

STANDARDIZACIJA ISTRAŽIVANJA KARIOTIPOVA ČETINJAČA NA PRIMJERU PICEA OMORICA

RESEARCH ON THE STANDARDIZATION OF GYMNOSPERM KARYOTYPES USING PICEA OMORICA AS AN EXAMPLE

Želimir BORZAN*, Marilena IDŽOJTIĆ* i Helmut GUTTENBERGER**

SAŽETAK: Izrađen je kariotip iz endosperma u razvoju jednog stabla Pančičeve omorike, *Picea omorica* (PANČ.) PURK. Deset kromosoma ($n=12$) je metacentrično, a kromosomi IX i XII su submetacentrični. Po položaju centromere, kromosomi X i XI su po izgledu skoro submetacentrični, ali su po definiciji klasificirani kao metacentrični. Ipak, na temelju ranijih radova, neki bi autori četiri najmanja kromosoma klasificirali kao submetacentrične. Takva različita stajališta česta su u definiranjima kariotipova iste vrste i problematična kod usporedbi rezultata sličnih citoloških istraživanja.

Na temelju iskustava brojnih autora koji su istraživali kariotipove golosjemenjača, predložena je standardizacija u njihovoj izradi, prikazana na primjeru izrade kariotipa Pančičeve omorike. Prikazane su prednosti i nedostaci u analizi metafaznih i anafaznih stanica, prezentaciji numeričkog kariotipa s apsolutnim i relativnim vrijednostima, različitim definicijama položaja centromere, grafičkim prikazima rezultata i vjerodostojnosti zaključaka glede opaženog broja i položaja sekundarnih konstrikcija.

Ključne riječi: *Picea omorica* (PANČ.) PURK., ženski gametofit, kariotip, golosjemenjače, položaj centromere, Feulgen squash metoda

UVOD — Introduction

Dugogodišnji rad na citološkim istraživanjima borova i analiza citološke literature gimnosperma, ukazali su nam na brojne poteškoće s kojima se susreće svaki citogenetičar, posebice početnik. U istraživanjima je idealna situacija kada je istraživač upoznat s postojećom literaturom iz užeg područja kojim se kani baviti. Na žalost, to najčešće nije slučaj, te se radovi drugih autora, ranije objavljeni, a vezani uz istraživanja na kojima se trenutno radi, nabavljaju sukcesivno, kako rad na istraživanjima odmiče. Dogodi se, da se u podmaklim istraživanjima zaključki kako bi bilo bolje da se u istraživanja krenulo primjenom druge metode rada ili upotrebom nekog drugog materijala. S obzirom na spon-

zorske rokove koji najčešće obvezuju istraživača, teško je u već podmaklim istraživanjima mijenjati uhodanu tehniku i započeti s nekim novim pristupom. Rezultat toga može biti izvrstan originalni rad, ali vrlo često objavljeni rad bude izvor terminoloških nepoznanica (novouvedenih termina za već postojeće) ili se u njemu prikazuju rezultati istraživanja koji nisu komparabilni s rezultatima istraživanjima ranijih autora.

Primjeri koji potvrđuju takvo gledište bit će iznešeni u ovom radu, uz prijedlog za standardizaciju materijala i metoda istraživanja u kariotipizaciji golosjemenjača, posebice vrsta iz porodice *Pinaceae*. Rad se temelji na vlastitim istraživanjima kariotipa *Picea omorica* (PANČ.) Purk. uz iznošenje mogućih načina prikazivanja rezultata, prema autorima koji su te načine koristili u svojim radovima.

* Prof. dr. sc. Želimir Borzan, dipl. ing. Marilena Idžojtić, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu;

** Prof. dr. Helmut Guttenberger, Institut für Pflanzenphysiologie, Karl-Franzens-Universität Graz, Österreich

MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA — Material and methods

Češerići za istraživanje kariotipa iz haploidnog tkiva endosperma u razvoju (= makrogametofit, ženski gametofit) sakupljeni su 7. lipnja 1976. s jednog stabla Pančičeve omorike (*Picea omorica* (PANČ.) PURK.) iz vrta Zavoda za šumarsku genetiku i dendrologiju Šumarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Trajni preparati izrađeni su metodom opisanom u ranijim radovima (Borzan, 1977, 1981, 1988) modificiranom, klasičnom Feulgenovom squash metodom bojenja preparata. Među tim 18 godina starim trajnim preparatima, odabrana su četiri, s 27 stanica s dobro raspoređenim kromosomima. Stanice su digitalizirane te analizirane, koristeći opremu koja se sastojala od videokamere na svjetlosnom mikroskopu, priključene za središnje računala.

Mjerene su apsolutne dužine krakova svih kromosoma izravno na ekranu računala, primjenom odgovarajućeg programskog paketa. Morfometrijske vrijednosti statistički su obrađene Excel programom. Izrađen je idiogram, temeljen na relativnim dužinama i morfologiji, u kojem su kromosomi obilježeni rastućim nizom brojeva od I do XII, s tim da je I najduži, a XII najkraći kromosom. Detaljniji opis primijenjene metodike i upotrebljene opreme opisan je u radu Köhler et al., 1995.

Kariotip istraživanog stabla prikazan je numerički i grafički, a u diskusiji se osvrćemo na različite moguće načine prikazivanja istih rezultata. Konačno, donosimo prijedlog za standardizaciju u istraživanjima kariotipa vrsta porodice *Pinaceae*.

REZULTATI ISTRAŽIVANJA — Results

Stanica sa dobro raspoređenim i identificiranim metafaznim kromosomima prikazana je na slici 1. Numerički kariotip prikazan je u tablicama 1 i 4, a izrađeni idiogram na slici 2. Većina kromosoma ($n = 12$) su me-

tacentrični. Držeći se strogo definicije submetacentričnosti kromosoma prema Sayloru (1961, 1964), samo su kromosomi IX i XII submetacentrični, međutim, kromosomi X i XI su toliko blizu granične vrijednosti

Numerički kariotip Pančičeve omorike (*Picea omorica* (Panč.) Purk.)

Numerical karyotype of the Picea omorica (Panč.) Purk.

Tablica 1.

