

SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU  
ODJEL ZA AKVAKULTURU  
DIPLOMSKI STUDIJ MARIKULTURA

Ana Čučević

**Kariološko istraživanje školjkaša zanimljivih za marikulturu**

DIPLOMSKI RAD

Mentori:  
prof. dr. sc. Branko Glamuzina  
dr. sc. Ákos Horváth

Dubrovnik, listopad 2009.

Ovaj diplomski rad izrađen je pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Branka Glamuzine i dr. sc. Ákosa Horvátha, u sklopu diplomskog studija Marikultura na Odjelu za akvakulturu Sveučilišta u Dubrovniku.

Zahvaljujem se svojim mentorima prof. dr. sc. Branku Glamuzini i dr. sc. Ákosu Horváthu na pomoći i vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada.

Također se zahvaljujem i dr. sc. Eszter Patakiné Várkonyi na susretljivosti i nesebičnom pomaganju.

## **Kariološko istraživanje školjkaša zanimljivih za marikulturu**

### **SAŽETAK**

Proučavanje kromosoma provedeno je na jedinkama vrsta europska plosnata kamenica, *Ostrea edulis*, dagnja, *Mytilus galloprovincialis*, kunjka, *Arca noae*, prnjavica, *Venus verrucosa*, kućica, *Ruditapes decussatus*, srčanka, *Cerastoderma glaucum* i kokoška, *Chamelea galina*. Za izradu preparata kromosoma korištena je uobičajena metoda s citostatikom kolhicinom i bojanje s Giemsa bojom. Uzorci su izrađeni od tkiva škrga i plašta te ličinka kod kamenice. Diploidni broj kromosoma utvrđen je za kamenicu,  $2n = 20$  s 5 metacentričnih, 4 submetacentrična i 1 subtelocentričnim parom kromosoma. Prvi put je kod kamenice utvrđena pojava subtelocentričnih kromosoma i izrada preparata kromosoma kod ličinka kamenice. Uzorci kromosoma srčanke pokazali su najveći diploidni broj kromosoma  $2n = 38$  kod 8 uzoraka. Usپoredbom s ranijim istraživanjima kariotipova srodnih vrsta iz reda Veneroida, kod kojih je diploidni broj utvrđen i iznosi  $2n = 38$ , a zbog malenog broja uzoraka pretpostavljeno je da je i diploidni broj kromosoma kod vrste *C. glaucum*  $2n = 38$ . Broj kromosoma kod ove vrste do sada nije bio utvrđen. Također je utvrđen i broj kromosoma kod kućice,  $2n = 38$ . Uzorci kromosoma ostalih vrsta sadržavali su kromosome zarobljene u plazmi, slabo vidljive i nebrojive kromosome te nisu napravljeni kariogrami.

Ključne riječi: kromosomi/ kariotip/ kariogram

## **Karyology research of shellfish interesting for mariculture**

### **ABSTRACT**

Chromosome studies were performed on species European flat oyster, *Ostrea edulis*, mussel, *Mytilus galloprovincialis*, Noah's arc, *Arca noae*, Venus shell, *Venus verrucosa*, grooved carpet shell, *Ruditapes decussatus*, common cockle, *Cerastoderma glaucum* and striped Venus, *Chamelea galina*. For chromosomal preparation a conventional technique with citostatic colchicine and Giemsa staining was used. Chromosome preparation was conducted on gill and mantle tissues as well as larvae of oysters. Diploid chromosome number of  $2n = 20$  was confirmed for *O. edulis*. Its karyotype consists of 5 metacentric, 4 submetacentric and 1 subtelocentric chromosomes. This is the first record of a subtelocentric chromosome pair and the first report of chromosome preparation in larvae for this species. Eight chromosome preparations of *C. glaucum* showed a diploid chromosome number  $2n = 38$ . Following a comparison with other species in the order Veneroida (which all share the same chromosome number of 38) the diploid number of  $2n = 38$  was confirmed for *C. glaucum*. This is a first record of chromosome number for *C. glaucum*. Also, diploid chromosome number of  $2n = 38$  was confirmed for grooved carpet shell. Chromosome samples of other species showed chromosomes captured in plasma, poorly visible and uncountable chromosomes.

Keywords: chromosome/ karyotype/ karyogram

# **SADRŽAJ**

1. UVOD .....	1
1.1. Dosadašnja kariološka istraživanja školjkaša.....	1
1.2. Struktura i građa kromosoma .....	3
1.3. Identifikacija kromosoma.....	6
1.4. Nomenklatura kromosoma prema položaju centromere.....	8
1.5. Ciljevi i svrha istraživanja .....	10
2. MATERIJAL I METODE.....	11
3. REZULTATI .....	15
4. RASPRAVA .....	23
5. ZAKLJUČCI .....	26
6. LITERATURA .....	27

## 1. UVOD

Kariologija je znanstvena disciplina koja se bavi proučavanjem značajki kromosoma. Analiza kromosoma važna je za identificiranje pojedinih vrsta organizama i proučavanje njihove filogenije, te također za otkrivanje promjena broja i morfologije kromosoma.

Kromosome je prvi puta opisao Karl Wilhelm von Nägeli 1842. godine na biljnim stanicama te kod životinjskih stanica Walther Flemming 1882. godine. Napretkom genetike početkom 20 st. otkriveno je da su kromosomi nositelji gena. Levitsky je prvi definirao pojam kariotip kao fenotipski izgled somatskih kromosoma (1931).

Skup svih kromosoma u jednoj stanci čini njezin kariotip. Kariotip svih stanica jednog organizma u pravilu je jednak, pa govorimo o kariotipu nekog organizma ili vrste. Kariotipovi različitih vrsta mogu se znatno razlikovati. Ako želimo shematski prikazati kariotip izrađujemo kariogram. To je crtež ili fotografija kromosoma koji su poredani prema dogovorenom sustavu. Kromosomi se precrtaju s preparata (uz pomoć aparata za crtanje, jer njihove dimenzije moraju biti točne) ili mikrofotografije i poredamo parove homolognih kromosoma po veličini. Shematsko prikazivanje kromosoma, da bi se jasnije prikazale karakteristike i razlike između pojedinih kromosoma, naziva se idiogram. Danas postoje programi pomoću kojih se brzo i pouzdano obrađuje mikroskopska slika pomoću računala.

### 1.1. Dosadašnja kariološka istraživanja školjkaša

Školjkaši imaju iznimno važan ekonomski značaj no istraživanja njihovih kromosoma nisu brojna. Kariološka istraživanja su napravljena za nekoliko vrsta školjkaša koje spadaju u podrazred Heterodonta i Pteriomorphia (Ieyama, 1980; Vitturi i sur., 2000). Podrazredu Pteriomorphia pripadaju redovi Arcoida, Mytiloida, Ostreoida i Pterioida. Kod reda Mytiloida najveći broj istraživanja proveden je za rod *Mytilus* porodice Mytilidae (Dixon i Flavel, 1986; Thiriot-Quievreux i Insua, 1992; Insua i sur., 1994; Martinez-Lage i sur., 1997). Opisane su vrste *Mytilus galloprovincialis* s  $2n = 28$  (Thiriot-Quievreux, 1984), *M. edulis* s  $2n = 28$  (Ahmed,

1970), *M. trossulus* s  $2n = 28$  (González-Tizón, 2000), *M. californianus* s  $2n = 28$  (Ahmed, 1970). Red Ostreoida uključuje i porodice Ostreidae i Pectinidae koje uključuju ekonomski značajne vrste školjkaša. Unutar Ostreidae 5 vrsta je prethodno kariološki proučavano i sve vrste imaju diploidni broj kromosoma  $2n = 20$  : *O. edulis* (Thiriot-Quiévreux 1984), *O. denselamellosa* (Insua i Thiriot-Quiévreux 1991), *O. puelchana* (Insua i Thiriot-Quiévreux 1993), *O. chilensis* (Landron de Guevara i sur. 1994) i *O. angasi* (Li i Havenhand 1997). *Crassostrea gigas* kao predstavnica podporodice Crassostreinae također ima diploidni broj kromosoma 20 (Thiriot-Quiévreux 1986). Kod porodice Pectinidae do sada je 17 vrsta kariološki istraženo: *Aequipecten opercularis*,  $2n = 26$  (Insua i sur., 1998), *Argopecten i. irradians*,  $2n = 32$  (Wang i Guo, 2004), *Argopecten purpuratus*,  $2n = 32$  (Gajardo i sur., 2002; Von Brand i sur., 1990), *Chlamys gabra*,  $2n = 28$  (Rasotto i sur., 1981), *Euvola ziczac*,  $2n = 38$  (Basoa i sur., 2000), *Nodipecten nodosus*,  $2n = 38$  (Pauls i Alfonso, 2000; Basoa i sur., 2000), *Pecten albicans*,  $2n = 38$  (Komaru i Wada, 1985; Ieyama, 1975), *Pecten jacobeus*,  $2n = 38$  (Rasotto i sur., 1981), *Pecten maximus*,  $2n = 38$  (Beaumont i Gruffydd, 1974), *Placopecten magellanicus*,  $2n = 38$  (Xiang i sur., 1993), *Azumpecten farreri*,  $2n = 38$  (Wang i Guo, 2004; Komaru i Wada, 1985), *Chlamys islandica*,  $2n = 38$  (Beaumont i Gruffydd, 1974), *Chlamys varia*,  $2n = 38$  (Beaumont i Gruffydd, 1974), *Hinnites distortus*,  $2n = 38$  (Beaumont i Gruffydd, 1974; López-Piñón i sur., 2005), *Patinopecten yessoensis*,  $2n = 38$  (Komaru i Wada, 1985), *Mimachlamys nobilis*,  $2n = 32$  (Komaru i Wada, 1985) i *Adamussium colbecki*,  $2n = 38$  (Odierna i sur., 2005).

Predstavnik reda Arcoida je kunjka, *Arca noae* koja je zanimljiva za marikulturu, a čiji kromosomi do sada nisu istraženi.

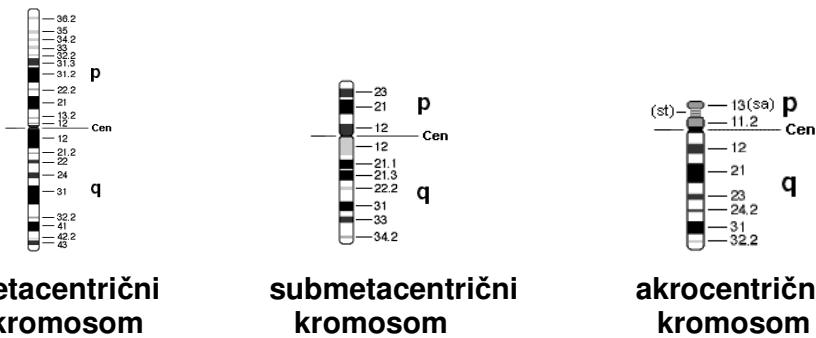
Podrazredu Heterodonta pripadaju redovi Veneroida i Myoida. Red Veneroida uključuje 2 porodice, Cardiidae i Veneridae s više vrsta od komercijalnog značaja. Proučavanja kromosoma izvršena su na 4 vrste iz porodice Cardiidae i 12 vrsta iz porodice Veneridae uključujući vrste kokoška, *Chamelea galina*, prnjavica, *Venus verrucosa* i kućica, *Ruditapes decussatus* (Menzel i Menzel, 1965; Menzel, 1968; Gerard, 1978; Rasotto i sur., 1981; Koulman i Wolff, 1977; Corni i Trentini, 1986; 1990). Diploidni broj kromosoma kod kućice i prnjavice iznosi  $2n = 38$  (Borsa i sur., 1990; Ebied i Aly, 2004). Jednak diploidni broj  $2n = 38$  je potvrđen i za kokošku (Corni i Trentini, 1986). Utvrđen je i kariotip za vrste *Cerastoderma edule* (Cardiidae),  $2n = 38$  (Koulman i Wolff, 1977), *Venerupis pullastra* (Veneridae)  $2n = 38$  (Insua A. i sur.

