

UNIVERZITET CRNE GORE

PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Vijeću Prirodno-matematičkog Fakulteta

PREDMET: Izvještaj komisije o master radu pod nazivom „Dokazivanje prisustva jegulje (*Anguilla anguilla*) i šarana (*Cyprinus carpio*) u slatkovodnim ekosistemima uz pomoć tehnike eDNK.

Na CVIII sjednica Vijeća Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta Crne Gore, održanoj 12. decembar, imenovana je Komisija za pregled i ocjenu magistarskog rada pod naslovom „Dokazivanje prisustva jegulje (*Anguilla anguilla*) i šarana (*Cyprinus carpio*) u slatkovodnim ekosistemima uz pomoć tehnike eDNK“ kandidatkinje Kristine Kračković. Na osnovu pregledanog rada i uslova utvrđenih Zakonom o visokom školstvu i Statutom Univerziteta Crne Gore, podnosimo sljedeći:

IZVJEŠTAJ

Analiza magistarskog rada:

Rad je prikazan na 61 stranici i sadrži sledeća poglavlja: Sažetak, Abstrakt, Uvod, Ciljeve, Materijali i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključak i Literatura. U radu se nalaze 17 slika i 5 tabela. Poglavlje Literatura sadrži 101 referencu.

Postavljeni ciljevi rada:

Osnovni motiv ovog istraživanja proizilazi iz potrebe da se testira nova tehnika eDNA (environmental DNA) na crnogorskim vodama, naročito na našem najvećem jezeru - Skadarskom jezeru. Environmental DNA tehnika pripada neinvazivnim metoda utvrđivanja prisustva vrsta u nekom ekosistemu na osnovu ostatka/fragmenata DNK koje ta vrsta ostavlja u životnoj sredini. Stoga je bilo od velikog interesa da se ta metoda primijeni na dvije vrste riba koje naseljavaju vode NP „Skadarsko Jezero“. Takođe je bilo od interesa i da se testira osjetljivost ove tehnike na koncentraciju DNK ali i da se utvrdi da li je pouzdana za jezera koja imaju veliku protočnost odnosno veći broj izmjena ukupne vodene mase u toku jednogodišnjeg ciklusa. Na kraju je bilo potrebno da se utvrdi da li količina uzorkovane vode može da utiče na rezultate testiranja.

Primijenjene metode:

U cilju ostvarenja prethodno zacrtanih ciljeva uzorci vode su sakupljeni u ljetnjem periodu od 25 jula do 10 septembra 2023 godine. Prosječna temperatura vode bila je oko 22 °C, dok je prosječna temperatura vazduha bila 35°C, sa prosječno jačinom vjetra 6 km/h. Uzorci vode sakupljeni su sa lokaliteta: **Koljeno** (42°11'31.9" N 19°17'16.2" E), **Grlo Zetičke rijeke** (42°15'52.8" N 19°13'08.3" E), **Čisti jasen** (42°25'35.1" N 19°18'23.9" E), **izvorište manastira Kom** (42°18'33.4" N 19°07'37.9" E) (Slika 9). Za potrebe ovog istraživanja u bazenu ukupne zapremine 3.85 m³, (2m x 2,5 m x 0,75 m), smo 25 dana držali 4 jedinke šarana prosječne težine 2.5 kg kako bi se nakon tog perioda uzela voda iz ovog basena i testirala eDNA metodom na prisustvo šarana. eDNK metoda prikupljanja i obrade uzoraka obuhvata nekoliko tehnika: filtraciju, precipitaciju i centrifugiranje. Filtriranje uzoraka je izvršeno u roku od 24h od njihovog sakupljanja.

Tokom procesa filtracije, uzorci vode zapremine 5 l, filtrirani su kroz celulozno-nitratni filter papir sa veličinom pora 47 mm, 0.8 µm, uz pomoću Membran vakumpumpe (ROTILABO® CR-MV100), (Slika 11). Zapremina alikvota kod Membran vakum pumpe je bila 250 ml, tako da su svih 5 l sakupljene vode po uzorku, filtrirani kroz jedan filter papir. Nakon završetka filtracije uzorka, sva oprema za filtriranje je isprana sa vodom iz česme, a potom i destilovanom vodom u

cilju sprečavanja unakrsne kontaminacije, ponavljajući ovaj postupak nakon svakog obrađenog uzorka. Vodeći računa o sterilnosti i sprečavanju kontaminacije, uz pomoću čistih rukavica i sterilne pincete filter papiri su prebačeni u zasebne zip kesice, a potom skladišteni u frižideru.