Broj kromosoma Chromosome Number	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Ukupna dužina Total Length												
\bar{x}	123.55	115.86	110.37	107.99	105.99	103.63	101.41	99.03	95.78	91.65	77.03	67.71
Razlika u dužini Length Differences												
s	4.47	3.78	2.95	2.21	2.01	2.36	2.22	2.39	3.24	4.14	14.6	9.32
C.V. %	3.62	3.26	2.67	2.04	1.89	2.49	2.45	2.16	2.44	3.92	6.95	5.53
Kratki krak Short Arm (S)												
\bar{x}	57.06	53.27	49.78	48.12	48.35	46.65	45.85	44.33	38.76	39.15	33.49	25.99
s	4.48	3.92	5.00	4.94	4.73	3.57	4.64	3.94	5.65	5.27	4.36	4.96
C.V. %	7.85	7.36	10.04	10.26	9.79	7.66	10.12	8.88	14.57	13.47	13.00	19.07
Dugi krak Long Arm (L)												
\bar{x}	66.48	62.70	60.59	59.88	57.64	56.99	55.57	54.70	57.02	52.50	43.53	41.72
s	2.96	4.86	5.05	5.20	5.16	3.54	4.50	4.04	6.10	5.10	3.56	5.09
C.V. %	4.45	7.75	8.33	8.69	8.95	6.22	8.09	7.38	10.70	9.72	8.18	12.19
Omjer krakova Arm Ratio (S/L)	0.86	0.86	0.83	0.82	0.85	0.82	0.83	0.82	0.70	0.76	0.77	0.64
Centromerni indeks Centromere Index	46.15	45.96	45.10	44.56	45.64	45.01	45.20	44.77	40.49	42.69	43.41	38.35
Položaj centromere Chromosome Designation	m	m	m	m	m	m	m	m	sm	m	m	sm
Sekundarne konstrikcije Secondary Constrictions												
Položaj na kraku Position on Arms			III L 47		V L 47				IX L 42	X S 61		

omjera krakova $S/L = 0.75$, da bi se kariotip mogao definirati sa četiri najmanja kromosoma (IX, X, XI i XII) kao submetacentričnima. Slične rezultate u analizi kariotipa Pančičeve omorike dobio je H i z u m e (1988).

Sekundarne konstrikcije nalaze se na dugim krakovima kromosoma III, V i IX, te na kratkom kraku kromosoma X.

Prema njihovoj udaljenosti od centromere, sekundarne konstrikcije na dugim krakovima su medijalne, a konstrikcija na kratkom kraku kromosoma X je smještena više terminalno.

U preparatima je opaženo "sljepljivanje" (stickiness) nehomoloških kromosoma.

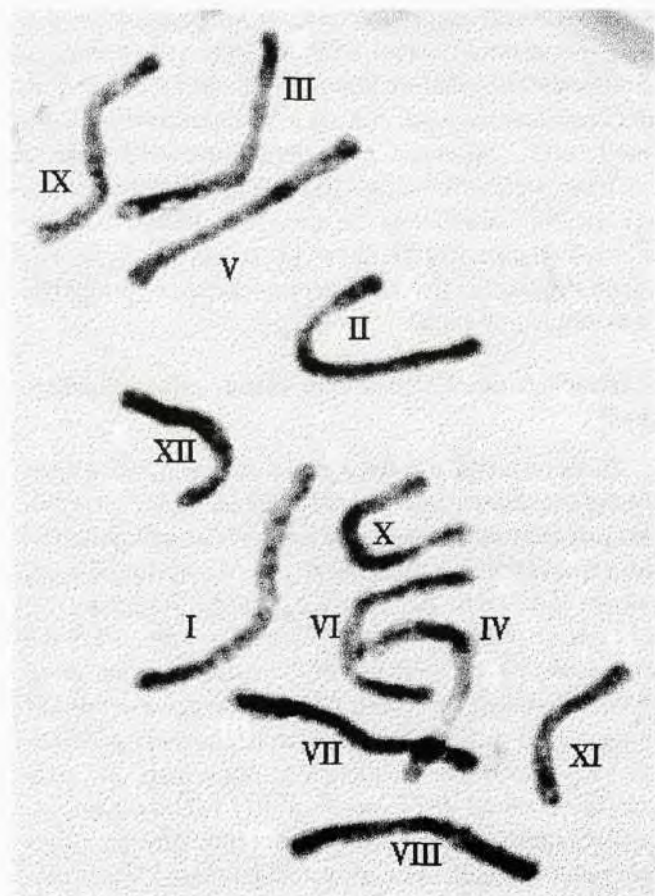
DISKUSIJA — Discussion

a) Izbor materijala za istraživanje: diploidni meristem korjenčića ili haploidni endosperm? - Research material option: rot tip meristem versus female gametophyte tissue?

Uobičajeni način istraživanja kariotipa je analiza metafaznih kromosoma u diploidnim stanicama meristema korjenčića. I golosjemenjače su se, sve do rada S a x & S a x (1933), istraživale na temelju analize preparata rađenih iz meristema korjenčića. S a x i S a x su 1933. prvi ukazali na prednosti u korištenju haploidnog endosperma u citološkim istraživanjima golosjemenjača. Analizirali su 53 vrste, svrstane u 16 rodova. Nakon toga rada, tek je mali broj istraživača koristio en-

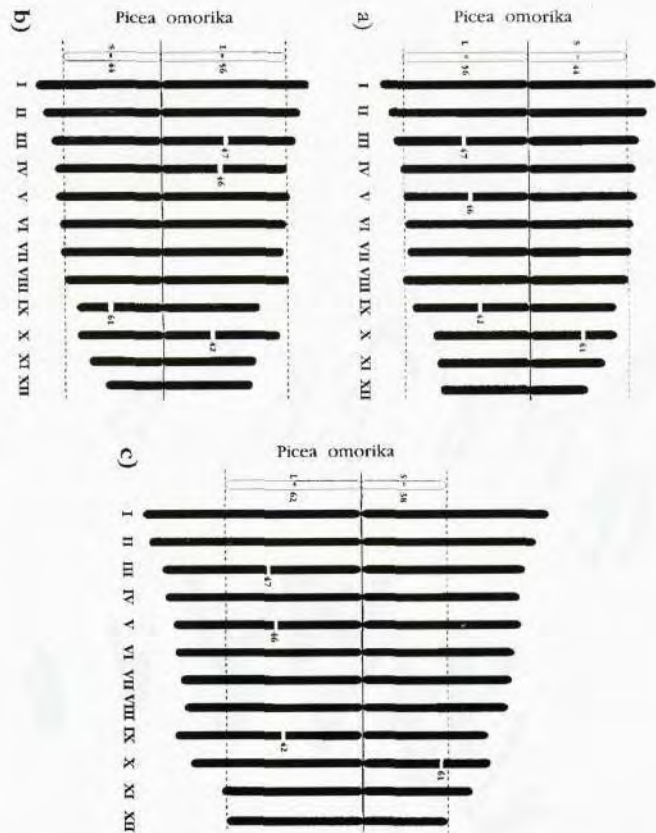
dosperm. Među njima treba spomenuti radove S a n t a m o u r a (1960), S a r k a r a (1963) M e r g e n a i B u r l e y a (1964), I l l i e s (1971). Osobitu pozornost zaslužuje rad P e d e r i c k a (1967, 1969, 1970), koji je prikazivao detaljnu morfologiju kromosoma u endospermu borova i sigurno bio poticaj drugim istraživačima kariotipova četinjača u pokušajima korištenja njegove metode za rješavanje različitih citoloških problema. Među te radove možemo ubrojiti radove: B o r z a n (1977, 1981, 1988), B o r z a n & P a p e š (1978) i M a c P h e r s o n & F i l i o n (1981).