1992), *V. rhomboides* (Veneridae),  $2n = 38$  (Insua A. i sur. 1992), *V. aurea* (Borsa i sur. 1990),  $2n = 38$  i *Ruditapes philippinarum* (Borsa i sur. 1990),  $2n = 38$ . Diploidni broj kromosoma srčanke, *Cerastoderma glaucum* nije utvrđen.

Ovi podaci se odnose na istraživanja provedena diljem svijeta dok kariološka Istraživanja školjkaša na istočnoj obali Jadranskog mora do sada nisu provedena.

## 1.2. Struktura i građa kromosoma

Kromosom čine dvije sestre kromatide (desna i lijeva polovica kromosoma) podijeljene na gornji (p) i donji (q) krak, na kojima su smješteni geni. Točka spajanja sestara kromatida zove se primarna konstrikcija (primarno suženje) ili centromera koja sadrži strukturu kinetohoru (pričvrsnicu) koja služi za kretanje kromosoma i njihovo odvajanje tijekom diobe. Centromeru tvori heterokromatinski blok od više repetativnih sekvenci različitih po broju parova baza za svaki kromosom. Centromera kontrolira razdvajanje kromosoma u mejozi i mitozi ali je i glavna oznaka raspoznavanja kromosoma. Centromera dijeli kromosom na dva kraka, pa njezin položaj određuje duljinu krakova. Kad se centromera nalazi u sredini (medijano) i dijeli kromosom na dva jednakih dijela, tj. oba kraka su jednako dugačka kromosom se zove metacentrični. Ako se centromera nalazi blizu jednog kraja kromosoma (submedijano) i ako su njegovi kraci nejednaki (jedan krak je nešto duži od drugoga) kromosom je telocentrični (submetacentrični). Telomera je završni dio kraka p i q, važna za stabilnost i replikabilnost kromosoma. Akrocentrični kromosomi imaju centromeru na kraju dugog kraka (subterminalno), dok je kratki krak sveden na sasvim mali dio koji ponekad nosi i satelite (trabante). Regije tzv. nukleolusne organizacije (engl. nucleolus organizing region, NOR) čine specijalnu strukturu akrocentričnih kromosoma bogatu ribosomnim genima (rDNK) te su one držak satelitima ili trabantima. Heitz 1931. govori o ulozi sekundarnog suženja, a Mc Clintok 1934. sekundarno suženje naziva regijom nukleolusne organizacije



Slika 1. Vrste kromosoma prema položaju centromere

Oblik kromosoma specifičan je za svaku vrstu. Kromosomi mogu biti veliki i mali.

Rani snimci kromosoma, dobiveni elektronskim mikroskopom, pokazali su vrlo složen splet, naizgled neorganiziranih niti. Dugo se nagađalo na kakav su način različite molekule međusobno organizirane u kromosomima. 1871. god. Miescher je izolirao jezgre iz stanica i pokazao da im je glavni sastojak tvar koju je nazvao nuklein. Daljnja analiza jezgrine tvari je pokazala da je važan sastavni dio jezgre, odnosno kromosoma nukleinska kiselina DNK. Kromosomi nisu sastavljeni samo od nukleinske kiseline DNK. Citokemijskim postupcima Brachet je 1942. godine dokazao i postojanje druge nukleinske kiseline RNK, a kratko vrijeme nakon toga Mirsky i Pollister (1946) pokazali su da su i bjelančevine sastavni dio kromosoma. Odvajanjem stanica i izoliranjem pojedinih vrsta molekula dokazano je da kromosomi sadrže četiri glavne skupine molekula: DNK, RNK, bjelančevine histone i nehistonske bjelančevine.

Kromosomi postoje u različitim organizacijskim stanjima u različitim fazama životnog ciklusa stanice što se može dokazati pokusom pomoću citokemije i autoradiografije. Ovi pokusi pokazuju da se kromosomi sintetiziraju, ali se ne vide u jednoj fazi životnog ciklusa stanice, te da im se temeljito mijenja organizacija kad stanica uđe u proces diobe zbog čega postaju vidljivi tj., dolazi do kondenziranja i zgrušavanja kromosomske tvari kromatina. Kromatin je osnovni sastavni dio kromosoma. Biokemijska zapažanja pokazala su da je kromatin sastavljen iz velikog broja jednakih jedinica. Elektronskim mikroskopom vidjelo se da je kromatin sastavljen od velikog broja zrnaca (perlica, agregata) nanizanih na niti nazvanih niti tjelešca ili nukleosomi (Olins, 1973). Promjer nukleosoma je 6-8 nm, a niti koja ih spaja 1-5 nm. Nukleosomi sadrže DNK i histone. Prisustvo histona je prvi otkrio Casperson 1950. godine. Svaki nukleosom se sastoji od osam molekula histona i to po dvije molekule svakog od četiri različita histona: H2A, H2B, H3 i H4. Peti histon H1 je uključen u povezivanje nukleosoma. Histoni čine česticu oko koje je navijena molekula DNK.

Kromatin se dijeli na eukromatin i heterokromatin. Eukromatinske regije su specifični dijelovi s određenim načinom kondenzacije i posebnim osobinama pri bojenju. Eukromatin čini uglavnom kromosomske krake i većina dosad poznatih gena smještena je u eukromatinskim regijama kratkog i dugog kromosomskog kraka.

Eukromatin se odnosi na jedinstvenu transkripcijski aktivnu DNA koja se replicira u ranoj S fazi staničnog ciklusa.

Heterokromatin se odnosi na visoko kondenziranu DNA koja se replicira u kasnoj S fazi staničnog ciklusa i zauzima karakterističan smještaj na kromosomima (centromerni, pericentromerni, interkalarni i telomerni smještaj). Heterokromatin je genetički neaktiviran. On ostaje kondenziran tijekom interfaze u staničnoj diobi. Funkcionalno postoje dvije vrste heterokromatina: konstitutivni (strukturni) (KH) i fakultativni heterokromatin. Fakultativni heterokromatin je kromatin koji je prešao u neaktivno stanje i karakterizira ga nejednoliki stupanj kondenziranosti homolognih kromosoma ili homolognih kromosomskih područja. Konstitutivni heterokromatin se pojavljuje na istim mjestima homolognih parova kromosoma. Konstitutivni heterokromatin je vidljiv u interfazi kao tamno obojena područja (kromocentri) nakon bojanja jezgri bojom Giemsa zahvaljujući trajnoj kondenzaciji kroz stanični ciklus. Međusobni odnos količine i rasporeda heterokromatina duž kromosoma karakterističan je za svaku vrstu i u pravilu se znatno razlikuje između srodnih vrsta. Konstitutivni heterokromatin stvaraju visoko repetitivne DNA sekvene koje se ne transkribiraju, ali se repliciraju u kasnoj S-fazi stanične diobe. Obično se nalazi u području centromere, kratkim kracima akrocentričnih kromosoma i u području sekundarnih konstrikcija kromosoma.

Regije heterokromatina mogu varirati veličinom, smještajem, načinom bojanja od stanice do stanice iste jedinke. Te heterokromatinske varijantne nasleđuju se u pravilu dominantno.

Faza stanične diobe u kojoj kromosomi dostignu maksimalno zgrušavanje je metafaza. Metafazni kromosomi su različitih veličina i oblika; mogu varirati od malenih zrnatih promjera 0.2 µm do dugih štapičastih 10 µm dugih i 2 µm širokih. Osim primarnog centromernog suženja, jedan ili nekoliko kromosoma mogu imati još jedno sekundarno suženje koje je uključeno u organiziranju i sintezi jezgrice. U normalnim uvjetima sve stanice organizma, osim spolnih stanica, sadrže istu garnituru kromosoma u kojoj su uvijek po dva kromosoma jednaka (homologni kromosomi). Iznimka su spolni kromosomi kada jedan spol ima dva jednakata spolna kromosoma, dok drugi spol ima dva različita spolna kromosoma. Ukupna garnitura kromosoma zove se diploidni broj. Polovica tog broja, tj. broj kromosoma koji se nalaze u gametama je haploidni broj. U haploidnom stanju je po jedan kromosom svakog homolognog para (Berns M., 1997).

Promjene na kromosomima tzv. kromosomske abnormalnosti mogu biti numeričke i strukturne. Mogu biti vezane za autosome ili za gonosome. Haploidan i diploidan broj kromosoma čine euploidiju. Ako je broj kromosoma umanjen ili povećan to se stanje naziva heteroploidija. Aneuploidija je pojava da je haploidan ili diploidan set kromosoma povećan ili smanjen za jedan ili više kromosoma na jednom ili više kromosomskih parova. Posljedica aneuploidije je pojava monosomije, trisomije, tetrasomije. Aneuploidije su nepoznata uzroka, a učinak su nerazdvajanja tijekom mejoze ili mitoze kromosoma. Poliploidije označavaju uvišestručenje čitavog haploidnog broja kromosoma. Strukturne promjene kromosoma otkrivaju se sve češće zahvaljujući boljim metodama pruganja (delecija, prstenasti kromosom, izokromosom, inverzija, duplikacija, translokacija...)(Zergollern Lj. I sur. 1994).

### **1.3. Identifikacija kromosoma**

U početku su se kromosomi određivali Moorheadovom tehnikom bojanja kromosoma koji su bili podijeljeni u 7 skupina na osnovi morfoloških karakteristika kao što su veličina i položaj centromere. Za bojanje kromosoma koristila su se uobičajena citološka bojila poput acetokarmina, heksatoksilina, Leishmanova bojila, Wrightova bojila i Feulgenova bojila. Za bojanje kromosoma danas se koriste Romanovsky bojila koja uključuju boje Giemsa, Leishman i Wright. Najčešće se koristi uobičajena tehnika bojanja s Giemsa bojom koja jednoliko boja kromosome a centromere ostaju stisnute što omogućava mjerjenje duljine kromosoma, položaj centromere i omjer krakova.

Glavna prekretnica u razvoju citogenetike nastupa uvođenjem tehnika pruga početkom 70-ih godina (Caspersson i sur. 1971) kojima se kromosomi mogu definirati prema karakterističnom rasporedu pruga duž kromosomske osi. Ovom metodom se pomoću kvinakrinskih boja koje se vezuju izravno na DNK dobivaju pruge, brojem i širinom specifične za svaki kromosom. Tom se metodom postiže bolji uvid u kromosomske homologe koji su bez tehnike pruganja bili teško razlučivani. Ovisno o pripremi kulture tkiva dobivaju se razne vrste pruga. Svaka tehnika pruganja vezana je za samo određene kromosomske regije (G-metoda boji kromatide; T-metoda telomere , NOR-metoda centromere).

