20; y-os predstavlja zbroj TPM vrijednosti normaliziranih unutar grupe Cryptophyta. Oznaka "NA" odnosi se na proteinske sljedove unutar grupe Cryptophyta koji nisu uspješno anotirani na razini roda. Na vrhu svakog stupca prikazan je broj rodova identificiranih u uzorku. Na vrhu svakog stupca naznačen je broj rodova identificiran u uzorku.

3.3.3. *Obrazac ekspresije metaboličkih puteva i odabranih gena*

U metatranskriptomima skupa podataka Po meta, identificirani su ključni geni za prilagodbu eukariotskog fitoplanktona na uvjete ograničenja fosforom. Među njima su bili geni povezani s akvizicijom anorganskog i organskog fosfora, tj. fosfatni transporteri iz SLC17 (K12300, K12302, K08193), SLC20 (K14640), SLC34A (K14683), PiT (K03306) te PHO84 (K08176) obitelji, alkalne fosfataze PhoA/B (K01077) i PhoD (K01113) tipa te fosfodiesteraza glpQ tipa (K01126). Također, identificirano je i nekoliko gena koji sudjeluju u hidrolizi PolyP-a; egzofosfataza PPX tipa (K01514) i endofosfataza (K06018) te geni koji sudjeluju u remodeliranju staničnih membrana; fosfolipaze A (K01047, K16342, K16343, K16815, K14674) B (K14621), C (K01114) i D (K13619, K01115, K17717) tipa, te sulfolipidna sintaza SQD2 (K06119) i monogalaktil-diacilglicerol sintaza MGD (K03715). Dodatno, identificiran je i gen za klatrin (K04646) koji sudjeluje u klatrinom-posredovanoj endocitozi, anorganska pirofosfataza (K01507) koja sudjeluje u pretpostavljenoj strategiji recikliranja pirofosfata te tripsin (K01312), pretpostavljeni regulator N-P homeostaze. Usporedbom ekspresije ovih ključnih gena među postajama Po transketa (RV001, SJ101, SJ107, SJ108), dva mjeseca uzorkovanja (lipanj i rujan) te dvije metode uzorkovanja (planktonska mreža i Niskinov crpac) opisani su obrasci koekspresije fitoplanktonskih grupa Dinoflagellata i Bacillariophyta (Slika 55, Slika 56, Slika 57 i Slika 58). Obrasci koekspresije identificiranih gena grupe Dinoflagellata u uzorcima prikupljenim planktonskom mrežom (Slika 55) pokazuju jasno razdvajanje na dva klastera, lipanjski i rujanski. U lipanjskom klasteru zabilježena je povišena razina ekspresija većeg broja gena (14) u odnosu na rujanski klaster (7) (Slika 55). U obrascima koekspresije u uzorcima prikupljenim Niskinovim crpcim, izdvojio se na postaji SJ108 metatranskriptom uzorkovan u lipnju na 20 metara dubine, gdje je identificiran najveći broj gena (13) s visokom razinom ekspresije (Slika 56).

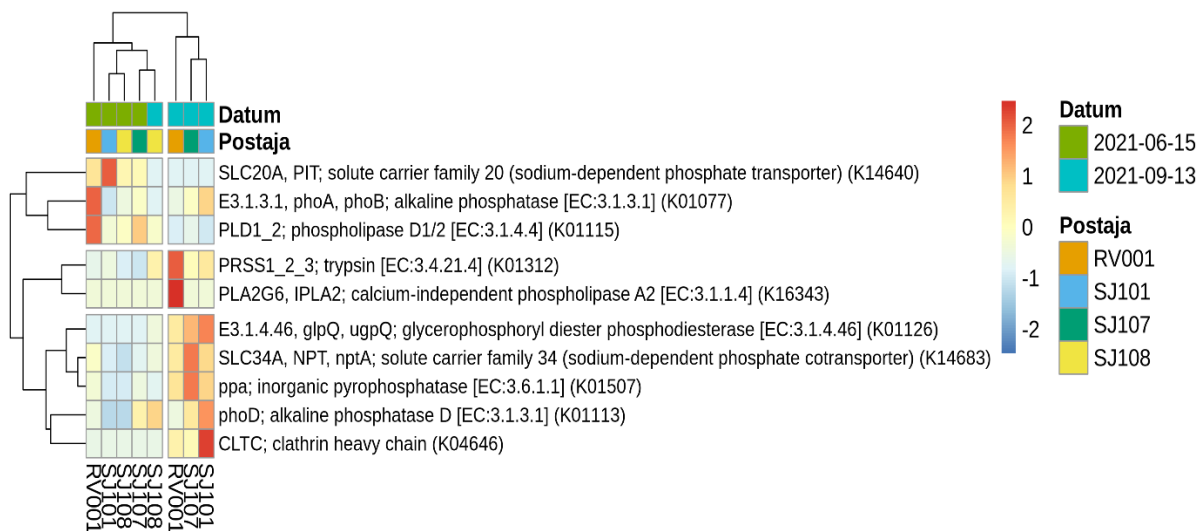


Slika 55 Obrasci koekspresije odabranih gena grupe Dinoflagellata identificirani u metatranskriptomima prikupljenim planktonskim mrežama. Oznake iznad stupaca prikazuju datum i postaju uzorkovanja. Redci prikazuju originalna imena gena iz KEGG baze, tj. ustaljenu skraćenicu; puno ime gena; kod enzima (ukoliko postoji) te KEGG.KO pristupni broj. Redci i stupci su hijerarhijski klasterirani temeljem euklidijskih udaljenosti.

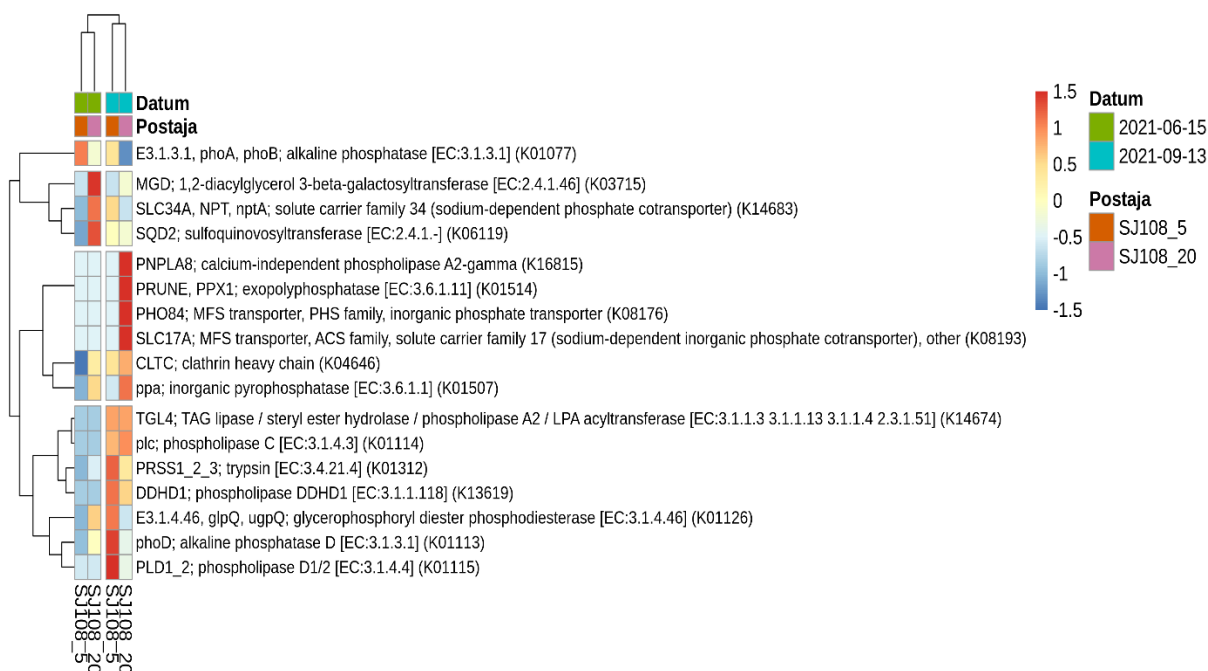


Slika 56 Obrasci koekspresije odabranih gena grupe *Dinoflagellata* identificirani u metatranskriptomima prikupljenim Niskinovim crpcima. Oznake iznad stupaca prikazuju datum i postaju uzorkovanja. Redci prikazuju originalna imena gena iz KEGG baze, tj. ustaljenu skraćenicu; puno ime gena; kod enzima (ukoliko postoji) te KEGG KO pristupni broj. Redci i stupci su hijerarhijski klasterirani temeljem euklidijskih udaljenosti.

Obrasci koekspresije identificiranih gena grupe Bacillariophyta u uzorcima prikupljenim planktonskom mrežom (Slika 57) također su pokazali razdvajanje u dva klastera: prvi uključuje rujanske metatranskriptome s postaja RV001, SJ107 i SJ101, dok drugi obuhvaća sve lipanjske metatranskriptome te rujanski metatranskriptom s postaje SJ108. Veći broj gena s povećanom ekspresijom identificiran je u prvom klasteru (7) (Slika 57). Obrasci koekspresije u uzorcima prikupljenim Niskinovim crpcima pokazuju razdvajanje metatranskriptoma prema mjesecu uzorkovanja, a najveći broj identificiranih gena s povišenom ekspresijom (10) pronađen je u rujanskom uzorku postaje SJ108 na 20 metara dubine (Slika 58).



Slika 57 Obrasci koekspresije odabranih gena grupe Bacillariophyta identificirani u metatranskriptomima prikupljenim planktonskim mrežama. Oznake iznad stupaca prikazuju datum i postaju uzorkovanja. Redci prikazuju originalna imena gena iz KEGG baze, tj. ustaljenu skraćenicu; puno ime gena; kod enzima (ukoliko postoji) te KEGG KO pristupni broj. Redci i stupci su hijerarhijski klasterirani temeljem euklidijskih udaljenosti.



Slika 58 Obrasci koekspresije odabranih gena grupe Bacillariophyta identificirani u metatranskriptomima prikupljenim Niskinovim crpcima. Oznake iznad stupaca prikazuju datum i postaju uzorkovanja. Redci prikazuju originalna imena gena iz KEGG baze, tj. ustaljenu skraćenicu; puno ime gena; kod enzima (ukoliko postoji) te KEGG KO pristupni broj. Redci i stupci su hijerarhijski klasterirani temeljem euklidijskih udaljenosti.

4. RASPRAVA

4.1. *Skup podataka SJ transkriptomi*

4.1.1. *Opće karakteristike skupa podataka SJ transkriptoma*

Sirovi podaci dobiveni u ovom istraživanju sastoje se od 519.136.526 kratkih nukleotidnih sljedova, sekvenciranih iz 12 uzoraka ukupne RNA, izoliranih iz šest vrsta dijatomeja, uzgojenih u dva *in vitro* uvjeta dostupnosti fosfora (F/2 i P-limit). Primijenjeni bioinformatički postupak rezultirao je konačnim skupom podataka od 12 transkriptoma, koji se sastoji od 106.274 proteinskih sljedova (u prosjeku 8.856 proteinskih sljedova po uzorku). Budući da monoklone kulture iz kojih su izolirani transkriptomi nisu bile aksenične, dodatno je nad proteinskim sljedovima primijenjen algoritam za predikciju taksonomske pripadnosti. Rezultati taksonomske anotacije bili su dosljedni među svim uzorcima. Ukupno je 77–84% funkcionalno anotiranih proteinskih sljedova dodijeljeno taksonomskoj razini Bacillariophyta, tj. dijatomejama. U prosjeku, 16% dodijeljeno je razini Eukaryota, 4% razini Bacteria, dok je manje od 1% pripisano arhejama i virusima. Ovi rezultati ukazuju na potrebu za taksonomskim filtriranjem transkriptoma, osobito kada se transkriptomi koriste kao referenca za taksonomsku anotaciju metatranskriptoma. Međutim, važno je naglasiti da i proteini dodijeljeni razini Eukaryota možda pripadaju dijatomejama, ali zbog trenutne opširnosti same referentne baze nisu mogli s visokom pouzdanošću biti anotirani na nižoj taksonomskoj razini.

Jedan od ciljeva analize konačnog skupa podataka SJ transkriptoma bio je istražiti koja od korištenih baza podataka: eggNOG, KEGG ili GO, pruža za istraživani skup podataka najviše funkcionalnih informacija i najvišu razinu anotacijske uspješnosti. EggNOG alat korišten je za dodjelu funkcionalne anotacije predviđenim proteinskim sljedovima. Funkcionalno je anotirano ukupno 97.271 proteinskih sljedova, što čini 91,5% konačnog skupa podataka. Od toga je 78% proteinskih sljedova dobilo barem jednu anotaciju iz korištenih baza (eggNOG opis, KEGG KO ili GO), dok je 22% pripalo proteinima nepoznate funkcije koji su prethodno identificirani u sekvencioniranim genomima. Najveći broj, tj. 77% anotiranih proteinskih sljedova pridružen je eggNOG opisu, dok su KEGG.KO i GO anotacije dodijeljene za 49% odnosno 33% proteinskih sljedova. Ovakva raspodjela u skladu je s očekivanjima s obzirom na to da je eggNOG baza

podataka (verzija 5.0) najobuhvatnija, s 4,4 milijuna ortolognih grupa (OG) raspoređenih kroz 379 taksonomskih razina (Huerta-Cepas i sur., 2019). Međutim, važno je naglasiti kako se izbor baze podataka ne bi trebao temeljiti isključivo na broju dodijeljenih anotacija, već i na postavljenom biološkom pitanju, budući da svaka od navedenih baza različito kategorizira proteine (vidi poglavlje 1.4.4.). Većina funkcionalno anotiranih sljedova sadržavala je anotacije iz više baza, što ukazuje na značajno preklapanje u vrsti sadržanih funkcionalnih informacija između baza podataka. Međutim, višestruke anotacije za jedan transkript/protein rezultat su i dužine samog transkripta/proteina te funkcionalne informacije koju sadrži, a koja je za veliku većinu transkripta/proteina (osobito onih dužih) povezana sa većim brojem raznovrsnih staničnih funkcija unutar često i različitih staničnih odjeljaka. Na ovaj način, iako bi korištenje i odabir samo jedne jedinstvene anotacije po proteinu bilo jednostavnije u kontekstu istraživanja općeg fiziološkog odgovora, uvođenje višestrukih anotacija može pružiti veću razlučivost svih funkcionalnih uloga transkripta/proteina.

Za provjeru uspješnosti anotacija kao i usporedbu svih funkcionalnih i taksonomskih karakteristika skupa podataka SJ transkriptoma a time i uspostavljene referentne baze transkriptoma sjevernog Jadrana, poslužila je javno dostupna i vrlo opsežna baza podataka transkriptoma MMETSP (Keeling i sur., 2014). Ova baza obuhvaća 194 transkriptoma izoliranih iz 71 vrste dijatomeja, prikupljenih s različitih lokacija svjetskih oceana i uzgajanih u različitim uvjetima rasta (GenBank BioProject PRJNA231566). Unutar roda *Chaetoceros* dostupni su transkriptomi za 8 različitih vrsta, dok su za rodove *Pseudo-nitzschia*, *Skeletonema* i *Thalassiosira* dostupni transkriptomi 6 vrsta. U usporedbi s MMETSP, skup podataka SJ transkriptoma pridonio je javnoj dostupnosti u referentnim bazama još tri nove dijatomejske vrste: *Chaetoceros protuberans*, *Chaetoceros danicus* i *Pseudo-nitzschia mannii*. Osim toga, transkriptomi P-limit uvjeta rasta čine SJ referentni skup značajnim doprinosom istraživanjima dijatomeja u kontekstu metabolizma hranjivih tvari, budući da su transkriptomi koji simuliraju uvjete ograničenja fosfata u MMETSP bazi rijetki za uobičajene rodove sjevernog Jadrana obuhvaćene u SJ referentnom skupu. Svakako je značajna i činjenica da je skup podataka SJ transkriptoma prvi skup transkriptoma dijatomeja izoliranih iz Jadranskog mora uzgojenih u okolišno relevantnim uvjetima za to područje (Grilli i sur., 2020; Ivančić i sur., 2016, 2021; Kužat i sur., 2022; Smodlaka Tanković i sur., 2018).

Analizirano za svaku vrstu, MMETSP i skup podataka SJ transkriptoma potvrdili su sličnosti u broju sklopljenih transkripata, broju predviđenih proteina te broju funkcionalno anotiranih proteina. Analizirano među vrstama, pokazalo se da prosječan broj predviđenih proteinskih sljedova više varira ovisno o vrsti, nego o uvjetu rasta. Tako je broj predviđenih proteina bio za red veličine veći kod vrste *Skeletonema marinoi* u odnosu na *Chaetoceros curvisetus* u MMETSP i SJ skupu podataka.

U oba skupa podataka transkriptomi *S. marinoi* MMETSP0920 i *C. curvisetus* CIM950 P-limit imali su znatno manji broj predviđenih proteinskih sljedova (444 za *S. marinoi* i 954 za *C. curvisetus*) u odnosu na ostale analizirane transkriptome pripadajućeg skupa podataka iako je ukupan broj sklopljenih transkripata u tim uzorcima bio velik (33.291 za *S. marinoi* i 70.298 za *C. curvisetus*). Međutim, za oba uzorka karakteristična je bila i kraća prosječna duljina transkripata (606 nukleotida za *S. marinoi* i 350 za *C. curvisetus*) što je moglo utjecati i na manji broj predviđenih proteinskih sljedova kako je naglašeno i u uputama za korištenje informatičkog alata Transdecoder (<https://github.com/TransDecoder/TransDecoder/wiki>). Razlike u duljini transkripata i ukupnom broju transkripata među uzorcima različitih vrsta mogu biti rezultat varijacija u kvaliteti samih uzoraka koje nastaju tijekom metodoloških koraka (izolacija RNA, priprema knjižnica i sekvenciranje) pripreme transkriptoma (Conesa i sur., 2016; Gallego Romero i sur., 2014; Oshlack i Wakefield, 2009). Međutim, trenutno nedostaju studije koje bi jasno definirale kriterije visoke kvalitete referentne baze transkriptoma. Zato bi za cjelovitu procjenu kvalitete referentne baze podataka bila potrebna sveobuhvatna studija koja bi uključila i vrednovala sve provedene metodološke korake i zadane parametre u pripremi i obradi transkriptoma.

Kako je istaknuto u popratnim podacima MMETSP skupa dostupnima u ENA arhivu (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJNA231566>), iako su brojni istraživači nastojali osigurati aksenične i monoklone RNA ekstrakte za potrebe sekvenciranja, za veći broj transkriptoma taj uvjet nije ostvaren. Kako ni SJ transkriptomi nisu generirani iz akseničnih kultura, za oba je skupa podataka tijekom bioinformatičke obrade proveden korak predviđanja taksonomske pripadnosti transkripata te su utvrđeni slični rezultati taksonomske anotacije. U MMETSP transkriptomima udio proteina dodijeljenih najboljoj taksonomskoj razini *Bacillariophyta* iznosio je 76–85%, dok je u SJ transkriptomima taj udio iznosio između 77 i 85%, što upućuje da je i za parametar taksonomske anotacije kvaliteta SJ transkriptoma u skladu s onom transkriptoma MMETSP referentne baze. Osim kod akseničnih kultura, rezultati obrade

transkriptoma upućuju da je taksonomsko filtriranje referentnih transkriptoma potrebno provesti i u slučajevima kada se primijenjeni uvjeti rasta mogu negativno odraziti na rast dijatomeja i/ili njihovu transkripcijsku aktivnost. To se dodatno potvrđuje transkriptom MMETSP0719 koji je prethodno bio tretiran nokodazolom, poznatim inhibitorom mikrotubula. U ovom je uzorku utvrđen najmanji udio proteinskih sljedova dijatomeja, svega 22%, dok je najveći udio proteinskih sljedova bio je dodijeljen arhejama, što upućuje na to da je nokodazol mogao negativno utjecati na rast i metaboličku aktivnost dijatomeja, a time i na karakteristike izrađenog transkriptoma.

Konačno, provedene analize potvrđuju da skup podataka SJ transkriptoma ne pokazuje uočljiva odstupanja u odnosu na MMETSP transkriptome, koji čine najveću do sad generiranu jedinstvenu bazu podataka transkriptoma. Ovi rezultati upućuju na to da je i skup podataka SJ transkriptoma moguće uspješno koristiti kao referentnu bazu u taksonomskoj anotaciji metatranskriptoma.

4.1.2. Metabolički obrasci

Skup podataka SJ transkriptoma pružio je zanimljive nove uvide u molekularne mehanizme fiziološkog odgovora istraživanih dijatomejskih vrsta na ograničenje fosforom. Ordinacijske analize na temelju funkcionalnog sastava transkriptoma pokazale su značajniju grupaciju uzoraka na temelju pripadnosti vrsti nego eksperimentalnom uvjetu (F/2 ili P-limit). Ovaj rezultat ukazuje na razlike u metaboličkim potencijalima istraživanih vrsta. Vrste iz roda *Chaetoceros* te vrsta *Pseudo-nitzschia manni* pokazale su slične molekularne obrasce u analiziranim KEGG metaboličkim putovima pri čemu između F/2 i P-limit uvjeta, za gotovo sve metaboličke putove, nisu identificirane razlike u ekspresiji. Ovakav rezultat upućuje da istraživane vrste roda *Chaetoceros* i vrsta *Pseudo-nitzschia manni* aktiviraju slične mehanizme u uvjetima ograničenja fosfora te na taj način zauzimaju sličnu ekološku nišu u sjevernom Jadranu gdje je ograničenje fosforom jedan od najznačajnijih ekoloških parametara. Praćenje sastava i brojnosti fitoplanktona u sjevernom Jadranu metodom svjetlosne mikroskopije pokazalo je da ove vrste roda *Chaetoceros* i vrsta *Pseudo-nitzschia manni* često dosežu visoke abundancije istovremeno, osobito tijekom jesenske cvatnje dijatomeja (Godrijan i sur., 2013; Marić i sur., 2012; Neri i sur., 2022). Svakako su potrebna daljnja istraživanja metodom transkriptomike koja bi obuhvatila veći broj kultura ovih vrsta kako bi se potvrdile njihove sličnosti u fiziološkom odgovoru na limitaciju fosforom.

Iako kod vrsta roda *Chaetoceros* većinom nisu zabilježene razlike ekspresijskih obrazaca između dva uvjeta rasta, detektirana je povećana ekspresija metaboličkog puta fotosinteze u transkriptomu vrste *C. danicus* iz P-limit uvjeta u odnosu na F/2 uvjet. Pojedine studije temeljene na transkriptomici pokazale su da se ekspresija fotosinteze kod dijatomeja u uvjetima P-limit smanjuje (Alipanah i sur., 2018; Cruz de Carvalho i sur., 2016; Harke i sur., 2017). Međutim, Shih i sur. (2015) u eksperimentima ograničenja fosforom kod vrste *Chaetoceros affinis* utvrđuju povećanu ekspresiju gena koji sudjeluju u reakcijama fotosinteze na svjetlu, a ti geni bili su posebice oni uključeni u poboljšano vezanje pigmenata i fotokemijsku učinkovitost. Međutim, izmjerene vrijednosti Fv/Fm (omjera maksimalne kvantne učinkovitosti fotosustava II) ukazivale su na to da fotosintetska aktivnost nije porasla. Do sličnih rezultata došli su i Yang i sur. (2014) u eksperimentu limitacije fosforom dijatomeje *Phaeodactylum tricornutum*. Autori sugeriraju da zbog ograničenja fosforom dolazi do pojačanog stvaranja elektrona i protona u kloroplastima, što uzrokuje na oksidativni stres. Stanice tada aktiviraju pojačanu ekspresiju gena koji predstavljaju kompenzacijsku strategiju disipacije viška energije u obliku topline kako bi se spriječila oštećenja fotosustava uzrokovana energetske viškom. Povećana ekspresija tih gena u transkriptomima identificira se kao povećanje fotosintetske aktivnosti iako se efektivno fotosintetska učinkovitost ne mijenja. Dobiveni rezultati ekspresije fotosintetske aktivnosti kod vrste *C. danicus* pokazuju da bi i ova vrsta mogla koristiti opisanu strategiju. Potrebna su dodatna istraživanja koja bi uključivala metode mjerenja fotosintetske učinkovitosti kako bi se ova pretpostavka sa sigurnošću utvrdila.

