

Proučavanje citogenetike riba

K. Al-Sabti

Izvod

U radu se pokazala potreba za preciznim pregledom citogenetike riba da bi se ustanovila kromosomska veza sa teleostima i da bi se razjasnili odnosi između evolucije kromosoma i raznolikosti vrsti vertebrata.

Kabil Al-Sabti, viši znan. suradnik, Centar za istraživanje ribarstva Zagreb, Institut »Ruder Bošković«, Zagreb.

UVOD

Ribe zauzimaju važno mjesto u proučavanju evolucije životinja i u razumijevanju razvoja vertebrata u cijelosti. Pokazala se potreba za preciznim pregledom citogenetike riba da bi se ustanovila kromosomska veza sa teleosteima i da bi se razjasnili odnosi između evolucije kromosoma i raznolikosti vrsta vertebrata. Budući da je ribe vrlo teško citogenetički istraživati, do sada u tom području nije učinjen veći napredak.

Činjenica je da postoji oko 20 000 živućih vrsta riba. Od toga je kod samo 1800 vrsta registriran broj kromosoma, a kompletan kariotip kod 1300 vrsta. Nasuprot tome, više od 35% živućih vrsta sisavaca je proučavano citološki, u nekim slučajevima vrlo intenzivno. U ovom radu obrađuje se citogenetika riba.

Za čitatelje zainteresirane za citogenetska istraživanja bilo bi od pomoći da razlikuju citogenetiku od citotaksonomije. Prvo se odnosi na proučavanje nasljeđa pomoću kromosoma (nosilac gena) i citološki mehanizam nasljeđivanja. Citotaksonomija se, s druge strane bavi proučavanjem fenotipskih i filogenetskih odnosa unutar vrsta riba, baziranih na komparaciji broja kromosoma i morfologiji (kariotip).

U pripremanju ovog rada koji će pomoći onima koji su zainteresirani za ovo područje (ihtiolozima, taksonomičarima) poslužio sam se izvrsnim radovima Gold (1979) i Ojima (1982).

KORIŠTENJE TEHNIKE ZA PREPARACIJU KROMOSOMA RIBA

Razvoj citogenetskih tehnika za kromosome riba od 1961., osobito sadašnja »air-drying« metoda, kombinirana sa kolhicinskim tretmanom da bi se akumulirale stanice u metafazi i olakšalo odvajanje kromosoma, omogućio je preciznu delineaciju kromosoma u somatskim stanicama. Tim više, kultura stanica riba koja pruža važne podatke za istraživanje u različitim područjima biologije stanica, bila je primijenjena odmah nakon razvoja tehnika za kulture stanica sisavaca i utemeljenja stanične linije in vitro. Tehnike stanične kulture riba postale su pogodne za korištenje leukocita i stanica dobivenih iz raznih izvora poput krvi, peraje, ljuska, škrga, ovarija, bubrega, oka embrija. Razvoj novih diferencijalnih tehnika bojenja učinio je vidljivim karakterističan način povezivanja kromosoma riba. Ti novi tehnički pristupi pokazali su se djelotvorni za bolje razumijevanje i standardiziranje kariotipa. Više o tehnikama preparacije kromosoma riba može se naći u radovima Al-Sabti (1983), Gold (1979) i Ojima (1982).

ODREĐIVANJE SPOLA U RIBA

Vrlo je teško razlikovati ribe po spolu. Različiti oblici uključuju hermafroditizam, uniseksualizam i biseksualizam. Kao posljedica te raznolikosti, ribe su korištene u mnogim proučavanjima određivanja i diferencijacije spola (Yamamoto, 1969).

Hermafroditi mogu biti sinhroni (simultani) kad jaje i sperma sazrijevaju u isto vrijeme, ili asinhroni (konsekutivni) kad riba funkcionira ili kao mužjak ili kao ženka u isto vrijeme. Hermafroditizam može postojati u vrsta koje su normalno biseksualne npr. kod nekih sojeva *Xiphophorus helleri* (Lodi, 1979). Smatra se da je hermafroditizam važniji proces diferencijacije nego determinacije spola (Gold, 1979).