Nabrajajući prednosti upotrebe endosperma golosjemenjača za citološka istraživanja, svakako na prvom



Sl. 1. Metafaza u endospermu Pančičeve omorike s identificiranim kromosomima.

Fig. 1 Metaphase plate from the female gametophyte tissue of *Picea omorika* (PANČ.) PURK. tree. All chromosomes are identified.



Sl. 2. Idiogram istraživanog stabla Pančičeve omorike prikazan prema tri različitim metodama: a) prema Borzanu (1988), b) prema Sayloru (1961) i c) prema Guttenbergeru (1933).

Fig. 2 Idiograms of the same *Picea omorika* (PANČ.) PURK. tree constructed after three different methods: a) after Borzan (1988), b) after Saylor (1961) and c) after Guttenberger (1933).

Broj i postotak submetacentričnih kromosoma u uzorku od 126 stanica četiriju različitih vrsta borova. Od sedam različitih stabala analizirano je po 18 stanica

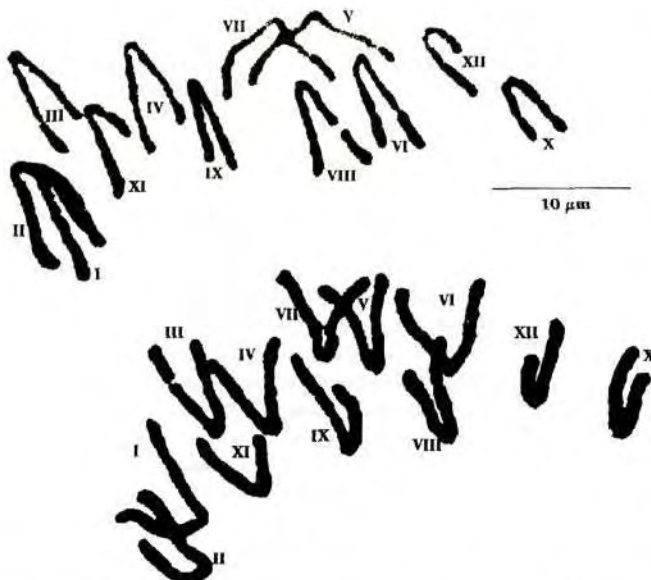
Number and percent of submetacentric chromosomes in 18-cell samples of 7 different trees of four pine species and out of a total of 126 cells

Tablica 2.

Kromosom br. Chromosome No.	Oznaka analiziranog stabla - Designation of the Analysed Tree										Ukupno Total					
	ni 47		ni 221		ni 366		sy 367		sy 77				de V 116		nisy 410	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%		
I	3	16.67	1	5.56	1	5.56	0	0.00	2	11.11	1	5.56	0	0.00	8	6.35
II	1	5.56	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	5.56	0	0.00	1	5.56	3	2.38
III	3	16.67	0	0.00	1	5.56	1	5.56	0	0.00	0	0.00	2	11.11	7	5.56
IV	0	0.00	0	0.00	3	16.67	0	0.00	0	0.00	1	5.56	1	5.56	5	3.97
V	2	11.11	1	5.56	1	5.56	1	5.56	1	5.56	0	0.00	0	0.00	6	4.76
VI	3	16.67	0	0.00	1	5.56	2	11.11	0	0.00	0	0.00	0	0.00	6	4.76
VII	1	5.56	0	0.00	2	11.11	2	11.11	1	5.56	0	0.00	2	11.11	8	6.35
VIII	2	11.11	1	5.56	2	11.11	3	16.67	1	5.56	1	5.56	2	11.11	12	9.52
IX	0	0.00	3	16.67	1	5.56	1	5.56	2	11.11	1	5.56	1	5.56	9	7.14
X	1	11.11	5	27.78	6	33.33	1	5.56	2	11.11	4	22.22	1	5.56	20	15.87
XI	12	66.67	10	55.56	11	61.11	12	66.67	10	55.56	9	50.00	2	11.11	66	52.38
XII	17	94.44	17	94.44	16	88.89	12	66.67	16	88.89	10	55.56	15	83.33	103	81.75

mjestu treba spomenuti haploidno stanje tkiva. Jednostavnija je i izrada preparata, s manjim brojem agresivnih kemikalija. Kromosomi u stanicama endosperma u razvoju pokazuju više morfoloških detalja, osobito u pogledu sekundarnih konstrikcija, ali i manje variraju od stanice do stanice. Tome je, vjerojatno, razlog što stanice endosperma predstavljaju genom stabla, a stanice meristema korjenčića mogu biti kompleksnije, ovisno o mogućim različitim roditeljskim parovima u formiranju sjemena, tj. svaki preparat napravljen iz jednog kor-

jenčića može s drugim preparatom imati sigurno zajedničkog samo jednog (ženskog) roditelja, ako sjeme potječe s istog stabla. Teoretski, dva preparata od kojih je svaki izrađen iz druge sjemenke, mogu predstavljati dva različita genoma. S obzirom da se kod izrade preparata iz tkiva endosperma ne koristi predtretiranje radi kontrahiranja kromosoma, variranje njihovih relativnih dužina je veće. Ukratko, u meristemu korjenčića može se vidjeti manje morfoloških karakteristika kromosoma, pa su i rezultati istraživanja "siromašniji". Jedina "zamjerka" endospermu jest kratko vrijeme (oko dva tjedna tijekom vegetacije) kada se materijal može prikupljati za citološka istraživanja.



Sl. 3. Anafaza u endospermu običnog bora (*Pinus sylvestris* L.). Kromatide br. IX imaju očigledno različite dužine. Iz rada Borzana (1988)

Fig. 3 Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) anaphase cell. Chromatids No. IX have obvious different morphometric values. Reproduced from Borzan (1988)

b) Izbor tehnike bojenja - Different staining techniques

Različite tehnike bojenja mogu se vrlo uspješno primijeniti na stanice u diobi endosperma u razvoju. Osobito prikladnom pokazala se mogućnost primjene Giemsa C - banding metode na ovo tkivo, na što ukazuju radovi: Borzan & Papeš (1978), Tanaka & Hizume (1980), MacPherson & Filion (1981), Borzan (1981, 1988) i rad Köhler et al. (1995). Preostaje još da se primjene druge metode diferencijalnog bojenja kromosoma, uspješno primijenjenih na meristeme korjenčića, kao npr. u radu Schlarbaum & Tsuchiya (1981), koji su pruganje kromosoma izazvali niskim temperaturama tijekom predtretiranja. Osobito obećavajućima, čine se metode koje su primijenjene u radovima Kondo & Hizume (1982), Hizume et al. (1983) i Kondo et al. (1985), u kojima su se koristile fluorescentne boje.

c) Diobeni stadiji, analiza slika i broj analiziranih stanica - Division phases, image analyses and the number of investigated cells