Transkriptomi vrsta *Skeletonema* i *Thalassiosira* činili su zasebnu grupu u ordinacijskim analizama, a imali su i izraženije promjene između ekspresijskih obrazaca metaboličkih puteva u F/2 i P-limit uvjetima. Kod vrste *S. marinoi* u P-limit uvjetu zabilježena je smanjena ekspresija puteva staničnog disanja i fotosintetskih reakcija, a suprotan obrazac zabilježen je kod vrste *Thalassiosira* sp., gdje su navedeni putovi pokazali višu razinu ekspresije u P-limit uvjetu. Ranija istraživanja transkriptoma vrsta *Thalassiosira pseudonana* (Dyhrman i sur., 2012) i *Skeletonema costatum* (S. F. Zhang i sur., 2016) uzgojenih u uvjetima ograničenja fosforom pokazala su da su obje vrste molekularno vrlo dobro prilagođene za preživljavanje u uvjetima nedostatka fosfora te da primjenjuju niz strategija, od promjena u ekspresiji fosfatnih transportera i različitih diesteraza za iskorištavanje DOP-a, preko remodeliranja membrana, do korištenja zaliha PolyP-a, kao odgovor na stresne uvjete nedostatka fosfora. Kod vrste *S. grevillei* potvrđena je uspješna prilagodba na uvjete promjenjive dostupnosti fosfora aktiviranjem enzima alkalne fosfataze

(Kužat, 2021). Osim toga, transkriptom *Skeletonema marinoi* SJ skupa podataka je u uvjetima ograničenja fosfora (P-limit) pokazao najvišu ekspresiju transportera anorganskog fosfata SLC34A u usporedbi s ostalim vrstama, što upućuje na to da ova vrsta posjeduje razvijen molekularni mehanizam unosa anorganskog fosfata te time uspješno konkurira drugim vrstama za dostupni anorganski fosfor i potencijalni razvoj fitoplanktonske cvatnje. Za potpuno objašnjenje složenog fiziološkog odgovora *S. marinoi* i *Thalassiosira* sp. na uvjete ograničenja fosforom potrebna su daljnja istraživanja koja bi uključivala mjerenje dodatnih parametara tijekom *in vitro* eksperimenta poput krivulje rasta i fotosintetske aktivnosti, pri čemu bi transkriptomi trebali biti uzorkovani u svakoj fazi rasta (lag, eksponencijska i stacionarna).

Ekspresija gena uključenih u metabolizam fosfora pokazala je da je dominantan odgovor analiziranih vrsta na ograničenje fosforom bila upravo pojačana ekspresija transportera anorganskog fosfata SLC34A. Ovaj gen pokazivao je povišene razine ekspresije u svim transkriptomima SJ skupa podataka iz P-limit uvjeta. Ovaj je molekularni mehanizam detektiran i u mnogim dosad dostupnim transkriptomskim studijama odgovora dijatomeja na uvjete ograničenja fosfora (Alipanah i sur., 2018; Cruz de Carvalho i sur., 2016; Dyhrman i sur., 2012; Yang i sur., 2014; S. F. Zhang i sur., 2016). Dyhrman i sur. (2012) ističu kako je aktivacija transportera visokog afiniteta ili povećanje njihova broja važan molekularni mehanizam fiziološkog odgovora na nedostatak fosfora.

Nukleotidni sljedovi gena za alkalnu fosfatazu vrlo su varijabilni među različitim mikroorganizmima (S. Lin i sur., 2016; X. Lin i sur., 2012a) pa anotacija gena na temelju KEGG baze vjerojatno pruža ograničenu razinu rezolucije kada je riječ o identifikaciji alkalnih fosfataza u eukariotskom fitoplanktonu. PhoA/B i PhoD sljedovi koji se nalaze u KEGG bazi korištenoj za anotaciju transkripata SJ skupa vjerojatno ne odgovaraju u potpunosti nukleotidnim sljedovima alkalnih fosfataza u SJ transkriptomima te zato geni za alkalne fosfataze nisu bili uspješno detektirani primijenjenim bioinformatičkim protokolom. Primjenom bioinformatičkih protokola koji bi koristili veći referentni skup za alkalne fosfataze trebala bi se povećati uspješnost njihove detekcije u transkriptomima. S obzirom da su najveće vrijednosti aktivnosti alkalne fosfataze izmjerene upravo u sjevernom Jadranu (Su i sur., 2023), može se očekivati da se u skupu podataka SJ transkriptoma kriju sekvence još neokarakteriziranih nukleotidnih sljedova za alkalne fosfataze.

SJ skup podataka omogućio je kod vrste roda *Chaetoceros* detekciju povećane ekspresije klatrina, ključnog gena za klatrinom posredovanu endocitozu, koja je prethodno predložena kao

jedan od mogućih mehanizama akvizicije organskog fosfora u obliku fosfonata kod vrste *Phaeodactylum tricornutum* (Shu i sur., 2022). Ovaj važan rezultat upućuje na to da i vrste roda *Chaetoceros* posjeduju molekularne kapacitete za korištenje ove strategije u fiziološkom odgovoru na dostupnost fosfora. Za potvrdu ove hipoteze potrebno je u budućnosti detaljno rekonstruirati pretpostavljeni metabolički put klatrinom-posredovane endocitoze kod dijatomeja.

4.2. Skup podataka LTRV meta

4.2.1. Godišnja sukcesija fitoplanktona

Dijatomeje se smatraju najvažnijim doprinositeljima ukupnoj brojnosti fitoplanktona u sjevernom Jadranu tijekom većeg dijela godine, dok se brojnost dinoflagelata i njihov doprinos u ukupnoj brojnosti fitoplanktona sjevernog Jadrana najčešće značajnije povećava samo tijekom ljeta (Aubry i sur., 2004, 2012; Godrijan i sur., 2013; Marić i sur., 2012). Međutim, posljednjih godina zabilježen je trend povećanog udjela dinoflagelata tijekom cijele godine u zajednici fitoplanktona sjevernog Jadrana (Vlašićek i sur., 2025). Skup podataka LTRV meta potvrdio je grupu Dinoflagellata kao metabolički najaktivniju fitoplanktonsku grupu na LTRV postajama (RV001 i RV004) sjevernog Jadrana tijekom jednogodišnjeg razdoblja uzorkovanja (2021./2022.). Promjene u relativnim udjelima fitoplanktonskih grupa i rodova u ukupnoj metaboličkoj aktivnosti zajednice utvrđene u ovom istraživanju relativno se dobro podudaraju s periodima pojavnosti te povećane brojnosti fitoplanktonskih skupina utvrđenim u dosadašnjim studijama klasičnim metodama mikroskopije (Aubry i sur., 2004, 2012; Cerino i sur., 2017, 2019.; Godrijan i sur., 2013; Marić i sur., 2012).

U proljeće 2021. godine zabilježeni su visoki udjeli roda *Noctiluca* u ukupnoj metaboličkoj aktivnosti fitoplanktonske zajednice kao što je ranije potvrđeno i primjenom metabarkodiranja za opis fitoplanktonske zajednice sjevernog Jadrana (Grižančić i sur., 2023).

U ljetnim mjesecima, nakon prestanka dominacije roda *Noctiluca*, zabilježen je porast metaboličke aktivnosti roda *Symbiodinium* koji je u ukupnom skupu LTRV podataka činio gotovo polovicu proteinskih sljedova grupe Dinoflagellata. Ovaj rod dosad nije bio zabilježen u istraživanjima sukcesije fitoplanktona sjevernog Jadrana temeljenima na svjetlosnoj mikroskopiji. Ipak, zabilježen je u nedavnom istraživanju temeljenom na metabarkodiranju (Grižančić i sur.,

2023). Vrste roda *Symbiodinium* poznate su kao slobodno živuće ili endosimbiontske koristeći za domaćina različite morske beskralješnjake (Huang i sur., 2013). Vrste roda *Symbiodinium* su identificirane i kao endosimbionti drugih protista, uključujući bentičke cilijate u koraljnim grebenima (Lobban i sur., 2002, 2005). Tek je 2016. godine prvi puta opisana pelagična endosimbioza između planktonskog cilijata i vrsta roda *Symbiodinium* u površinskim oceanskim vodama (Mordret i sur., 2016). Analiza raznolikosti slobodnoživućih i endosimbiontskih oblika u Južnokineskom moru temeljena na metabarkodiranju pokazala je visoku raznolikost slobodnoživućih vrsta te znatno manju raznolikost endosimbionata povezanih s koraljima (H. Huang i sur., 2013). Na temelju ovih rezultata H. Huang i sur. (2013) sugeriraju da je izmjena vrsta roda *Symbiodinium* između koralja i morskog okoliša u toj regiji ograničena. Istraživanja raznolikosti roda *Symbiodinium* nedostaju za područje Jadrana. Rezultati prezentirani u ovom radu upućuju na to da rod *Symbiodinium* ima važnu ulogu u ukupnoj metaboličkoj aktivnosti fitoplanktonske zajednice sjevernog Jadrana. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdilo jesu li ove vrste prisutne u obliku slobodnoživućih stanica, endosimbionata ili oboje.

Važno je istaknuti da čak i kada se proteinski sljedovi roda *Symbiodinium* isključe iz analiza, grupa Dinoflagellata i dalje ostaje metabolički najaktivnija grupa u promatranom razdoblju, što potvrđuje njezin dominantan udio u ukupnoj metaboličkoj aktivnosti fitoplanktonske zajednice. Ovakav obrazac taksonomske aktivnosti s dominacijom dinoflagelata učestalo je zabilježen u istraživanjima morskih mikrobnih eukariota u oligotrofnim oceanskim područjima temeljenim na metatranskriptomici (Cohen i sur., 2021; Hu i sur., 2018; Lampe i sur., 2018, 2019). U sjevernom Jadranu nedavna su istraživanja temeljena na metabarkodiranju, također ukazala na dominaciju ASV-ova dinoflagelata na pojedinim postajama tijekom cijele godine, a ne isključivo tijekom ljeta (Armeli Minicante i sur., 2019; Grižančić i sur., 2023). Isti je obrazac nedavno je zabilježen i u oligotrofnim vodama južnog Jadrana (Baričević i sur., 2024). Ipak, važno je istaknuti činjenicu da dinoflagelati posjeduju iznimno velike genome (Lin i sur. 2011), što može doprinijeti metodološkim pristranostima molekularnih (omics) metoda u procjenama funkcionalne i/ili taksonomske brojnosti ove skupine unutar ukupne fitoplanktonske zajednice. Zato je uz primjenu metatranskriptomike u budućnosti iznimno važna komplementarna upotreba klasičnih metoda mikroskopije u opisu fitoplanktonske zajednice.

U skupu LTRV su proljeće i ljeto bila razdoblja tijekom kojih je većina detektiranih rodova dinoflagelata pokazivala pojačanu metaboličku aktivnost u usporedbi s ostatkom godine, a takvi

rezultati u skladu su i s prethodnim studijama (Aubry i sur., 2004, 2012; Marić i sur., 2012; Neri i sur., 2022). Rod *Ceratium* pokazivao je visoku metaboličku aktivnost tijekom jeseni, a *Alexandrium* u zimskom periodu. Grupe Bacillariophyta i ostali Ochrophyta pokazivale su povišenu metaboličku aktivnost tijekom jeseni. Jesenska cvatnja dijatomeja obično uključuje više vrsta, ali često dominiraju rodovi *Pseudo-nitzschia* i *Chaetoceros* (Godrijan i sur., 2013; Marić i sur., 2012; Neri i sur., 2022). U LTRV skupu podataka tijekom jeseni je uočena povećana metabolička aktivnost roda *Pseudo-nitzschia* u odnosu na ostatak godine. U 2021. godini je proljetni cvat dijatomeja bio smanjenog intenziteta ili prekinut cvatom roda *Noctiluca*. Ipak, povećana aktivnost u travnju i svibnju uspješno je zabilježena za neke dijatomejske rodove (*Chaetoceros*, *Skeletonema*, *Thalassiosira* i *Leptocylindrus*), što upućuje na to da je proljetni cvat dijatomeja bio prisutan, ali ipak manje izražen zbog dominacije roda *Noctiluca*. Haptofiti su u literaturi najčešće zabilježeni kao najzastupljeniji tijekom zime, s dominantnom vrstom *Emiliana huxleyi* koja vrhunac brojnosti dostiže u veljači (Cerino i sur., 2017), što se također dobro podudara s predstavljanim rezultatima skupa LTRV. Visoke brojnosti haptofiti bilježe i u svibnju i lipnju kada često dominiraju vrste roda *Syracosphaera* (Cerino i sur., 2017). Za to razdoblje je u LTRV skupu podataka detektirana povećana aktivnost roda *Isochrysis*. Ovaj rod dosad nije zabilježen u Jadranskom moru (Godrijan i sur., 2023). Međutim, od haptofita koji jesu zabilježeni u Jadranu, jedino je vrsta *Emiliana huxleyi* obuhvaćena MMETSP bazom podataka koja je poslužila kao referentna baza u taksonomskoj anotaciji metatranskriptoma. Stoga je moguće da mnogi/svi proteinski sljedovi koji su taksonomski pripali rodu *Isocrysis* zapravo pripadaju drugim, rodu *Isocrysis* bliskim, vrstama haptofita sličnog metaboličkog profila.

Kriptofiti i klorofiti nisu proučavani u sjevernom Jadranu u jednakoj mjeri kao prethodno spomenute fitoplanktonske skupine te su potrebna dodatna istraživanja kako bi se utvrdili godišnji obrasci sukcesije na razini rodova s kojima bi se mogli usporediti podaci dobiveni metodom metatranskriptomike. Na taj način, opisani obrasci ekspresije ovih skupina pružaju prve detaljne opise godišnje pojavnosti i aktivnosti kriptofita i klorofita. Relativno visoki i stabilni udjeli u ukupnoj metaboličkoj aktivnosti fitoplanktonske zajednice bez izraženih vrhunaca bile su karakteristike godišnje fiziološke aktivnosti kriptofita i klorofita

U većini uzoraka LTRV skupa podataka, najveći broj proteinskih sljedova nije uspješno pridružen taksonomskoj razini nižoj od koljena što upućuje na nepotpunost referentne baze i

potrebu njenog redovitog proširivanja novim taksonomski drugačijim te funkcionalno raznolikim transkriptomima.

4.2.2. Ordinacijski obrasci fitoplanktonske zajednice

NMDS analiza cjelokupne fitoplanktonske zajednice LTRV skupa potvrdila je sezonske obrasce funkcionalne sukcesije. Proljetni uzorci formirali su jasno odvojenu grupu, pri čemu se samo jedan proljetni uzorak (RV004 travanj) odvajao. Ovakva ordinacija odražava zabilježenu funkcionalnu dominaciju roda *Noctiluca* u fitoplanktonskoj zajednici proljetnog razdoblja. Uzorci zime i jeseni također su pokazali jasno grupiranje s odvajanjem samo uzorka listopad RV004 od ostalih jesenskih uzoraka. U ovom uzorku zabilježen je vrhunac aktivnosti grupe Bacillariophyta, što ukazuje na prisutnost jesenske cvatnje dijatomeja i njezin specifičan metabolički otisak. Ljetni uzorci nisu formirali jasno odvojenu grupu, što upućuje na to da je metabolička aktivnost fitoplanktona tijekom tog razdoblja najviše varirala ovisno o postaji i/ili mjesecu uzorkovanja.

RDA modeli dali su različite rezultate za fitoplanktonske grupe. Najveći udio varijance objašnjene okolišnim parametrima zabilježen je za grupu Dinoflagellata, dok su za sve ostale grupe prve dvije RDA osi zajedno obuhvatile manje od 20 % varijance. Ovi rezultati upućuju na to da su okolišni čimbenici uključeni u analizu imali najsnažniji utjecaj na funkcionalni sastav grupe Dinoflagellata, dok su kod preostalih grupa veću ulogu imali drugi čimbenici koji nisu obuhvaćeni analizom. Ti čimbenici mogu uključivati okolišne čimbenike koji nisu bili mjereni ili biološke interakcije poput kompeticije između vrsta. Jedno od mogućih objašnjenja jest da je pritisak izazvan dominacijom grupe Dinoflagellata imao veći utjecaj na ostatak zajednice od samih abiotičkih okolišnih parametara. Ipak, većina uključenih okolišnih parametara, s izuzetkom ukupnog otopljenog dušika (DIN) pokazala se značajnim prediktorima. Ova tvrdnja dobro se uklapa u činjenicu da je sjeverni Jadran more ograničeno fosforom, dok su koncentracije dušika uglavnom dovoljne za rast fitoplanktona (Grilli i sur., 2020). To dodatno podupire i činjenica da je ukupni fosfor (Total P) bio vrlo značajan prediktor metaboličke aktivnosti svih grupa.

U prikazanim RDA modelima vektori koji predstavljaju ukupni otopljeni dušik (DIN), ukupni fosfor (Total P) i salinitet (Sal) usmjereni su u istom smjeru, podudarajući se sa zimskim uzorcima. Vektor koji predstavlja ortosilikat (SiO_4^-) usmjeren je suprotno, prema uzorcima iz kasnog ljeta, dok je vektor koji predstavlja temperaturu usmjeren prema ljetnim uzorcima.

Nasuprot tome, niti jedan okolišni parametar ne pokazuje snažnu orijentaciju prema proljetnim i jesenskim uzorcima, što sugerira da čimbenici koji oblikuju funkcionalni sastav fitoplanktonskih grupa tijekom tih sezona nisu obuhvaćeni odabranim parametrima. Neki drugi okolišni parametri koji nisu mjereni ili kompeticija između vrsta vjerojatno su imali važniju ulogu u oblikovanju funkcionalnog sastava zajednice tijekom tih razdoblja.

U skladu s time, proljetni uzorci bili su obilježeni metaboličkom dominacijom roda *Noctiluca*. Istraživanja cvatnji vrsta roda *Noctiluca* u sjevernom Atlantiku i Crnom moru pokazuju značajnu negativnu korelaciju između brojnosti stanica ovih vrsta i intenziteta vjetra, što upućuje na izravan utjecaj vjetra na dinamiku cvatnje (Mikaelyan i sur., 2014). Autori su sugerirali da su proljetne cvatnje ovih vrsta prvenstveno potaknute uvjetima vjetra. Nadalje, koncentracija ortosilikata (SiO_4^-) pokazala se kao najznačajniji prediktor za sve fitoplanktonske grupe, osim za grupe Bacillariophyta i ostale Ochrophyta, kao što bi bilo očekivano. Budući da se porast koncentracije ortosilikata (SiO_4^-) podudara s porastom metaboličke aktivnosti grupa Bacillariophyta i ostali Ochrophyta u jesen, ovaj rezultat ukazuje na to da je kompeticija s grupom Bacillariophyta i grupom ostali Ochrophyta mogla imati snažan utjecaj na širu strukturu fitoplanktonske zajednice.

4.2.3. Metabolički obrasci grupe *Dinoflagellata*

Kod grupe *Dinoflagellata* je jedinstven metabolički profil zabilježen u proljeće za vrijeme dominacije roda *Noctiluca*. Tijekom proljeća je u LTRV setu zabilježeno izraženo povećanje ekspresije metaboličkih puteva povezanih s osnovnim procesima stjecanja energije, uključujući glikolizu/glukogenezu (map00010), ciklus limunske kiseline (TCA ciklus) (map00020) te metabolizam piruvata (map00620). Pojačana ekspresija ovih puteva ukazuje na povećanu potražnju za proizvodnjom energije u tom razdoblju. Suprotno tome, put oksidativne fosforilacije (map00190) pokazivao je niže razine ekspresije tijekom proljeća. Budući da oksidativna fosforilacija ovisi o dostupnosti kisika, niže razine njezine ekspresije mogu ukazivati na ograničenje kisika tijekom cvjetanja roda *Noctiluca*, potencijalno uzrokovano intenzivnim heterotrofnim načinom ishrane. Povećana ekspresija metabolizma piruvata dodatno podupire hipotezu o metaboličkom pomaku prema anaerobnom stjecanju energije. Slobodnoživuće jednostanične alge prepoznate su kao jedni od najbolje opremljenih eukariotskih organizama u

kontekstu enzima koji sudjeluju u anaerobnom metabolizmu (Atteia i sur., 2013), a zajednice dinoflagellata uočene su u različitim anoksičnim morskim okolišima (Edgcomb i sur., 2002; Stoeck i sur., 2009) upućuju na postojanje metaboličke fleksibilnosti i sposobnosti prijelaza na anaerobne puteve kada koncentracija kisika nije dovoljna za održavanje aerobne respiracije. Ova strategija mogla bi biti osobito korisna za vrste koje tijekom cvjetanja ostvaruju visoke biomase i gustoće stanica, poput roda *Noctiluca*. U istom razdoblju zabilježena je i povišena ekspresija metaboličkog puta fiksacije ugljika Calvinovim ciklusom (tzv. reakcije fotosinteze u tami) (map00710), dok su fotosintetski putovi koji ovise o svjetlosti (uključujući fotosintezu (map00195) i ekspresiju antenskih proteina (map00196) pokazivali niže razine ekspresije u usporedbi s ostatkom godine. Povećanje ekspresije puteva uključenih u metabolizam ugljikohidrata kao što su metabolizam fruktoze i manoze (map00051), galaktoze te škroba i saharoze (map00500), sugerira da je fiksirani ugljik bio preusmjeren prema pohrani ugljikohidrata i alternativnim metaboličkim putovima umjesto da se neposredno koristi za proizvodnju energije putem reakcija fotosinteze ovisnih o svjetlu. Analiza procesa koji reguliraju encistaciju i ulazak u dormantno stanje kod dinoflagelata *Scrippsiella trochoidea*, temeljena na transcriptomici, pokazala je da putovi glikolize i TCA ciklusa ostaju aktivni i tijekom stanja mirovanja, iako su stope respiracije snižene, a fotosintetska aktivnost zaustavljena (Deng i sur., 2017). Sličan metabolički obrazac: visoka ekspresija puteva glikolize i TCA ciklusa u kombinaciji s niskom ekspresijom fotosintetskih puteva ovisnih o svjetlu opažen je i kod grupe Dinoflagellata tijekom proljeća, što može ukazivati na prisutnost ili formiranje dormantnih stadija (cista) u vodenom stupcu. U ljetnim mjesecima, nakon završetka cvjetanja roda *Noctiluca*, zabilježena je viša razina ekspresije metaboličkih puteva povezanih s reakcijama fotosinteze ovisnim o svjetlu te metaboličkog puta i pojedinačnih gena oksidativne fosforilacije, što ukazuje na prijelaz s anaerobnog na aerobni metabolizam kao i na povećanu primarnu produkciju.