Hermafroditizam postoji u nekoliko redova riba (Atz, 1964). To, zajedno sa različitim oblicima gonad-

na upućuje na to, da je hermafroditizam evoluirao od biseksualnih ili gonohističnih vrsta (LePori, 1983), premda neki autori smatraju da je hermafroditizam primitivna osobina.

Uniseksualizam je rjeđi od hermafroditizma, ali poznati su slučajevi kad ženka producira samo ženske potomke. On može biti popraćen bilo ginogenezom bilo hibridogenezom. Kod ginogeneze sperma vrlo bliskih vrsta korištena je da bi se potaknuo razvoj jezgre jajeta, ali da se s njom ne spoji (Al-Sabti, 1984). Jezgra mužjaka ne sudjeluje u razvoju embrija. Kod hibridogeneze genom mužjaka sudjeluje u fuziji, ali je samo haploidan genom ženke prenesen u jaje.

Većina riba reproducira se biseksualno, imaju odvojene spolove koji se u prirodi nalaze u odnosu 1:1. Zbog toga je uobičajeno mišljenje da određivanje spola ovisi u velikoj mjeri o genima koji pripadaju jednom paru kromosoma (Gold, 1979). Određivanje spola u nekih riba kaže se da je poligeno, tj. spol je određen brojem manjine gena raspoređenih po kromosomskim komplementima. U zigoti, smatra se da je spol rezultat balansa između muških i ženskih gena. Također se smatra da je poligenična determinacija spola najprimitivniji mehanizam iz kojeg postepeno evoluiraju kromosomski sistem spola (Ohno, 1967). To ne znači da su sve ribe sa poligeničnim određivanjem spola primitivne.

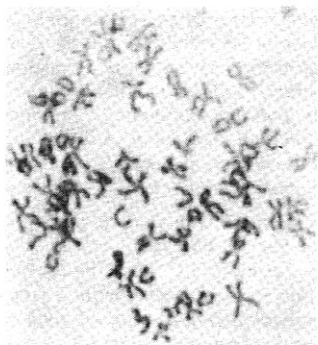
Kod većine ispitivanih biseksualnih riba postoji neka vrsta spolnih kromosoma uključenih u determinaciju spola. Često je evidencija indirektna, ali često dolazi do muških heterogameta (npr. XX ženski i XY muški) i ženskih heterogameta (WZ ženski i ZZ muški). Spolni kromosomi su na primitivnom stupnju evolucije riba (Ohno, 1967) i morfološki se ne razlikuju od autosoma u većine vrsta. Zbog toga su korištene druge metode da bi se prikazali spolni kromosomi. Razumijevanje determinacije spola zahtijeva razjašnjenje citogenetičkih mehanizama, orfoloških procesa i hormonalne kontrole. U odnosu na druge životinje kod teleostea se o tome vrlo malo zna.

KROMOSOMSKI KOMPLEMENT I VELIČINA GENOMA

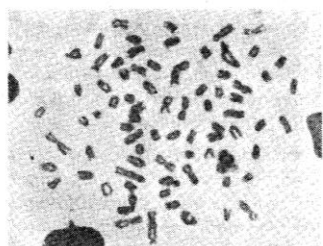
Mnogi redovi riba imaju relativno uniformiran kariotip, premda se evoluciono razlikuju desecima i milionima godina (Gold, 1979). Broj kromosoma riba kreće se od haploidnog broja (n)=8 kod *Notobranchius rachovii* (Post, 1965), do $n=84$ kod *Petromyzon marinus* (Potter i Rothwell, 1970). Široki raspon kromosomskog broja je varljiv (sl. 1.). Broj kromosoma i varijabilnost u broju kromosoma čini osnovu po kojoj se vrši određivanje u taksonomiji riba. Postoje najmanje 3 citološka mehanizma koji mogu pokazati promjene u broju kromosoma (Gold, 1979): Poliploidizacija, kad se umnožava broj kromosoma u setu, (2) Robertsonijeva translokacija, kad centrično spajanje 2 nehomologna akrocentrična kromosoma producira jedan metacentrični ili kad centralna disocijacija jednog metacentričnog kromosoma producira

dva nehomologna akrocentrika, i (3) aneuploidija gdje neodvajanje rezultira dobicom ili gubitkom pojedinog kromosoma.