Svaki kromosom ima određeni uzorak pruganja što omogućuje razlikovanje pojedinih kromosoma unutar kariotipa. Pomoću tehnike pruganja svaki kromosom

pokazuje cijelom duljinom svjetlige i tamnije pruge koje predstavljaju eukromatinska i heterokromatinska područja kromosoma, te su se bolje identificirati ne samo cijeli kromosomi, već i njihovi pojedini dijelovi, tj. omogućeno je otkrivanje velikog broja dotada neotkrivenih kromosomske aberacija.

Metode pruganja mogu se podijeliti prema načinu bojanja (apsorbcijsko i fluorescencijsko bojanje). Za razliku od tehnika fluorescencijskog bojanja kod kojih se u većini slučajeva koristi jednostavno bojanje fluorescencijskim bojama (fluorokromima), ostale tehnike pruganja uključuju neku vrstu predtretmana prije bojanja.

Najčešće korišteno pruganje kromosoma je G-pruganje. G-pruganje je metoda u kojoj se kromosomi tretiraju tripsinom, a nakon toga boje ljubičastom bojom Giemsa. Svaki homologni par ima jedinstveni profil G-pruga što omogućuje prepoznavanje pojedinih kromosoma u kariotipu. Tretirani kromosomski preparati analiziraju se pod svjetlosnim mikroskopom. Pregleda se 15-20 metafaznih stanica te im se odredi broj kromosoma. Za detaljnu analizu izabere se najmanje 5 najkvalitetnijih metafaznih ploča. Detaljna analiza temelji se na usporedbi svake pruge na jednom kromosomu s prugom homolognog kromosoma. Nakon mikroskopske analize fotografiraju se najkvalitetnije metafazne stanice. Izrežu se svi kromosomi i poslože u parove prema veličini i uzorku pruganja u kariotip (Seabright, 1971).

Osim G-pruganja koriste se također još i C- pruganje, Q- pruganje, T- pruganje i R- pruganje, te NOR- bojanje i DAPI/Distamycin A bojanje. C-pruganjem dobiju se rezultati bojanjem preparata Giemsa bojom nakon tretmana s NaOH. Pruge koje se dobiju predstavljaju konstitutivni heterokromatin u području centromera (Sumner, 1972). Kod Q-pruganja kromosomi se tretiraju s fluorescentnom bojom kako bi se odredili specifični kromosomi i njihove strukturne promjene (Sumner, 1972). T-pruganje se koristi za bojanje područje telomera na kromosomu kako bi se provele citogenetičke analize (Dutrillaux 1973).

R-pruganje obuhvaća dvije vrste pruganja: RHG (Giemsa Reverse Banding) i AO pruganje (Acridin Orange). RHG pruganje se koristi za analizu delecija i translokacija. Ova tehnika uključuje inkubaciju stakalaca u vrućem fosfatnom puferu sa Giemsa bojom. Kromosomi na ovaj način pokazuju tamno obojane R pruge i slabo vidljive G pruge. R pruge su bogate GC-regijama dok su AT-regije uništene zbog topline.

AO-pruganje se provodi pomoću Acridin Orange fluorokroma koji se vezuje na DNK. Kod NOR-bojanja se kromosomi tretiraju sa otopinom srebro-nitrata koja se vezuje za regije nukleolarnog organizatora (NOR-Nucleolar Organizing Regions) tj., sekundarna suženja akrocentričnih kromosoma (Verma i sur., 1976).

DAPI/Distamycin A bojanje se koristi kod identifikacije pericentromernih točaka kod promjena kromosoma i kod identifikacije jako malih kromosoma koje je nemoguće bojati standardnim tehnikama.

Različite tehnike bojanja kromosoma također su primjenjivane kod citogenetičkih proučavanja različitih vrsta školjkaša (Rodriguez-Romero et al., 1979; Dixon et al., 1986; Insua i Thiriot-Quievreux, 1991; Li i Heavenhand, 1997).

#### **1.4. Nomenklatura kromosoma prema položaju centromere**

Najčešća morfološka karakteristika kromosoma koja se koristi za karakterizaciju kromosoma je položaj centromere.

Položaj centromere izračunava se pomoću ukupne duljine kromosoma (c), duljine dugog kraka (l) i duljine kratkog kraka (s) kao razlika

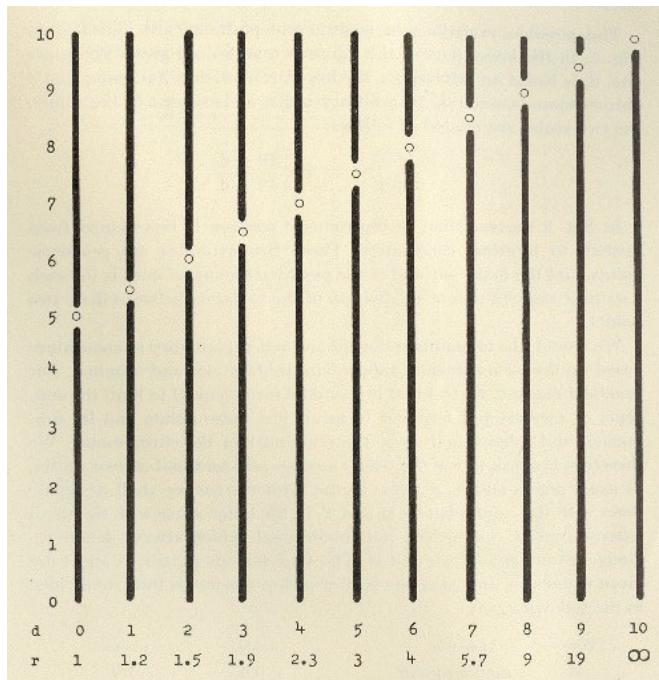
$$d = l - s$$

ili u obliku omjera

$$r = l / s \quad (r = \text{ratio})$$

Omjer između krakova obično se računa kao centromerni indeks  $i = 100 s / c$ .

Moguće varijacije u položaju centromere prikazane su na slici 3. (Levan i sur., 1964). U donjem dijelu slike nalaze se dvije skale, gornja d koja se temelji na izračunu razlika i donja r koja se temelji na izračunu omjera.



Slika 3. Varijacije u položaju centromere

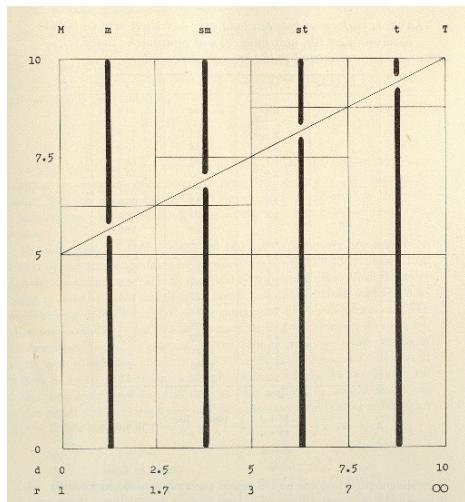
Slika 3. prikazuje različite položaje centromere između dvije točke, medijane (M) i terminalne (T), te je glavna svrha nomenklature omogućiti prikladnu podjelu kromosoma s obzirom na položaj centromere između ove dvije točke.

Između medijane i terminalne točke postoje 4 regije: medijana (m), submedijana (sm), subterminalna (st) i terminalna regija (t), a njihove d i r vrijednosti su dane u tablici 1.

Tablica 1. Medijana (m), submedijana (sm), subterminalna (st) i terminalna regija (t), i njihove d i r vrijednosti.

Naziv	Položaj	d vrijednost	r vrijednost
M	medijana točka	0.0	1.0
m	medijana regija	0.0-2.5	1.0-1.7
sm	submedijana regija	2.5-5.0	1.7-3.0
st	subterminalna regija	5.0-7.5	3.0-7.0
t	terminalna regija	7.5-10.0	7.0-∞
T	terminalna točka	10	∞

Na slici 4. (Levan isur., 1964) prikazane su karakteristične vrste kromosoma za svaku od 4 regije.



Slika 4. raspon promjena položaja centromere podijeljen na 4 regije: m, sm, st i t; svaka regija ima karakterističan kromosom.

### 1.5. Ciljevi i svrha istraživanja

Svrha ovog rada je dobijanje podataka o broju i vrsti kromosoma kod različitih vrsta školjkaša koji obitavaju u Jadranskom moru. Istraživanje je provedeno na populaciji školjkaša s dvije lokacije na području južnog Jadrana: Malostonski zaljev i ušće rijeke Neretve. Broj kromosoma kod srčanke i kunjke do sada nije utvrđen, te je jedan od ciljeva ovog proučavanja bio odrediti taj broj. Kariološko opisivanje ovih vrsta značajno bi doprinjelo identificiranju vrsta i razumijevanju filogenetskih odnosa s drugim srodnim vrstama.

Također je jedan od ciljeva ovog istraživanja bilo ponovavljanje postupka određivanja broja kromosoma kod različitih vrsta školjkaša kod kojih je utvrđivanje broja kromosoma već provedeno (kamenica, dagnja, prnjavica, kokoška i kućica) u svrhu izrade kariograma ove populacije.

Određivanje diploidnog broja tj., ploidije kod školjkaša koji imaju ekonomsku važnost značajno je radi mogućnosti križanja i dobijanja jedinka s točno određenim stupnjem ploidije u svrhu poboljšanja karakteristika bitnih kod komercijalnog uzgoja.

Rezultati ovakvog istraživanja od velike su važnosti radi mogućnosti usporedbe sa ranije provedenim istraživanjima i određivanja mogućih razlika u kariotpu istih vrsta kod različitih populacija.

## 2. MATERIJAL I METODE

Za određivanje broja kromosoma prikupljene su jedinke odraslih školjkaša kamenice, *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758) (30 komada), dagnje, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) (14 komada), kunjke, *Arca noae* (Linnaeus, 1758) (15 komada), prnjavice, *Venus verrucosa* (Linnaeus, 1758) (16 komada), kućice, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758) (12 komada), srčanke, *Cerastoderma glaucum* (Poiret, 1789) (3 komada) i kokoške, *Chamelea galina* (Linnaeus, 1758) (5 komada). Jedinke kamenice, dagnje i kunjke su dobivene iz Malostonskog zaljeva, dok su jedinke prnjavice, kućice, srčanke i kokoške prikupljene sa ušća rijeke Neretve. Jedinke kunjke prikupljene su na području Malostonskog zaljeva. Proučavanje je obuhvatilo četiri pokusa, tri su provedena na odraslim jedinkama školjkaša dok je posljednji proveden na ličinkama kamenice.

Za određivanje broja kromosoma korištena je metoda C-mitoze u kojoj se koristi citostatik kolhicin koji spriječava formiranje diobenog vretena, pa stoga u metafazi mitoze izostaje nakupljanje kromosoma u ekvatorijalnoj ravnini. Maksimalno spiralizirani kromosomi ostaju razbacani po stanici (metafazna ploča) i stoga ih je moguće izbrojiti i analizirati njihovu morfologiju.