Metabolički profil grupe Dinoflagellata ukazuje na upotrebu različitih trofičkih strategija tijekom godine. Metabolički putovi povezani s fagotrofijom, uključujući fagosom (map04145), lizozom (map04142) i peroksisom (map04146, imali su visoku razinu ekspresije tijekom proljeća, što je očekivano s obzirom na to da je *Noctiluca* fagotrofna vrsta (Fonda Umani i sur., 2004). Dominacija fagotrofije u proljeće dodatno je istaknuta povišenom ekspresijom nekoliko gena za proteaze kao što su katepsinske proteaze (K01365, K01363 i K01379) i cisteinsku endopeptidazu (K16292) te povišenom ekspresijom gena za kalretikulin (K08057). Navedeni proteini prethodno

su okarakterizirani kao važne komponente u stanicama protista koji se aktivno hrane heterotrofno (Gotthardt i sur., 2002; Labarre i sur., 2020). Međutim, neki metabolički putovi povezani s fagotrofijom ostali su visoko izraženi tijekom cijele godine, osobito putovi endocitoza (map04144) i regulacija aktinskog citoskeleta (map04810), zajedno s visokom ekspresijom gena za pojedine citoskeletne komponente, što podupire hipotezu o širokom spektru strategija preživljavanja fitoplanktona sjevernog Jadrana (Ivančić i sur., 2012, 2016). Geni povezani s aktinom, tubulinom i miozinom (K05699, K05692, K07375, K07374, K12749, K12757 i K10352) svrstani su među 60 gena s najvišim srednjim vrijednostima ekspresije, a najviše vrijednosti imali su u zimskom razdoblju. U istraživanjima miksotrofnih i heterotrofnih flagelata u uvjetima hranjenja, temeljenim na transkriptomici i metatranskriptomici, citoskeletne komponente pokazivale su povišenu ekspresiju pa autori sugeriraju da imaju važnu ulogu u procesu fagocitoze (Labarre i sur., 2020; McKie-Krisberg i sur., 2018). U nedavnom istraživanju zajednica dinoflagelata otvorenog oceana temeljenom na metatranskriptomici zabilježena je povišena ekspresija gena za katepsin, cisteinske peptidaze, kalretikulin te za komponente aktina i tubulina u mezopelagičkim zonama, dok su geni uključeni u fotosintezu imali snižene ekspresije pa su ih autori povezali s fagotrofnim načinom ishrane (Cohen i sur., 2021). Metabolički putovi koji uključuju fotosintetske reakcije ovisne o svjetlosti pokazali su višu razinu ekspresije krajem proljeća i ostali povišeni tijekom ljeta i jeseni, što ukazuje na povećanu primarnu produkciju u tom razdoblju. Značaj fotosinteze kao trofičke strategije kod dinoflagelata dodatno potvrđuje konstantno visoka ekspresija α -karbonske anhidraze. α -karbonska anhidraza prepoznata je kao važna komponenta mehanizma koncentriranja ugljika (engl. *Carbon concentrating mechanisms* - CCM) u morskom eukariotskom fitoplanktonu (Dimario i sur., 2018; Giordano i sur., 2005; Jensen i sur., 2019; Reinfelder, 2011), omogućujući održavanje fotosinteze čak i pri niskoj dostupnosti anorganskog ugljika. I fotosinteza i fagotrofija pojavljuju se kao važne trofičke strategije dinoflagelata, ali važno je istaknuti kako ih je grupa Dinoflagellata koristila u različitim razdobljima tijekom godine. Fagotrofija je dominirala u proljeće (osobito tijekom cvjetanja roda *Noctiluca*) te u zimskom razdoblju (kada je trajanje dnevne svjetlosti bilo kraće, a temperature niže), što ukazuje na prevladavanje sekundarne produkcije u tom razdoblju. Suprotno tome, fotosinteza je bila široko korištena tijekom ljeta i jeseni, u toplijim mjesecima s dužim trajanjem dnevne svjetlosti i višim temperaturama.

Uočena sezonska varijacija u metaboličkim putovima iz kategorije obrada genetskih informacija (engl. *Genetic Information Processing*) ukazuje na jasne promjene u metaboličkim

prioritetima grupe Dinoflagellata tijekom godine. Tijekom proljeća, pojačana ekspresija putova, osnovni transkripcijski faktori (map03022), replikacija DNA (map03030), RNA polimeraza (map03020) te razgradnja RNA (map03018) upućuje na povećanu transkripcijsku i translacijsku aktivnost, vjerojatno u svrhu poticanja brze proliferacije stanica i formiranja cvjetanja. Nasuprot tome, tijekom ljeta, jeseni i zime prevladava ekspresija putova prekrajanje RNA (map03040), ribosom (map03010), nukleocitoplazmatski transport (map03013), izvoz proteina (map03013) te procesiranje proteina u endoplazmatskom retikulumu (map04141). Ova promjena upućuje na pomak prema posttranskripcijskoj regulaciji, homeostazi proteina i staničnom održavanju. Ovakva tranzicija sugerira metaboličku prilagodbu na dugoročno preživljavanje i učinkovito iskorištavanje resursa izvan razdoblja cvjetanja. Ovu interpretaciju dodatno podupire opažanje da se metabolička aktivnost grupe Dinoflagellata smanjila nakon završetka cvjetanja roda *Noctiluca*, ali je kumulativna vrijednost ekspresija ostala relativno stabilna tijekom ostatka godine. Ukupno, ovi rezultati ukazuju na sezonski pomak u metaboličkim ulaganjima, pri čemu je proljeće obilježeno poticanjem brze ekspanzije populacije i sekundarne produkcije, dok je ostatak godine obilježen dominacijom staničnog održavanja i učinkovitim iskorištavanjem resursa, što je u skladu s promjenama u trofičkoj strategiji i uočenim okolišnim parametrima.

Sezonski obrasci metaboličkih puteva iz kategorije obrada informacija iz okoliša (engl. *Environmental Information Processing*) ukazuju na jasne promjene u trofičkoj strategiji, staničnoj funkciji i odgovoru na okolišne pritiske kod grupe Dinoflagellata. Proljeće je bilo obilježeno visokom ekspresijom aktivnošću četiriju metaboličkih puta iz ove kategorije. To su bili: ABC transporteri (map02010), MAPK signalni put kvasaca (map04011), fosfatilil-inozitol (map04070) te mTOR (map04150) signalnih puteva. Tijekom ranog ljeta i jeseni, visoka razina ekspresije zabilježena je za dvo-komponentni signalni sustav (map02020), MAPK signalni put (map04010) te MAPK signalni put biljka (map04016), dok su tijekom kasne jeseni i zime više razine ekspresije uočene za signalni put kalcija (map04020), cAMP-a (map04024) i cGMP-PKG-a (map04022) te gena za kalmodulin (K02183), koji sudjeluje u ovim putovima. Razlike u ekspresiji puteva za obradu informacija iz okoliša prate dinamičnu sezonsku upotrebu temeljnih puteva metabolizma energije, trofičkih strategija i mehanizama brze proliferacije tijekom razdoblja cvjetanja, nasuprot staničnom održavanju i učinkovitom iskorištavanju resursa u ostatku godine.

4.2.4. *Metabolički obrasci ostalih fitoplanktonskih grupa*

Za razliku od grupe Dinoflagellata, ostale detektirane fitoplanktonske skupine obilježilo je manje izraženo sezonsko razdvajanje metaboličkih otisaka. Kod njih se vrhunci ekspresije većine metaboličkih puteva javljaju u izoliranim uzorcima ili u više vremenski nepovezanih točaka, što otežava identificiranje jasnog sezonskog obrasca. Osim toga, u brojnim slučajevima više metaboličkih putova zajedno sudjeluje u jednom funkcionalnom procesu unutar stanice. Primjerice, glikoliza, TCA ciklus i oksidativna fosforilacija zajedno doprinose procesima staničnog disanja. Kada takvi komplementarni putovi nisu ekspresijski usklađeni ili grupirani, teško je razaznati koji je biološki proces u tom trenutku doista aktivan. Također, ostale fitoplanktonske skupine imale su znatno manji broj pripisanih proteinskih sljedova u uzorcima u odnosu na grupu Dinoflagellata zbog čega je razumno pretpostaviti da su bile nedovoljno obuhvaćene uzorkovanjem što je otežalo detaljnu rekonstrukciju njihovih metaboličkih obrazaca. Ipak, unatoč nižoj zastupljenosti u ukupnoj zajednici, rezultati metaboličke aktivnosti fitoplanktonskih grupa uz dinoflagelate opisuju molekularne strategije prilagodbe na okolišne uvjete.

4.2.4.1. *Obrada informacija iz okoliša*

Kod ostalih fitoplanktonskih grupa u LTRV skupu metabolički putovi iz kategorije obrada informacija iz okoliša istaknuli su se povećanom aktivnošću u različitim razdobljima tijekom godine. Međutim, kod svih fitoplanktonskih skupina gen za kalmodulin koji sudjeluje u signalnim putovima ovisnim o kalciju kao što su signalni put kalcija (ko04020), cAMP (ko04024) i cGMP-PKG signalni put (ko04022) bio je unutar 60 gena s najvećim srednjim vrijednostima ekspresije. Visoka ekspresija ovog gena u gotovo svim uzorcima i za sve skupine ukazuje na to da su kalcij-ovisni signalni putovi vjerojatno dominantni molekularni mehanizam praćenja signala iz okoliša. Novije studije temeljene na molekularnim metodama već su identificirale ovaj mehanizam kao važnu strategiju u obradi okolišnih podataka, podataka o koncentraciji nutrijenata kao što su P i N, međutim detaljni metabolički putovi i dalje ostaju nerazjašnjeni za eukariotski fitoplankton te su potrebna dodatna istraživanja (Helliwell, 2023; Murphy i sur., 2024). Kod grupe Bacillariophyta i dodatni geni ključni za putove obrade informacija iz okoliša identificirani su unutar 60 gena s najvećim srednjim vrijednostima ekspresije: inozitol-polifosfat multikinaza (K00915), kalcij-

ovisna proteinska kinaza (K13412), serin/treonin kinaza (K04372) i cGMP-ovisna proteinska kinaza 1 (K07376), što ukazuje na to da dijatomeje posjeduju složen i kontinuirano aktivan sustav za praćenje informacija iz okoliša. Ova opažanja podupiru tvrdnju da dijatomeje imaju sposobnost brzo detektirati promjene u dostupnosti nutrijenata, što im omogućuje da prve iskoriste takve pulseve nutrijenata za razvoj cvatnji (Armbrust, 2009; Helliwell, 2023). To je dodatno potvrđeno rezultatima ovog istraživanja gdje je tijekom ljetnih mjeseci, unatoč visokim temperaturama i smanjenim koncentracijama nutrijenata, zabilježena povećana ekspresija gena iz kategorije obrada informacija iz okoliša kod skupina Bacillariophyta i ostalih Ochrophyta. Kraj ljeta obilježen je porastom koncentracije nutrijenata, osobito ortosilikata, nakon čega je uslijedila povećana metabolička aktivnost ostalih Ochrophyta u kasno ljeto, a zatim i Bacillariophyta u ranu jesen, što je rezultiralo jesenskom cvatnjom.

4.2.4.2. *Trofičke strategije*

Eukariotski fitoplankton u različitim okolišnim uvjetima može koristiti različite trofičke strategije. Heterotrofni način ishrane, indukcijom fagotrofije, u prijašnjim je istraživanjima povezivan sa strategijama nadomještanja nedostatka nutrijenata iz okoliša (K. J. Flynn i sur., 2013; Hartmann i sur., 2012; Jeong i sur., 2010; Stoecker, 1999; Stoecker i sur., 2017). Fagotrofija je identificirana kod dinoflagelata (S. Lin i sur., 2016; Stoecker, 1999), haptofita (Avrahami i Frada, 2020; Koppelle i sur., 2022), kriptofita (Stoecker i sur., 2017) te klorofita (R. Anderson i sur., 2018; Bell i Laybourn-Parry, 2003), a nedavna istraživanja ukazuju na to da i određene vrste dijatomeja mogu primjenjivati ovu strategiju (Kumar i sur., 2024; Shu i sur., 2024; Villanova i Spetea, 2021). Zastupljenost miksotrofije kroz različita koljena morskih mikrobnih eukariota ukazuje na izrazitu važnost ove strategije u njihovoj ekologiji, međutim i dalje se nedovoljno zna o tome kako se ova strategija primjenjuje i koje su njezine ekološke implikacije (K. J. Flynn i sur., 2019; Stoecker i sur., 2017). U metaboličkim profilima fitoplanktonskih skupina vidljiva je aktivacija metaboličkih putova iz kategorije staničnih procesa koji ukazuju na fagotrofni način ishrane (lizosom (map04142), fagosom (map04145) i endocitoza (map04144)) kod svih promatranih grupa u različitim razdobljima kroz godinu. Također, kod većine grupa je unutar 60 gena s najvećim srednjim vrijednostima ekspresije pronađeni su ključni geni koji sudjeluju u različitim oblicima fagotrofnog načina ishrane poput karboksipeptidaza (K01298, K01290, K01291), katepsina

(K01363, K01363, K01365), kalretikulina (K08057) i sl. Iako su kod dijatomeja ovi geni identificirani, nisu imali visoke vrijednosti ekspresije. Dijatomeje su ujedno bile jedina skupina kod koje su najveće vrijednosti metaboličkih putova povezanih s fotosintezom (fotosinteza (K08057) i fotosinteza – antenski proteini (map00196)) zabilježene upravo u razdoblju kada je zabilježen i njihov najveći udio u ukupnoj metaboličkoj aktivnosti fitoplanktonske zajednice, odnosno tijekom jeseni. Ovaj rezultat govori da je autotrofija, tj. fotosinteza primarna trofička strategija koja podržava dijatomejski cvat, dok ostale proučavane fitoplanktonske skupine pokazuju veliki potencijal za fagotrofiju.

4.2.4.3. Odgovor na stres

Među genima s najvišim srednjim vrijednostima ekspresije identificirano je nekoliko povezanih s odgovorom na stres. Kod većine fitoplanktonskih grupa, među njima su bili geni koji kodiraju proteine HSP (proteine toplinskog šoka), molekularne čaperone koji sudjeluju u popravku oštećenih ili nepravilno savijenih proteina. Naziv "proteini toplinskog šoka" (engl. *Heat shock proteins*) dobili su jer su prvi put identificirani kao odgovor stanica na povišenu temperaturu, no danas je poznato da sudjeluju u odgovoru na različite stresne uvjete, poput jakog svjetla, nedostatka nutrijenata, zagađenja i sl. Kod fitoplanktona istraživanja su potvrdila da su HSP geni dobri indikatori rane faze stresnog odgovora kod dijatomeje *Skeletonema marinoi* (Lauritano i sur., 2015). U LTRV setu je kod dinoflagelata, klorofita i kriptofita povećana ekspresija HSP gena zabilježena u listopadu na postaji RV001. Dodatno, NMDS analiza metatranskriptoma u listopadu s postaje RV001 pokazuje jasno odvajanje od ostalih jesenskih uzoraka. Upravo u listopadu započinje porast metaboličkog udjela dijatomeja u zajednici, što ukazuje na to da je početak njihove jesenske cvatnje stvorio pritisak na ostale skupine. Ovi rezultati naglašavaju utjecaj interspecijske kompeticije u oblikovanju metaboličkog profila fitoplanktonske zajednice. Dodatno, povećana ekspresija ovih gena zabilježena je kod grupa Dinoflagellata, Bacillariophyta i Chlorophyta u ožujku na postaji RV004 kada je zabilježen najviši salinitet tijekom cijele godine, što upućuje na to da je nagla intruzija voda visokog saliniteta predstavljala značajan okolišni pritisak na navedene fitoplanktonske skupine.

Aktivacija gena koji sudjeluju u metabolizmu glutationa smatraju se važnim molekularnim mehanizmom odgovora na oksidativni stres kod fitoplanktona (Tamaki i sur., 2021). Dokazano je

da kod dijatomeje *S. marinoi* povećana ekspresija ovih gena služi kao dobar indikator kasne faze nutritivnog stresa (Lauritano i sur., 2015), a povećana ekspresija ovih gena uočena je i u transkriptomskim studijama odgovora dijatomeja na pritisak uzrokovan teškim metalima (A. Huang i sur., 2022) ili izloženosti domoičnoj kiselini (Cabrera i sur., 2023). Kod grupa Bacillariophyta, Chlorophyta i Cryptophyta ovi geni (glutation peroksidaza (K00432) i glutation S-transferaza (K00799)) bili su među genima s najvećim srednjim vrijednostima ekspresije. Dodatno, među genima s najvišim srednjim vrijednostima ekspresije kod grupa Bacillariophyta i Haptophyta pronađeni su geni za dvije serinske proteaze, tripsin (K01312) i kimotripsin (K01310). Iako su ovi proteini najpoznatiji kao probavni enzimi kod metazoa, njihova funkcija kod fitoplanktona predmet je najnovijih istraživanja. U studiji koja je uspoređivala metaboličke profile obalne cvatnje dijatomeja i dinoflagelata zabilježena je visoka ekspresija gena za tripsin tijekom formiranja dijatomejske cvatnje, što su autori povezali s ulogom tripsina u formiranju frustule (S. F. Zhang i sur., 2019). Međutim, suprotna istraživanja (You i sur., 2022) sugeriraju da tripsin u dijatomeji *Phaeodactylum tricornutum* djeluje kao koordinirani regulator N:P stehiometrijske homeostaze. Naime, u eksperimentalnom istraživanju utišavanja gena dokazano je da tripsin potiskuje preuzimanje dušika te se zato njegova ekspresija smanjuje u uvjetima nedostatka dušika. Suprotno tome, tripsin izravno potiče preuzimanje fosfata, a njegova se ekspresija povećava tijekom nedostatka fosfora. Iako su najnovija istraživanja kod eukariotskog fitoplanktona utvrdila veliku raznolikost gena za tripsin (You i sur., 2023), konkretni metabolički putovi u kojima tripsin sudjeluje i dalje nisu utvrđeni. Visoka ekspresija gena za tripsin u različitim dijelovima godine upućuje na to da bi aktivacija ovih gena mogla predstavljati važnu strategiju prilagodbe na okolišne pritiske u ekosustavu sjevernog Jadrana koji se odlikuje izraženim gradijentima koncentracije nutrijenata.

4.2.4.4. Akvizicija fosfora

Kod Haptophyta i Bacillariophyta u LTRV skupu među genima s najvišim srednjim vrijednostima ekspresije kroz godinu detektirana je ekspresija gena koji sudjeluju u metabolizmu fosfora i izravno su povezani sa strategijama prilagodbe na ograničenje fosforom. Kod grupe Bacillariophyta to je bio gen za transporter anorganskog fosfora tipa SLC20 (K14640) te fosfolipaza D (K01115), pri čemu su njihove najviše razine ekspresije zabilježene tijekom ljeta

kada su koncentracije anorganskog fosfora u vodenom stupcu bile gotovo iscrpljene. U skupini Haptophyta povećana ekspresija SLC34A transportera (K14683) anorganskog fosfora detektirana je u proljeće i ljeto. Ovi rezultati upućuju na to da dijatomeje potencijalno koriste remodeliranje membrana zamjenom fosfolipida alternativnim lipidima kao dominantnu strategiju recikliranja fosfora u uvjetima niske dostupnosti anorganskog fosfora. Dodatno, kontinuirano visoka ekspresija transportera anorganskog fosfora potencijalno čini ove dvije fitoplanktonske grupe glavnim kompetitorima za anorganski fosfor u ekosustavu sjevernog Jadrana.

4.3. *Skup podataka Po meta*

4.3.1. *Prostorno-vremenska karakterizacija metaboličkog obrasca fitoplanktonske zajednice*

U sukcesiji fitoplanktonske zajednice sjevernog Jadrana početak ljeta (lipanj-srpanj) je razdoblje kada se zajednica kojom dominiraju dijatomeje uglavnom mijenja u zajednicu kojom dominiraju dinoflagelati (Aubry i sur., 2004). Rujan ili listopad razdoblje je kada se događa suprotna promjena u zajednici, s početkom uzdizanja nutrijenata iz dubljih slojeva vodeni stupac se obogaćuje nutrijentima te u brojnosti dinoflagelate u zajednici zamijene dijatomeje (Aubry i sur., 2004). Zato su grupe Dinoflagelata i Bacilariophyta odabrane kao ciljane grupe u istraživanju molekularnih mehanizama fiziološkog odgovora na promjenjive uvjete dostupnosti fosfora na Po transektu gdje je moguće očekivati izraženije prostorno vremenske razlike fitoplanktonske zajednice nego na LTRV, a time i jasnije izraženu ranije opisanu izmjenu zajednice u razdoblju lipanj - rujan. Relativni udjeli u ukupnoj metaboličkoj aktivnosti cjelokupne zajednice Po transekta su, kao i u LTRV skupu, pokazali jasnu dominaciju grupe Dinoflagellata u svim uzorcima. Međutim, u rujnu povećao se relativni udio grupe Bacillariophyta u ukupnoj metaboličkoj aktivnosti zajednice.

4.3.1.1. *Grupa Dinoflagellata*

Obrasci koekspresije gena u skupini Dinoflagellata jasno pokazuju razdvajanje između lipanjskog i rujanskog klastera kod metatranskriptoma uzorkovanih planktonskim mrežama. U lipanjskom klasteru zabilježena je viša ekspresija većeg broja ciljanih gena u usporedbi s rujanskim, a prisutnost raznolikog seta gena upućuje i na primjenu raznolikih životnih strategija u lipanjskom razdoblju. Na svim postajama u lipnju zabilježena je povećana ekspresija alkalne fosfataze PhoD tipa (K01113) unatoč činjenici da omjer N:P u većem dijelu vodenog stupca nije ukazivao na ograničenje fosforom. Uz to, visoka ekspresija gena za glicerofosforil fosfodiesterazu (glpQ, K01126) dodatno upućuje na aktivnu akviziciju DOP-a. Iako su prethodna istraživanja pokazala da je aktivnost alkalne fosfataze prvenstveno inducirana niskim koncentracijama anorganskog fosfora, a ne visokim koncentracijama DOP-a (Dyhrman i Ruttenberg, 2006; Matsui i sur., 2024; Suzumura i sur., 2012), rezultati Po skupa ukazuju na to da dinoflagelati u sjevernom Jadranu aktivno koriste DOP čak i u uvjetima kada ne postoji teorijsko ograničenje fosforom, tj. N:P omjer nije veći od 16. Osim gena za alkalne fosfataze zabilježena je i povišena ekspresija dvaju transportera anorganskog fosfora, uključujući PHO84 (K08176), transporter visokog afiniteta. Uz mehanizme za akviziciju fosfora iz okoliša visoka ekspresija određeni gena također ukazuje na strategije recikliranja unutarstaničnih fosfatnih rezervi. Tako je u Po skupu podataka u visokoj ekspresiji detektirano pet gena za fosfolipaze tipa A (K01047, K16342 i K14674) i D (K17717 i K01115) i monogalaktosil diacilglicerol sintazu (MGD, K03715), a koji svi upućuju na aktivne procese remodeliranja staničnih membrana. Također, povećanu ekspresiju imali su i geni za egzofosfolipazu (PPX, K01514) i endofosfolipaze (PPN1, K06018), koji sudjeluju u hidrolizi PolyP-a, te gen za anorgansku pirofosfatazu (K01507), enzim uključen u recikliranje fosfora iz pirofosfata. U rujanskom klasteru zabilježena je povećana ekspresija drugačijeg seta gena, što se osobito ističe na postaji SJ108 gdje su zabilježene najviše vrijednosti ekspresije te visoki N:P omjeri. U rujnu je detektirana visoka ekspresija gena za alkalnu fosfatazu PhoA/B tipa (K01077), nekoliko gena za transportere anorganskog fosfora (K14640, K14683, K03306) te dodatno gen za tripsin (K01312). Kod fitoplanktona, tripsin je predložen kao regulator N:P homeostaze koji potiče unos anorganskog fosfora, a smanjuje unos dušika u uvjetima ograničenja fosforom (You i sur., 2022). Uz njih zabilježena je i povećana ekspresija fosfolipaze

B (K14621) koja ukazuje na aktivno remodeliranje staničnih membrana te gena za klatrin koji ukazuje na aktivaciju fagotrofije.