Neke od prednosti, koje, za kariološku analizu pruža tkivo endosperma u razvoju, mogu se jasno vidjeti na slici 3. Slika prikazuje anafazu običnog bora (B o r z a n , 1988) na kojoj se mogu pojedine kromatide pridružiti i identificirati kao par koji je bio združen u odgovarajući kromosom. Izmjera dužina pojedinih kromatida pokazala je, međutim, da se nakon razdvajanja pojedine kromatide koje pripadaju istom paru, mogu znatno razlikovati po svojim ukupnim dužinama. To je i razlog da se na sljedećoj slici (slika 4), koja prikazuje anafazu analiziranog stabla Pančićeve omorike, ne može tako jasno, kao na prethodnoj slici, pridružiti sve kromatide u odgovarajuće parove. Pokušali smo to učiniti na temelju pojavljivanja sekundarnih konstrikcija i na temelju izmjere dužina kromatida, rangiranjem parova u niz od I - XII. Radeći tako, ustanovili smo da se u ovom slučaju javlja isti problem kao i kod analize neke diploidne metafaze iz meristema korjenčića. Jedina razlika je bila u tome što se na ovoj anafaznoj slici jasno vidjelo da se pojedine kromatide po svojoj dužini ne može združiti u par, što se u diploidnim stanicama ne može vidjeti. Kod anafazne stanice dodatna pomoć u združivanju parova može biti orijentacija kromatida prema suprotnom polu. Na anafazi (slika 4) nije vidljiva jasna orijentacija svih kromatida na dva suprotna pola, pa je u tom pogledu ta stanica slična diploidnim meta-



Sl. 4. Anafaza u endospermu Pančićeve omorike. U ovom slučaju nije bilo moguće sa sigurnošću identificirati sve kromatide.

Fig. 4 *Picea omorica* (PANČ.) PURK. anaphase cell. It was not possible to identify chromatids with certainty.

fazama iz meristema korjenčića, gdje je moguće združivanje kromosoma u parove prema ukupnoj dužini kromosoma i eventualno položaju centromere, odnosno položaju sekundarne konstrikcije. Združivanjem kromatida u parove samo prema dužini u ovoj anafaznoj stanici, dešavalo se, da su u parove združene kromatide

Različiti rezultati dobiveni u položaju centromere kromosoma Pančićeve omorike (metacentričan, submetacentričan ili metasubmetacentričan), ovisno o upotrebljenoj klasifikaciji prema SAYLORU (1961), LEVANU et al. (1964) ili SCHLARBAUMU & TSUCHIYI (1984)

Differences in the centromeric positions of three presentations of Picea omorica chromosomes (metacentric, submetacentric or metasubmetacentric) depending on the classification used after SAYLOR 1961, after LEVAN et al. 1964 and after SCHLARBAUM and TSUCHIYA 1984.

Tablica 3.

Kromosom br. Chromosome No.	Po definiciji - According to Definition of SAYLOR (1961)	Po definiciji - According to Definition of LEVAN et al. (1964)	Po definiciji - According to Definition of SCHLARBAUM & TSUCHIYA (1984)
I	m	m	m
II	m	m	m
III	m	m	m
IV	m	m	m
V	m	m	m
VI	m	m	m
VII	m	m	m
VIII	m	m	m
IX	sm	m	msm
X	m	m	msm
XI	m	m	m
XII	sm	m	msm

koje po svom obliku, orijentaciji, mjestu gdje su pričvršćene niti diobenog vretena ili po položaju sekundarne konstrikcije, ne bi smjele biti združene u par. Niti na temelju usvajanja drugih kriterija (položaj sekundarnih konstrikcija, položaj centromere) nismo uspjeli identificirati parove kromatida te anafazne stanice. Zaključujemo, da se u izradi kariotipa diploidnih metafaza meristema korjenčića zapravo nasilno združuju u parove kromosomi koji ne pripadaju istom paru, što je na ovom primjeru anafazne stanice više nego očito. Stoga i S i m a k (1966) idiograme kojima se prikazuje rezultat kariološke analize smatra samo vjerojatnim prikazom i naziva ih "prividnim" (apparent idiogram).

Upotreba računalne opreme u istraživanjima daje novi kvalitetni iskorak u analizi kariotipa, jer se preparati mogu snimiti na tvrdi disk, bez potrebe za izradom trajnih preparata. Snimci se mogu spremati i čuvati na različitim magnetnim medijima i kasnije obrađivati po potrebi. Ubrzanje u analizi i radu koje pruža računalo, omogućava obradu velikog broja podataka za vrlo krat-

ko vrijeme. Velik je napredak postignut u razradi tzv. ekspertnog sistema, temeljenog na prepoznavanju određenih karakteristika kromosoma (G u t t e n b e r g e r et al., 1995). Sigurno je da danas moderni laboratoriji više i ne mogu zamisliti rad na citološkim istraživanjima bez obrade uz pomoć računala.

d) Varijabilnost kariotipova - Karyotype variability

U istraživanju kariotipa neke vrste, jedan od glavnih ciljeva je odgovoriti na pitanje o mogućoj unutarvrstnoj varijabilnosti kariotipova:

Da li postoji unutarvrstna varijabilnost kariotipova?

Da bi točno odgovorili na to pitanje, još uvijek nemamo dovoljno parametara za točnu identifikaciju kromosoma. To znači da intraspecifična varijabilnost u rodovima u kojima nije pronađen neki specifičan marker poput B-kromosoma, koji bi neku populaciju ili provenijenciju s takvim markerom izdvojio od ostalih populacija ili provenijencija, ne dolazi do izražaja. Stoga su

Numerički kariotip analiziranog stabla Pančičeve omorike. Ukupne dužine kromosoma

Numerical karyotype of the analysed Picea omorica (PANČ.) PURK. tree. Chromosome lengths

Tablica 4a.

Kromosom br. Chromosome No.	Razlike između susjednih kromosoma Differences Between Neighbouring Chromosomes	Srednja relativna dužina Relative Mean Lengths (S+L) \bar{x}	Standardna devijacija Standard Deviations s	C.V. %
I		123.5481	4.466597	3.62
	7.69208717			
II		115.856	3.781672	3.26
	5.48357909			
III		110.3724	2.947787	2.67
	2.37867506			
IV		107.9938	2.205168	2.04
	2.00555188			
V		105.9882	2.005308	1.89
	2.35602264			
VI		103.6322	2.585574	2.49
	2.21798163			
VII		101.4142	2.486175	2.45
	2.38663403			
VIII		99.02758	2.135006	2.16
	3.24495158			
IX		95.78263	2.338546	2.44
	4.13622902			
X		91.6464	3.588389	3.92
	14.6199595			
XI		77.02644	5.353526	6.95
	9.31449107			
XII		67.71195	3.743811	5.53

Numerički kariotip analiziranog stabla Pančičeve omorike. Dužine kromosomskih krakova

Numerical karyotype of the analysed Picea omorica (PANČ.) PURK. tree.

Chromosome arm lengths

Tablica 4b.