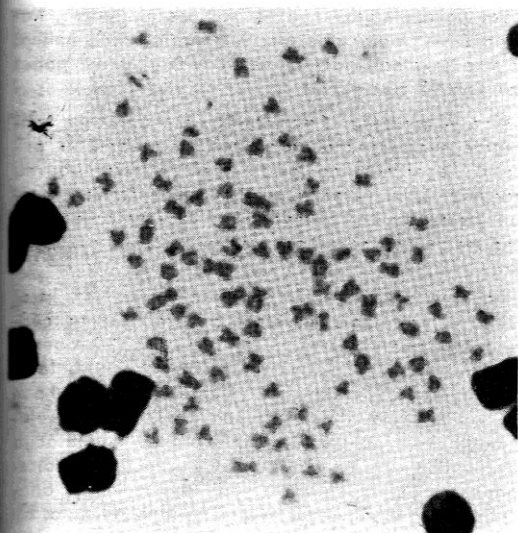
Sl. 1 a—d: Četiri metafaze u salmonida i ciprinida sa različitim brojem kromosoma (2n)



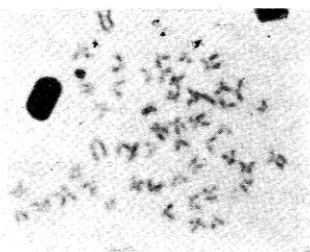
a — Kalifornijska pastrva, *Salmo gairdneri*, 2n = 60



b — Glavatica, *Salmo marmoratus*, 2n = 80



c — Šaran, *Cyprinus carpio*, 2n = 98



d — Klen, *Leuciscus cephalus*, 2n = 50

Među diploidnim vrstama, svaki par homolognih kromosoma se razlikuje genetski od drugog para kromosoma u istoj stanici. Manifestacije nekih od tih razlika uključuju morfološke (fenotipske) ili veličinske razlike među parovima kromosoma u relativnoj veličini, obliku i poziciji centromera. Kariotipske razlike među vrstama i redovima mogu biti korištene da bi se odredile fenotipske sličnosti i filogenetski odnosi. Više o morfologiji kromosoma može se naći u radu Al-Sabti, 1983.

Veličina genoma, ili količina DNA po nukleusu, također pokazuje veliku raznolikost među ribama. Postoj uobičajena homogenost količine DNA unutar porodica i nižih taksonomskih kategorija, i veličina genoma nastoji da bude relativno stabilna. Iznimke se mogu naći u nekim porodicama poput Ciprinida, gdje se vrste mogu razlikovati u količini DNA više nego dvostruko. Smanjenje količine DNA često je povezano sa porastom specijalizacije koja se očituje u obliku tijela i izgledu tijela. Više specijalizirane vrste imaju manje DNA po stanici nego nespecijalizirani oblici.