Kod metatranskriptomata iz uzoraka uzorkovanih Niskinovim crpcima posebno se ističe uzorak iz lipnja s postaje SJ108 (20 m) gdje je N:P omjer bio veći od 16, a istovremeno su zabilježene i visoke koncentracije DOP-a ($0,46 \mu\text{mol/L}$). U ovom uzorku uočena je povišena ekspresija čak 13 gena uključenih u različite strategije prilagodbe na ograničenje fosforom, od recikliranja unutarstaničnih rezervi (K03715, K01514, K17717, K16342, K14674, K01114, K06119, K01047, K0115) preko sva tri promatrana enzima za akviziciju DOP-a, PhoA/B (K01077), PhoD (K01113) i glpQ (K01126), do transportera anorganskog fosfora (K12302). Nasuprot tome, u rujanskom uzorku s postaje SJ108 (5 m) gdje je izmjeren najviši N:P omjer, ali znatno niže koncentracije DOP-a ($0,25 \mu\text{mol/L}$), zabilježena je povišena ekspresija manjeg broja gena. Ipak, obrazac ekspresije sličan je onome iz rujanskih uzoraka prikupljenih planktonskom mrežom, a karakteriziran je pojačanom ekspresijom alkalne fosfataze PhoA/B tipa (K01077), dvaju transportera anorganskog fosfora (K03306 i K08176), fosfolipaze B (K14621) i tripsina (K01312).

Ukupno, čini se da dinoflagelati pokazuju izražen metabolički odgovor na povećane koncentracije DOP-a, što bi moglo objasniti njihovu visoke abundancije tijekom ljeta kada u vodenom stupcu prevladavaju niske koncentracije nutrijenata, ali su koncentracije DOP-a povišene. Nasuprot tome, njihov odgovor na ograničenje anorganskim fosforom vjerojatno uključuje aktivaciju drugačijeg seta gena među kojima dominiraju alkalne fosfataze PhoA/B tipa, transporteri anorganskog fosfata, fosfolipaza B i tripsin.

4.3.1.2. *Grupa Bacillariophyta*

Obrasci koekspresije gena grupe Bacillariophyta pokazuju razdvajanje dva klastera. Prvi klaster činili su rujanski metatranskriptomi s postaja RV001, SJ107 i SJ101. Drugi klaster obuhvaća sve lipanjske metatranskriptome te rujanski metatranskriptom s postaje SJ108. Suprotno od grupe Dinoflagelata, veći broj gena koji pokazuju povećanu ekspresiju pronađen je u rujanskom klasteru kada su u vodenom stupcu N:P omjeri bili veći od 16, a koncentracija DOP-a je bila niža. U ovom klasteru zabilježena je povećana ekspresija alkalne fosfataze PhoD tipa (K01113), fosfodiesteraze (glpQ, K01126), transportera anorganskog fosfora (SLC34A, K14683) te gena za tripsin (K01312). Ovaj rezultat također podržava pretpostavljenu ulogu tripsina kao regulatora N:P

homeostaze. Dodatno, zabilježena je i povećana ekspresija fosfolipaze A tipa (K16343), anorganske pirofosfataze (K01507) te klatrina (K04646). Suprotno tome, u drugom klasteru zabilježene su povećane ekspresije manjeg broja gena: alkalne fosfataze PhoA/B tipa (K01077), SLC20A transportera anorganskog fosfora (K14640) te fosfolipaze D (K01115).

Kod metatranskriptoma dobivenih Niskinovim crpcima posebno se ističe rujanski metatranskriptom s postaje SJ108 (20 m) gdje je najveći broj gena imao povećanu ekspresiju. Koncentracija ortofosfata (PO_4^{3-}) na toj dubini iznosila je svega 0,02 $\mu\text{mol/L}$, međutim vrijednost N:P omjera ipak nije ukazivala na ograničenje fosforom. Također, u dubljim slojevima (30 m) tada je zabilježena najveća koncentracija ortofosfata (PO_4^{3-}) (0,3 $\mu\text{mol/L}$), što ukazuje na početak uzdizanja nutrijenata iz dubljih slojeva. Među visoko eksprimiranim genima ovdje se nije našao niti jedan gen koji sudjeluje u akviziciji DOP-a, međutim našla su se dva gena za transportere anorganskog fosfora, PHO84 (K08176) i SLC17A (K08193) te tripsin (K01312). Uz njih tu su bili i geni koji sudjeluju u remodeliranju staničnih membrana, tj. fosfolipaze A (K16815, K14674), C (K01114) i D (K13619), iskorištavanja rezervi PolyP-a, tj. egzopolifosfataza PPX (K01514) i anorganska pirofosfataza (K01517) te klatrin (K04646). Suprotno tome u oba lipanjska metatranskriptoma uzorkovana Niskinovim crpcima kada su bile prisutne više koncentracije DOP-a tj. 0,7 $\mu\text{mol/L}$ na 5 m i 0,4 $\mu\text{mol/L}$ na 20 m, manji broj gena pokazao je povećanu ekspresiju, i to ne na oba uzorka. To su geni za alkalnu fosfatazu PhoA/B tipa (K01077), transporter anorganskog fosfora SLC34A (K14683) te sulfolipidna sintaza SQD2 (K06119) i monogalaktil-sil-diacilglicerol sintaza MGD (K03715), što ukazuje na aktivnost strategija za akviziciju anorganskih i organskih oblika fosfora te remodeliranje staničnih membrana.

Rezultati koekspresije gena u grupi Bacillariophyta pokazuju manje jasan obrazac nego kod grupe Dinoflagellata. Međutim, prema broju visoko eksprimiranih gena uočljivo je da dijatomeje slabije reagiraju na visoke koncentracije DOP-a, a snažno reagiraju na pojačani unos anorganskog fosfora. Ovaj rezultat u skladu je s dosadašnjim istraživanjima (Alipanah i sur., 2018; Cruz de Carvalho i sur., 2016; Ivančić i sur., 2016; Kužat i sur., 2022; Smoldaka Tanković i sur., 2018; Yang i sur., 2014) koja ukazuju da dijatomeje koriste raznoliki spektar strategija za prilagodbu na nedostatak fosfora, ali najpovoljnije uvjete za rast ostvaruju kada dođe do naglog unosa nutrijenata u okoliš, što iskorištavaju za formiranje cvatnji (Armbrust, 2009; Helliwell, 2023; Marić Pfannkuchen i sur., 2018).

5. ZAKLJUČAK

U ovom istraživanju izrađena je prva referentna baza transkriptoma koja obuhvaća šest vrsta dijatomeja izoliranih iz sjevernog Jadrana i uzgojenih u okolišno relevantnim uvjetima. Detaljno je opisan postupak izrade baze, a dobiveni transkriptomi uspoređeni su s transkriptomima iz baze MMETSP. Izrađena baza transkriptoma sjevernog Jadrana pridonijela je javnoj dostupnosti u referentnim bazama još tri nove dijatomejske vrste: *Chaetoceros protuberans*, *Chaetoceros danicus* i *Pseudo-nitzschia mannii*. Izrađenu bazu moguće je koristiti u svrhu taksonomske anotacije transkripata ili proteinskih sljedova metatranskriptomapridruživanjem većim referentnim bazama kao što je MMETSP.

Na temelju izrađenih transkriptoma analizirana je genska ekspresija proučavanih vrsta u eksperimentalnim uvjetima različite dostupnosti fosfora. Ordinacijske analize funkcionalnog sastava transkriptoma pokazale su grupaciju uzoraka na temelju pripadnosti vrsti, dok je eksperimentalni uvjet imao ograničen i neznatjan utjecaj na ordinaciju uzoraka. Ovaj rezultat ukazao je na razlike u metaboličkim potencijalima istraživanih vrsta. Također, transkriptomi vrsta *S. marinoi* i *Thalassiosira* sp. činili su jednu grupu, a transkriptomi vrsta *C. curvisetus*, *C. danicus* i *P. mannii* drugu grupu prema osi NMDS2. Ekspresijski obrasci KEGG metaboličkih putova pokazali su manje razlike između uvjeta kod vrsta rodova *Chaetoceros* i vrste *P. mannii*. Suprotno tome, kod vrste *S. marinoi* zabilježena je smanjena ekspresija odabranih KEGG metaboličkih putova u P-limit uvjetu u odnosu na F/2, dok je kod vrste *Thalassiosira* sp. uočen suprotan obrazac. Literaturnim pregledom utvrđeni su geni ključni za prilagodbu na promjenjive uvjete dostupnosti fosfora. Kod vrsta roda *Chaetoceros* utvrđena je i povećana ekspresija gena za klatrin, a ovaj rezultat ukazuje na to da bi vrste ovog roda mogle primjenjivati strategiju akvizicije fosfora u obliku fosfonata u uvjetima ograničenja fosforom. Primijenjena funkcionalna analiza potvrdila je postojanje razlika u obrascima genske ekspresije proučavanih vrsta u uvjetima limitacije fosforom, što potvrđuje prvu postavljenu hipotezu. Međutim, uočene su i neke sličnosti između svih proučavanih vrsta, primjerice dominantni odgovor svih proučavanih vrsta na P-limit uvjet bio je aktivacija transportera anorganskog fosfora SLC34A.

Također, u ovom je istraživanju po prvi puta primijenjena metoda metatranskriptomike u analizi eukariotskog fitoplanktona sjevernog Jadrana. Opisan je prostorno vremenski obrazac genske ekspresije odabranih fitoplanktonskih skupina u skupovima podataka LTRV meta i Po

meta. Analiza godišnjih obrazaca taksonomske i funkcionalne sukcesije zajednica u skupu podataka LTRV meta otkrila je neočekivanu cjelogodišnju dominaciju metaboličke aktivnosti dinoflagelata. Vrhunci metaboličke aktivnosti ostalih proučavanih skupina odgovarali su tipičnoj sezonskoj sukcesiji kako je i ranije zabilježeno. Najizraženiji vrhunac metaboličke aktivnosti dinoflagelata zabilježen je u proljeće i rano ljeto. Također su zabilježena i dva vrhunca metaboličke aktivnosti haptofita u veljači i lipnju. Zabilježena je i jesenska cvatnja dijatomeja u kojoj su dominirale vrste roda *Pseudo-nitzschia*. No proljetna cvatnja dijatomeja nije zabilježena. Osim toga, metabolička aktivnost slabije istraženih skupina u sjevernom Jadranu, poput kriptofita i zelenih algi, pokazala je relativno visoke i stabilne doprinose ukupnoj metaboličkoj aktivnosti fitoplanktona kroz cijelu godinu, i to bez izraženih vrhunaca.

NMDS analize ordinacije pokazale su izražene sezonske promjene u funkcionalnom sastavu cjelokupne fitoplanktonske zajednice i pojedinih fitoplanktonskih grupa, dok je prostorna komponenta (postaja) imala manji utjecaj. RDA analize potvrdile su da su sezonske promjene prvenstveno potaknute okolišnim čimbenicima, osobito dostupnošću fosfora i silicija, kao i međuvrtnim interakcijama. Dobiveni rezultati podupiru drugu hipotezu, odnosno postojanje prostorno vremenske dinamike ukupne genske ekspresije zajednice, koja djelomično ovisi o ekološkim uvjetima, tj. okolišnim parametrima, a potencijalno i biološkim interakcijama, pri čemu je vremenska komponenta imala izraženiji utjecaj.

Uočene promjene u aktivaciji različitih metaboličkih putova te pojedinačnih gena koji upućuju na sezonsku promjenu u metaboličkim ulaganjima razlikovala se ovisno o taksonomskoj skupini. Kod dinoflagelata proljetni su uvjeti pogodovali brzom rastu populacije, dok je ostatak godine obilježen dominantnom transkripcijskom aktivnošću povezanoj s održavanjem staničnih funkcija i prilagodbenim odgovorima. Kod ostalih fitoplanktonskih skupina vrhunci ekspresije većine metaboličkih putova javljaju se u izoliranim uzorcima ili u više vremenski nepovezanih točaka, što je otežalo identificiranje jasnog sezonskog obrasca iako je on jasno uočljiv u ordinacijskim analizama. Ipak, unatoč nižoj zastupljenosti u ukupnoj zajednici, rezultati metaboličke aktivnosti fitoplanktonskih grupa uz dinoflagelate ukazuju na postojanje molekularnih strategija prilagodbe na okolišne uvjete i kompeticijske pritiske. Primjerice, kod svih fitoplanktonskih skupina gen za kalmodulin koji sudjeluje u signalnim putovima ovisnim o kalciju kao što su signalni put kalcija bio je unutar 60 gena s najvećim srednjim vrijednostima ekspresije. Visoka ekspresija ovog gena u gotovo svim uzorcima i za sve skupine ukazuje na to da su kalcij

ovisni signalni putovi vjerojatno dominantni molekularni mehanizam praćenja signala iz okoliša. Kontinuirano visoka ekspresija dodatnih gena koji sudjeluju u signalnim putovima kod dijatomeja ukazuje na postojanje složenog i kontinuirano aktivnog sustava za praćenje informacija iz okoliša. Prethodna istraživanja pokazala su da dijatomeje imaju sposobnost brzo prepoznati promjene u dostupnosti nutrijenata, a ova strategija omogućuje im da prve iskoriste iznenadne pulseve nutrijenata za razvoj cvatnji, što rezultati ovog istraživanja dodatno potvrđuju. Nadalje, obrasci ekspresije metaboličkih putova i pojedinačnih gena koji sudjeluju u heterotrofnom načinu ishrane (fagotrofiji) i fotosintezi ukazuju na to da je autotrofija, tj. fotosinteza primarna trofička strategija koja podržava dijatomejski cvat, dok ostale proučavane fitoplanktonske skupine pokazuju veliki potencijal za fagotrofiju. Nekoliko gena povezanih s odgovorom na stresne uvjete (geni HSP obitelji, geni koji sudjeluju u metabolizmu glutationa i tripsin) imali su visoke vrijednosti ekspresije kod proučavanih skupina u različitim ekološkim uvjetima. Iako je visoka ekspresija ovih gena prema dosadašnjim istraživanjima indikacija da se stanice nalaze u stresnim uvjetima, potrebna su daljnja istraživanja koja bi utvrdila na koji način ovi geni pomažu stanicama da se prilagode na stres. Ekspresija gena koji sudjeluju u metabolizmu fosfora također ukazuje na posjedovanje prilagodba na ograničenu dostupnost ovog nutrijenta kod nekih od promatranih skupina. Primjerice, kontinuirano visoka ekspresija gena za transportere anorganskog fosfora kod dijatomeja i haptofita mogla bi predstavljati mehanizam prilagodbe koji ovim skupinama daje prednost u kompeticiji za anorganski fosfor u sjevernom Jadranu. Analiza skupa podataka Po meta pokazala je da i dijatomeje i dinoflagelati koriste različite strategije za prilagodbu na ograničenje fosforom. Ipak, dinoflagelati su pokazali snažan metabolički odgovor na povišene koncentracije otopljenog organskog fosfora (DOP), što vjerojatno objašnjava njihovu visoku brojnost tijekom ljeta kada u vodenom stupcu prevladavaju niske koncentracije nutrijenata, ali su razine DOP-a povišene. Dijatomeje, s druge strane, pokazuju snažan metabolički odgovor na nagli unos nutrijenata, što iskorištavaju za formiranje cvatnji. Zaključno, utvrđeni obrasci ekspresije metaboličkih puteva i pojedinačnih gena potvrđuju treću hipotezu, tj. odražavaju ekološki značajne molekularne mehanizme koji eukariotskom fitoplanktonu omogućavaju prilagodbu na različite pritiske. Metatranskriptomi prirodnih zajednica ekosustava sjevernog Jadrana odražavaju složene molekularne odgovore fitoplanktonskih grupa na promjenjive okolišne uvjete, pružaju nove uvide u metabolizam slabije proučenih fitoplanktonskih taksona te ističu šire ekološke promjene koje se trenutno odvijaju u ekosustavu sjevernog Jadrana.

6. LITERATURA

- Achbergerová, L., i Nahálka, J. (2011). Polyphosphate-an ancient energy source and active metabolic regulator. *Microbial Cell Factories*, 10, 1–14.
- Aleksander, S. A., Balhoff, J., Carbon, S., Cherry, J. M., Drabkin, H. J., Ebert, D., Feuermann, M., Gaudet, P., Harris, N. L., Hill, D. P., Lee, R., Mi, H., Moxon, S., Mungall, C. J., Muruganugan, A., Mushayahama, T., Sternberg, P. W., Thomas, P. D., Van Auken, K., ... Westerfield, M. (2023). The Gene Ontology knowledgebase in 2023. *Genetics*, 224(1). <https://doi.org/10.1093/genetics/iyad031>
- Alexander, H., Rouco, M., Haley, S. T., Wilson, S. T., Karl, D. M., i Dyhrman, S. T. (2015). Functional group-specific traits drive phytoplankton dynamics in the oligotrophic ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(44), E5972–E5979. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518165112>
- Alipanah, L., Winge, P., Rohloff, J., Najafi, J., Brembu, T., i Bones, A. M. (2018). Molecular adaptations to phosphorus deprivation and comparison with nitrogen deprivation responses in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PLoS ONE*, 13(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193335>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., i Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Anderson, R., Charvet, S., i Hansen, P. J. (2018). Mixotrophy in Chlorophytes and Haptophytes—Effect of Irradiance, Macronutrient, Micronutrient and Vitamin Limitation. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01704>
- Armbrust, E. V. (2009). The life of diatoms in the world's oceans. *Nature*, 459(7244), 185–192. <https://doi.org/10.1038/nature08057>
- Armbrust, E. V., Berges, J. A., Bowler, C., Green, B. R., Martinez, D., Putnam, N. H., Zhou, S., Allen, A. E., Apt, K. E., i Bechner, M. (2004). The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science*, 306(5693), 79–86.
- Armeli Minicante, S., Piredda, R., Quero, G. M., Finotto, S., Bernardi Aubry, F., Bastianini, M., Pugnetti, A., i Zingone, A. (2019). Habitat Heterogeneity and Connectivity: Effects on the Planktonic Protist Community Structure at Two Adjacent Coastal Sites (the Lagoon and the Gulf of Venice, Northern Adriatic Sea, Italy) Revealed by Metabarcoding. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02736>
- Atteia, A., Van Lis, R., Tielens, A. G. M., i Martin, W. F. (2013). Anaerobic energy metabolism in unicellular photosynthetic eukaryotes. In *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* (Vol. 1827, Issue 2, pp. 210–223). <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.08.002>

- Aubry, F. B., Berton, A., Bastianini, M., Socal, G., i Acri, F. (2004). Phytoplankton succession in a coastal area of the NW Adriatic, over a 10-year sampling period (1990–1999). *Continental Shelf Research*, 24(1), 97–115. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.csr.2003.09.007>
- Aubry, F. B., Cossarini, G., Acri, F., Bastianini, M., Bianchi, F., Camatti, E., De Lazzari, A., Pugnetti, A., Solidoro, C., i Socal, G. (2012). Plankton communities in the northern Adriatic Sea: Patterns and changes over the last 30 years. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115, 125–137. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.03.011>
- Avrahami, Y., i Frada, M. J. (2020). Detection of Phagotrophy in the Marine Phytoplankton Group of the Coccolithophores (Calcihaptophycidae, Haptophyta) During Nutrient-replete and Phosphate-limited Growth. In *Journal of Phycology* (Vol. 56, Issue 4, pp. 1103–1108). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/jpy.12997>
- Baricevic, A., Kogovsek, T., Smoldaka Tankovic, M., Grizancic, L., Knjaz, M., Vlasicek, I., Podolsak, I., Kuzat, N., Pfannkuchen, M., i Maric Pfannkuchen, D. (2024). Coastal Eukaryotic Plankton Diversity of the Southern Adriatic as Revealed by Metabarcoding. *Diversity*, 16(5). <https://doi.org/10.3390/d16050293>
- Bell, E. M., i Laybourn-Parry, J. (2003). Mixotrophy in the antarctic phytoflagellate, *Pyramimonas gelidicola* (Chlorophyta: Prasinophyceae). *Journal of Phycology*, 39(4), 644–649. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2003.02152.x>
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Ostell, J., Pruitt, K. D., i Sayers, E. W. (2018). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 46(Database issue), D41.
- Berhe, A., Fristedt, U., i Persson, B. L. (1995). Expression and Purification of the High-affinity Phosphate Transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 227(1–2), 566–572. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb0426.x>
- Bertrand, E. M., McCrow, J. P., Moustafa, A., Zheng, H., McQuaid, J. B., Delmont, T. O., Post, A. F., Sipler, R. E., Spackeen, J. L., Xu, K., Bronk, D. A., Hutchins, D. A., Allen, A. E., i Karl, D. M. (2015). Phytoplankton-bacterial interactions mediate micronutrient colimitation at the coastal Antarctic sea ice edge. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(32), 9938–9943. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501615112>
- Beszteri, S., Yang, I., Jaekisch, N., Tillmann, U., Frickenhaus, S., Glöckner, G., Cembella, A., i John, U. (2012). Transcriptomic response of the toxic prymnesiophyte *Prymnesium parvum* (N. Carter) to phosphorus and nitrogen starvation. *Harmful Algae*, 18, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.03.003>
- Bolger, A. M., Lohse, M., i Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bowler, C., Allen, A. E., Badger, J. H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., Maheswari, U., Martens, C., Maumus, F., Otilar, R. P., Rayko, E., Salamov, A., Vandepoele, K., Beszteri, B., Gruber, A., Heijde, M., Katinka, M., Mock, T., Valentin, K., ... Grigoriev, I. V. (2008a).