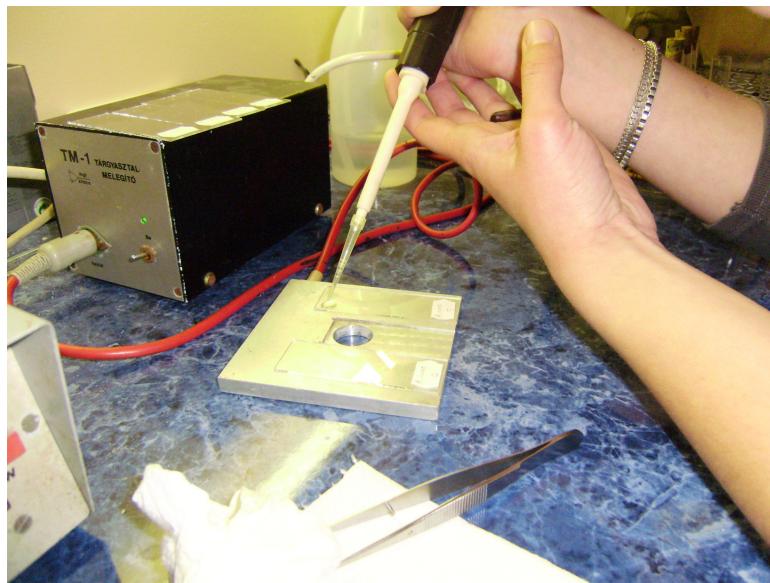
### Pokus 1

Za prvi pokušaj određivanja broja kromosoma korištene su 3 jedinke kamenice, 7 jedinka dagnje, 7 jedinka kunjke, 8 jedinka prnjavice, 6 jedinka kućice i 2 jedinke kokoške. Jedinke su smještene u akvarij s 20 l morske vode i aeracijom.

Jedinke su izložene tretmanu kolhicinom 0,004% u trajanju od 12 sati. Nakon tretmana kolhicinom sekcijom su uzeti uzorci tkiva škrga. Uzorci su stavljeni u hipotoničnu otopinu 0,9 % natrij-citrata u trajanju od 40 minuta. Tkivo je zatim fiksirano u fiksativu 75 ml metanola i 25 ml acetatne kiseline (3:1) i fiksativ je tri puta, svakih 20 minuta, izmjenjivan. Fiksirano tkivo korišteno je za izradu preparata kromosoma na vrućem stakalcu.

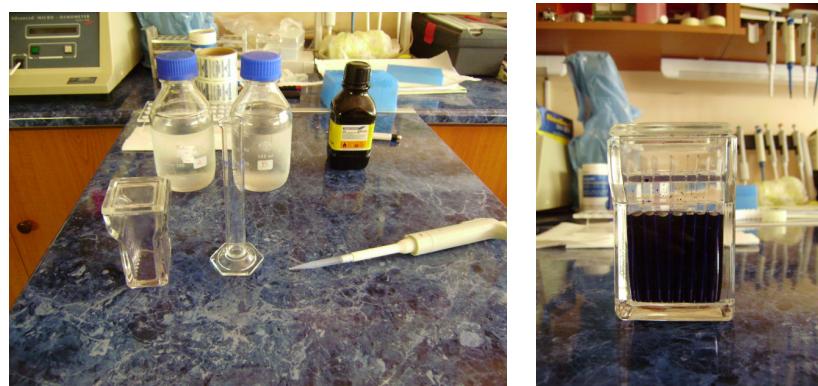
Stakalce se postavi na grijач na optimalnu temperaturu od 45 do 50 °C. Uzorak tkiva se osuši na zraku a zatim se usitnjuje u 50% otopini destilirane vode i acetatne kiseline, te se pipetom uzimaju usitnjeni dijelovi tkiva i stavljaju na stakalce. Proces usitnjavanja treba provesti u što kraćem mogućem roku jer acetatna kiselina

može oštetiti tkivo prilikom duljeg izlaganja. Na svakom stakalcu su uzorci napravljeni od jedne jedinke (Slika 5.).



Slika 5. Izrada preparata kromosoma na vrućem stakalcu

Nakon izrade preparati se bojaju. Provedeno je uobičajeno bojanje s Giemsa bojom. Za to je korišteno 20 ml otopine A ( $12.5\text{g Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O} + 500 \text{ ml destilirane vode}$ ) i 20 ml otopine B ( $4.76 \text{ KH}_2\text{PO}_4 + 500 \text{ ml destilirane vode}$ ), te 1 ml Giemsa boje. Bojanje preparata trajalo je 7 minuta (Slika 6.).



Slika 6. Uobičajeno bojanje s Giemsa bojom

Napravljeni su preparati za jedinke prnjavice, kućice, kokoške, kunjke i kamenice. Jedino za dagnju nisu izrađeni preparati od fiksiranog tkiva. Metafaze su proučavane pomoću Nikon Eclipse E600 svjetlosnog mikroskopa i napravljene su

fotografije najbolje vidljivih metafaza koristeći 100 x objektiv sa kompjuterskom digitalnom kamerom MicroPublisher 3.3.

#### Pokus 2

Korišteno je 7 jedinka dagnje, 8 jedinka prnjavice, 6 jedinka kunjke, 2 jedinke kućice i 1 jedinka kokoške. Jedinke su također bile smještene u akvarij s 20 l morske vode i aeracijom. Kod drugog pokušaja tretman kolhicinom je bio jednak što se tiče koncentracije samo je izmijenjena duljina trajanja tretmana na 14 sati. Ostali koraci u izradi preparata ostali su jednaki.

#### Pokus 3

Korišteno je 16 jedinka srčanke i 10 jedinka kunjke. Jedinke su smještene u bazen s 10 l morske vode i aeracijom, te su izložene tretmanu kolhicinom 0.004% u trajanju 14 sati. Zatim su uzorci tkiva od škrga i plašta stavljeni u hipotoničnu otopinu 0.9% natrij-citrata u trajanju od 40 minuta. Nakon toga su fiksirani u otopini 3:1 etanola i acetatne kiseline koja je izmjenjivana svakih 20 minuta tri puta. Nakon fiksiranja izrađeni su preparati na vrućem staklaku. Za bojanje je korišteno 25 ml otopine A i 25 ml otopine B te 2.5 ml Giemsa boje. Bojanje je trajalo 20 minuta.

#### Pokus 4.

Za izradu kariograma korištene su ličinke kamenice koje su bile izložene tretmanu kolhicinom 0.1% u trajanju 2 sata. Nakon toga uzorak je stavljen u 0.9 hipotoničnu otopinu natrij-citrata u trajanju 40 minuta. Uzorak je fiksiran u fiksativu 3:1 etanola i acetatne kiseline i nakon tri izmjene, svakih 20 minuta, izrađeni su uzorci na vrućem stakalcu. Nakon izrade uzorci su obojani Giemsa bojom u trajanju od 20 minuta.

Kariotipovi su napravljeni od mikrofotografija metafaza kod ličinka kamenice koristeći besplatni program preuzet s interneta «ImageJ» verzija 1.41o. Fotografije u boji su prvenstveno pretvorene u 8-bitske crno-bijele fotografije. Zatim su pojedinačni kromosomi kopirani s fotografije na bijeli papir i mjerene su im duljine dugog i kratkog kraka u pikselima. Kromosomi su klasificirani u skladu s omjerom duljina (r) dugih krakova (l) i kratkih krakova (s) na način  $r = l / s$ .

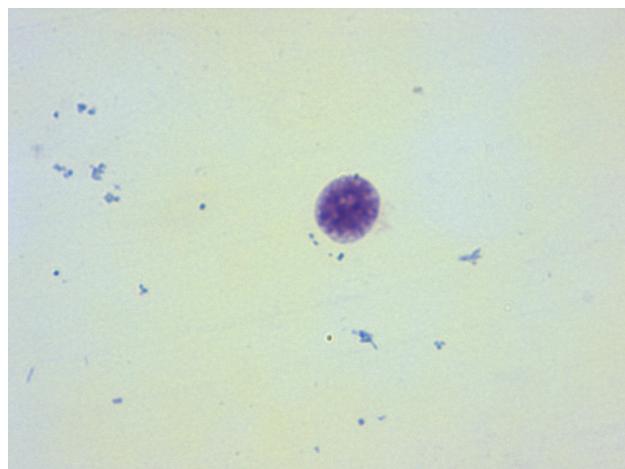
<b>r (proporcije)</b>	<b>Klasifikacija</b>
1,00-1,70	Metacentrični kromosom
1,71-3,00	Submetacentrični kromosom
3,01-7,00	Subtelocentrični kromosom
7,00-∞	Akrocentrični ili telocentrični kromosom

Pojedinačni kromosomi su spareni prema omjeru r i parovi su poredani u tri reda sa metacentricima u prvom, submetacentricima u drugom i subtelocentricima u trećem redu (akrocentrici i telocentrici nisu uočeni kod kamenice). Za klasifikaciju kromosoma korištena je metoda koju su opisali Levan i suradnici (1964).

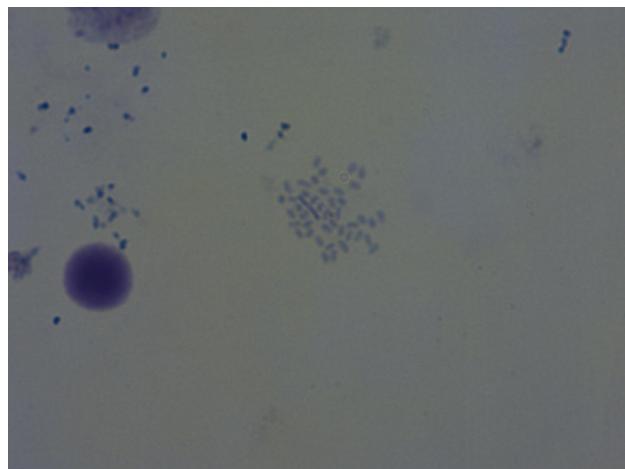
### 3. REZULTATI

Pokus 1.

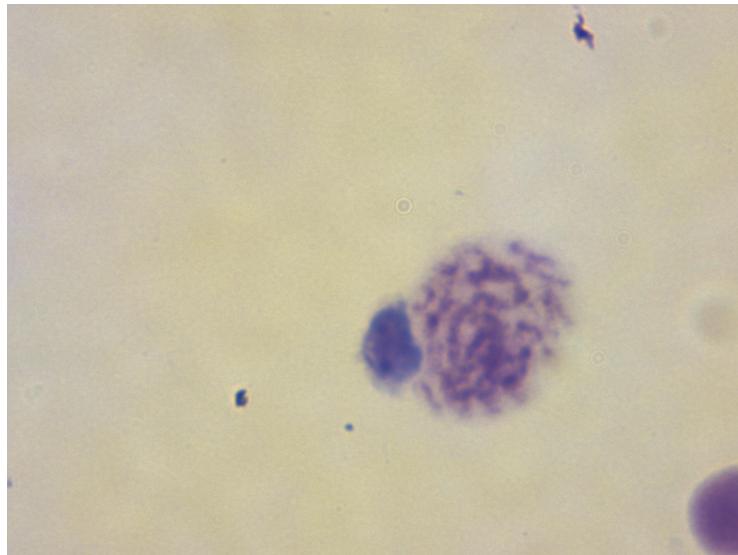
Kod prvog pokusa određivanja broja kromosoma rezultati nisu bili zadovoljavajući. Kromosomi su uglavnom bili slabo vidljivi, nebrojivi i zarobljeni u plazmi te nije bilo moguće odrediti broj kromosoma kod svih vrsta školjkaša osim kod kamenice kod koje su kromosomi bili vidljivi i bilo je moguće utvrditi njihov broj te su za ovu vrstu napravljeni uzorci na tri stakalca za određivanje broja kromosoma. Pregledavanjem uzorka utvrđen je broj kromosoma kod kamenice  $2n = 20$ .