Kromosom br. Chromosome No.	Kratki krak - Short Arms (S)			Dugi krak - Long Arms (L)		
	\bar{x}	s	C. V. %	\bar{x}	s	C. V. %
I	57.06325	4.479643	7.85	66.48486	2.960115	4.45
II	53.27163	3.920674	7.36	62.7012	4.861042	7.75
III	49.78405	4.997463	10.04	60.5884	5.047345	8.33
IV	48.11511	4.935561	10.26	59.87866	5.20127	8.69
V	48.35208	4.732728	9.79	57.63614	5.160655	8.95
VI	46.64559	3.572534	7.66	56.9866	3.544545	6.22
VII	45.84552	4.64033	10.12	55.5687	4.497435	8.09
VIII	44.32829	3.938377	8.88	54.69929	4.038272	7.38
IX	38.75945	5.64551	14.57	57.02318	6.103014	10.70
X	39.14555	5.27417	13.47	52.50085	5.101821	9.72
XI	33.4921	4.35551	13.00	43.53434	3.559989	8.18
XII	25.99246	4.95762	19.07	41.71949	5.08747	12.19

i rezultati istraživanja unutarvrstne varijabilnosti kariotipova za vrste porodice *Pinaceae* zaključivani zaključkom da razlika unutar vrsta nema, te da su i razlike između pojedinih vrsta nekoga roda vrlo malene ili da ih uopće nema.

Razlog koji dovodi do takvog zaključka je prvenstveno zamjena u redosljedu kromosoma (M a t e r n & S i m a k, 1968), osobito onih koji su slični po svojoj ukupnoj dužini i položaju centromere. Uslijed toga, razlike među njima bivaju maskirane, te redovito dolazi do izjednačavanja vrijednosti (uprosječivanja) kojima se eventualno postojeće razlike u morfometriji kromosoma unutar vrste prikrivaju.

Da bismo to pojasnili, moramo istaći činjenicu koje smo zapravo svi svjesni, ali ju u analizi kariotipa rijetko uzimamo u obzir. Naime, kod analize svake metafazne slike pretpostavlja se da su kromosomi fiksni, kako po svojoj dužini, tako i u svojim međusobnim odnosima. Pretpostavljamo dakle, da je npr. kromosom III UVIJEK duži od kromosoma IV - XII, odnosno da je kromosom IV UVIJEK kraći od kromosoma I - III. Rađeći tako, zaboravljamo činjenicu da se tijekom diobe kromosomi ponašaju kao individualna tjelešca koja se ispružaju (istežu), skupljaju (kontrahiraju), savijaju, te stoga u trenutku fiksiranja i prepariranja imaju zamrznut izgled stanja svoje trenutne fiziološke aktivnosti. U ta-

Numerički kariotip analiziranog stabla Pančičeve omorike. Omjeri krakova,

centromerni indeksi i definicija kromosoma prema položaju centromere

Numerical karyotype of the analysed Picea omorica (PANČ.) PURK. tree.

Chromosome arm ratios, centromere indices and chromosome designations

Tablica 4c.

Kromosom br. Chromosome No.	Omjeri krakova - Arm Ratios (S/L)			Centromerni indeksi - Centromere Indices (S*100/S+L)			Chromosome Designation
	\bar{x}	s	C. V. %	\bar{x}	s	C. V. %	
I	0.860885	0.085462	9.93	46.14516	2.551548	5.53	m
II	0.857528	0.111301	12.98	45.96171	3.400203	7.40	m
III	0.832169	0.134821	16.20	45.10208	4.330696	9.60	m
IV	0.815494	0.141273	17.32	44.56327	4.582299	10.28	m
V	0.850781	0.136494	16.04	45.63706	4.511798	9.89	m
VI	0.824449	0.104284	12.65	45.00626	3.201312	7.11	m
VII	0.834456	0.124751	14.95	45.19706	4.313331	9.54	m
VIII	0.818899	0.120838	14.76	44.7655	3.868671	8.64	m
IX	0.697503	0.170934	24.51	40.48986	5.981498	14.77	sm
X	0.758908	0.152934	20.15	42.69211	5.259123	12.32	m
XI	0.774891	0.116494	15.03	43.40522	3.872479	8.92	m
XII	0.642982	0.188903	29.38	38.35276	6.829564	17.81	sm

kvom stanju, stoga, neki, npr. kromosom III, može biti duži od kromosoma II ili kraći od kromosoma IV. Isto to se odnosi i na krakove svakog kromosoma. Krakovi se također mogu istežati ili skupljati kod istog kromosoma tako da npr. istežanje kraćeg kraka kod metacentričnih kromosoma rezultira u analizi kariotipa njegovim svrstavanjem u duži krak, ili kontrakcija dužeg kraka rezultira njegovim svrstavanjem u kraći krak. Na taj način neki metacentrični kromosom može često biti svrstan među submetacentrične i obratno. Takav je primjer prikazan u radu B o r z a n a (1988), koji je analizirao broj i postotak submetacentričnih kromosoma u uzorku od 18 analiziranih stanica svakog od sedam različitih stabala četiriju vrsta borova, odnosno ukupno 126 stanica (tablica 2). Naravno da se to reflektira na nekonzistentnost u registriranju sekundarnih konstri-

cija. Stoga i autori, poput S a y l o r a (1961) i Y i m a (1963), napominju u svojim radovima da identifikacija pojedinih kromosoma nije mogla biti provedena na temelju registriranja položaja sekundarnih konstrikcija. Izuzetak je u tom pogledu P e d e r i c k (1967, 1970), koji je upravo po položaju i izgledu sekundarnih i tercijarnih konstrikcija ukazivao na razlike u kariotipu pojedinih vrsta borova. Međutim, usporedbom kariotipova crnog bora publiciranih u radu P e d e r i c k a (1970) i S a y l o r a (1964), sa svojim rezultatima istraživanja, B o r z a n (1977) nije mogao potvrditi brojnost i položaj konstrikcija koje je objavio P e d e r i c k, niti položaje svih sekundarnih konstrikcija koje je objavio S a y l o r.

Koji su razlozi takvim razlikama u rezultatima istraživanja iste vrste nije moguće spoznati, dok se ne dogovorimo o standardizaciji metoda istraživanja i načina prezentacije rezultata. Tek će se tada dobiti jasnija slika o unutarvrstnoj varijabilnosti. Primjenom standardne metode kariotipizacije različitih stabala neke vrste, koju u različito vrijeme i nezavisno mogu raditi različiti autori, približavamo se saznanju o unutarvrstnoj slici kariotipa te vrste. Time svaki takav rad postaje vrijedan doprinos spoznajama o mogućoj varijabilnosti kariotipova. Pritom moramo istaknuti važnost utvrđivanja unutarvrstnih razlika u kariotipovima, jer bez takvih saznanja nije moguće u cijelosti govoriti o razlikama kariotipova između pojedinih vrsta.