- The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature*, 456(7219), 239–244. <https://doi.org/10.1038/nature07410>
- Bowler, C., Allen, A. E., Badger, J. H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., Maheswari, U., Martens, C., Maumus, F., Otiillar, R. P., Rayko, E., Salamov, A., Vandepoele, K., Beszteri, B., Gruber, A., Heijde, M., Katinka, M., Mock, T., Valentin, K., ... Grigoriev, I. v. (2008b). The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature*, 456(7219), 239–244. <https://doi.org/10.1038/nature07410>
- Buchfink, B., Reuter, K., i Drost, H. G. (2021). Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND. *Nature Methods*, 18(4), 366–368. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01101-x>
- Bun-ya, M., Nishimura, M., Harashima, S., i Oshima, Y. (1991). The PH084 Gene of *Saccharomyces cerevisiae* Encodes an Inorganic Phosphate Transporter. In *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* (Vol. 11, Issue 6).
- Bun-ya, M., Shikata, K., Nakade, S., Yompakdee, C., Harashima, S., i Oshima, Y. (1996). Two new genes, PHO86 and PHO87, involved in inorganic phosphate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 29(4), 344–351. <https://doi.org/10.1007/s002940050055>
- Cabrera, J., Puntarulo, S., i González, P. M. (2023). Domoic Acid Oxidative Effects on the Microalgae *Phaeodactylum tricornutum*. *Life*, 13(3). <https://doi.org/10.3390/life13030676>
- Caputi, L., Carradec, Q., Eveillard, D., Kirilovsky, A., Pelletier, E., Pierella Karlusich, J. J., Rocha Jimenez Vieira, F., Villar, E., Chaffron, S., Malviya, S., Scalco, E., Acinas, S. G., Alberti, A., Aury, J. M., Benoiston, A. S., Bertrand, A., Biard, T., Bittner, L., Boccara, M., ... Iudicone, D. (2019). Community-Level Responses to Iron Availability in Open Ocean Plankton Ecosystems. *Global Biogeochemical Cycles*, 33(3), 391–419. <https://doi.org/10.1029/2018GB006022>
- Caron, D. A., Alexander, H., Allen, A. E., Archibald, J. M., Armbrust, E. V., Bachy, C., Bell, C. J., Bharti, A., Dyhrman, S. T., Guida, S. M., Heidelberg, K. B., Kaye, J. Z., Metzner, J., Smith, S. R., i Worden, A. Z. (2017). Probing the evolution, ecology and physiology of marine protists using transcriptomics. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 15, Issue 1, pp. 6–20). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.160>
- Caron, D. A., Countway, P. D., Jones, A. C., Kim, D. Y., i Schnetzer, A. (2012). Marine protistan diversity. *Annual Review of Marine Science*, 4, 467–493. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142802>
- Carradec, Q., Pelletier, E., Da Silva, C., Alberti, A., Seeleuthner, Y., Blanc-Mathieu, R., Lima-Mendez, G., Rocha, F., Tirichine, L., Labadie, K., Kirilovsky, A., Bertrand, A., Engelen, S., Madoui, M. A., Méheust, R., Poulain, J., Romac, S., Richter, D. J., Yoshikawa, G., ... Wincker, P. (2018). A global ocean atlas of eukaryotic genes. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02342-1>

- Cerino, F., Fornasaro, D., Kralj, M., Giani, M., i Cabrini, M. (2019a). Phytoplankton temporal dynamics in the coastal waters of the north-eastern Adriatic Sea (Mediterranean Sea) from 2010 to 2017. *Nature Conservation*, 34, 343–372. <https://doi.org/10.3897/natureconservation.34.30720>
- Cerino, F., Fornasaro, D., Kralj, M., Giani, M., i Cabrini, M. (2019b). Phytoplankton temporal dynamics in the coastal waters of the north-eastern Adriatic Sea (Mediterranean Sea) from 2010 to 2017. *Nature Conservation*, 34, 343–372.
- Cerino, F., Malinverno, E., Fornasaro, D., Kralj, M., i Cabrini, M. (2017). Coccolithophore diversity and dynamics at a coastal site in the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 196, 331–345. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2017.07.013>
- Chung, C. C., Hwang, S. P. L., i Chang, J. (2003). Identification of a high-affinity phosphate transporter gene in a prasinophyte alga, *Tetraselmis chui*, and its expression under nutrient limitation. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 754–759. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.754-759.2003>
- Cohen, N. R., Alexander, H., Krinos, A. I., Hu, S. K., i Lampe, R. H. (2022a). Marine Microeukaryote Metatranscriptomics: Sample Processing and Bioinformatic Workflow Recommendations for Ecological Applications. In *Frontiers in Marine Science* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.867007>
- Cohen, N. R., Alexander, H., Krinos, A. I., Hu, S. K., i Lampe, R. H. (2022b). Marine Microeukaryote Metatranscriptomics: Sample Processing and Bioinformatic Workflow Recommendations for Ecological Applications. In *Frontiers in Marine Science* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.867007>
- Cohen, N. R., Ellis, K. A., Lampe, R. H., McNair, H., Twining, B. S., Maldonado, M. T., Brzezinski, M. A., Kuzminov, F. I., Thamatrakoln, K., Till, C. P., Bruland, K. W., Sunda, W. G., Bargu, S., i Marchetti, A. (2017). Diatom transcriptional and physiological responses to changes in iron bioavailability across ocean provinces. *Frontiers in Marine Science*, 4(NOV). <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00360>
- Cohen, N. R., McIlvin, M. R., Moran, D. M., Held, N. A., Saunders, J. K., Hawco, N. J., Brosnahan, M., DiTullio, G. R., Lamborg, C., McCrow, J. P., Dupont, C. L., Allen, A. E., i Saito, M. A. (2021). Dinoflagellates alter their carbon and nutrient metabolic strategies across environmental gradients in the central Pacific Ocean. *Nature Microbiology*, 6(2), 173–186. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00814-7>
- Colella, S., Falcini, F., Rinaldi, E., Sammartino, M., i Santoleri, R. (2016). Mediterranean ocean colour chlorophyll trends. *PLoS ONE*, 11(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155756>
- Collins, J. F., Bai, L., i Ghishan, F. K. (2004). The SLC20 family of proteins: dual functions as sodium-phosphate cotransporters and viral receptors. *Pflügers Archiv*, 447, 647–652.

- Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A., Szczesniak, M. W., Gaffney, D. J., Elo, L. L., Zhang, X., i Mortazavi, A. (2016). A survey of best practices for RNA-seq data analysis. In *Genome Biology* (Vol. 17, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0881-8>
- Consortium, G. O. (2004). The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Research*, 32(suppl_1), D258–D261. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh036>
- Cooper, G. M., i Adams, K. (2022). *The cell: a molecular approach*. Oxford University Press.
- Cordier, T., Frontalini, F., Cermakova, K., Apothéloz-Perret-Gentil, L., Treglia, M., Scantamburlo, E., Bonamin, V., i Pawlowski, J. (2019). Multi-marker eDNA metabarcoding survey to assess the environmental impact of three offshore gas platforms in the North Adriatic Sea (Italy). *Marine Environmental Research*, 146, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.12.009>
- Cozzi, S., i Giani, M. (2011). River water and nutrient discharges in the Northern Adriatic Sea: Current importance and long term changes. *Continental Shelf Research*, 31(18), 1881–1893. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2011.08.010>
- Crick, F. (1970). Central dogma of molecular biology. *Nature*, 227(5258), 561–563.
- Crick, F. H. (1958). On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol*, 12(138–63), 8.
- Cruz de Carvalho, M. H., Sun, H. X., Bowler, C., i Chua, N. H. (2016). Noncoding and coding transcriptome responses of a marine diatom to phosphate fluctuations. *New Phytologist*, 210(2), 497–510. <https://doi.org/10.1111/nph.13787>
- Cruz-Ramírez, A., Oropeza-Aburto, A., Razo-Hernández, F., Ramírez-Chávez, E., i Herrera-Estrella, L. (2006). Phospholipase DZ2 plays an important role in extraplastidic galactolipid biosynthesis and phosphate recycling in Arabidopsis roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(17), 6765–6770.
- Cui, Y., Lin, X., Zhang, H., Lin, L., i Lin, S. (2016). PhnW-PhnX pathway in dinoflagellates not functional to utilize extracellular phosphonates. *Frontiers in Marine Science*, 2(JAN). <https://doi.org/10.3389/fmars.2015.00120>
- Curtis, B. A., Tanifuji, G., Maruyama, S., Gile, G. H., Hopkins, J. F., Eveleigh, R. J. M., Nakayama, T., Malik, S. B., Onodera, N. T., Slamovits, C. H., Spencer, D. F., Lane, C. E., Gray, M. W., Archibald, J. M., Burki, F., Hirakawa, Y., Reyes-Prieto, A., Keeling, P. J., Fast, N. M., ... McFadden, G. I. (2012). Algal genomes reveal evolutionary mosaicism and the fate of nucleomorphs. *Nature*, 492(7427), 59–65. <https://doi.org/10.1038/nature11681>
- Degobbis, D., i Gilmartin, M. (1990). *Nitrogen, phosphorus, and biogenic silicon budgets for the northern Adriatic Sea*.
- Degobbis, D., Precali, R., Ivancic, I., Smodlaka, N., Fuks, D., i Kveder, S. (2000). Long-term changes in the northern Adriatic ecosystem related to anthropogenic eutrophication. *International Journal of Environment and Pollution*, 13(1–6), 495–533.

- Dell'Aquila, G. (2020). *Diatoms and their response to phosphate limitation*.
- Deng, Y., Hu, Z., Shang, L., Peng, Q., i Tang, Y. Z. (2017). Transcriptomic analyses of *Scrippsiella trochoidea* reveals processes regulating encystment and dormancy in the life cycle of a dinoflagellate, with a particular attention to the role of abscisic acid. *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02450>
- Derelle, E., Ferraz, C., Rombauts, S., Rouzé, P., Worden, A. Z., Robbens, S., Dé Ric Partensky, F., Degroeve, S., Echeynié, S., Cooke, R., Saeys, Y., Wuyts, J., Jabbari, K., Bowler, C., Panaud, O., Benoit, B., Gu, P., Ball, S. G., Ral, J.-P., ... Moreau, H. (2006). *Genome analysis of the smallest free-living eukaryote Ostreococcus tauri unveils many unique features*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0604795103
- De Vargas, C., Audic, S., Henry, N., Decelle, J., Mahé, F., Logares, R., Lara, E., Berney, C., Le Bescot, N., i Probert, I. (2015). Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. *Science*, 348(6237), 1261605.
- Dimario, R. J., Machingura, M. C., Waldrop, G. L., i Moroney, J. V. (2018). *Title: The many types of carbonic anhydrases in photosynthetic organisms*.
- Dyhrman, S. T., Chappell, P. D., Haley, S. T., Moffett, J. W., Orchard, E. D., Waterbury, J. B., i Webb, E. A. (2006b). Phosphonate utilization by the globally important marine diazotroph *Trichodesmium*. *Nature*, 439(7072), 68–71. <https://doi.org/10.1038/nature04203>
- Dyhrman, S. T., Haley, S. T., Birkeland, S. R., Wurch, L. L., Cipriano, M. J., i McArthur, A. G. (2006a). Long serial analysis of gene expression for gene discovery and transcriptome profiling in the widespread marine coccolithophore *Emiliana huxleyi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 252–260. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.252-260.2006>
- Dyhrman, S. T., Jenkins, B. D., Rynearson, T. A., Saito, M. A., Mercier, M. L., Alexander, H., Whitney, L. A. P., Drzewianowski, A., Bulygin, V. V., Bertrand, E. M., Wu, Z., Benitez-Nelson, C., i Heithoff, A. (2012). The transcriptome and proteome of the diatom *thalassiosira pseudonana* reveal a diverse phosphorus stress response. *PLoS ONE*, 7(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033768>
- Dyhrman, S. T., i Ruttenberg, K. C. (2006). Presence and regulation of alkaline phosphatase activity in eukaryotic phytoplankton from the coastal ocean: Implications for dissolved organic phosphorus remineralization. *Limnology and Oceanography*, 51(3), 1381–1390. <https://doi.org/10.4319/lo.2006.51.3.1381>
- Edgcomb, V. P., Kysela, D. T., Teske, A., De Vera Gomez, A., Sogin, M. L., The, § †, i Paul, J. B. (2002). *Benthic eukaryotic diversity in the Guaymas Basin hydrothermal vent environment* (Vol. 99, Issue 11). PNAS. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.062186399
- Falkowski, P. G., Fenchel, T., i Delong, E. F. (2008). The microbial engines that drive earth's biogeochemical cycles. In *Science* (Vol. 320, Issue 5879, pp. 1034–1039). <https://doi.org/10.1126/science.1153213>

- Falkowski, P. G., i Raven, J. A. (2007). *Aquatic Photosynthesis* (2nd ed.). Blackwell Science.
- Fields, M. W., Hise, A., Lohman, E. J., Bell, T., Gardner, R. D., Corredor, L., Moll, K., Peyton, B. M., Characklis, G. W., i Gerlach, R. (2014). Sources and resources: importance of nutrients, resource allocation, and ecology in microalgal cultivation for lipid accumulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 4805–4816.
- Flynn, K. J., i Mitra, A. (2009). Building the “perfect beast”: Modelling mixotrophic plankton. *Journal of Plankton Research*, 31(9), 965–992. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbp044>
- Flynn, K. J., Mitra, A., Anestis, K., Anschütz, A. A., Calbet, A., Ferreira, G. D., Gypens, N., Hansen, P. J., John, U., Martin, J. L., Mansour, J. S., Maselli, M., Medić, N., Norlin, A., Not, F., Pitta, P., Romano, F., Saiz, E., Schneider, L. K., ... Traboni, C. (2019). Mixotrophic protists and a new paradigm for marine ecology: Where does plankton research go now? *Journal of Plankton Research*, 41(4), 375–391. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbz026>
- Flynn, K. J., Stoecker, D. K., Mitra, A., Raven, J. A., Glibert, P. M., Hansen, P. J., Granéli, E., i Burkholder, J. M. (2013). Misuse of the phytoplankton–zooplankton dichotomy: the need to assign organisms as mixotrophs within plankton functional types. *Journal of Plankton Research*, 35(1), 3–11. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbs062>
- Fonda Umani, S., Beran, A., Parlato, S., Virgilio, D., Zollet, T., De Olazabal, A., Lazzarini, B., i Cabrini, M. (2004). *Noctiluca scintillans* Macartney in the Northern Adriatic Sea: Long-term dynamics, relationships with temperature and eutrophication, and role in the food web. *Journal of Plankton Research*, 26(5), 545–561. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbh045>
- Franco, P., i Michelato, A. (1992). Northern Adriatic Sea: oceanography of the basin proper and of the western coastal zone. *Science of the Total Environment*, SUPPL., 35–62. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-89990-3.50013-4>
- Galachyants, Y. P., Zakharova, Y. R., Petrova, D. P., Morozov, A. A., Sidorov, I. A., Marchenkov, A. M., Logacheva, M. D., Markelov, M. L., Khabudaev, K. v., Likhoshway, Y. v., i Grachev, M. A. (2015). Sequencing of the complete genome of an araphid pennate diatom *Synedra acus* subsp. *radians* from Lake Baikal. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 461(1), 84–88. <https://doi.org/10.1134/S1607672915020064>
- Gallego Romero, I., Pai, A. A., Tung, J., i Gilad, Y. (2014). RNA-seq: Impact of RNA degradation on transcript quantification. *BMC Biology*, 12. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-12-42>
- Galperin, M. Y., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., i Koonin, E. V. (2015). Expanded Microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D261–D269. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1223>
- Gašparović, B., Frka, S., Koch, B. P., Zhu, Z. Y., Bracher, A., Lechtenfeld, O. J., Neogi, S. B., Lara, R. J., i Kattner, G. (2014). Factors influencing particulate lipid production in the East Atlantic Ocean. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 89, 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2014.04.005>

- Gašparović, B., Godrijan, J., Frka, S., Tomažić, I., Penezić, A., Marić, D., Djakovac, T., Ivančić, I., Paliaga, P., Lyons, D., Precali, R., i Tepić, N. (2013). Adaptation of marine plankton to environmental stress by glycolipid accumulation. *Marine Environmental Research*, 92, 120–132. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.09.009>
- Gaude, N., Nakamura, Y., Scheible, W. R., Ohta, H., i Dörmann, P. (2008). Phospholipase C5 (NPC5) is involved in galactolipid accumulation during phosphate limitation in leaves of *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 56(1), 28–39. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03582.x>
- Geider, R. J., i La Roche, J. (2002). Redfield revisited: Variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. In *European Journal of Phycology* (Vol. 37, Issue 1, pp. 1–17). <https://doi.org/10.1017/S0967026201003456>
- Giani, M., Djakovac, T., Degobbi, D., Cozzi, S., Solidoro, C., i Umani, S. F. (2012). Recent changes in the marine ecosystems of the northern Adriatic Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.08.023>
- Giordano, M., Beardall, J., i Raven, J. A. (2005). CO₂ concentrating mechanisms in algae: Mechanisms, environmental modulation, and evolution. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 56, pp. 99–131). <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144052>
- Gobler, C. J., Berry, D. L., Dyhrman, S. T., Wilhelm, S. W., Salamov, A., Lobanov, A. v., Zhang, Y., Collier, J. L., Wurch, L. L., Kustka, A. B., Dill, B. D., Shah, M., VerBerkmoes, N. C., Kuo, A., Terry, A., Pangilinan, J., Lindquist, E. A., Lucas, S., Paulsen, I. T., ... Grigoriev, I. v. (2011). Niche of harmful alga *Aureococcus anophagefferens* revealed through ecogenomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(11), 4352–4357. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016106108>
- Godrijan, J., Arapov, J., Skejić, S., i Bužančić, M. (2023). Back to Basics: Revision of Coccolithophore Species List in the Adriatic Sea. In *Water (Switzerland)* (Vol. 15, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/w15030603>
- Godrijan, J., Marić, D., Tomažić, I., Precali, R., i Pfannkuchen, M. (2013). Seasonal phytoplankton dynamics in the coastal waters of the north-eastern Adriatic Sea. *Journal of Sea Research*, 77, 32–44.
- Gomez-Garcia, M. R., Davison, M., Blain-Hartnug, M., Grossman, A. R., i Bhaya, D. (2011). Alternative pathways for phosphonate metabolism in thermophilic cyanobacteria from microbial mats. *The ISME Journal*, 5(1), 141–149.
- Gong, W., Browne, J., Hall, N., Schruth, D., Paerl, H., i Marchetti, A. (2017). Molecular insights into a dinoflagellate bloom. *ISME Journal*, 11(2), 439–452. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.129>
- González-Pech, R. A., Stephens, T. G., Chen, Y., Mohamed, A. R., Cheng, Y., Shah, S., Dougan, K. E., Fortuin, M. D. A., Lagorce, R., Burt, D. W., Bhattacharya, D., Ragan, M. A., i Chan, C. X. (2021). Comparison of 15 dinoflagellate genomes reveals extensive sequence and

- structural divergence in family Symbiodiniaceae and genus *Symbiodinium*. *BMC Biology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12915-021-00994-6>
- Gotthardt, D., Jö Rg Warnatz, H., Henschel, O., Brü, F., Schleicher, M., i Soldati, T. (2002). High-Resolution Dissection of Phagosome Maturation Reveals Distinct Membrane Trafficking Phases. *Molecular Biology of the Cell*, 13, 3508–3520. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-04>
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., di Palma, F., Birren, B. W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., ... Regev, A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 29(7), 644–652. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>
- Grilli, F., Accoroni, S., Acri, F., Bernardi Aubry, F., Bergami, C., Cabrini, M., Campanelli, A., Giani, M., Guicciardi, S., i Marini, M. (2020). Seasonal and interannual trends of oceanographic parameters over 40 years in the northern Adriatic Sea in relation to nutrient loadings using the EMODnet chemistry data portal. *Water*, 12(8), 2280. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/w12082280>
- Grižančić, L., Baričević, A., Smodlaka Tanković, M., Vlašiček, I., Knjaz, M., Podolšak, I., Kogovšek, T., Pfannkuchen, M., i Marić Pfannkuchen, D. (2023). A metabarcode based (species) inventory of the northern Adriatic phytoplankton. *Biodiversity Data Journal*, 11. <https://doi.org/10.3897/BDJ.11.e106947>
- Guillard, R. R. L. (1975). Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In W. L. Smith i M. H. Chanley (Eds.), *Culture of Marine Invertebrate Animals: Proceedings — 1st Conference on Culture of Marine Invertebrate Animals Greenport* (pp. 29–60). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3
- Harke, M. J., Juhl, A. R., Haley, S. T., Alexander, H., i Dyhrman, S. T. (2017). Conserved transcriptional responses to nutrient stress in bloom-forming algae. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1279.
- Harris, M. A., Clark, J., Ireland, A., Lomax, J., Ashburner, M., Foulger, R., Eilbeck, K., Lewis, S., Marshall, B., Mungall, C., Richter, J., Rubin, G. M., Blake, J. A., Bult, C., Dolan, M., Drabkin, H., Eppig, J. T., Hill, D. P., Ni, L., ... White, R. (2004). The Gene Oncology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Research*, 32(DATABASE ISS.). <https://doi.org/10.1093/nar/gkh036>
- Hartmann, M., Grob, C., Tarran, G. A., Martin, A. P., Burkill, P. H., Scanlan, D. J., i Zubkov, M. V. (2012). Mixotrophic basis of Atlantic oligotrophic ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(15), 5756–5760. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118179109>
- Helliwell, K. E. (2023). Emerging trends in nitrogen and phosphorus signalling in photosynthetic eukaryotes. *Trends in Plant Science*, 28(3), 344–358.

- Huang, A., Wang, Y., Duan, J., Guo, S., i Xie, Z. (2022). Differential Response of *Phaeodactylum tricornutum* and *Cylindrotheca fusiformis* to High Concentrations of Cu²⁺ and Zn²⁺. *Water (Switzerland)*, 14(20). <https://doi.org/10.3390/w14203305>
- Huang, H., Zhou, G., Yang, J., Liu, S., You, F., i Lei, X. (2013). Diversity of free-living and symbiotic Symbiodinium in the coral reefs of Sanya, South China Sea. *Marine Biology Research*, 9(2), 117–128. <https://doi.org/10.1080/17451000.2012.708045>
- Huang, K., Wang, Z., Tan, J., Wang, D., Dai, X., Cen, J., Ou, L., i Lu, S. (2022). Phosphomonoesterase and phosphodiesterase activities and their regulation during dinoflagellate blooms under different external phosphate conditions. *Marine Ecology Progress Series*, 698, 41–54. <https://doi.org/10.3354/meps14158>
- Huerta-Cepas, J., Forslund, K., Coelho, L. P., Szklarczyk, D., Jensen, L. J., von Mering, C., i Bork, P. (2017). Fast Genome-Wide Functional Annotation through Orthology Assignment by eggNOG-Mapper. *Molecular Biology and Evolution*, 34(8), 2115–2122. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx148>
- Huerta-Cepas, J., Forslund, K., Coelho, L. P., Szklarczyk, D., Jensen, L. J., Von Mering, C., i Bork, P. (2017). Fast genome-wide functional annotation through orthology assignment by eggNOG-mapper. *Molecular Biology and Evolution*, 34(8), 2115–2122. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx148>
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Heller, D., Hernández-Plaza, A., Forslund, S. K., Cook, H., Mende, D. R., Letunic, I., Rattei, T., Jensen, L. J., Von Mering, C., i Bork, P. (2019). EggNOG 5.0: A hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D309–D314. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1085>
- Hürlimann, H. C., Pinson, B., Stadler-Waibel, M., Zeeman, S. C., i Freimoser, F. M. (2009). The SPX domain of the yeast low-affinity phosphate transporter Pho90 regulates transport activity. *EMBO Reports*, 10(9), 1003–1008. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.105>
- Hu, S. K., Liu, Z., Alexander, H., Campbell, V., Connell, P. E., Dyhrman, S. T., Heidelberg, K. B., i Caron, D. A. (2018a). Shifting metabolic priorities among key protistan taxa within and below the euphotic zone. *Environmental Microbiology*, 20(8), 2865–2879. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14259>
- Hu, S. K., Liu, Z., Alexander, H., Campbell, V., Connell, P. E., Dyhrman, S. T., Heidelberg, K. B., i Caron, D. A. (2018b). Shifting metabolic priorities among key protistan taxa within and below the euphotic zone. *Environmental Microbiology*, 20(8), 2865–2879. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14259>
- Ilikchyan, I. N., McKay, R. M. L., Zehr, J. P., Dyhrman, S. T., i Bullerjahn, G. S. (2009). Detection and expression of the phosphonate transporter gene phnD in marine and freshwater picocyanobacteria. *Environmental Microbiology*, 11(5), 1314–1324.