Ekstrakcija eDNK je proces uz pomoću koga se oslobađa DNK iz netaknute ćelije ili organele, koje su sastavni dio uzoraka sakupljenih iz životne sredine. Osnovni koraci tokom izolovanja molekula DNK su: priprema uzorka, liziranje, vezivanje DNK, ispiranje i elucija. Prilikom ekstrakcije eDNK korišćen je DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany), prateći Quick-Start protokol, 1b. Nonnucleated blood.

Prije samog početka ekstrakcije, svaki filter papir je bio isjeckan uz pomoću sterilnih makaza na fragmente veličine 1mm x 5 mm, koji su potom stavljani u Eppendorf tubice od 1.5 ml, koje su obilježene istim brojem kao i filter papir. Upotrijebljeno je smo ¼ filter papira.

Nakon završene pripreme uzoraka, slijedi liziranje, kada se u Eppendorf tube sa komadićima filter papira doda 20 µl proteinaze K čija je uloga da odvoji histone od molekula DNK, a potom 200 µl lizirajućeg AL pufera. Slijedi vorteksiranje par sekundi na vorteksu Microspin 12, i inkubacija na inkubatoru Termomixer comfort (Eppendorf) na 56 °C sat vremena do potpune lize. Po završetku inkubacije, u tubicu je dodato 200 µl etanola (96-100%), uz pomoću kojeg se vezuju niti DNK, zatim se blago vorteksira kako bi se sve homogenizovalo.

Sljedeći korak je ispiranje nukleinske kiseline, kada se sadržaj iz Eppendorf tube najprije ispipetira u DNeasy Mini spin kolumnu koja je ubačena u kolekcionu tubu od 2 ml, a potom ostavi da se iscentrifugira na $\geq 6000 \times g$. Stara kolekciona tuba se odbacuje, dok se DNeasy Mini spin kolumna prebacuje u novu kolekcionu tubu od 2ml, uz dodavanje 500 µl AW1, a potom se centrifugira 1 min na 13,000 rpm. Slijedi isti postupak odbacivanja stare i uzimanje nove kolekcione tube, uz dodavanje 500 µl AW2. Iznova je izvršeno centrifugiranje na 20,000 x g (14,000 rpm), 3 minuta. Odbacuje se kolekciona tuba, a DNeasy spin kolumna se prebacuje u novu mikrocentrifugalnu tubu od 1.5 ml ili od 2 ml.

Na samom kraju slijedi rastvaranje DNK, dodavanjem 200 µl AE pufera, a potom se ostavi da odstoji 1 minut na sobnoj temperaturi, a na samom kraju se iscentrifugira 1 minut na $\geq 6000 \times g$.

DNeasy spin kolumna se odbacuje, dok rastvor DNK ostaje u mikrocentrifugalnoj tubi od 1.5 ml.

Kao pozitivna kontrola korišćena je rastvor DNK dobijen izolacijom iz tkiva (peraja) šarana i jegulje. DNK je izolovana uz pomoću DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden,

Germany), prateći Quick- Start protokol, 1a. Tissue, po uzoru na rad Takahara et al., 2014. Proces izolacije DNK iz peraja je isti za obje vrste. Tokom istraživanja koristena je i pozitivna proba koja je dobijena izolovanjem DNK i komada peraja krapa i jegulje, kao i negativna proba. Za potrebe ovog istraživanja napravljena su i razblaženja uzoraka krapa i jegulje i cilju određivanja minimalne količine koncentracije DNK ovih jedinki koja se može detektovati. Stoga su napravljena razblaženja u razmjeri 10:90, 5:95, 2:98, 0.5:99.5, za šarana.

Sekvence prajmera koje su korišteni za PCR reakcije za vrste *Anguilla anguilla* i *Cyprinus carpio* dobijeni su od NCBI Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). Prajmeri za vrstu *Anguilla anguilla* su identifikovani koristeći funkcije NCBI primer- Blast features koji su vizuelno optimizovani za qPCR (Weldon et al., 2020), dok su za detekciju DNK šarana korišteni prajmeri koje su dizajnirali Židek & Golian (2008).

Nakon eDNK ekstrakcije, izmjerena je koncentracija DNK u svakom uzorku uz pomoću Qubit 3 fluorometra sa dsDNA HS assay kit-om. Za identifikaciju specifičnih markera dvije vrste *Cyprinus carpio* i *Anguilla anguilla* korišteni su specifični prajmeri: Carp1-F (5'TGGCATCTGGTTCCTATTTC-3'), Carp1-R (5'CCAAAGGGGGGCACTATGTAA-3') za šarana, Ang1-F 5'-3' TTGCCCTATTCTACCCGAACC, Ang 2-R 5'-3' ACAAGGCTAATACCCCGCC, za jegulju. Sve PCR amplifikacione reakcije su izvedene u ukupnoj zapremini od 30 µl uključujući: 1 µl prajmera R i prajmera F, 0.5 µl dNTP, 3 µl MgCl₂, 3 µl puffera BD, 8 µl dH₂O, 8 µl Solution S, 0.5 DNA polymerase i 5 µl DNK. PCR reakcije su pripremane odvojeno za šaran i jegulju, koristeći se prajmerima specifičnim za istraživanu vrstu.