Distribucija frekvencija sekundarnih konstrikcija analiziranog stabla Pančićeve omorike. Ubilježene su na kraku kromosoma na kojem su se najčešće nalazile kao prosijek pojavljivanja i dobile oznake: III L 47, V L 47, IX L 42 and X S 61.

Frequency distribution of secondary constrictions in the analyzed Picea omorica (PANČ.) PURK. tree. Secondary constrictions were placed on the arm of a chromosome on which they most often appear, as an average result of their distribution of frequencies and defined as: III L 47, V L 47, IX L 42 and X S 61.

Tablica 5.

%	KROMOSOM BR. - CHROMOSOME NO.											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
100												
90			I		I							
80												
70	I		I	I		I	II	II	I			
60			I	I	I			I	II	III	I	
50	II		II	I	I		I	II	II	III		
40						I	I	I				
30		II	II	I		I						I
20						I						
10									I			
100												
90												
80												
70	I											
60	II	II	II	I	III		I		III	I		
50		I	III	II	I	I		II	III			
40	I	II	II		III	I	I	I	I	II		I
30		I	I	I	I			I	I	I		
20			III	I	II		II	I	II			I
10			I	I	I							I

e) Poteškoće i dileme kod izrade kariotipa - Difficulties and dilemmas in revealing karyotypes

Najveća poteškoća za svakog istraživača je mogućnost ponavljanja rezultata istraživanja nekoga od prethodnih autora. Poteškoća leži u razumijevanju njegovih izbora u načinu obrade podataka i prikazivanja rezultata. Obično to autori čine tako, da se radom nekog prethodnika posluže kao uzorom, a zatim dodaju vlastite modifikacije. Veći broj različitih takvih radova kroz duže razdoblje povećava poteškoće u izboru prikladne metode za rad, ali i za analizu, usporedbe rezultata s drugim istraživanjima te za prikaz vlastitih rezultata istraživanja. Primjeri su za to brojni. Pojedini su autori samo slikom metafazne ploče definirali kariotip istraživane vrste. U takvom je slučaju vlastite rezultate istraživanja teško uspoređivati sa slikom koja je u radu objavljena (i pritom, ponekad, razmišljati o lošoj kvaliteti reprodukcije). Drugi su autori vrlo detaljno opisivali morfološke karakteristike kariotipova pojedinih vrsta, ali nisu naveli broj analiziranih stanica za definiranje tih kariotipova. Stoga se može zaključiti da su analizirali samo jednu stanicu. U tom slučaju nije moguće raspravljati o varijabilnosti unutar vrste, niti varijabilnosti uzorka koji je trebao poslužiti kao podloga za izradu kariotipa.

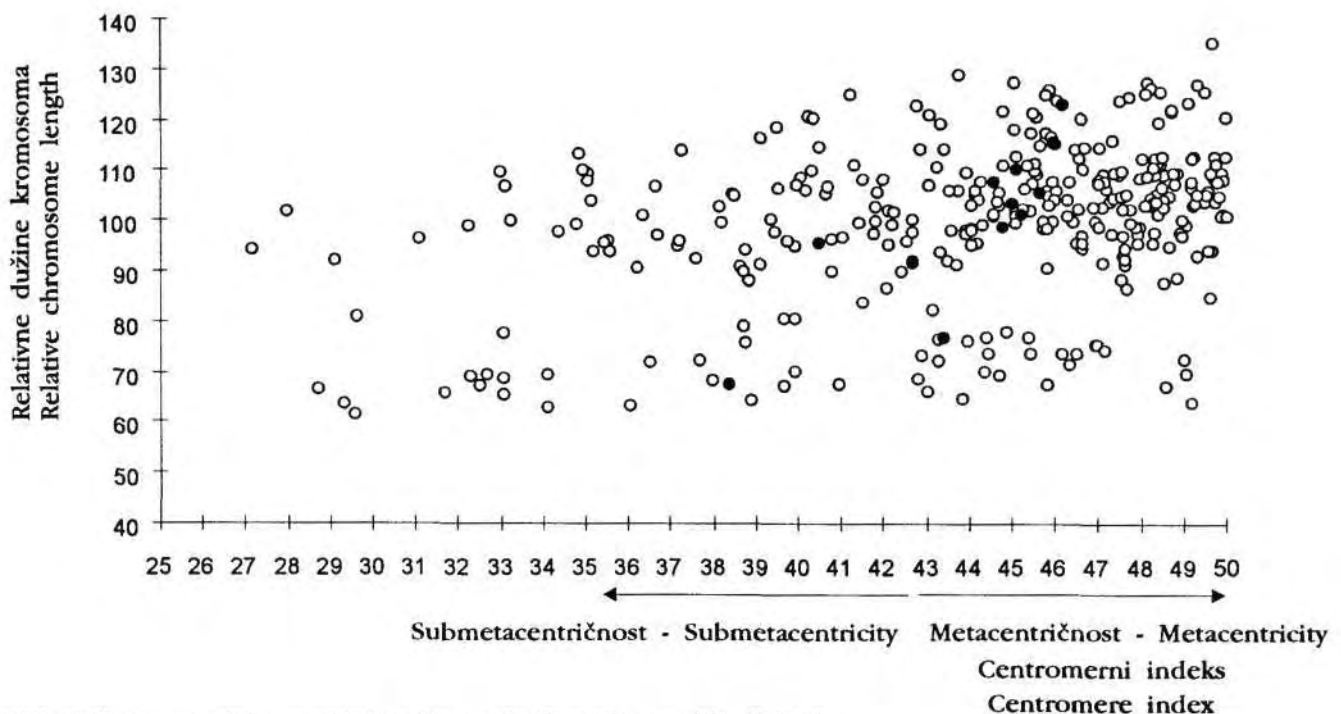
U izboru metode konstrukcije idiograma kromosomi mogu se poredati u niz od najmanjeg prema najvećem, od najvećeg prema najmanjem, u niz od 1 do 12, na način da od najvećeg prema najmanjemu kromosomu osnovni kriterij za redosljed bude padajući niz dužina kratkih krakova ili pak dužina dugih krakova. Numeričke vrijednosti kariotipa ponekad se mogu, ali i ne moraju, naći publicirane u radu. Ako su numeričke vrijednosti publicirane, mogu predstavljati apsolutne vrijednosti izmjera kromosoma ili pak preračunate, relativne vrijednosti dužina kromosoma. Vrlo često objavljene morfometrijske vrijednosti kojima se definira kariotip ne sadrže statističke parametre kojima bi se definirala varijabilnost rezultata i moglo statistički usporediti rezultate iz literature s vlastitim rezultatima istraživanja. Određivanje položaja centromere je uobičajeno prikazati prema Sayloru (1961), Levanu et al. (1964) ili prema Schlarbaumu & Tsuchiyi (1984). Što se dešava ako se isti rezultati tumače prema svakome od ovih autora, može se jasno vidjeti iz tablice 3, jer različiti kriteriji dovode do, najblaže rečeno, terminološke zbrke.