- Ivančič, I., i Degobbi, D. (1984). An optimal manual procedure for ammonia analysis in natural waters by the indophenol blue method. *Water Research*, 18(9), 1143–1147.
- Ivančič, I., Godrijan, J., Pfannkuchen, M., Marić, D., Gašparović, B., Djakovac, T., i Najdek, M. (2012). Survival mechanisms of phytoplankton in conditions of stratification-induced deprivation of orthophosphate: Northern adriatic case study. *Limnology and Oceanography*, 57(6), 1721–1731. <https://doi.org/10.4319/lo.2012.57.6.1721>
- Ivančič, I., Kraus, R., Najdek, M., i Cozzi, S. (2021). Ecological importance of alkaline phosphatase activity in changing marine environmental conditions. *Water*, 13(19), 2750.
- Ivančič, I., Pfannkuchen, M., Godrijan, J., Djakovac, T., Marić Pfannkuchen, D., Korlević, M., Gašparović, B., i Najdek, M. (2016). Alkaline phosphatase activity related to phosphorus stress of microphytoplankton in different trophic conditions. *Progress in Oceanography*, 146, 175–186. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2016.07.003>
- Jensen, E. L., Clement, R., Kosta, A., Maberly, S. C., i Gontero, B. (2019). A new widespread subclass of carbonic anhydrase in marine phytoplankton. *ISME Journal*, 13(8), 2094–2106. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0426-8>
- Jeong, H. J., du Yoo, Y., Kim, J. S., Seong, K. A., Kang, N. S., i Kim, T. H. (2010). Growth, feeding and ecological roles of the mixotrophic and heterotrophic dinoflagellates in marine planktonic food webs. *Ocean Science Journal*, 45(2), 65–91. <https://doi.org/10.1007/s12601-010-0007-2>
- Ji, N., Lin, L., Li, L., Yu, L., Zhang, Y., Luo, H., Li, M., Shi, X., Wang, D. Z., i Lin, S. (2018). Metatranscriptome analysis reveals environmental and diel regulation of a *Heterosigma akashiwo* (raphidophyceae) bloom. *Environmental Microbiology*, 20(3), 1078–1094. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14045>
- Johnson, K. A., i Krishnan, A. (2022). Robust normalization and transformation techniques for constructing gene coexpression networks from RNA-seq data. *Genome Biology*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02568-9>
- Johnson, L. K., Alexander, H., i Brown, C. T. (2019). Re-assembly, quality evaluation, and annotation of 678 microbial eukaryotic reference transcriptomes. *Gigascience*, 8(4), giy158.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Kawashima, M., i Ishiguro-Watanabe, M. (2023). KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D587–D592. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac963>
- Kanehisa, M., i Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27–30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., i Tanabe, M. (2016). KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D457–D462. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1070>

- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., i Duran, C. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647–1649.
- Keeling, P. J., Burki, F., Wilcox, H. M., Allam, B., Allen, E. E., Amaral-Zettler, L. A., Armbrust, E. V., Archibald, J. M., Bharti, A. K., i Bell, C. J. (2014). The Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project (MMETSP): illuminating the functional diversity of eukaryotic life in the oceans through transcriptome sequencing. *PLoS Biology*, 12(6), e1001889.
- Klingenberg, H., i Meinicke, P. (2017). How to normalize metatranscriptomic count data for differential expression analysis. *PeerJ*, 2017(10). <https://doi.org/10.7717/peerj.3859>
- Knjaz, M., Baricevic, A., Tankovic, M. S., Kuzat, N., Vlasicek, I., Grizancic, L., Podolsak, I., Pfannkuchen, M., Kogovsek, T., i Pfannkuchen, D. M. (2024). First regional reference database of northern Adriatic diatom transcriptomes. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-67043-4>
- Kolde, R. (2019). pheatmap: Pretty Heatmaps.[R package version 1.0. 12:[Available from: <https://cran.r-project.org/web/packages/pheatmap/index.html>. Accessed Sept.
- Kolody, B. C., Harke, M. J., Hook, S. E., i Allen, A. E. (2022). *Transcriptomic and metatranscriptomic approaches in phytoplankton: insights and advances*.
- Kolody, B. C., McCrow, J. P., Allen, L. Z., Aylward, F. O., Fontanez, K. M., Moustafa, A., Moniruzzaman, M., Chavez, F. P., Scholin, C. A., Allen, E. E., Worden, A. Z., Delong, E. F., i Allen, A. E. (2019). Diel transcriptional response of a California Current plankton microbiome to light, low iron, and enduring viral infection. *ISME Journal*, 13(11), 2817–2833. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0472-2>
- Koppelle, S., López-Escardó, D., Brussaard, C. P. D., Huisman, J., Philippart, C. J. M., Massana, R., i Wilken, S. (2022). Mixotrophy in the bloom-forming genus *Phaeocystis* and other haptophytes. *Harmful Algae*, 117. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2022.102292>
- Kopylova, E., Noé, L., i Touzet, H. (2012). SortMeRNA: Fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics*, 28(24), 3211–3217. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts611>
- Kornberg, A., Rao, N. N., i Ault-Riche, D. (1999). Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annual Review of Biochemistry*, 68(1), 89–125.
- Krinos, A. I., Hu, S. K., Cohen, N. R., i Alexander, H. (2020). *EUKulele: Taxonomic annotation of the unsung eukaryotic microbes*. <https://doi.org/10.21105/joss.02799>
- Kumar, M., Tibocha-Bonilla, J. D., Füßy, Z., Lieng, C., Schwenck, S. M., Levesque, A. V, Al-Bassam, M. M., Passi, A., Neal, M., Zuniga, C., Kaiyom, F., Espinoza, J. L., Lim, H., Polson,

- S. W., Allen, L. Z., i Zengler, K. (2024). Mixotrophic growth of a ubiquitous marine diatom. In *Sci. Adv* (Vol. 10). <https://www.science.org>
- Kužat, N. (2021). *Životne strategije morskih dijatomeja u uvjetima ograničenoga fosfora*. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:629267>
- Kužat, N., Marić Pfannkuchen, D., Smoldaka Tanković, M., Baričević, A., Ivančić, I., Vrana, I., Gašparović, B., i Pfannkuchen, M. (2022). Morpho-physiological adaptations of *Leptocylindrus aporus* and *L. hargravesii* to phosphate limitation in the northern Adriatic. *Scientific Reports*, 12(1), 2687.
- Labarre, A., Obiol, A., Wilken, S., Forn, I., i Massana, R. (2020). Expression of genes involved in phagocytosis in uncultured heterotrophic flagellates. *Limnology and Oceanography*, 65(S1), S149–S160. <https://doi.org/10.1002/lno.11379>
- Lambert, B. S., Groussman, R. D., Schatz, M. J., Coesel, S. N., Durham, B. P., Alverson, A. J., White, A. E., i Armbrust, E. V. (2022). The dynamic trophic architecture of open-ocean protist communities revealed through machine-guided metatranscriptomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(7), e2100916119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2100916119>
- Lampe, R. H., Cohen, N. R., Ellis, K. A., Bruland, K. W., Maldonado, M. T., Peterson, T. D., Till, C. P., Brzezinski, M. A., Bargu, S., Thamtrakoln, K., Kuzminov, F. I., Twining, B. S., i Marchetti, A. (2018). Divergent gene expression among phytoplankton taxa in response to upwelling. *Environmental Microbiology*, 20(8), 3069–3082. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14361>
- Lampe, R. H., Wang, S., Cassar, N., i Marchetti, A. (2019). Strategies among phytoplankton in response to alleviation of nutrient stress in a subtropical gyre. *ISME Journal*, 13(12), 2984–2997. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0489-6>
- Lauritano, C., Orefice, I., Procaccini, G., Romano, G., i Ianora, A. (2015). Key genes as stress indicators in the ubiquitous diatom *Skeletonema marinoi*. *BMC Genomics*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1574-5>
- Lei, Q.-Y., i Lu, S.-H. (2011). Molecular ecological responses of the dinoflagellate *Karenia mikimotoi* to phosphate stress. *Harmful Algae*, 12, 39–45.
- Lin, H. Y., Shih, C. Y., Liu, H. C., Chang, J., Chen, Y. L., Chen, Y. R., Lin, H. T., Chang, Y. Y., Hsu, C. H., i Lin, H. J. (2013). Identification and Characterization of an Extracellular Alkaline Phosphatase in the Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine Biotechnology*, 15(4), 425–436. <https://doi.org/10.1007/s10126-013-9494-3>
- Lin, S., Litaker, R. W., i Sunda, W. G. (2016). Phosphorus physiological ecology and molecular mechanisms in marine phytoplankton. In *Journal of Phycology* (Vol. 52, Issue 1, pp. 10–36). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/jpy.12365>

- Lin, X., Wang, L., Shi, X., i Lin, S. (2015). Rapidly diverging evolution of an atypical alkaline phosphatase (PhoA_{aty}) in marine phytoplankton: Insights from dinoflagellate alkaline phosphatases. *Frontiers in Microbiology*, 6(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00868>
- Lin, X., Zhang, H., Cui, Y., i Lin, S. (2012). High sequence variability, diverse subcellular localizations, and ecological implications of alkaline phosphatase in dinoflagellates and other eukaryotic phytoplankton. *Frontiers in Microbiology*, 3(JUL). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00235>
- Lin, X., Zhang, H., Huang, B., i Lin, S. (2011). Alkaline Phosphatase Gene Sequence And Transcriptional Regulation By Phosphate Limitation In Amphidinium Carterae (Dinophyceae). *Journal of Phycology*, 47(5), 1110–1120. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.01038.x>
- Lin, X., Zhang, H., Huang, B., i Lin, S. (2012). Alkaline phosphatase gene sequence characteristics and transcriptional regulation by phosphate limitation in *Karenia brevis* (Dinophyceae). *Harmful Algae*, 17, 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.02.005>
- Lobban, C. S., Modeo, L., Verni, F., i Rosati, G. (2005). *Euplotes uncinatus* (Ciliophora, Hypotrichia), a new species with zooxanthellae. *Marine Biology*, 147(5), 1055–1061. <https://doi.org/10.1007/s00227-005-0024-3>
- Lobban, C. S., Schefter, M., Simpson, A. G. B., Pochon, X., Pawlowski, J., i Foissner, W. (2002). *Maristentor dinoferus* n. gen., n. sp., a giant heterotrich ciliate (Spirotrichea: Heterotrichida) with zooxanthellae, from coral reefs on Guam, Mariana Islands. *Marine Biology*, 140(2), 411–423. <https://doi.org/10.1007/s002270100690>
- Lomas, M. W., Burke, A. L., Lomas, D. A., Bell, D. W., Shen, C., Dyhrman, S. T., i Ammerman, J. W. (2010). Sargasso Sea phosphorus biogeochemistry: an important role for dissolved organic phosphorus (DOP). In *Biogeosciences* (Vol. 7). www.biogeosciences.net/7/695/2010/
- Lommer, M., Specht, M., Roy, A. S., Kraemer, L., Andreson, R., Gutowska, M. A., Wolf, J., Bergner, S. v., Schilhabel, M. B., Klostermeier, U. C., Beiko, R. G., Rosenstiel, P., Hippler, M., i LaRoche, J. (2012). Genome and low-iron response of an oceanic diatom adapted to chronic iron limitation. *Genome Biology*, 13(7). <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-7-r66>
- Love, M. I., Huber, W., i Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S., i Shafee, T. (2017). Transcriptomics technologies. *PLoS Computational Biology*, 13(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005457>
- Magagnin, S., Werner, A., Markovich, D., Sorribas, V., Stange, G., Biber, J., i Murer, H. (1993). Expression cloning of human and rat renal cortex Na/Pi cotransport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(13), 5979–5983.

- Malfatti, F., Turk, V., Tinta, T., Mozetič, P., Manganelli, M., Samo, T. J., Ugalde, J. A., Kovač, N., Stefanelli, M., Antonoli, M., Fonda-Umani, S., Del Negro, P., Cataletto, B., Hozic, A., Ivošević DeNardis, N., Žutić, V., Svetličić, V., Mišić Radić, T., Radić, T., ... Azam, F. (2014). Microbial mechanisms coupling carbon and phosphorus cycles in phosphorus-limited northern Adriatic Sea. *Science of the Total Environment*, 470–471, 1173–1183. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.040>
- Marchetti, A., Schruth, D. M., Durkin, C. A., Parker, M. S., Kodner, R. B., Berthiaume, C. T., Morales, R., Allen, A. E., i Armbrusta, E. V. (2012). Comparative metatranscriptomics identifies molecular bases for the physiological responses of phytoplankton to varying iron availability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(6). <https://doi.org/10.1073/pnas.1118408109>
- Marić, D., Kraus, R., Godrijan, J., Supić, N., Djakovac, T., i Precali, R. (2012). Phytoplankton response to climatic and anthropogenic influences in the north-eastern Adriatic during the last four decades. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115, 98–112. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.02.003>
- Marić Pfannkuchen, D., Godrijan, J., Smoldaka Tanković, M., Baričević, A., Kužat, N., Djakovac, T., Pustijanac, E., Jahn, R., i Pfannkuchen, M. (2018). The Ecology of One Cosmopolitan, One Newly Introduced and One Occasionally Advected Species from the Genus *Skeletonema* in a Highly Structured Ecosystem, the Northern Adriatic. *Microbial Ecology*, 75(3), 674–687. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1069-9>
- Martinez, P., i Persson, B. L. (1998). Identification, cloning and characterization of a derepressible Na⁺-coupled phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics MGG*, 258, 628–638.
- Martin, P., Van Mooy, B. A. S., Heithoff, A., i Dyhrman, S. T. (2011). Phosphorus supply drives rapid turnover of membrane phospholipids in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *ISME Journal*, 5(6), 1057–1060. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.192>
- Mather, R. L., Reynolds, S. E., Wolff, G. A., Williams, R. G., Torres-Valdes, S., Woodward, E. M. S., Landolfi, A., Pan, X., Sanders, R., i Achterberg, E. P. (2008). Phosphorus cycling in the North and South Atlantic Ocean subtropical gyres. *Nature Geoscience*, 1(7), 439–443. <https://doi.org/10.1038/ngeo232>
- Matsui, H., Harada, H., Maeda, K., Sugiyama, T., Fukuchi, Y., Kimura, N., Nawaly, H., Tsuji, Y., i Matsuda, Y. (2024). Coordinated phosphate uptake by extracellular alkaline phosphatase and solute carrier transporters in marine diatoms. *New Phytologist*, 241(3), 1210–1221. <https://doi.org/10.1111/nph.19410>
- McGrath, J. W., Chin, J. P., i Quinn, J. P. (2013). Organophosphonates revealed: new insights into the microbial metabolism of ancient molecules. *Nature Reviews Microbiology*, 11(6), 412–419.

- McKie-Krisberg, Z. M., Sanders, R. W., i Gast, R. J. (2018). Evaluation of mixotrophy-associated gene expression in two species of polar marine algae. *Frontiers in Marine Science*, 5(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00273>
- McLaughlin, K., Sohm, J. A., Cutter, G. A., Lomas, M. W., i Paytan, A. (2013). Phosphorus cycling in the Sargasso Sea: Investigation using the oxygen isotopic composition of phosphate, enzyme-labeled fluorescence, and turnover times. *Global Biogeochemical Cycles*, 27(2), 375–387. <https://doi.org/10.1002/gbc.20037>
- Menzel, D. W., i Corwin, N. (1965). The measurement of total phosphorus in seawater based on the liberation of organically bound fractions by persulfate oxidation 1. *Limnology and Oceanography*, 10(2), 280–282.
- Metegnier, G., Paulino, S., Ramond, P., Siano, R., Sourisseau, M., Destombe, C., i Le Gac, M. (2020). Species specific gene expression dynamics during harmful algal blooms. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63326-8>
- Mikaelyan, A. S., Malej, A., Shiganova, T. A., Turk, V., Sivkovitch, A. E., Musaeva, E. I., Kogovšek, T., i Lukasheva, T. A. (2014). Populations of the red tide forming dinoflagellate *Noctiluca scintillans* (Macartney): A comparison between the Black Sea and the northern Adriatic Sea. *Harmful Algae*, 33, 29–40. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.01.004>
- Mock, T., Otilar, R. P., Strauss, J., McMullan, M., Paaanen, P., Schmutz, J., Salamov, A., Sanges, R., Toseland, A., Ward, B. J., Allen, A. E., Dupont, C. L., Frickenhaus, S., Maumus, F., Veluchamy, A., Wu, T., Barry, K. W., Falcioro, A., Ferrante, M. I., ... Grigoriev, I. v. (2017). Evolutionary genomics of the cold-Adapted diatom *Fragilariopsis cylindrus*. *Nature*, 541(7638), 536–540. <https://doi.org/10.1038/nature20803>
- Mordret, S., Romac, S., Henry, N., Colin, S., Carmichael, M., Berney, C., Audic, S., Richter, D. J., Pochon, X., De Vargas, C., i Decelle, J. (2016). The symbiotic life of *Symbiodinium* in the open ocean within a new species of calcifying ciliate (*Tiarina* sp.). *ISME Journal*, 10(6), 1424–1436. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.211>
- Moseley, J. L., Chang, C. W., i Grossman, A. R. (2006). Genome-based approaches to understanding phosphorus deprivation responses and PSR1 control in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, 5(1), 26–44. <https://doi.org/10.1128/EC.5.1.26-44.2006>
- Mozetič, P., Francé, J., Kogovšek, T. Š., Talaber, I., i Malej, A. (2012). Plankton trends and community changes in a coastal sea (northern Adriatic): Bottom-up vs. top-down control in relation to environmental drivers. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115, 138–148. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.02.009>
- Mozetič, P., Solidoro, C., Cossarini, G., Socal, G., Precali, R., Francé, J., Bianchi, F., De Vittor, C., Smolaka, N., i Fonda Umani, S. (2010). Recent trends towards oligotrophication of the northern adriatic: Evidence from chlorophyll a time series. *Estuaries and Coasts*, 33(2), 362–375. <https://doi.org/10.1007/s12237-009-9191-7>

- Mukherjee, A., i Reddy, M. S. (2020). Metatranscriptomics: an approach for retrieving novel eukaryotic genes from polluted and related environments. In 3 *Biotech* (Vol. 10, Issue 2). Springer. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2057-1>
- Murphy, E. A., Kleiner, F. H., Helliwell, K. E., i Wheeler, G. L. (2024). Channels of Evolution: Unveiling Evolutionary Patterns in Diatom Ca²⁺ Signalling. *Plants*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/plants13091207>
- Nakamura, Y., Awai, K., Masuda, T., Yoshioka, Y., Takamiya, K. I., i Ohta, H. (2005). A novel phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C induced by phosphate starvation in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 280(9), 7469–7476. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408799200>
- Neri, F., Romagnoli, T., Accoroni, S., Campanelli, A., Marini, M., Grilli, F., i Totti, C. (2022). Phytoplankton and environmental drivers at a long-term offshore station in the northern Adriatic Sea (1988–2018). *Continental Shelf Research*, 242. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2022.104746>
- Ogawa, N., Derisi, J., Brown, P. O., i Fink, G. R. (2000). New Components of a System for Phosphate Accumulation and Polyphosphate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* Revealed by Genomic Expression Analysis. In *Molecular Biology of the Cell* (Vol. 11). <http://cmgm.stan->
- Ogura, A., Akizuki, Y., Imoda, H., Mineta, K., Gojobori, T., i Nagai, S. (2018). Comparative genome and transcriptome analysis of diatom, *Skeletonema costatum*, reveals evolution of genes for harmful algal bloom. *BMC Genomics*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5144-5>
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., i Wagner, H. (2013). Community ecology package. *R Package Version*, 2(0), 321–326.
- Oshlack, A., i Wakefield, M. J. (2009). Transcript length bias in RNA-seq data confounds systems biology. *Biology Direct*, 4. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-4-14>
- Osuna-Cruz, C. M., Bilcke, G., Vancaester, E., de Decker, S., Bones, A. M., Winge, P., Poulsen, N., Bulankova, P., Verhelst, B., Audoor, S., Belisova, D., Pargana, A., Russo, M., Stock, F., Cirri, E., Brembu, T., Pohnert, G., Piganeau, G., Ferrante, M. I., ... Vandepoele, K. (2020). The *Seminais robusta* genome provides insights into the evolutionary adaptations of benthic diatoms. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17191-8>
- Palenik, B., Grimwood, J., Aerts, A., Rouzé, P., Salamov, A., Putnam, N., Dupont, C., Jorgensen, R., Derelle, E., Rombauts, S., Zhou, K., Otiillar, R., Merchant, S. S., Podell, S., Gaasterland, T., Napoli, C., Gendler, K., Manuell, A., Tai, V., ... Grigoriev, I. v. (2007). *The tiny eukaryote Ostreococcus provides genomic insights into the paradox of plankton speciation.* www.pnas.org/cgi/content/full/

- Parsons, T. R., Maita, Y., i Lalli, C. M. (1984). *A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis*. Pergamon Press.
- Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A., i Kingsford, C. (2017). Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods*, 14(4), 417–419. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4197>
- Paytan, A., i McLaughlin, K. (2007). The oceanic phosphorus cycle. *Chemical Reviews*, 107(2), 563–576. <https://doi.org/10.1021/cr0503613>
- Pearson, G. A., Lago-Leston, A., Cánovas, F., Cox, C. J., Verret, F., Lasternas, S., Duarte, C. M., Agusti, S., i Serrão, E. A. (2015). Metatranscriptomes reveal functional variation in diatom communities from the Antarctic Peninsula. *ISME Journal*, 9(10), 2275–2289. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.40>
- Read, B. A., Kegel, J., Klute, M. J., Kuo, A., Lefebvre, S. C., Maumus, F., Mayer, C., Miller, J., Monier, A., Salamov, A., Young, J., Aguilar, M., Claverie, J. M., Frickenhaus, S., Gonzalez, K., Herman, E. K., Lin, Y. C., Napier, J., Ogata, H., ... Wurch, L. L. (2013a). Pan genome of the phytoplankton *Emiliana* underpins its global distribution. *Nature*, 499(7457), 209–213. <https://doi.org/10.1038/nature12221>
- Read, B. A., Kegel, J., Klute, M. J., Kuo, A., Lefebvre, S. C., Maumus, F., Mayer, C., Miller, J., Monier, A., Salamov, A., Young, J., Aguilar, M., Claverie, J. M., Frickenhaus, S., Gonzalez, K., Herman, E. K., Lin, Y. C., Napier, J., Ogata, H., ... Wurch, L. L. (2013b). Pan genome of the phytoplankton *Emiliana* underpins its global distribution. *Nature*, 499(7457), 209–213. <https://doi.org/10.1038/nature12221>
- Redfield, A. C., Ketchum, B. H., i Richards, F. A. (1963). The influence of organisms on the composition of seawater. *The Sea*, 2(2), 26–77.
- Reinfelder, J. R. (2011). Carbon concentrating mechanisms in eukaryotic marine phytoplankton. *Annual Review of Marine Science*, 3, 291–315. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142720>
- Richter, D. J., Berney, C., Strassert, J. F. H., Poh, Y.-P., Herman, E. K., Muñoz-Gómez, S. A., Wideman, J. G., Burki, F., i Vargas, C. de. (2022). EukProt: A database of genome-scale predicted proteins across the diversity of eukaryotes. *BioRxiv*, 2020.06.30.180687. <https://doi.org/10.1101/2020.06.30.180687>
- Rocap, G., Larimer, F. W., Lamerdin, J., Malfatti, S., Chain, P., Ahlgren, N. A., Arellano, A., Coleman, M., Hauser, L., i Hess, W. R. (2003). Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature*, 424(6952), 1042–1047.
- Sforza, E., Calvaruso, C., La Rocca, N., i Bertucco, A. (2018). Luxury uptake of phosphorus in *Nannochloropsis salina*: Effect of P concentration and light on P uptake in batch and continuous cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 134, 69–79.