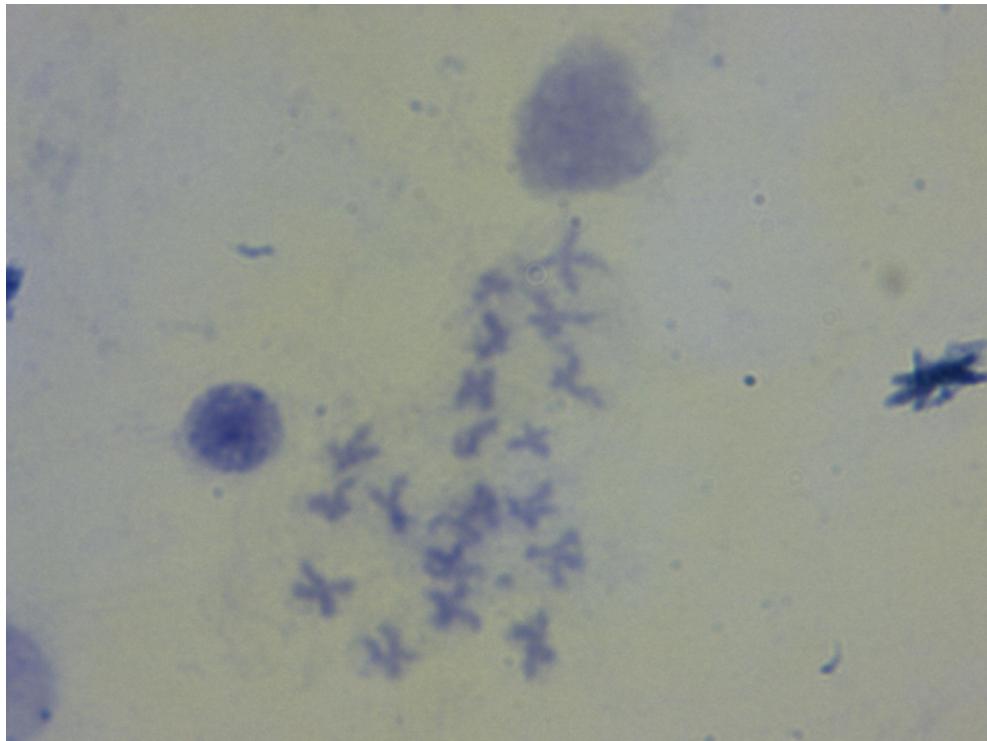
Slika 7 . Kunjka, *Arca noae*, kromosomi zarobljeni u plazmi



Slika 8. Prnjavica, *Venus verrucosa*, slabo vidljivi kromosomi



Slika 9. Kućica, *Ruditapes decussatus*, nebrojivi kromosomi

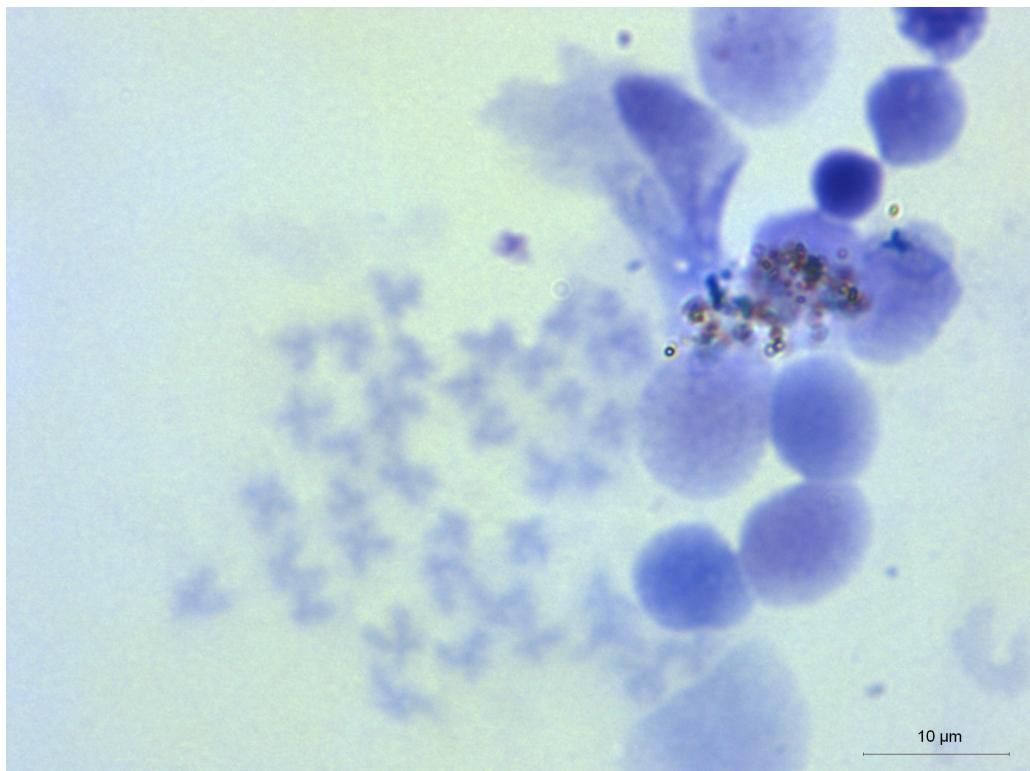


Slika 10. Kamenica, *Ostrea edulis*, jasno vidljivi kromosomi,  $2n = 20$

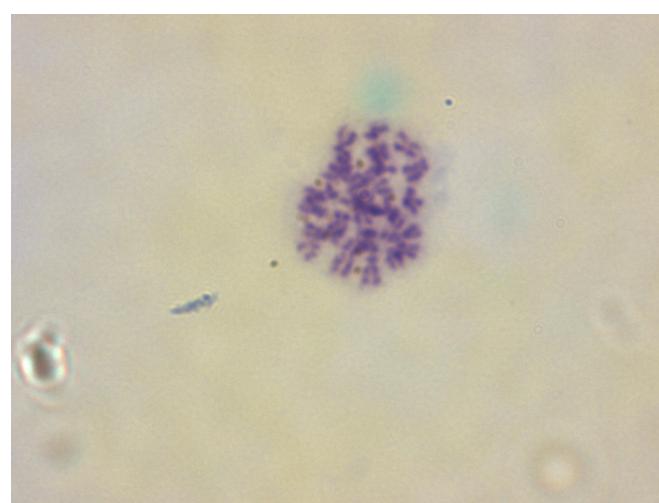
#### Pokus 2.

Zbog manjkavih rezultata ponovljeno je određivanje broja kromosoma kod dagnje, prnjavice, kunjke, kućice i kokoške ovaj puta s tretmanom duljeg izlaganja kolhicinu (14 sati). Kod jedinka kunjke, prnjavice i kokoške nisu dobijeni uzorci s

kromosomima, dok su uzorci kod dagnje sadržavali kromosome ali nažalost nisu bili brojivi te nije određen broj kromosoma kod ove vrste. Jedino su uzorci kod kućice sadržavali jasno vidljive kromosome, te je utvrđen diploidni broj kromosoma  $2n = 38$  za ovu vrstu.



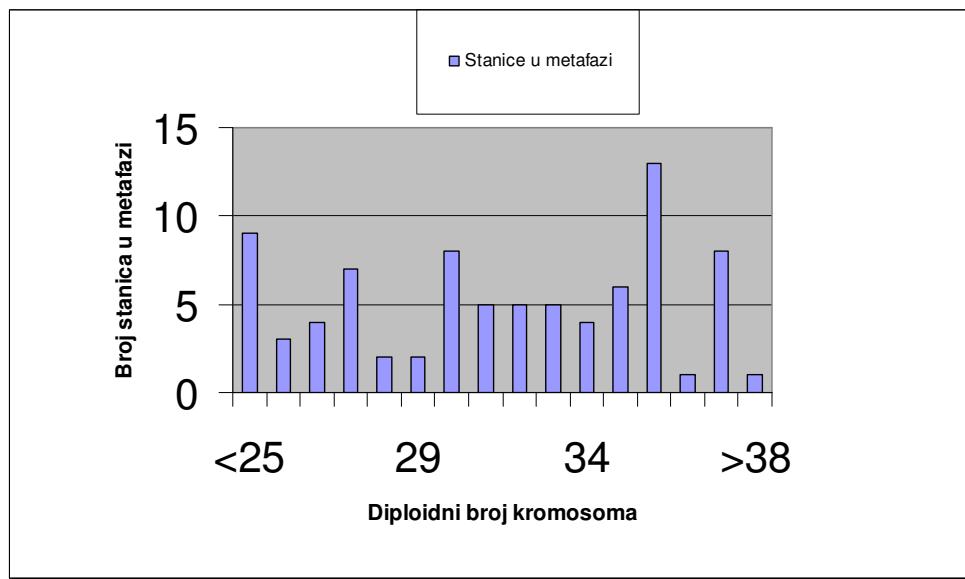
Slika 11. Kromosomi kućice, *Ruditapes decussatus*,  $2n = 38$



Slika 12. Dagnja, *Mytilus galloprovincialis*, nebrojivi kromosomi

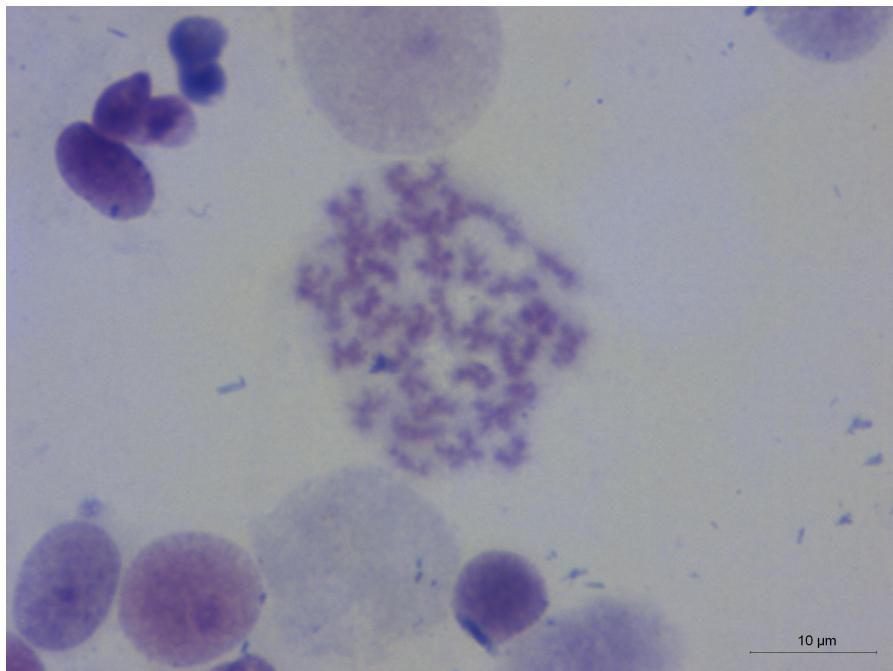
### Pokus 3.