Termalni ciklus na PCR-u za jegulju bio je: inicijalna denaturacija 2 minuta na 50 °C, potom 10 minuta na 95 °C, zatim 60 ciklusa po 30 sekundi na 95 °C i 30 sekundi na 60 °C, pri čemu je vrijeme trajanja ovog termalnog ciklusa bilo 2 sata i 17 minuta (Hinlo et al., 2017).

Termalni ciklus za šarana traje 4 sata i 14 minuta i bio je postavljen po sledećim uslovima: inicijalna denaturacija 2 minuta na 48 °C, 5 minuta na 95 °C, zatim 50 ciklusa po 30 sekundi na 95 °C, 1 minut na 60 °C, 1 minut i 20 sekundi na 72 °C, kao i finalna ekstenzija 10 minuta na 72 °C (Bajzik et al., 2012). Nakon završetka PCR reakcija, produkti amplifikacije su očitavani opet uz pomoću Qubit 3 fluorometra sa dsDNA HS assay kit-om.

Na kraju produkti PCR reakcija su vizualizovani uz pomoć elektroforeze na agaroznom gelu. Gel za elektroforezu je napravljen uz pomoć 0.9 g i 60 ml SB pufera kao i vrlo malo SYBR® Safe DNA Stain (fluorescentna boja koja se vezuje za molekul DNK). Provjera uspješnosti PCR reakcije se nakon završene elektroforeze provjeravala na UV Transiluminatoru.

Dobijeni rezultati:

U poglavlju Rezultati predstavljeni su rezultati analize testiranih uzoraka. Pokazalo se da je cDNK tehnikom je moguće potvrditi prisustvo jegulje i šarana u Skadarskom jezeru sa tim što je za šarana bila manje efikasna. cDNK tehnika se pokazala kao vrlo osjetljiva u odnosu na poziciju i način to jeste dubinu uzorkovanja. Suštinski cDNK tehnika se pokazuje kao neefikasna za velika jezera velike protočnosti kao što je Skadarsko jezero dok je sudeći prema do sada objavljenim podacima cDNK tehnika je pogodna za manja jezera, veće lokve i močvare gdje ne postoji veliki stepen izmjene vodenih masa. Količina izlovane cDNK iz vode je direktno zavisna od kompleksnosti ekosistema odnosno od njegovog bogatstva vrstama ali i od godišnjeg doba. Takođe se pokazalo da način uzorkovanja za cDNK tehniku mora biti prilagođena biologiji i ponašanju ciljne vrste koja se želi potvrditi. Potvrda prisustva ili odsustva određene vrste u akvatičnom ekosistemu zavisi od koncentracije njene DNK u uzorku vode dok je u ukupno izolovanoj cDNA neophodno je da bude što veći udio fragmenata DNK ciljne vrste, ali još bitnije je da ti fragmenti sadrže specifična mjesta vezivanja prajmera, kako bi imali pozitivnu PCR reakciju i potvrdu te vrste. Pretpostavljamo da je za analizu prisustva vrsta iz ekosistema veće protočnosti i površine, potrebno upotrijebiti neku od NGS metode (next generation sequencing) obrade dobijene cDNK

Zaključak i predlog Komisije:

Nakon pregledanog magistarskog rada, analize rezultata i značaja ostvarenih istraživanja, Komisija konstatuje da rad zadovoljava sve uslove naučno-istraživačkog rada. Zadana tema ovog rada je naučno aktuelna i na savremen način obrazložena. Prikazano istraživanje je dalo značajne rezultate o potencijalima ali i ograničenjima upotrebe cDNA tehnike za crnogorske vodne ekosisteme.

Na osnovu izloženog, Komisija predlaže Vijeću Prirodno-matematičkog fakulteta u Podgorici, da rad kandidatkinje Jovane Drobnjak, pod naslovom „**Dokazivanje prisustva jegulje (*Anguilla anguilla*) i šarana (*Cyprinus carpio*) u slatkovodnim ekosistemima uz pomoć tehnike eDNK**“ prihvati kao master rad i odobri javnu usmenu odbranu.

Podgorica, 14.02.2024. god.

Komisija:

1. Dr Dragana Milošević Malidžan, redovni profesor, PMF, član



2. Dr Anđelka Šćepanović, vanredni profesor, PMF, član



3. Dr Danilo Mrdak, vanredni profesor, PMF, mentor