- Shakya, M., Lo, C. C., i Chain, P. S. G. (2019). Advances and challenges in metatranscriptomic analysis. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 10, Issue SEP). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00904>
- Shih, C. Y., Kang, L. K., i Chang, J. (2015). Transcriptional responses to phosphorus stress in the marine diatom, *Chaetoceros affinis*, reveal characteristic genes and expression patterns in phosphorus uptake and intracellular recycling. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 470, 43–54. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.05.001>
- Shu, H., Shen, Y., Wang, H., Sun, X., Ma, J., i Lin, X. (2024). Biogenic Phosphonate Utilization by Globally Distributed Diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Microorganisms*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms12040761>
- Shu, H., You, Y., Wang, H., Wang, J., Li, L., Ma, J., i Lin, X. (2022). Transcriptomic-Guided Phosphonate Utilization Analysis Unveils Evidence of Clathrin-Mediated Endocytosis and Phospholipid Synthesis in the Model Diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. *MSystems*, 7(6). <https://doi.org/10.1128/msystems.00563-22>
- Socal, G., Acri, F., Bastianini, M., Bernardi Aubry, F., Bianchi, F., Cassin, D., Coppola, J., De Lazzari, A., Bandelj, V., Cossarini, G., i Solidoro, C. (2008). Hydrological and biogeochemical features of the Northern Adriatic Sea in the period 2003-2006. *Marine Ecology*, 29(4), 449–468. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.2008.00266.x>
- Solovchenko, A. E., Ismagulova, T. T., Lukyanov, A. A., Vasilieva, S. G., Konyukhov, I. V., Pogosyan, S. I., Lobakova, E. S., i Gorelova, O. A. (2019a). Luxury phosphorus uptake in microalgae. In *Journal of Applied Phycology* (Vol. 31, Issue 5, pp. 2755–2770). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01831-8>
- Solovchenko, A., Khozin-Goldberg, I., Selyakh, I., Semenova, L., Ismagulova, T., Lukyanov, A., Mamedov, I., Vinogradova, E., Karpova, O., i Konyukhov, I. (2019b). Phosphorus starvation and luxury uptake in green microalgae revisited. *Algal Research*, 43, 101651.
- Stephens, T. G., González-Pech, R. A., Cheng, Y., Mohamed, A. R., Burt, D. W., Bhattacharya, D., Ragan, M. A., i Chan, C. X. (2020). Genomes of the dinoflagellate *Polarella glacialis* encode tandemly repeated single-exon genes with adaptive functions. *BMC Biology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00782-8>
- Stoecker, D. K. (1999). Mixotrophy among dinoflagellates. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(4), 397–401. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04619.x>
- Stoecker, D. K., Hansen, P. J., Caron, D. A., i Mitra, A. (2017). Mixotrophy in the Marine Plankton. *Annual Review of Marine Science*, 9(1), 311–335. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010816-060617>
- Stoeck, T., Behnke, A., Christen, R., Amaral-Zettler, L., Rodriguez-Mora, M. J., Chistoserdov, A., Orsi, W., i Edgcomb, V. P. (2009). Massively parallel tag sequencing reveals the complexity of anaerobic marine protistan communities. *BMC Biology*, 7, 72. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-72>

- Su, B., Song, X., Duhamel, S., Mahaffey, C., Davis, C., Ivančić, I., i Liu, J. (2023). A dataset of global ocean alkaline phosphatase activity. *Scientific Data*, 10(1), 205.
- Sun, F., Yang, H., Wang, G., i Shi, Q. (2020). Combination Analysis of Metatranscriptome and Metagenome Reveal the Composition and Functional Response of Coral Symbionts to Bleaching During an El Niño Event. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00448>
- Suzumura, M., Hashihama, F., Yamada, N., i Kinouchi, S. (2012). Dissolved phosphorus pools and alkaline phosphatase activity in the euphotic zone of the western North Pacific Ocean. *Frontiers in Microbiology*, 3(MAR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00099>
- Tamaki, S., Mochida, K., i Suzuki, K. (2021). Diverse biosynthetic pathways and protective functions against environmental stress of antioxidants in microalgae. In *Plants* (Vol. 10, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/plants10061250>
- Tanaka, T., Maeda, Y., Veluchamy, A., Tanaka, M., Abida, H., Maréchal, E., Bowler, C., Muto, M., Sunaga, Y., Tanaka, M., Yoshino, T., Taniguchi, T., Fukuda, Y., Nemoto, M., Matsumoto, M., Wong, P. S., Aburatani, S., i Fujibuchi, W. (2015). Oil accumulation by the oleaginous diatom *Fistulifera solaris* as revealed by the genome and transcriptome. *Plant Cell*, 27(1), 162–176. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.135194>
- Tanković, M. S., Baričević, A., Ivančić, I., Kužat, N., Medić, N., Pustijanac, E., Novak, T., Gašparović, B., Pfannkuchen, D. M., i Pfannkuchen, M. (2018). Insights into the life strategy of the common marine diatom *Chaetoceros peruvianus* Brightwell. *PLoS ONE*, 13(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203634>
- Tatusov, R. L., Fedorova, N. D., Jackson, J. D., Jacobs, A. R., Kiryutin, B., Koonin, E. V., Krylov, D. M., Mazumder, R., Mekhedov, S. L., Nikolskaya, A. N., Rao, B. S., Smirnov, S., Sverdlov, A. V., Vasudevan, S., Wolf, Y. I., Yin, J. J., i Natale, D. A. (2003). *The COG database: an updated version includes eukaryotes*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/4/41>
- Team, R. C. (2024). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Thomson, B., Wenley, J., Lockwood, S., Twigg, I., Currie, K., Herndl, G. J., Hepburn, C. D., i Baltar, F. (2020). Relative Importance of Phosphodiesterase vs. Phosphomonoesterase (Alkaline Phosphatase) Activities for Dissolved Organic Phosphorus Hydrolysis in Epi- and Mesopelagic Waters. *Frontiers in Earth Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/feart.2020.560893>
- Totti, C., Romagnoli, T., Accoroni, S., Coluccelli, A., Pellegrini, M., Campanelli, A., Grilli, F., i Marini, M. (2019). Phytoplankton communities in the northwestern Adriatic Sea: Interdecadal variability over a 30-years period (1988–2016) and relationships with meteoroclimatic drivers. *Journal of Marine Systems*, 193, 137–153.
- Traller, J. C., Cokus, S. J., Lopez, D. A., Gaidarenko, O., Smith, S. R., McCrow, J. P., Gallaher, S. D., Podell, S., Thompson, M., Cook, O., Morselli, M., Jaroszewicz, A., Allen, E. E., Allen, A. E., Merchant, S. S., Pellegrini, M., i Hildebrand, M. (2016). Genome and methylome of the

- oleaginous diatom *Cyclotella cryptica* reveal genetic flexibility toward a high lipid phenotype. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0670-3>
- van Mooy, B., Fredricks, H., Pedler, B., Dyhrman, S., Karl, D., Koblížek, M., Lomas, M., Mincer, T. J., Moore, L., Moutin, T., i Phytoplank-, al. (2009). *Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity*. <https://doi.org/10.1038/nature07659>
- Van Wambeke, F., Conan, P., Pujo-Pay, M., Taillandier, V., Crispi, O., Pavlidou, A., Nunige, S., Didry, M., Salmeron, C., i Pulido-Villena, E. (2024). Phosphomonoesterase and phosphodiesterase activities in the eastern Mediterranean in two contrasting seasonal situations. *Biogeosciences*, 21(10), 2621–2640. <https://doi.org/10.5194/bg-21-2621-2024>
- Villanova, V., i Spetea, C. (2021). Mixotrophy in diatoms: Molecular mechanism and industrial potential. *Physiologia Plantarum*, 173(2), 603–611. <https://doi.org/10.1111/ppl.13471>
- Villarreal-Chiu, J. F., Quinn, J. P., i McGrath, J. W. (2012). The genes and enzymes of phosphonate metabolism by bacteria, and their distribution in the marine environment. *Frontiers in Microbiology*, 3(JAN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00019>
- Virginia Armbrust, E., Berges, J. A., Bowler, C., Green, B. R., Martinez, D., Putnam, N. H., Zhou, S., Allen, A. E., Apt, K. E., Bechner, M., Brzezinski, M. A., Chaal, B. K., Chiovitti, A., Davis, A. K., Demarest, M. S., Chris Detter, J., Glavina, T., Goodstein, D., Hadi, M. Z., ... Rokhsar, D. S. (2004). *The Genome of the Diatom Thalassiosira Pseudonana: Ecology, Evolution, and Metabolism*. <https://www.science.org>
- Vlašiček, I., Marić Pfannkuchen, D., Smoldaka Tanković, M., Baričević, A., Kužat, N., Knjaz, M., Grižančić, L., Podolšak, I., Kogovšek, T., i Pfannkuchen, M. (2025). Cluster analysis of long-term phytoplankton data from the Northern Adriatic reveals environmental influences and disruptions in seasonal patterns. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 13. <https://doi.org/10.3389/fevo.2025.1498307>
- Vrana, I., Gašparović, B., Geček, S., Godrijan, J., Novak, T., Kazazić, S. P., Mlakar, M., Kužat, N., Pfannkuchen, M., i Pfannkuchen, D. M. (2023). Successful acclimation of marine diatoms *Chaetoceros curvisetus*/pseudocurvisetus to climate change. *Limnology and Oceanography*, 68(S1), S158–S173. <https://doi.org/10.1002/lno.12293>
- Wagner, G. P., Kin, K., i Lynch, V. J. (2012). Measurement of mRNA abundance using RNA-seq data: RPKM measure is inconsistent among samples. *Theory in Biosciences*, 131(4), 281–285. <https://doi.org/10.1007/s12064-012-0162-3>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. <https://ggplot2.tidyverse.org>
- Wilms, S. N. (2021). A Beginner's Guide on Integrating *Omics Approaches to Study Marine Microbial Communities: Details and Discussions From Sample Collection to Bioinformatics Analysis. In *Frontiers in Marine Science* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.692538>

- Worden, A. Z., Lee, J.-H., Mock, T., Rouzé, P., Simmons, M. P., Aerts, A. L., Allen, A. E., Cuvelier, M. L., Derelle, E., Everett, M. v, Foulon, E., Grimwood, J., Gundlach, H., Henrissat, B., Napoli, C., McDonald, S. M., Parker, M. S., Rombauts, S., Salamov, A., ... Grigoriev, I. v. (2009). Green Evolution and Dynamic Adaptations Revealed by Genomes of the Marine Picoeukaryotes *Micromonas*. *Science*, 324(5924), 268–272. <https://doi.org/10.1126/science.1167222>
- Wu, J., Sunda, W., Boyle, E. A., i Karl, D. M. (2000). Phosphate depletion in the western North Atlantic Ocean. *Science*, 289(5480), 759–762.
- Wurch, L. L., Bertrand, E. M., Saito, M. A., van Mooy, B. A. S., i Dyhrman, S. T. (2011). Proteome changes driven by phosphorus deficiency and recovery in the brown Tide-Forming alga *Aureococcus anophagefferens*. *PLoS ONE*, 6(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028949>
- Xu, Y., Wahlund, T. M., Feng, L., Shaked, Y., i Morel, F. M. M. (2006). A novel alkaline phosphatase in the coccolithophore *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) and its regulation by phosphorus. *Journal of Phycology*, 42(4), 835–844. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00243.x>
- Yang, Z. K., Zheng, J. W., Niu, Y. F., Yang, W. D., Liu, J. S., i Li, H. Y. (2014). Systems-level analysis of the metabolic responses of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* to phosphorus stress. *Environmental Microbiology*, 16(6), 1793–1807. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12411>
- Young, C. L., i Ingall, E. D. (2010). Marine dissolved organic phosphorus composition: Insights from samples recovered using combined electrodialysis/reverse osmosis. *Aquatic Geochemistry*, 16(4), 563–574. <https://doi.org/10.1007/s10498-009-9087-y>
- You, Y., Sun, X., i Lin, S. (2023). An ancient enzyme finds a new home: Prevalence and neofunctionalization of trypsin in marine phytoplankton. *Journal of Phycology*, 59(1), 152–166. <https://doi.org/10.1111/jpy.13300>
- You, Y., Sun, X., Ma, M., He, J., Li, L., Porto, F. W., i Lin, S. (2022). Trypsin is a coordinate regulator of N and P nutrients in marine phytoplankton. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31802-6>
- Zavatarelli, M., Baretta, J. W., Baretta-Bekker, J. G., i Pinardi, N. (2000). The dynamics of the Adriatic Sea ecosystem.: An idealized model study. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 47(5), 937–970.
- Zavatarelli, M., Raicich, F., Bregant, D., Russo, A., i Artegiani, A. (1998). Climatological biogeochemical characteristics of the Adriatic Sea. *Journal of Marine Systems*, 18(1–3), 227–263.
- Zhang, S. F., Yuan, C. J., Chen, Y., Chen, X. H., Li, D. X., Liu, J. L., Lin, L., i Wang, D. Z. (2016). Comparative transcriptomic analysis reveals novel insights into the adaptive response of

- Skeletonema costatum to changing ambient phosphorus. *Frontiers in Microbiology*, 7(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01476>
- Zhang, S. F., Yuan, C. J., Chen, Y., Lin, L., i Wang, D. Z. (2019). Transcriptomic response to changing ambient phosphorus in the marine dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense*. *Science of The Total Environment*, 692, 1037–1047. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.07.291>
- Zhang, Y., Lin, X., Shi, X., Lin, L., Luo, H., Li, L., i Lin, S. (2019). Metatranscriptomic signatures associated with phytoplankton regime shift from diatom dominance to a dinoflagellate bloom. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00590>
- Zhao, Y., Li, M. C., Konaté, M. M., Chen, L., Das, B., Karlovich, C., Williams, P. M., Evrard, Y. A., Doroshow, J. H., i McShane, L. M. (2021). TPM, FPKM, or Normalized Counts? A Comparative Study of Quantification Measures for the Analysis of RNA-seq Data from the NCI Patient-Derived Models Repository. *Journal of Translational Medicine*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-021-02936-w>
- Zhuang, Y., Zhang, H., Hannick, L., i Lin, S. (2015). Metatranscriptome profiling reveals versatile n-nutrient utilization, co2 limitation, oxidative stress, and active toxin production in an *Alexandrium fundyense* bloom. *Harmful Algae*, 42(1), 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.12.006>

7. PRILOZI

Prilog 1 Detalji molekularne identifikacije. Ime I nukleotidni slijed – ime početnice kako je definirano u publikacijama te nukleotidni slijed smjera 5'-3'. Barkod – ciljani gen. Barkod regija – ciljana regija unutar gena. Veličina amplikona (pb) – veličina ciljane regije u parovima baza. Referenca – publikacija u kojoj je objavljen slijed početnice. *Zimmermann, J., Jahn, R. i Gemeinholzer, B. Barcoding diatoms: Evaluation of the V4 subregion on the 18S rRNA gene, including new primers and protocols. *Org Divers Evol* 11, 173–192 (2011). Hadziavdic, K. i sur. Characterization of the 18s rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers. *PLoS One* 9, (2014). Scholin, C. A. i sur. Ribosomal DNA sequences discriminate among toxic and non-toxic *Pseudonitzschia* species. *Nat Toxins* 2, 152–165 (1994). Bruder, K. i Medlin, L. K. Molecular assessment of phylogenetic relationships in selected species/genera in the naviculoid diatoms (Bacillariophyta). I. The genus *Placoneis*. *Nova Hedwigia* 85, 331–352 (2007). Alverson, A. J. Molecular Systematics and the Diatom Species. *Protist* 159, 339–353 (2008).

Ime i nukleotidni slijed	Barkod	Barkod regija	Veličina amplikona (pb)	Referenca*
D512for, 5'-ATTCCAGCTCCAATAGCG-3'	18 S rRNA	V4	≈ 400	Zimmerman i sur. 2011.
D978rev, 5'-GACTACGATGGTATCTAATC-3'				
F-566, 5'-CAGCAGCCGCGGTAATTCC-3'	18 R rRNA	V4-V5	≈ 650	Hadziavdic i sur. 2014.
R-1200, 5'-CCCGTGTTGAGTCAAATTAAG -3'				
D1R, 5'-ACCCGCTGAATTTAAGCATA-3'	28 S rRNA	D1-D3	≈ 800	Scholin i sur. 1994., Bruder i Medlin 2007.
D3Ca, 5'-ACGAACGATTGACAGTCAG-3'				
rbcl66+, 5'-TTAAGGAGAAATAAATGTCTCAATCTG-3'	rbcl	5' end region	≈ 800	Alverson 2008., MacGillivray i Kaczmarzka 2011.
Dtrbcl3R, 5'-ACACCWGACATACGCATCCA-3'				

Prilog 2 Rezultati PERMANOVA analize za procjenu utjecaja pripadnosti vrsti na funkcionalni sastav transkriptoma. Tablica uključuje stupnjeve slobode (Df), zbroj kvadrata (SumsOfSqs), srednje kvadrate (MeanSqs), F-statistiku (F.Model), udio objašnjene varijance (R²) i značajnost (P vrijednost). Analiza pokazuje da pripadnost vrsti ima značajan utjecaj na funkcionalni sastav (P vrijednost = 0,01).

PERMANOVA REZULTATI – vrsta					
Factor	Df	SumOfSqs	R2	F	P vrijednost
Model	4	0.760913	0.814106	5.474279	0.002
Residual	5	0.173747	0.185894	NA	NA
Total	9	0.934661	1	NA	NA

Prilog 3 Rezultati PERMANOVA analize za procjenu utjecaja eksperimentalnog uvjeta na funkcionalni sastav transkriptoma. Tablica uključuje stupnjeve slobode (Df), zbroj kvadrata (SumsOfSqs), srednje kvadrata (MeanSqs), F-statistiku (F.Model), udio objašnjene varijance (R^2) i značajnost (P vrijednost). Analiza pokazuje da eksperimentalni uvjet nema značajan utjecaj na funkcionalni sastav (P vrijednost = 0,97).

	REZULTATI PERMANOVA - eksperimentalni uvjet				
	Df	SumOfSqs	R2	F	P vrijednost
Model	1	0.030725	0.032873	0.271926	0.97
Residual	8	0.903935	0.967127	NA	NA
Total	9	0.934661	1	NA	NA

Prilog 4 Rezultati PERMANOVA analize za procjenu utjecaja sezone na funkcionalni sastav fitoplanktonske zajednice i šest promatranih fitoplanktonskih grupa zasebno. Tablica uključuje stupnjeve slobode (Df), zbroj kvadrata (SumsOfSqs), srednje kvadrata (MeanSqs), F-statistiku (F.Model), udio objašnjene varijance (R^2) i značajnost (P vrijednost). Analiza pokazuje da postaja nema značajan utjecaj na sastav fitoplanktona, budući da su sve p-vrijednosti neznačajne (P vrijednost < 0,05).

	PERMANOVA RESULTS - season						
Grupa	Factor	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F,Model	R^2	P vrijednost
Fitoplanktonska zajednica (6 fito grupa)	season	3	0,464620627	0,154874	5,052525	0,431133	0,001
	Residuals	20	0,613054064	0,030653	NA	0,568867	NA
	Total	23	1,077674691	NA	NA	1	NA
Dinoflagellata	season	3	1,228054712	0,409352	18,13328	0,731182	0,001
	Residuals	20	0,451492093	0,022575	NA	0,268818	NA
	Total	23	1,679546804	NA	NA	1	NA
Bacillariophyta	season	3	1,978994012	0,659665	5,919134	0,470303	0,001
	Residuals	20	2,22892288	0,111446	NA	0,529697	NA
	Total	23	4,207916892	NA	NA	1	NA
Ostali Ochrophyta	season	3	1,192027064	0,397342	3,469818	0,34231	0,001
	Residuals	20	2,290277631	0,114514	NA	0,65769	NA
	Total	23	3,482304695	NA	NA	1	NA
Haptophyta	season	3	1,08287915	0,36096	3,403014	0,337947	0,001
	Residuals	20	2,121411958	0,106071	NA	0,662053	NA
	Total	23	3,204291108	NA	NA	1	NA
Chlorophyta	season	3	0,727682207	0,242561	3,818087	0,364156	0,001
	Residuals	20	1,270587875	0,063529	NA	0,635844	NA
	Total	23	1,998270082	NA	NA	1	NA
Cryptophyta	season	3	1,029521993	0,343174	3,325954	0,332841	0,001
	Residuals	20	2,06361247	0,103181	NA	0,667159	NA
	Total	23	3,093134463	NA	NA	1	NA

Prilog 5 Rezultati PERMANOVA analize za procjenu utjecaja postaje na funkcionalni sastav fitoplanktonske zajednice i šest promatranih fitoplanktonskih grupa zasebno. Tablica uključuje stupnjeve slobode (Df), zbroj kvadrata (SumsOfSqs), srednje kvadrate (MeanSqs), F-statistiku (F.Model), udio objašnjene varijance (R^2) i značajnost (P vrijednost). Analiza pokazuje da postaja nema značajan utjecaj na sastav fitoplanktona, budući da su sve p-vrijednosti neznačajne (P vrijednost > 0,05).

	PERMANOVA REZULTATI - postaja						
Grupa	Factor	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F,Model	R ²	P vrijednost
Fitoplanktonska zajednica (6 fito grupa)	station	1	0,018948	0,018948	0,393743	0,017583	0,999
	Residuals	22	1,058726	0,048124	NA	0,982417	NA
	Total	23	1,077675	NA	NA	1	NA
Dinoflagellata	station	1	0,011322	0,011322	0,149315	0,006741	0,995
	Residuals	22	1,668224	0,075828	NA	0,993259	NA
	Total	23	1,679547	NA	NA	1	NA
Bacillariophyta	station	1	0,063691	0,063691	0,338111	0,015136	0,999
	Residuals	22	4,144226	0,188374	NA	0,984864	NA
	Total	23	4,207917	NA	NA	1	NA
Ostali Ochrophyta	station	1	0,078326	0,078326	0,506221	0,022493	0,991
	Residuals	22	3,403979	0,154726	NA	0,977507	NA
	Total	23	3,482305	NA	NA	1	NA
Haptophyta	station	1	0,066721	0,066721	0,467837	0,020823	0,999
	Residuals	22	3,13757	0,142617	NA	0,979177	NA
	Total	23	3,204291	NA	NA	1	NA
Chlorophyta	station	1	0,03584	0,03584	0,401784	0,017935	0,996
	Residuals	22	1,96243	0,089201	NA	0,982065	NA
	Total	23	1,99827	NA	NA	1	NA
Cryptophyta	station	1	0,087387	0,087387	0,639613	0,028252	0,938
	Residuals	22	3,005747	0,136625	NA	0,971748	NA
	Total	23	3,093134	NA	NA	1	NA

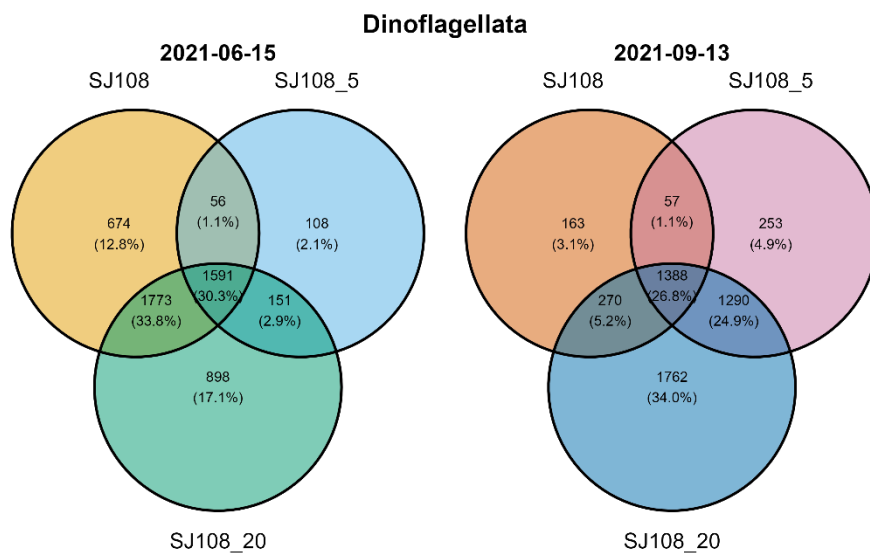
Prilog 6 Rezultati testa značajnosti RDA modela, procijenjeni pomoću ANOVA analize. Tablica uključuje stupnjeve slobode (Df), varijancu, F-vrijednost i značajnost (P vrijednost). Oznake značajnosti: 0 ‘’, 0.001 ‘***’, 0.01 ‘’, 0.05 ‘.’ i 0.1 ‘.’**