Kod trećeg pokusa dobijeni su kvalitetni uzorci kromosoma kod srčanke. Od 20 stakalaca sa po šest uzoraka na svakom stakalcu najveći broj stanica u metafazi je pokazivao diploidni broj kromosoma 36, dok je 8 uzoraka imalo najveći broj kromosoma koji je iznosio 38. Slika 13. prikazuje distribuciju frekvencija diploidnog broja kromosoma kod srčanke.



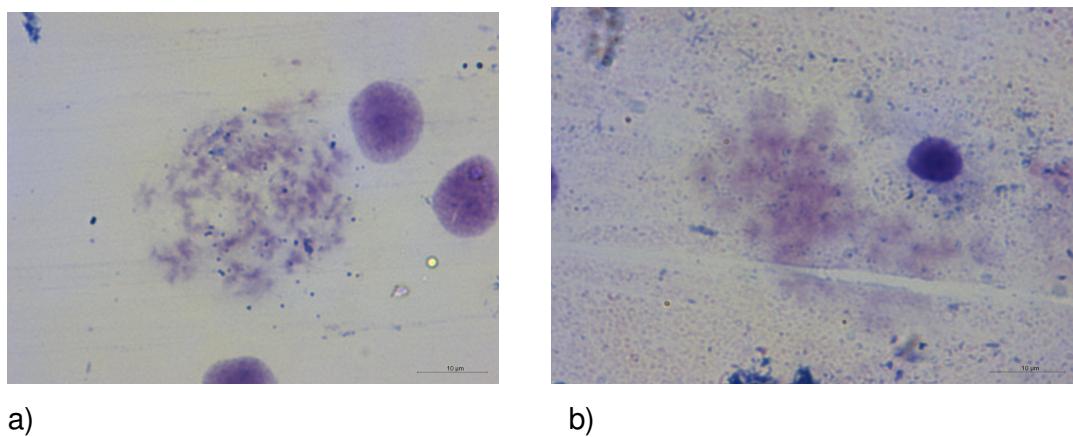
Slika 13. Distribucija frekvencija diploidnog broja kromosoma kod srčanke, *Cerastoderma glaucum*

Samo je jedan uzorak imao broj kromosoma veći od 38 ( $2n = 59$ ). Osim ove iznimke najveći diploidni broj kromosoma iznosio je  $2n = 38$  kod 8 uzoraka. Usporedbom sa ranijim istraživanjima kariotipova srodnih vrsta iz reda Veneroida, kod kojih je diploidni broj utvrđen i iznosi  $2n = 38$ , i na temelju rezultata u ovom istraživanju utvrđeno je da je i diploidni broj kromosoma kod srčanke  $2n = 38$ .



Slika 14. Diploidni kromosomi srčanke, *Cerastoderma glaucum*  $2n = 38$

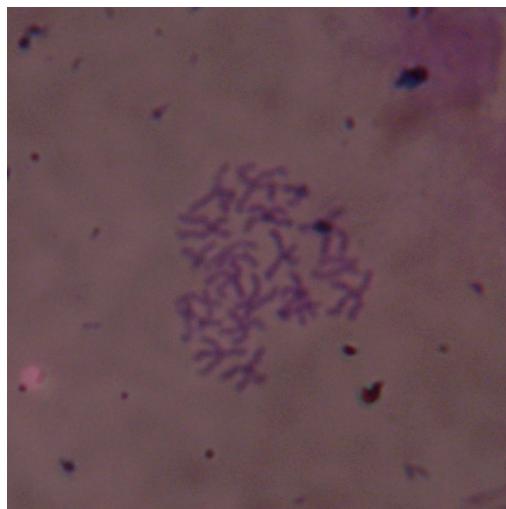
Također su bili vidljivi kromosomi kod kunjke ali nije bilo dovoljno uzoraka za utvrditi broj kromosoma. Od četiri uzorka dva su bila nebrojiva, jedan je pokazivao broj kromosoma 23, a jedan 40 (Slika 15. a i b).



Slika 15. Kromosomi kunjke, *Arca noae*, a) 40 kromosoma; b) 23 kromosoma

## Pokus 4.

Najbolji rezultati dobijeni su kod ličinka europske plosnate kamenice s višebrojnim uzorcima kromosoma s diploidnim brojem  $2n = 20$  (Slika 16 a-e).



a)



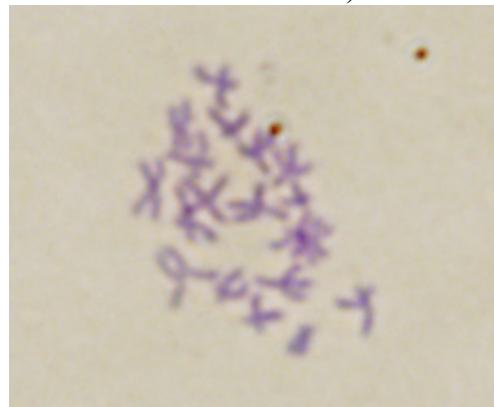
b)



c)



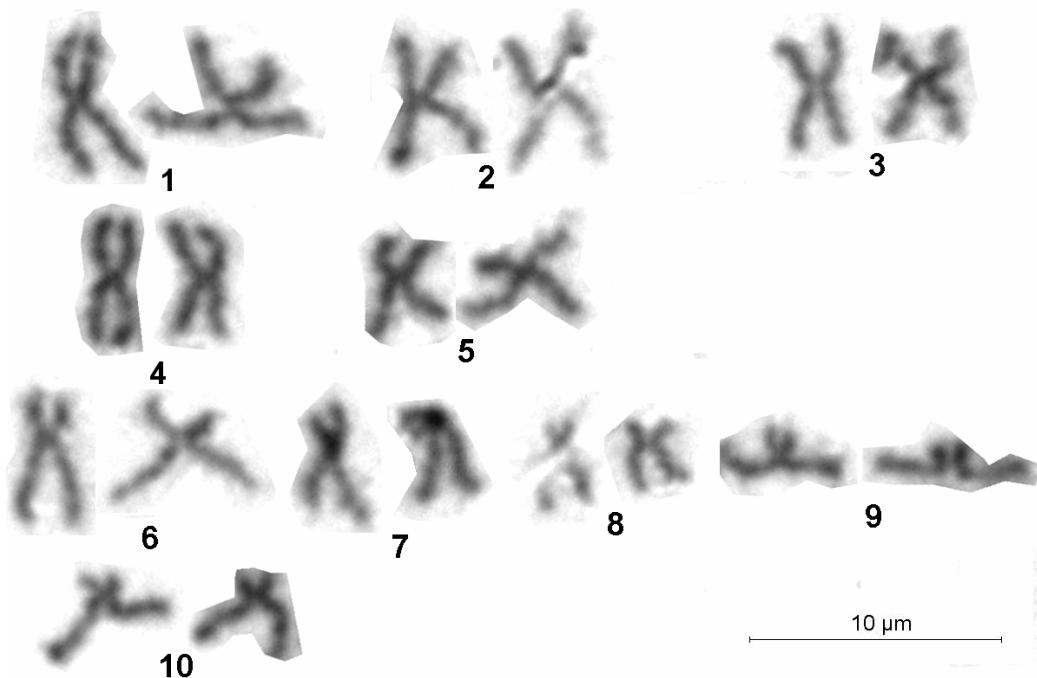
d)



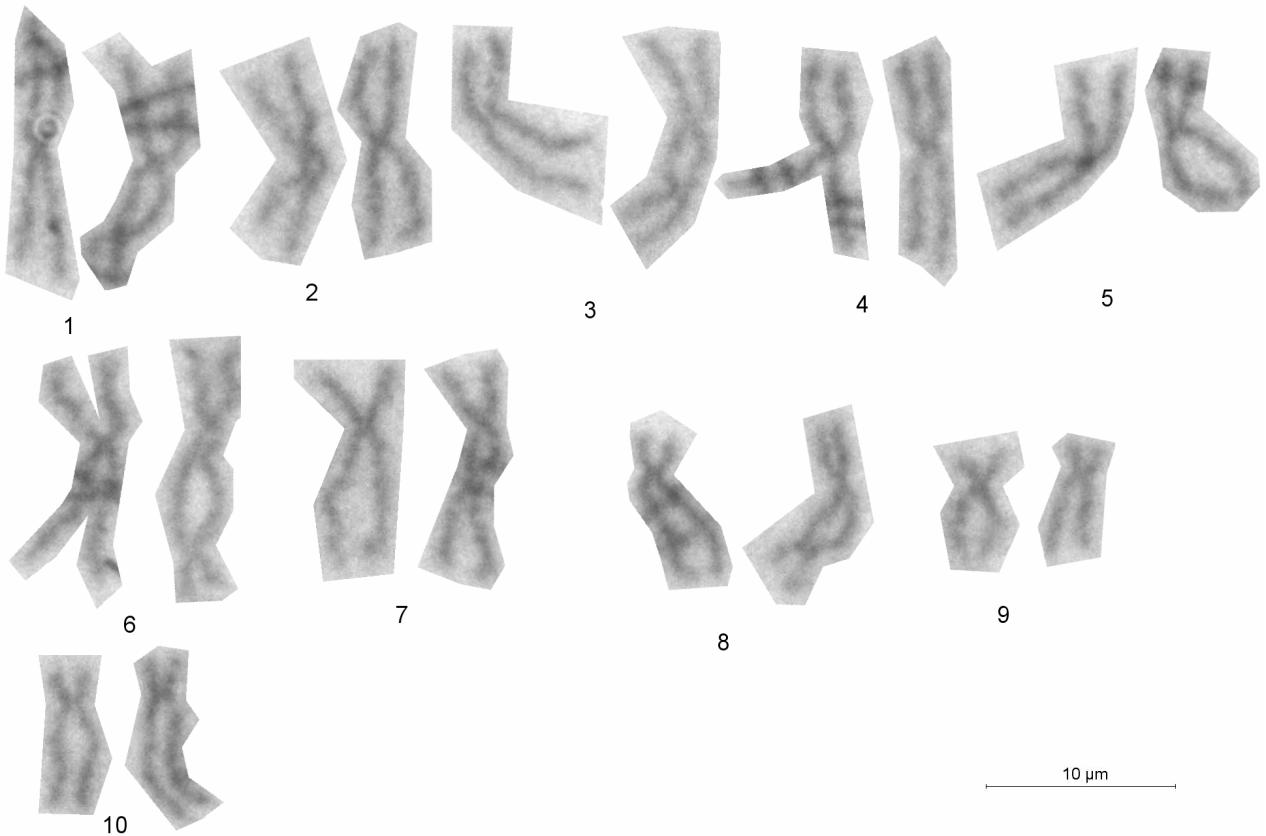
e)

Slika 16. Kromosomi kamenice, *Ostrea edulis* dobijeni kod ličinka a); b); c); d); e)  
 $2 n = 20$

Mjerenjem nekoliko uzoraka metafaznih kromosomskih parova utvrđeno je da se kariogram europske plosnate kamenice iz Malostonskog zaljeva sastoji od 5 metacentričnih, 4 submetacentrična i 1 subtelocentričnog para kromosoma. Odnos dugog i kratkog kraka kod subtelocentričnog para kromosoma iznosio je dugi krak / kratki krak = 3.3. Do sada nije zabilježena pojava subtelocentričnih kromosoma kod ove vrste. Na slikama 17. i 18. koje prikazuju kromosomske parove poredane u skladu sa njihovim oblikom i veličinom jasno su vidljivi metacentrični, submetacentrični i subtelocentrični parovi kromosoma.