KORIŠTENJE CITOGENETIKE RIBA U ZAŠTITI LJUDSKOG ZDRAVLJA I PROGRAMU MONITORINGA

Onečišćenje vodenog okoliša kemijskim onečišćivačima postalo je ozbiljan problem, tim više što su se mnoga od tih onečišćenja pokazala mutagena ili kancerogena. Riba je korištena u monitoringu efekata niske koncentracije polutanata na njihove kromosome u prirodi i u eksperimentima, koji bi mogli dati kvantitativnu procjenu rizika ekspozicije riba agensima koji oštećuju kromosome. To bi mogao biti koristan prilog skrining testovima napravljenim da bi se zaštitilo ljudsko zdravlje (Kligerman et al., 1975; Kligerman, 1979; Prein et al., 1978; Barker i Racham, 1979; Alink i sur., 1980; Sofrandžija i sur., 1980; Maddock i Kelly, 1980; Stromberg i sur., 1981; Refstie, 1981; Hoofman, 1981; Kocan i sur., 1981; Landolt i Kocan, 1983; Al-Sabti i sur., 1984; Al-Sabti, 1985). U studijama o zaštiti okoliša također su korišteni eritrociti riba koji su imali mikronukleuse (Jenssen i Ramel, 1980; Hoofman i Raat, 1982).

Čitatelji zainteresirani više za efekte polutanata na kromosome riba mogu pročitati rad Al-Sabti, 1983.

CITOGENETIKA U UZGOJU RIBA

Poboljšanja u uzgoju riba selekcioniranjem napredovala su brže kod *Ciprinida* i *Salmonida*. Prilikom odabiranja jedinki koje će dati potomstvo uvijek su se odabirale najveće i najbolje ribe pri čemu su se uzimale u obzir slijedeće osobine: mala glava, visoko tijelo, jaka leđa, otpornost na bolesti, prilagodljivost klimatskim uvjetima, pokrivenost ljuskama. Takva selekcija rezultirala je poboljšanjima u veličini i stopi rasta i drugim željenim kvalitetama (Hickling, 1971).

Da bi se danas napravila selekcija na bilo kojoj vrsti riba, populacija ne može biti izolirana od citogenetičkih analiza vrsta u toj populaciji. Klasični rezultati selekcije ovise većinom o merističnim i morfometrijskim analizama, dok citogenetičke analize ne ovise samo o genotipskim proučavanjima, nego i o odnosu bilo koje promjene u fenotipu te populacije povezano sa bilo kojom promjenom u njihovom genotipu, i o povezanosti promjena genotipa sa bilo kojim efektom okoliša (citotaksonomija).

Citogenetika sa svim svojim praktičnim primjenama trebala bi se mnogo koristiti u reprodukciji riba. Ozbiljne poteškoće u programima reprodukcije riba predstavlja utvrđivanje vremena i cijene rada. Purdom i Linkoln (1973) smatraju da visoko križani sojevi mogu biti producibilni samo u nekoliko generacija povećanjem stupnja parenja kroz artificijelnu partenogenezu, tj. kad sperma stimulira razvoj ili ginogenezu diploidnog jajeta. Upotreba temperaturnih šokova tokom fertilizacije normalnom spermom može također biti korisna u kulturi riba. Praktična korist triploidnih riba je u tome što se očekuje da će biti sterilne tokom iregularne segracije tokom mejoze. Sterilna riba je od koristi u programima uzgoja i reprodukcije kad je genetički integritet prirodne populacije ugrožen uvođenjem umjetne oplodnje.

Uloga kromosomskih aberacija (anomalija) u reproduktivnom neuspjehu nije poznata, ali te je anomalije lako identificirati općim kariotipskim analizama. Slučajevi reproduktivnog neuspjeha u kulturi riba su česti, ali su obično povezani s neadekvatnim postupcima koji rezultiraju fiziološkim stresom na odrasle jedinke, jaja i embrije. Razumljivo je da kromosomske anomalije igraju važnu ulogu u neuspjehu reprodukcije riba. Odrasli sa povećanom reproduktivskom sposobnošću povezanom sa strukturalnom heterozigotnošću za kromosomsko preuređenje mogu biti identificirani prije njihove upotrebe u programima ukrštavanja. Individualni kromosomi također mogu služiti za identifikaciju specifičnih sojeva ili hibrida. Citogenetske tehnike kao uvijek, trebaju biti potvrđene da bi mogle služiti u unapređivanju produkcije uzgoja riba.