Grupa	Faktor	Df	Varijanca	F-vrijednost	P vrijednost	Oznaka značajnosti
Dinoflagellata	Model	5	13245,4	4,8216	0,001	***
	Residual	18	9889,6			
Bacillariophyta	Model	5	6656,6	1,4731	0,001	***
	Residual	18	16267,2			
Ostali Ochrophyta	Model	5	8784,5	1,5549	0,001	***
	Residual	18	20339			
Haptophyta	Model	5	8153,4	1,6116	0,001	***
	Residual	18	18213,1			
Chlorophyta	Model	5	8675,7	1,6808	0,001	***
	Residual	18	18581,5			
Cryptophyta	Model	5	8664,4	1,573	0,001	***
	Residual	18	19829			

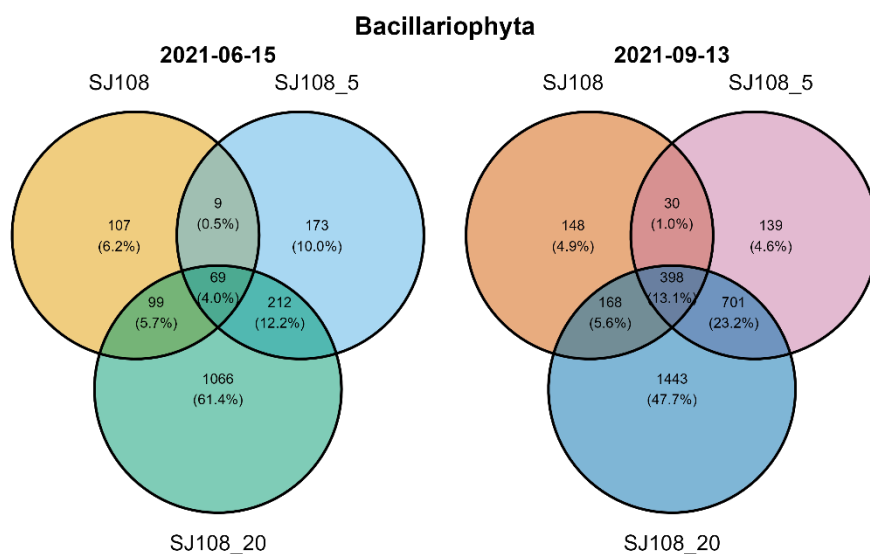
Prilog 7 Rezultati testa značajnosti utjecaja okolišnih parametara (objašnjavajućih varijabli) RDA modela, procijenjeni pomoću ANOVA analize. Okolišne varijable uključuju temperaturu (°C), koncentraciju otopljenog anorganskog dušika (DIN), koncentraciju ortosilikata (SiO₄), salinitet (Sal) i ukupnu koncentraciju fosfora (Total_P). Tablica uključuje stupnjeve slobode (Df), varijancu, F-vrijednost i značajnost (P vrijednost). Oznake značajnosti: 0 “, 0.001 “***”, 0.01 “”, 0.05 “.” i 0.1 “.”**

Grupa	Okolišni parametar	Df	Varijanca	F-vrijednost	P vrijednost	Oznaka značajnosti
Dinoflagellata	DIN	1	572,6	1,0422	0,327	
	SiO ₄	1	5733,5	10,4355	0,001	***
	Total_P	1	1811,9	3,2977	0,028	*
	°C	1	3879,8	7,0615	0,002	**
	Sal	1	1247,6	2,2708	0,07	,
	Residual	18	9889,6			
Bacillariophyta	DIN	1	1074,8	1,1893	0,12	
	SiO ₄	1	1504,1	1,6643	0,001	***
	Total_P	1	1434,5	1,5873	0,002	**
	°C	1	1299,2	1,4376	0,007	**
	Sal	1	1343,9	1,4871	0,005	**
	Residual	18	16267,2			
Ostali Ochrophyta	DIN	1	1308,8	1,1583	0,13	
	SiO ₄	1	2137,6	1,8918	0,001	***
	Total_P	1	1815,3	1,6066	0,001	***
	°C	1	1670,2	1,4781	0,006	**
	Sal	1	1852,6	1,6395	0,002	**
	Residual	18	20339			
Haptophyta	DIN	1	1162,8	1,1492	0,139	
	SiO ₄	1	2156,7	2,1314	0,001	***
	Total_P	1	1661	1,6415	0,001	***
	°C	1	1580,3	1,5618	0,005	**
	Sal	1	1592,7	1,574	0,001	***
	Residual	18	18213,1			
Chlorophyta	DIN	1	1205	1,1673	0,167	
	SiO ₄	1	2222,4	2,1529	0,001	***
	Total_P	1	1784,4	1,7285	0,004	**
	°C	1	1657,4	1,6056	0,004	**
	Sal	1	1806,5	1,75	0,001	***
	Residual	18	18581,5			
Cryptophyta	DIN	1	1241,1	1,1266	0,188	
	SiO ₄	1	2203,2	1,9999	0,001	***
	Total_P	1	1771,5	1,6081	0,003	**
	°C	1	1643,3	1,4917	0,006	**
	Sal	1	1805,4	1,6389	0,003	**
	Residual	18	19829			

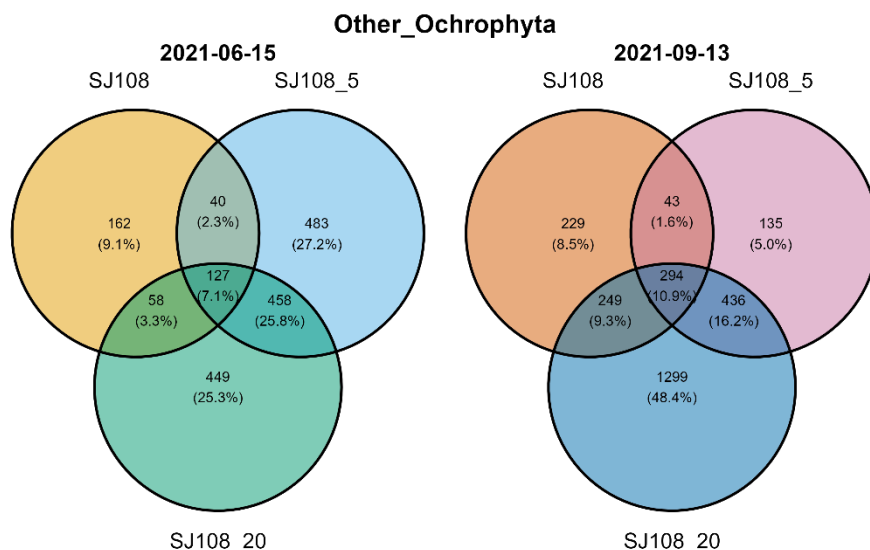
Prilog 8 Prikaz broja KEGG.KO anotacija u metatranskriptomima grupe Dinoflagellata dobivenih različitim metodom uzorkovanja na postaji SJ108 u lipnju i rujnu. SJ108 – planktonska mreža, SJ108_5 – Niskinov crpac (5 m), SJ108_20 – Niskinov crpac (20 m).



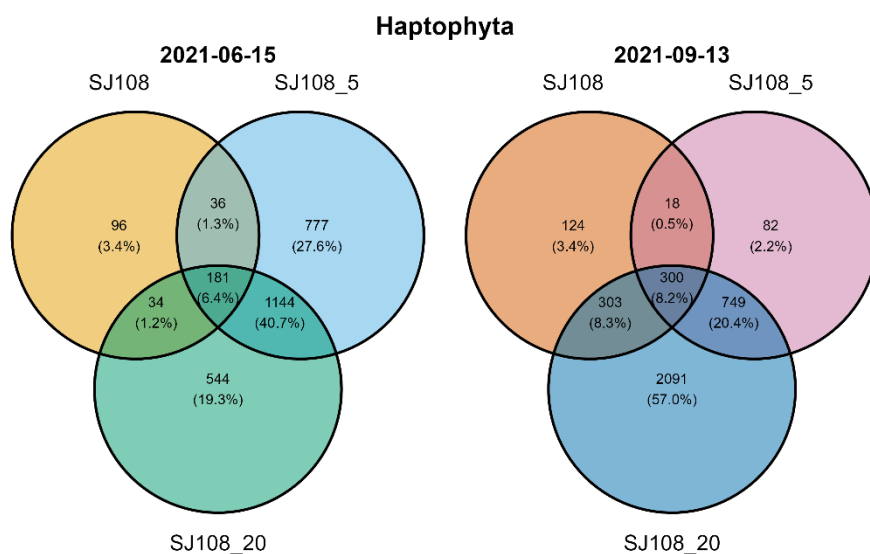
Prilog 9 Prikaz broja KEGG.KO anotacija u metatranskriptomima grupe Bacillariophyta dobivenih različitim metodom uzorkovanja na postaji SJ108 u lipnju i rujnu. SJ108 – planktonska mreža, SJ108_5 – Niskinov crpac (5 m), SJ108_20 – Niskinov crpac (20 m).



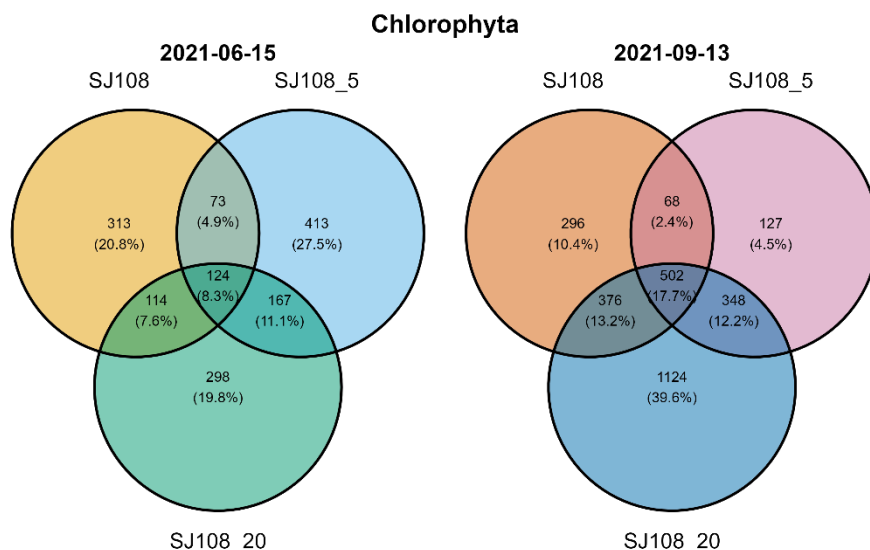
Prilog 10 Prikaz broja KEGG.KO anotacija u metatranskriptomima grupe ostali Ochrophyta dobivenih različitim metodom uzorkovanja na postaji SJ108 u lipnju i rujnu. SJ108 – planktonska mreža, SJ108_5 – Niskinov crpac (5 m), SJ108_20 – Niskinov crpac (20 m).



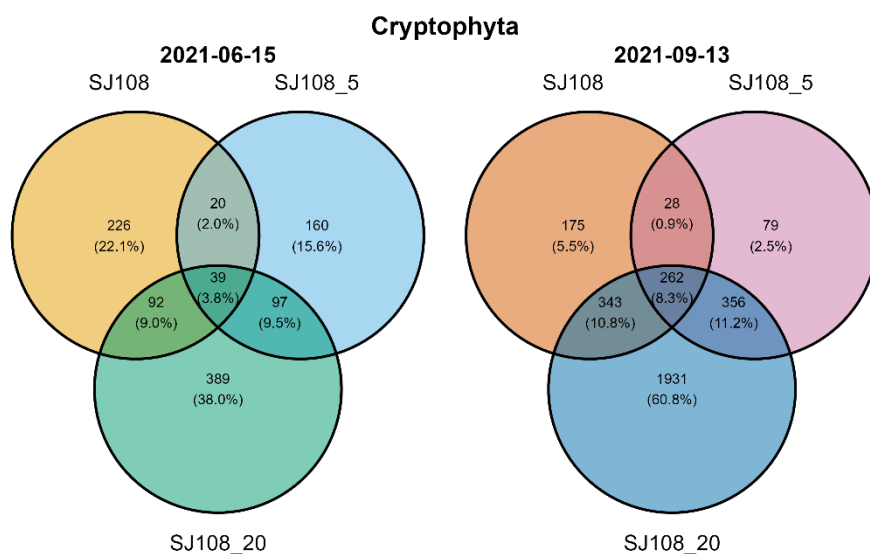
Prilog 11 Prikaz broja KEGG.KO anotacija u metatranskriptomima grupe Haptophyta dobivenih različitim metodom uzorkovanja na postaji SJ108 u lipnju i rujnu. SJ108 – planktonska mreža, SJ108_5 – Niskinov crpac (5 m), SJ108_20 – Niskinov crpac (20 m).



Prilog 12 Prikaz broja KEGG.KO anotacija u metatranskriptomima grupe Chlorophyta dobivenih različitim metodom uzorkovanja na postaji SJ108 u lipnju i rujnu. SJ108 – planktonska mreža, SJ108_5 – Niskinov crpac (5 m), SJ108_20 – Niskinov crpac (20 m).



Prilog 13 Prikaz broja KEGG.KO anotacija u metatranskriptomima grupe Cryptophyta dobivenih različitim metodom uzorkovanja na postaji SJ108 u lipnju i rujnu. SJ108 – planktonska mreža, SJ108_5 – Niskinov crpac (5 m), SJ108_20 – Niskinov crpac (20 m).



8. ŽIVOTOPIS

Mia Knjaz rođena je 16.7.1995. u Zagrebu. Osnovno i srednjoškolsko obrazovanje završava u Zagrebu, nakon čega upisuje Preddiplomski studij Biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Godine 2017. stječe zvanje „Sveučilišna prvostupnica biologije, univ. bacc. biol.” te upisuje diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Zoologija. Godine 2020. stječe zvanje “Magistra eksperimentalne biologije, *mag. biol. exp.*.” Godine 2021. zapošljava se kao asistentica u Laboratoriju za evolucijsku ekologiju Centra za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković, i to na projektu Hrvatske zaklade za znanost *Molekularne životne strategije fitoplanktona u Jadranu – ADRILife* (UIP -2020-02-7868). Iste godine nastavlja školovanje na Interdisciplinarnom doktorskom studiju iz Oceanologije na Geološkom odjelu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Daniele Marić Pfannkuchen i dr. sc. Ane Baričević. Prva je autorica na jednoj, a koautorica na četiri znanstvene publikacije objavljene tijekom dokorskog studija. Za vrijeme dokorskog studija sudjelovala je na jednoj domaćoj i tri međunarodne radionice na temu bioinformatičke obrade te genomike. Sudjelovala je na tri međunarodna kongresa kao prva autorica to na usmenim priopćenjima i posteru. Također je sudjelovala na pet međunarodnih kongresa kao koautorica na usmenim priopćenjima ili posterima.

CRORIS PROFIL: Mia Knjaz (CroRIS ID: 46046, MBZ: 407333)

Publikacije u časopisima:

Knjaz, Mia; Baričević, Ana; Smolaka Tanković, Mirta; Kužat, Nataša; Vlašiček, Ivan; Grižančić, Lana; Podolšak, Ivan; Pfannkuchen, Martin; Kogovšek, Tjaša; Marić Pfannkuchen, Daniela First regional reference database of northern Adriatic diatom transcriptomes // Scientific reports, 14 (2024), 16209, 18. doi: 10.1038/s41598-024-67043-4

Vlašiček, Ivan; Marić Pfannkuchen, Daniela; Smolaka Tanković, Mirta; Baričević, Ana; Kužat, Nataša; Knjaz, Mia; Grižančić, Lana; Podolšak, Ivan; Kogovšek, Tjaša; Pfannkuchen, Martin Cluster analysis of long-term phytoplankton data from the Northern Adriatic reveals environmental influences and disruptions in seasonal patterns // Frontiers in ecology and evolution, 13 (2025), -, 15. doi: 10.3389/fevo.2025.1498307

Baričević, Ana; Kogovšek, Tjaša; Smolaka Tanković, Mirta; Grižančić, Lana; Knjaz, Mia; Vlašiček, Ivan; Podolšak, Ivan; Kužat, Nataša; Pfannkuchen, Martin; Marić Pfannkuchen, Daniela Coastal Eukaryotic Plankton Diversity of the Southern Adriatic as Revealed by Metabarcoding // Diversity, 16 (2024), 5; 293, 19. doi: 10.3390/d16050293

Grižančić, Lana; Baričević, Ana; Smolaka Tanković, Mirta; Vlašiček, Ivan; Knjaz, Mia; Podolšak, Ivan; Kogovšek, Tjaša; Pfannkuchen, Martin; Marić Pfannkuchen, Daniela A metabarcoding based (species) inventory of the northern Adriatic phytoplankton // Biodiversity data journal, 11 (2023), e106947, 50. doi: 10.3897/BDJ.11.e106947

Baričević, Ana; Marić Pfannkuchen, Daniela; Smolaka Tanković, Mirta; Knjaz, Mia; Vlašiček, Ivan; Grižančić, Lana; Kogovšek, Tjaša; Pfannkuchen, Martin Identification of the heterotrophic nanoflagellate *Bilabrum latius* in the southern Adriatic (Mediterranean Sea) // European journal of protistology, 90 (2023), 125999, 9. doi: 10.1016/j.ejop.2023.125999

Sažeci sa skupova:

Knjaz, Mia; Baričević, Ana; Grižančić, Lana; Vlašiček, Ivan; Podolšak, Ivan; Smolaka Tanković, Mirta; Kogovšek, Tjaša; Pfannkuchen, Martin; Marić Pfannkuchen, Daniela Molecular characterization of the northern Adriatic (Mediterranean Sea) diatom community - the comprehensive approach // Molecular Life of Diatoms 7 San Diego (CA), Sjedinjene Američke Države, 16.07.2023-20.07.2023

Knjaz, Mia; Baričević, Ana; Smodlaka Tanković, Mirta; Kužat, Natasa; Vlašiček, Ivan; Grižančić, Lana; Podolšak, Ivan; Pfannkuchen, Martin; Kogovšek, Tjaša; Marić Pfannkuchen, Daniela First regional reference database of northern Adriatic diatom transcriptomes // Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 75, S1, 2024. str. 32-32

Baričević, Ana; Smodlaka Tanković, Mirta; Marić Pfannkuchen, Daniela; Kogovšek, Tjaša; Grižančić, Lana; Vlašiček, Ivan; Knjaz, Mia; Podolšak, Ivan; Pfannkuchen, Martin Omics in the service of characterising the eukaryotic plankton community in the Adriatic Sea // AquaEcOmics meeting: exploring aquatic ecology through omics. March 17-20, 2025. Program and abstracts booklet / AquaEcOmics meeting (ur.). Entrepôt-Catalogue Recherche Data Gouv, 2025. str. 79-80

Grižančić, Lana; Baričević, Ana; Smodlaka Tanković, Mirta; Vlašiček, Ivan; Knjaz, Mia; Podolšak, Ivan; Kogovšek, Tjaša; Pfannkuchen, Martin; Marić Pfannkuchen, Daniela; Net or Niskin: sampling method most suitable for the northern Adriatic phytoplankton monitoring // AquaEcOmics meeting: exploring aquatic ecology through omics. March 17-20, 2025. Program and abstracts booklet / AquaEcOmics meeting (ur.). Entrepôt-Catalogue Recherche Data Gouv, 2025

Pfannkuchen, Martin; Baričević, Ana; Smodlaka Tanković, Mirta; Grižančić, Lana; Vlašiček, Ivan; Knjaz, Mia; Podolšak, Ivan; Kogovšek, Tjaša; Marić Pfannkuchen, Daniela Genomics in coastal oceanography // Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 75, S1, 2024. str. 79-79

Vlašiček, Ivan; Knjaz, Mia; Smodlaka Tanković, Mirta; Baričević, Ana; Kogovšek, Tjaša; Grižančić, Lana; Podolšak, Ivan; Kužat, Nataša; Pfannkuchen, Martin; Daniela Marić Pfannkuchen Cluster analysis reveals different HAB-related species assemblages in the northern Adriatic // 20th International Conference on Harmful Algae, ICHA 2023 : HAB Science and Human Well-being : Abstract book. Hiroshima, Japan: International Society for the Study of Harmful Algae (ISSHA), 2023. str. 25-25

Marić Pfannkuchen, Daniela; Baričević, Ana; Smodlaka Tanković, Mirta; Kužat, Nataša; Vlašiček, Ivan; Knjaz, Mia; Podolšak, Ivan; Grižančić, Lana; Vrana, Ivna; Ujević, Ivana i sur. Genus Pseudo-nitzschia: The physiology of success in a highly structures and dynamic phytoplankton ecosystem // 20th International Conference on Harmful Algae, ICHA 2023 : HAB Science and

Human Well-being : Abstract book. Hiroshima, Japan: International Society for the Study of Harmful Algae (ISSHA), 2023. str. 160-160

Grižančić, Lana; Baričević, Ana; Smolaka Tanković, Mirta; Vlašićek, Ivan; Knjaz, Mia; Podolšak, Ivan; Kogovšek, Tjaša; Pfannkuchen, Martin; Marić Pfannkuchen, Daniela Marine environmental DNA metabarcoding for northern Adriatic phytoplankton monitoring // Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 75, S1, 2024. str. 128-128

Grižančić, Lana; Baričević, Ana; Marić Pfannkuchen, Daniela; Smolaka Tanković, Mirta; Kogovšek, Tjaša; Vlašićek, Ivan; Knjaz, Mia; Podolšak, Ivan; Pfannkuchen, Martin A metabarcoding based (species) inventory of the northern Adriatic phytoplankton // "Scientific Opportunities for a Global Algal Revolution" : Program and Book of Abstracts of the 8th European Phycological Congress / Connan, Solène; Creis, Emeline; Jacquemin, Bertrand i sur. (ur.). Brest: Federation of European Psychological Societies (FEPS), 2023. str. 215-216

Baričević, Ana; Smolaka Tanković, Mirta; Marić Pfannkuchen, Daniela; Kogovšek, Tjaša; Grižančić, Lana; Vlašićek, Ivan; Knjaz, Mia; Podolšak, Ivan; Hervat, Martina; Pfannkuchen, Martin; Brijuni National Park (Adriatic Sea, Croatia) phytoplankton biodiversity assessment // "Scientific Opportunities for a Global Algal Revolution" : Program and Book of Abstracts of the 8th European Phycological Congress / Connan, Solène; Creis, Emeline; Jacquemin, Bertrand i sur. (ur.). Brest: Federation of European Psychological Societies (FEPS), 2023. str. 202-202

Pfannkuchen, Martin; Baričević, Ana; Smolaka Tanković, Mirta; Kužat, Nataša; Vlašićek, Ivan; Knjaz, Mia; Podolšak, Ivan; Grižančić, Lana; Kogovšek, Tjaša; Marić Pfannkuchen, Daniela; The ecology of *Ostreopsis ovata* spreading along the rocky coast of the eastern Adriatic // 20th International Conference on Harmful Algae, ICHA 2023 : HAB Science and Human Well-being : Abstract book. Hiroshima, Japan: International Society for the Study of Harmful Algae (ISSHA), 2023. str. 251-251

Marić Pfannkuchen, Daniela; Grižančić, Lana; Baričević, Ana; Knjaz, Mia; Vlašićek, Ivan; Podolšak, Ivan; Smolaka Tanković, Mirta; Kogovšek, Tjaša; Pfannkuchen, Martin The ecology of genetic diversity in the northern Adriatic Sea // Molecular Life of Diatoms 7 San Diego (CA), Sjedinjene Američke Države, 16.07.2023-20.07.2023

Radionice i znanstveno usavršavanje:

Tečajevi SRCA: Upoznavanje sa sintaksom jezika R i njegova primjena u osnovnoj statističkoj i grafičkoj analizi podataka (S721) (20 školskih sati)

EMBO event: Evolutionary and Comparative Genomics from 03 – 06 November 2024 in Nafplion, Greece

Physalia courses: RNAseq in R/Bioconductor ” (8 contact hours (1 ECTS).

Physalia courses: Metagenomics, metatranscriptomics , and multi'omics for microbial community studies ” (35 contact hours 3.5 ECTS).