Slika 17. Kariogram europske plosnate kamenice *O. edulis*. Prva dva reda prikazuju 5 metacentričnih parova kromosoma, treći red 4 submetacentrična para kromosoma i četvrti red prikazuje 1 subtelocentrični par kromosoma.



Slika 18. Kariogram europske plosnate kamenice *O edulis*. Kromosomski parovi; 1-5 metacentrični parovi kromosoma, 6-9 submetacentrični parovi kromosoma i 10 subtelocentrični par kromosoma

## 4. RASPRAVA

Iako su školjkaši važna sastavnica morske i slatkovodne faune istraživanja njihovih kromosoma nisu brojna. Kariološka istraživanja su napravljena za nekoliko vrsta školjkaša (Cornet i Soulard, 1990; Wada i Komaru, 1993; Insua i sur., 1998; Martinez-Lage i sur., 2002; Lopez-Pinon i sur., 2005; Insua i sur., 2006). Nekoliko vrsta koje spadaju u podrazred Heterodonta i Pteriomorphia su citogenetički istražene (Ieyama, 1980; Vitturi i sur., 2000). Također su dostupni podaci o izradi kariograma kod vrsta koje pripadaju redovima Arcoida, Mytiloida, Ostreoida i Pterioidea podrazreda Pteriomorphia (Martinez-Lage i sur., 1994, 1997; Insua i sur., 1998; Torreiro i sur., 1999; Pauls i Affonso, 2000; Cross, 2005).

Podaci o kariotipu kod reda Mytiloida su najbrojniji za rod *Mytilus* porodice Mytilidae (Dixon i Flavel, 1986; Thiriot-Quievreux i Insua, 1992; Insua i sur., 1994; Martinez-Lage i sur., 1997). Diploidni broj dagnje *Mytilus galloprovincialis* iznosi  $2n = 28$  (Thiriot-Quievreux, 1984). Kromosomi ove vrste u našem istraživanju bili su slabo vidljivi i nebrojivi, te nismo uspjeli ponoviti izradu kariograma. U istraživanju je korištena standardna metoda s citostatikom kolhicinom, kao što je ranije opisano u radovima, ali rezultati nisu bili zadovoljavajući. Za određivanje broja kromosoma provedena su dva pokusa sa koncentracijom kolhicina 0,004 % a različitim vremenom djelovanja (12 i 14 sati). Za daljnje pokuse trebalo bi pokušati sa drugim koncentracijama kolhicina.

24 vrste iz nadporodice Ostreacea su citogenetički proučavane (Ieyama, 1990; Insua i Thiriot-Quievreux, 1993). Porodica Ostreidae uključuje tri podporodice Lophinae, Ostreinae i Crassostreinae. Unutar Ostreinae 5 vrsta je prethodno kariološki proučavano: *O. edulis* (Thiriot-Quiévreux 1984), *O. denselamellosa* (Insua i Thiriot-Quiévreux 1991), *O. puelchana* (Insua i Thiriot-Quiévreux 1993), *O. chilensis* (Landron de Guevara i sur. 1994) i *O. angasi* (Li i Havenhand 1997). Diploidni broj  $2n = 20$  karakterističan je za rod *Ostrea* (Nakamura, 1985; Ieyama, 1990). Kariološko proučavanje kod australske kamenice *Ostrea angasi* pokazalo je  $2n = 20$  sa 5 metacentričnih, 3 submetacentrična i 2 subtelocentrična para kromosoma (Li i Havenhand, 1997). Kariotip vrste *O. conchaphila* se sastoji od 6 metacentričnih (1,2,4,6,8 i 10) i 4 submetacentrična para kromosoma (3,5,7,9). *Crassostrea gigas* također ima diploidni broj kromosoma 20 (Thiriot-Quiévreux 1986), te vrste *Ostrea denselamellosa* (Insua i Thiriot-Quiévreux, 1991), *O. puelchana* i *Tiostrea chilensis*

(Insua i Thiriot-Quievreux, 1991, 1993; Thiriot-Quievreux i Insua, 1992; Landron de Guevara i sur., 1994).

U našem istraživanju također je diploidni broj kromosoma kamenice iznosio  $2n = 20$ . Istraživanje je rađeno na odraslim jedinkama i ličinkama evropske plosnate kamenice. U oba slučaja dobiveni su jasno vidljivi metafazni uzorci kromosoma, te je izrađen kariogram za ovu vrstu. Mjeranjem nekoliko uzoraka metafaznih kromosomskih parova utvrđeno je da se kariogram evropske plosnate kamenice iz Malostonskog zaljeva sastoji od 5 metacentričnih, 4 submetacentrična i 1 subtelocentričnog para kromosoma. Do sada nije zabilježena pojava subtelocentričnih kromosoma kod ove vrste. Leitão i sur. (2002) opisali su 5 metacentričnih i 5 submetacentrična kromosomska para kod evropske plosnate kamenice. Thiriot-Quievreux C. i sur. (1982) opisali su metacentrične, submetacentrične i telocentrične kromosome kod evropske plosnate kamenice. Iako su do sada su urađeni preparati kromosoma od ličinka kod srodnih vrsta kamenica poput *Crassostrea gigas* (Cheung i sur., 2006), po prvi put su dobijeni kromosomi od ličinka evropske plosnate kamenice.

Red Veneroida uključuje 2 porodice, Cardiidae i Veneridae s više vrsta od komercijalnog značaja. Proučavanja kromosoma izvršena su na 4 vrste iz porodice Cardiidae i 12 vrsta iz porodice Veneridae uključujući vrste kokoška, *Chamelea galina*, prnjavica, *Venus verrucosa* i kućica, *Ruditapes decussatus* (Menzel i Menzel, 1965; Menzel, 1968; Gerard, 1978; Rasotto i sur., 1981; Koulman i Wolff, 1977; Corni i Trentini, 1986; 1990). Diploidni broj kromosoma kod kućice i prnjavice iznosi  $2n = 38$  (Borsa i sur., 1990; Ebied i Aly, 2004). Jednak diploidni broj  $2n = 38$  je potvrđen i za kokošku (Corni i Trentini, 1986). U našem istraživanju provedeni su pokusi za određivanje broja kromosoma kod kokoške, prnjavice, kućice i srčanke. Najveći diploidni broj kromosoma kod srčanke iznosi je  $2n = 38$  kod 8 uzoraka. Usporedbom sa ranijim istraživanjima kariotipova srodnih vrsta iz reda Veneroida, kod kojih je diploidni broj utvrđen i iznosi  $2n = 38$ , i na temelju rezultata ovog istraživanja utvrđen je diploidni broj kromosoma kod srčanke  $2n = 38$ . Naime, utvrđen je kariotip za vrstu *Cerastoderma edule* (Cardiidae),  $2n = 38$  (Koulman i Wolff, 1977). Kariotip se sastoji od 12 submetacentričnih, 4 subtelocentrična i 3 telocentrična para kromosoma. Kod vrste *Venerupis pullastra* (Veneridae) diploidni broj kromosoma  $2n = 38$  (3 metacentrična, 8 sumnetacentričnih i 8 subtelocentrična kromosomska para), te kod

vrste *V. rhombooides* diploidni broj kromosoma  $2n = 38$  (Veneridae) (4 metacentrična, 8 submetacentričnih, 4 subtelocentrična i 3 telocentrična kromosomska para).

Kromosomi kokoške i prnjavice u svakom pokusu nisu bili jasno vidljivi, bili su nebrojivi i nije bilo moguće odrediti njihov broj niti izraditi kariogram. U našem istraživanju uspješno smo utvrdili diploidni broj kromosoma kod kućice  $2n = 38$ .

Jedan od glavnih ciljeva ovog istraživanja bilo je određivanje broja kromosoma kod kunjke koji do sada nisu opisani niti određeni. U tri pokušaja je napravljen pokus određivanja broja kromosoma. Korištena je koncentracija 0,004 % kolhicina u trajanju 12, 14 i 14 sati, no pokusi nisu rezultirali metafazama koje bi bile pogodne za određivanje broja kromosoma. Kromosomi su bili zarobljeni u plazmi, slabo vidljivi i nebrojivi. Za daljnje proučavanje potrebno je mijenjati koncentraciju kolhicina i odrediti optimalnu metodu provođenja istraživanja, te tretirati ranije životne stadije, ličinke i mlađ.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Napravljeni su preparati kromosoma kod sljedećih vrsta školjkaša: kamenica *Ostrea edulis*, dagnja *Mytilus galloprovincialis*, kunjka *Arca noae*, prnjavica *Venus verrucosa*, kućica *Ruditapes decussatus*, srčanka *Cerastoderma glaucum* i kokoška *Chamelea galina*
2. Diploidni broj kromosoma kućice, *Ruditapes decussatus* iznosi  $2n = 38$
3. Diploidni broj kromosoma  $2n = 38$  opisan je po prvi puta kod srčanke, *Cerastoderma glaucum*
4. Preparati od kromosoma ličinka kamenice *Ostrea edulis* napravljeni su prvi put
5. Diploidni broj kromosoma kamenice *Ostrea edulis* iz Malostonskog zaljeva je  $2n = 20$
6. Po prvi puta je opisan subtelocentrični par kromosoma kod europske plosnate kamenice. Ovom genetičkom značajkom se kamenica iz Malostonskog zaljeva razlikuje od drugih europskih populacija koje su kariološki opisane