SAŽETAK

Pokazala se potreba za preciznim pregledom citogenetike riba da bi se ustanovila kromosomska veza sa teleosticima i da bi se razjasnili odnosi između evolucije kromosoma i raznolikosti vrsta vertebrata. Budući da je vrlo teško citogenetički istraživati, do sada u tom području nije učinjen veći napredak. Razvoj citogenetskih tehnika za kromosome riba od 1961. osobito sadašnja »Air-drying« metoda, kombinirana sa kolhicinskim tretmanom da bi se akumulirale stanice u metafazi i olakšalo odvajanje kromosoma, omogućio je preciznu delineaciju kromosoma u somatskim stanicama. Tim više, kultura stanica riba (krv, peraje, ljuske, škrge, ovariji, bubreg, oči embrija) pruža podatke za citološka istraživanja.

Vrlo je teško razlikovati ribe po spolu. Različiti oblici uključuju hermafroditizam, uniseksualizam i biseksualizam. Hermafroditi mogu biti sinhroni (simultani) kad i jaja i sperma sazrijevaju u isto vrijeme, ili asinhroni (konsekutivni) kad riba funkcionira ili kao mužjak ili kao ženka u isto vrijeme. Uniseksualizam je rjeđi od hermafroditizma, ali poznati su slučajevi kad ženka producira samo ženske potomke. On može biti popraćen bilo ginogenezom bilo hibridogenezom. Većina riba reproducira se biseksualno, imaju odvojene spolove koji se u prirodi nalaze u odnosu 1 : 1. Spolni kromosomi su na primitivnom stupnju evolucije riba i morfološki se ne razlikuju od autosoma kod većine vrsta. Zbog toga su korištene druge metode da bi se prikazali spolni kromosomi.

Široki raspon kromosomskog broja je varljiv. Broj kromosoma i varijabilnost u broju kromosoma čini osnovu po kojoj se vrši određivanje u taksonomiji riba. Kariotipske razlike među vrstama i redovima mogu biti korištene da bi se odredile fenotipske sličnosti i filogenetski odnosi.

Veličina genoma, ili količina DNA po nukleusu, također pokazuje veliku raznolikost među ribama. Količina DNA unutar porodice bude relativno stabilna, iznimke se mogu naći u nekim porodicama poput *ciprinida* (Gold, 1979).

Riba je korištena u monitoringu efekata niske koncentracije polutanata na njihove kromosome u prirodi u eksperimentima koji su mogli dati kvantitativnu procjenu rizika ekspozicije riba agensima koji oštećuju kromosome, to bi mogao biti koristan prilog skrining testovima napravljenim da bi se zaštitilo ljudsko zdravlje.

Da bi se danas napravila selekcija na bilo kojoj vrsti riba, populacija ne može biti izolirana od citogenetičkih analiza vrsta u toj populaciji. Citogenetika sa svim svojim praktičnim primjenama trebala bi se mnogo više koristiti u reprodukciji riba. Purdom i Linkoln (1973) smatraju da visoko križani sojevi mogu biti producibilni samo u nekoliko generacija povećanjem stupnja parenja kroz artificijelnu partenogenezu ili ginogenezu. Uloga kromosomskih anomalija u reproduktivnom neuspjehu nije poznata, ali te je anomalije lako identificirati općim kariotipskim analizama,

Summary

STUDIES ON FISH CYTOGENETICS

An accurate cytogenetic survey of fish has become increasingly important in order to establish the chromosomal relation with teleost, and to enlighten the relations between chromosomal evolution and differentiation of vertebrata species. Since fish are comparatively difficult for cytogenetic studies, not much progress has been made in this field. The development of cytogenetic techniques for fish chromosomes since 1961, particularly, the accurate air-drying method, combined with colchicine treatment to accumulate cells at metaphase and facilitate the spread of chromosomes, enabled the accurate delination of chromosomes in somatic cells. In addition, fish cell culture (blood, fins, scales, ovaries, kidney, and eye embryos) provides important material for cytological analysis.