Položaj i pojavljivanje sekundarnih konstrikcija je također veliki problem, jer se objavljuje njihov položaj u idiogramu, navodi se kako nisu mogli služiti za identifikaciju pojedinih kromosoma, a ne objašnjava se, kako se ipak mogao definirati njihov položaj na pojedinim kromosomima.

Na slici 2 vide se izgledi idiograma Pančičeve omorike kao rezultat istraživanja kariotipa te vrste, teme-

ljenog na analizi 27 stanica, ali je idiogram prikazan na 3 različita načina: prema metodi Borzana (1988), Saylora (1961) i Guttenbergera (1995). Iz slike možemo zaključiti da je za očitavanje prikazanih rezultata istraživanja s idiograma svakoga od ovih autora i za uspoređivanje nekog novo izrađenog kariotipa Pančičeve omorike potrebno zapravo jedno novo istraživanje o mogućnosti usporedbe dobivenih rezultata. Slično, nužno istraživanje, radi mogućnosti usporedbe nekih objavljenih i vlastitih rezultata istraživanja uslijeduje ako želimo usporediti objavljene numeričke kariotipove prikazane u apsolutnim vrijednostima sa vlastitim rezultatima koje smo izračunali u relativnim vrijednostima. Poteškoće naročito dolaze do izražaja ako su npr. apsolutne vrijednosti izmjere kontrahiranih kromosoma diploidnih stanica a relativne vrijednosti izmjera kromosoma iz stanica endosperma. Tada moramo najprije apsolutne vrijednosti iz nekog objavljenog rada preračunati u relativne, ali za polovičan broj kromosoma, kako bismo ih usporedili s vlastitim rezultatima istraživanja.

Nabrajajući ove poteškoće u izboru metode rada u prikazivanju rezultata citoloških istraživanja (a sigurno je da ih nismo niti sve nabrojali), htjeli smo ukazati na ogroman nepotreban posao kojeg svaki znanstvenik mora uložiti da bi usporedio vlastita istraživanja s već objavljenima o istoj vrsti, samo ako se metode prikazivanja rezultata razlikuju. To je razlog zašto apeliramo na jedinstven način rada i prikazivanja rezultata karioloških istraživanja za vrste porodice *Pinaceae*.



Sl. 5. Polikariogram analiziranog stabla Pančičeve omorike. Crne točke su srednje vrijednosti.

Fig. 5. Polykariogram of the analyzed *Picea omorica* tree. Filled dots are average values.

ZAKLJUČAK - Conclusion

Prijedlog standardiziranog načina kariotipizacije vrsta porodice Pinaceae - Proposed standard method of karyotyping species of the Pinaceae family

Ako u citološkim istraživanjima nema posebnih razloga zbog kojih su odabrane diploidne stanice (npr. za bioindikacijska istraživanja), za kariološka istraživanja borovki preporuča se koristiti haploidno tkivo endosperma u razvoju.

Preparati se mogu raditi kao trajni ili polutrajni. Ako se preparati rade kao polutrajni, obrađene stanice je potrebno sačuvati ili kao fotografiju ili kao snimak načinjen videokamerom montiranom na mikroskop, spremljen na tvrdom disku priključenog računala. Jedini nedostatak u radu s polutrajnim preparatima jest u tome, da se isti preparati ne mogu naknadno pregledavati, kada je znanstvenik, koji ih je ranije pretraživao, postao iskusen citolog.

S obzirom da je standardiziranje bojenja preparata jedan od najvećih problema u citologiji, preporuča se primjena bilo koje metode bojenja, koja će za krajnji rezultat imati dobro kontrastirane i obojene kromosome. Kao prihvatljiv vodič svakom istraživaču mogu općenito poslužiti Feulgenova squash metoda bojenja preparata, bojenje acetokarminom, Giemsa - C metoda oprugavanja kromosoma ili neka od fluorescentnih metoda.

Vrlo je važan dovoljan broj analiziranih stanica u radu, s ciljem dobivanja najvećeg mogućeg broja pokazatelja u varijabilnosti analiziranog uzorka. Ne preporuča se analizirati manje od osamnaest stanica, a uzorak od trideset analiziranih stanica trebao bi biti dovoljan za dobivanje rezultata koji su statistički dobro dokumentirani. F i t test su jednostavni i dobro ih je koristiti u analizi vlastitih rezultata i za komparaciju s rezultatima istraživanja drugih autora.

U radu je nužno objaviti sliku najbolje stanice s dobro raspoređenim kromosomima ili stanice sa značajnim i zanimljivim detaljima o kojima se u radu diskutira.

Preporuča se rasporediti kromosome od najdužeg, obilježenog brojem I, do najkraćeg, obilježenog brojem

XII. Dužine kromosoma i krakova u stanicama trebaju biti prikazane relativnim vrijednostima u odnosu na dužinu prosječnog kromosoma u svakoj stanici (= 100).

Sekundarne konstrikcije treba prikazivati kao postotak udaljenosti od centromere, u odnosu na ukupnu dužinu kraka na kojem se nalaze. U idiogramu ih treba ucrtati na krak kromosoma na kojem su najčešće registrirane, kao prosječan rezultat učestalosti njihovog pojavljivanja. Primjer prikazujemo u tablici 5. Veličinu same sekundarne konstrikcije ne treba uključivati u ukupnu dužinu kraka kromosoma na kojem se nalazi, iako se preporuča u radu posebno registrirati i navesti broj i učestalost prominentnih sekundarnih konstrikcija (jasno neobojenih dijelova krakova kromosoma).

Položaj centromere i pripadajuću nomenklaturu kromosoma za vrste porodice *Pinaceae* treba koristiti prema S a y l o r u (1961). Prema toj klasifikaciji submetacentrični kromosomi imaju odnos kratki/dugi krak (S/L) manji od 0.75, dok metacentrični kromosomi imaju veću vrijednost od navedene. Što se opreme tiče, uputno je koristiti se najboljom raspoloživom opremom. Svakako se preporuča spremanje podataka na računalo, njihova analiza, numerička i grafička prezentacija. U ovom trenutku moderna oprema za citološka istraživanja opisana je u radu Guttenbergera et al. (1995), uz primjenu tzv. ekspertnog sistema, koji se može primijeniti i ako se u citološkim istraživanjima računalo niti ne koristi za analizu.

Numerički kariotip treba prikazati kao u ovom radu u tablicama 4a, 4b i 4c. Grafički prikaz karioloških istraživanja idiogramom (slika 2a) je obavezan. Vrlo su informativni i preporučuju se također izraditi tzv. polikariogrami (I l c h e n k o , 1975; M u r a t o v a , 1978; B o r z a n , 1988), prikazani u ovom radu na slici 5.

Konačno, bit ćemo zahvalni kolegama za svaki komentar na ovaj rad, jer ne smatramo da su preporuke za standardizaciju koje smo ovdje iznijeli bez nedostataka. Ovim radom bila nam je namjera ukazati na nužnost u standardiziranju kariotipizacije vrsta porodice *Pinaceae*, te se nadamo da ćemo uz pomoć primjedbi koje bi trebale uslijediti, biti u mogućnosti unaprijediti naša istraživanja i time postići bolje rezultate.