## 6. LITERATURA

- Ahmed M., Sparks A. K. 1967. A preliminary study of chromosomes of two species of oysters (*Ostrea lurida* and *Crassostrea gigas*). J. Fish. Res. Bd. Canada 24:2155-2159
- Ahmed M., Sparks A. K. 1970. Chromosome number, structure and autosomal Polymorphism in the marine mussel *Mytilus edulis* and *Mytilus Californianus*. Biol Bull 138:1-13
- Ahmed M. 1973. Cytogenetics of oysters. Cytologia 38:337-346
- Basoa E., Alfonsi C., Perez J. E., Cequea H. 2000. Karyotypes on the scallops *Euvola ziczac* and *Nodipecten nodosus* from the gulf of Cariaco, Sucre State, Venezuela. Bol. Inst. Oceanogr. Venez. 39: 49-54
- Batista F. M., Leitao A., Fonesca V. G., Ben-Hamadou R., Ruano F., Henriques M. A., Guedes-Pinto H., Boudry P. 2007. Individual relationship between aneuploidy of gill cells and growth rate in the cupped oysters *Crassostrea angulata*, *C. gigas* and their reciprocal hybrids. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 352: 226-233
- Beaumont A. R., Gruffydd L. D. 1974. Studies on the chromosomes of the scallop *Pecten maximus* (L.) and related species. J. Mar. Biol. Assoc. UK 54: 713-718
- Berns M., 1997. Stanice, Školska knjiga, Zagreb
- Borsa P., Thiriot-Quiévreux C. 1990. Karyological and allozymic characterization Of *Ruditapes philippinarum*, *R. aureus* and *R. decussatus* (Bivalvia, Veneridae). Aquaculture, 90, 209-227
- Bouilly K., Bonnard M., Gagnaire B., Renault T., Lapégue S. 2007. Impact of Duration on Aneuploidy and Hemocyte Parameters in Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 52, 58-63
- Cheung V. V., Jha A., Owen R., Depledge M. H., Galloway T. S. 2006. Development of the in vitro chromosome aberration assay in oyster (*Crassostrea gigas*) embryo-larvae for genotoxicity assessment. Marine Environmental Research 62, S278-S282.
- Corni M. G., Trentini M. 1986. A chromosomal study of *Chamelea galina* (Bivalvia, Veneridae). Italian Journal of Zoology, Vol. 53. 23-24
- Corni M. G.; Trentini M. 1990. The chromosomes of *Venerupis aurea* and *Ruditapes philippinarum* of the Northern Adriatic sea (Bivalvia, Heterodontia, Veneridae). Venus 49, 258-261

- Cornet M., Soulard C. 1990. Chromosome number and karyotype of *Donax trunculus* L. (Mollusca, Bivalvia, Tellinacea). *Genetica* 82 (2): 93-97
- Cross I., Diaz E., Sanchez I., Rebordinos L. 2005. Molecular and cytogenetic characterization of *Crassostrea angulata* chromosomes. *Aquaculture* 247: 135-144
- Dixon D. R., Flavel I. R. B. 1986. A comparative study of the chromosomes of *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. *J. Mar Biol Ass UK* 66: 219-228
- Dutrillaux B. 1973. Nouveau systeme de marquage chromosomique: Les bands T. *Chromosoma* 41:395-402
- Ebied A. B., Aly F. 2004. Cytogenetic Studies of Metaphase Chromosomes of Six Bivalve Species of Families Mytilidae and Veneridae (Nucinelliodea, Mollusca). *Cytologia*, Vol. 69, No. 3: 261-273
- Gajardo G., Parraguez M., Colihueque N. 2000. Karyotype analysis and Chromosome banding of the Chilean-Peruvian scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *J. Shellfish J. Res.* 21: 585-590
- González-Tizón A., Martínez-Lage A., Ausio J., Méndez J. 2000. Polyploidy in a natural population of mussel, *Mytilus trossulus*. *Genome* 43: 409–411
- <https://secure.nsanmartino.it>
- Ieyama H. 1975. Chromosome number in three species in three families of Pteriomorphia (Bivalvia). *Venus* 34 (1/2): 26-32
- Ieyama H. 1980. Studies on the chromosomes in three species of the Veneridae (Bivalvia: Heterodonta). *Venus* 39 (1): 49-55
- Insua A., Thiriot-Quiévreux C. 1992. Karyotypes of *Cerastoderma edule*, *Venerupis pullastra* and *Venerupis rhomboides* (Bivalvia, Veneroida). *Aquat. Living Resour.*, 5, 1-8
- Insua A., Thiriot-Quiévreux C. 1991. The characterization of *Ostrea denselamellosa* (Mollusca, Bivalvia) chromosomes: karyotype, constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions. *Aquaculture* 97:317-325
- Insua A., Thiriot-Quiévreux C. 1993. Karyotype and nucleolus organizer regions in *Ostrea puelchana* (Bivalvia:Ostreidae). *Veliger* 36:215-219
- Insua A., Labat J. P., Thiriot-Quiévreux C. 1994. Comparative analysis of karyotypes and nucleolar organizer regions in different populations of *Mytilus trossulus*, *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. *J Moll Stud* 60: 359-370
- Insua A., Lopez-Piñón M. J., Méndez J. 1998. Characterization of *Aequipecten*

- Opercularis* (Bivalvia: Pectinidae) by different staining techniques and Fluorescent *in situ* hybridisation. Genes Genet. Systems 73: 193-200
- Insua A., López-Piñón M. J., Freire R., Méndez J. 2006. Karyotype and chromosomal location of 18S-28S and 5S ribosomal DNA in the scallops *Pecten maximus* and *Mimachlamys varia* (Bivalvia: Pectinidae), Genetica 126(3): 291-301
- Komaru A., Wada K. T. 1985. Karyotypes of four species in the Pectinidae (Bivalvia: Pteriomorpha). Venus Jpn. J. Malacol. 44: 249-259
- Koulman J. G., Wolff W. S. 1977. The Mollusca of the estuarine region of the Rivers Rhine, Meuse and Scheldt in relation to the hydrography of the area. V. The Cardidae, Basteria 41, 21-32
- Ladron de Guevara B., Winkler B., Palma C. 1994. Karyotype description and the position of the nucleolar organizer region (NOR) in the Chilean oyster *Tiostrea chilensis* (Philippi) Chanley and Dinamani. In: Beaumont, A. R.: (Ed.), Genetics and Evolution of Aquatic Organisms. Chapman and Hall, London, pp. 399-405
- Ladron de Guevara B., Winkler F., Rodriguez-Romero F., Palma-Rojas C. 1996. Comparative karyology of four American oyster species. Veliger 39:260-266
- Leitão a., Boudry P., Labat J: P., Thiriot-Quiévreux C. 1999. Comparative karyological study of cupped oyster species. Malacologia, 41, 175-186
- Leitão A., Chaves R., Santos S., Boudry P., Guedes-Pinto H., Thiriot-Quiévreux C. 2002. Cytogenetic study of *Ostrea conchaphila* (Mollusca: Bivalvia) and comparative karyological analysis within Ostreinae. Journal of Shellfish Research, Vol. 21, No. 2., 685-690
- Levan A., Fredga K., Sandberg A. A., 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, 52, 201-220
- Levitsky G.A., 1931. The morphology of chromosomes. Bull. Applied Bot. Genet. Plant Breed. 27, 19-174
- Li X. X., Havenhand N. 1997. Karyotype, nucleolus organiser regions and constitutive heterochromatin in *Ostrea angasi* (Mollusca: Bivalvia): evidence of taxonomic relationships within the Ostreidae. Marine Biology 127: 443-448
- López-Piñón M. J., Insua A., Méndez J. 2005. Chromosome analysis and mapping of Ribosomal genes by one- and two- color fluorescent *in situ* hybridization in *Hinnites distortus* (Bivalvia: Pectinidae). J. Hered. 96: 52-58

- Martinez-Lage A., González-Tizón A., Méndez J. 1994. Characterization of different chromatin types in *Mytilus galloprovincialis* Lmk. After C-banding, fluorochrome and restriction endonuclease treatments. *Heredity* 72: 242-249
- Martinez-Lage A., González-Tizón A., Ausió J., Méndez J. 1997. Karyotype and Ag-NORs of the mussel *Mytilus californianus* and *M. trossulus* from the Pacific Canadian coast. *Aquaculture* 153: 239-249
- Menzel R. W., Menzel M. Y. 1965. Chromosomes of two species of quahog clams and their hybrids. *Biol. Bull.*, 129, 181-188
- Menzel R. W. 1968. Chromosome number in nine families of marine pelecypod mollusks. *Nautilus*, 82, 45-58
- Nakamura H. K. 1985. A review of molluscan cytogenetic information based on CISMOCH-Computerized Index System for Molluscan Chromosomes. Bivalvia Polyplacophora and Cephalopoda. *Venus* 44: 193-226
- Pauls E., Affonso P. R. 2000. The karyotype of *Nodipecten nodosus* (Bivalvia: Pectinidae). *Hydrobiologia* 420: 99-102
- Rasotto M., Altieri D., Colombera D. 1981. I chromosomi spermatocitari di 16 Specie appartenenti alla classe Pelecypoda. *Atti Congr. Soc. Malacol. Ital.* 1198: 113-127
- Rodríguez-Romero F., Laguarda-Figueras A., Uribe-Alcocer M., Rojas-Lara M. L. 1979. Distribution of «G» bands in the karyotype of *Crassostrea virginica*. *Venus, Kyoto* 38: 180-184
- Seabright, M. 1971. Rapid banding techniques for human chromosomes. *Lancet* 2: 971-972
- Sumner, A. 1972. A simple method for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75:304-306
- Švob T. i suradnici. 1991. Osnove opće i humane genetike. Školska knjiga, Zagreb
- Thiriot-Qiévreux C. i Ayraud N. 1982. Les caryotypes de quelques espèce bivalves et de gastéropodes marins. *Marine Biology* 2, 165-172
- Thiriot-Qiévreux C. 1984. Chromosome analysis of three species of *Mytilus* (Bivalvia, Mytilidae). *Mar Biol Lett* 5: 265-273
- Thiriot-Qiévreux C., Insua A. 1992. Nucleolar organizer region variation in the chromosomes of three oyster species. *J. Exp Mar Biol Ecol* 157: 33-40
- Thiriot-Qiévreux C. 1986. Etude de l'aneuploidie dans différentes naissains d'Ostreidae (Bivalvia). *Genetica* 70: 225-231

- Torreiro A., Martínez-Expósito M. J., Trucco M. I., Pasantes J. J. 1999. Cytogenetics in *Brachiodontes rodiguezi* d'Orb (Bivalvia, Mytilidae). Chromosome Res 7(1): 49-55
- Verma, R.S., Lubs H.A. 1976. Additional observations on the preparation of R banded human chromosomes with acridine orange. Can J Genet Cytol 18:45-50
- Vitturi R., Gianguzza P., Colomba M. S., Riggio S. 2000. Cytogenetic characterization of *Brachidontes pharaonis* (Fisher P., 1870): Karyotype, banding and fluorescent in situ hybridization (FISH)(Mollusca: Bivalvia: Mytilidae). Ophelia 52: 213-220
- Von Brand E., Bellolio G., Lohrmann K. 1990. Chromosome number of the Chilean Scallop *Argopecten purpuratus*. Tohoku J. Agric. Res. 40: 91-95
- Wada K. T., Komaru A. 1993. Karyotype of the Chinese Macra clam; *Macra chinensis* (Bivalve: Mactridae). Venus 52(1): 63-68
- Wang Y. i Guo X. 2004. Chromosomal rearrangement in Pectinidae revealed by rRNA Loci and implications for bivalve evolution. Biol. Bull. 207: 247-256
- Xiang J. H.: Desrosiers R. R., Dube F. 1993. Studies on the chromosomes Of the giant scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin) and thesurf clam *Spisula solidissima* (Dillwyn). Cytology 58: 125-132
- Zergollern Lj. i suradnici.1994. Medicinska genetika 2. Školska knjiga, Zagreb