CITIRANA LITERATURA - References

- B o r z a n , Ž., 1977: Contribution to the karyotype analysis of the European black pine (*Pinus nigra* Arn.). *Ann. Forest.*, vol. 8(3), pp. 29-50.
- B o r z a n , Ž., 1981: Karyotype analysis from the endosperm of European black pine and Scots pine. *Ann. Forest.*, vol. 10(1), pp. 1-42.
- B o r z a n , Ž., 1988: Kariotipovi nekih borova podsekcije *Sylvestres*. *Glasnik za šumske pokuse*, Zagreb, vol. 24, pp. 1-100. (In Croatian with English summary).
- B o r z a n , Ž. & P a p e š , D., 1978: Karyotype analysis in *Pinus*: A contribution to the standardization of the karyotype analysis and review of some applied techniques. *Silvae Genetica*, vol. 27(3-4), pp. 144-150.
- G u t t e n b e r g e r , H., 1993: Image analysis and pattern recognition for cytogenetic studies. IUFRO Cytogenetic Working Party (S2.04-08) Symposium, Brijuni, Croatia. Manuscript, pp. 1-12.

- Guttenberger, H., Köhler, B. & Borzan, Ž., 1995: Chromosome banding for identification of the chromosomes of Spruce trees. Manuscript. Cytogenetics Working party meeting, IUFRO Congress Tampere, Finland, August 7-13, 1995.
- Hizume, M., 1988: Karyomorphological studies in the family Pinaceae. *Mem. Fac. Educ. Ehime Univ., Nat. Sci.*, vol. 8, pp. 1-108.
- Hizume, M., Ohgiku, A. & Tanaka, A., 1983: Chromosome banding in the genus *Pinus*. I. Identification of chromosomes in *Pinus nigra* by fluorescent banding method. *Bot. Mag. Tokyo*, vol. 96, pp. 273-276.
- Ilchenko, T. P., 1975: Sravniteljno-kariologičeskoe issledovanie listvenic primorja. Akademija nauk SSSR, Krasnojarsk. pp. 1-34.
- Illies, Z. M., 1971: First results on karyological investigations in the endosperm of an aneuploid Larch derived from a C_1 generation of *Larix decidua* x C_0 *Larix leptolepis*. *Ann. Univ. et A.R.E.R.S.* vol. 9, pp. 12-15.
- Kondo, T. & Hizume, M., 1982: Banding for the chromosomes of *Cryptomeria japonica* D. Don. *J. Jap. For. Soc.*, vol. 64(9), pp. 356-358.
- Kondo, T., Hizume, M. & Kubota, R., 1985: Variation of fluorescent chromosome bands of *Cryptomeria japonica*. *J. Jap. For. Soc.*, vol. 67(5), pp. 184-189.
- Köhler, B., Guttenberger, H. & Borzan, Ž., 1995: Karyotype analysis based on female gametophyte of Norway spruce. *Forest Genetics*, vol. 2(1), pp. 41-48.
- Levan, A., Fredga K. & Sandberg, A. A., 1964: Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, vol. 52, pp. 201-220.
- MacPherson, P. & Filion, W. G. 1981: Karyotype analysis and the distribution of constitutive heterochromatin in five species of *Pinus*. *Hereditas*, vol. 72, pp. 193-198.
- Matern, B. & Simak, M. 1968: Statistical problems in karyotype analysis. *Hereditas*, vol. 59, pp. 280-288.
- Mergen, F. & Burley, J., 1964: Abies karyotype analysis. *Silvae Genetica*, vol. 13(3), pp. 63-68.
- Muratova, E. N., 1978: Kariotipi kedrovih sosen. I. Kariotip *Pinus sibirica* Du Tour. *Citologija*, vol. 20(8), pp. 972-976.
- Pederick, L. A., 1967: The structure and identification of the chromosomes of *Pinus radiata* D. Don. *Silvae Genetica*, vol. 16, pp. 69-77.
- Pederick, L. A., 1969: The potential of cytogenetic research in Conifer species as indicated by some studies with *Pinus radiata*. 2nd FAO/IUFRO World Consult. For. Tree Breed., Wash., No FO-FTB-69-8/14, pp. 1-6.
- Pederick, L. A., 1970: Chromosome relationships between *Pinus* species. *Silvae Genetica*, vol. 19, pp. 171-180.
- Santamour, F. S. Jr., 1960: New chromosome counts in *Pinus* and *Picea*. *Silvae Genetica*, vol. 9, pp. 87-88.
- Sarkar, P., 1963: Chromosome studies on *Pinus* species. (Abstract). *Canad. J. Genet. Cytol.*, vol. 5, p. 107.
- Sax, K. & Sax H. J., 1933: Chromosome number and morphology in the Conifers. *J. Arnold Arb.*, vol. 14, pp. 356-375.
- Saylor, L. C., 1961: A karyotypic analysis of selected species of *Pinus*. *Silvae Genetica* 10(3), pp. 77-84.
- Saylor, L. C., 1964: Karyotype analysis of *Pinus*-group *Laricines*. *Silvae Genetica*, vol. 13(6), pp. 165-170.
- Schlarbaum, S. E. & Tsuchia, T., 1984: The Chromosomes of *Cunninghamia konishii*, *C. lanceolata*, and *Taiwania cryptomerioides* (Taxodiaceae). *Plant Systematics and Evolution*, vol. 145, pp. 169-181.
- Simak, M., 1966: Karyotype analysis of *Larix griffithiana* Carr. *Hereditas*, vol. 56, pp. 137-141.
- Tanaka, R. & Hizume M., 1980: C-banding treatment for the chromosomes of some Gymnosperms. *Bot. Mag. Tokyo*, vol. 93, pp. 167-170.
- Yim, K. B., 1963: Karyotype analysis of *Pinus rigida*. *Hereditas*, vol. 49, pp. 274-276.

SUMMARY: The karyotype analysis of a single *Picea omorica* (PANČ.) PURK. tree was completed using female gametophyte tissue. Most chromosomes ($n=12$) were metacentric, but chromosomes IX and XII were submetacentric. The positions of the centromeres of chromosomes X and XI were close to submetacentric, but were classified as metacentric. Some authors, however, could have considered the smallest four chromosomes as submetacentric. This variance among authors in describing karyotypes is problematic when comparisons are made among studies.

Based on a review of literature on karyotype analyses of gymnosperms, a standardization for gymnosperm karyotypes is presented. Recommendations for standardization are given including: karyotype analyses using metaphase or anaphase cells, presentations of numerical karyotypes in absolute or relative length, definitions of centromere position, karyotype graphs, and reliability of position and frequency of secondary constrictions.

Key words: *Picea omorica* (PANČ.) PURK., Karyotypes, Endosperm in development, Gymnosperms, Centromere nomenclature, Feulgen squash method