Fish stand out amongst the vertebrates in the range of sexuality which they exhibit. The various strategies employed include hermaphroditism, unisexuality and bisexuality. Hermaphrodites, may be synchronous (simultaneous) when both eggs and sperms mature at the same time, or asynchronous (consecutive) when the fish functions as either male or female at any one time. Unisexuality in fish is rarer than hermaphroditism, but cases are known whereby the female produce only female offspring. This may be accomplished by either gynogenesis or hybridogenesis. The majority of fish reproduce bisexually, and have separate sexes which in nature are regularly encountered in an approximate 1:1 ratio. Sex chromosomes are in a primitive state of evolution in fish and are morphologically indistinguishable from autosomes in the majority of species. Hence, methods other than cytological ones have to be used to demonstrate sex chromosomes.

The wide range of chromosome numbers in fish is misleading. Chromosome number and variabilities in chromosome number distinguish certain major taxonomic groupings of fish. Karyotypic differences among species of taxons may be used to determine phenetic similarities and phylogenetic relationships.

Genome size, or the amount of DNA per nucleus, also shows wide variation among fish. DNA amounts in one family tend to be relatively stable, but exceptions occur in some families like cyprinida, where species may differ in DNA content by more than two fold (Gold, 1979).

Fish have been used in monitoring the effects of low level pollutants on their chromosomes in the field and/or experimental conditions which could give quantitative estimates of risk from exposure of fish to chromosome damaging agents. This could be a useful addition to screening tests designed to protect public health.

Presently, selection on any fish species population cannot be isolated from the cytogenetical analysis of

the specimens in that population. The discipline of cytogenetics, along with its practical application, has yet to be used extensively in fish breeding on fish culture. Purdom and Lincoln (1973), have suggested that highly inbred strains could be produced in only a few generations by increasing the rate of inbreeding through artificial parthenogenesis or gynogenesis. The role of chromosomal anomalies in reproduction failure is not well known, but those anomalies are easily identified through general karyological analysis.

LITERATURA

- Alink, G. M., Frederix-Wolters, E. M. H., Van der Gaag, M. A., Van Kerckhoff, J. F. J., Poels, C. L. M. (1980): Induction of sister chromatid exchanges in fish exposed to Rhine water. *Mutat. Res.* 78, 396—374.
- Al-Sabti, K. (1983): O kromosomima i upotrebljavanoj terminologiji. *Ribarstvo Jugoslavije* 38, 31—32.
- Al-Sabti, K. (1983): Pregled metoda upotrebljavanih za preparaciju kromosoma riba. *Ribarstvo Jugoslavije*, 38, 77—78.
- Al-Sabti, K. (1983): Efekt zagađenja voda na citogenetika ribe (Kromosomske aberacije). *Ribarstvo Jugoslavije* 38, 109—110.
- Al-Sabti, K. (1983): Ginogeneza u riba. *Ribarstvo Jugoslavije* 39, 5—6.
- Al-Sabti, K., Fijan, N., Kurelec, B. (1984): Frequency of chromosomal aberrations in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) exposed to detergent and benzene. *Vet. arh.* 54, 83—89.
- Al-Sabti, K. (1985): Frequency of chromosomal aberrations in the rainbow trout, (*Salmo gairdneri* Rich.), exposed to five pollutants. *J. Fish Biol.* 26, 13—19.
- Atz, J. W. (1964): Intersexuality in fishes. In «Intersexuality in vertebrates including man» (C. N. Armstrong and A. J. Marshall, eds.), pp. 145—232. Academic Press, New York.
- Barker, C. J., Rackham, B. D. (1979): The induction of sister chromatid exchanges in cultured fish cells (*Ameioblastus*) by carcinogenic mutagens. *Mutat. Res.* 68, 381—387.
- Gold, J. R. (1979): Cytogenetics. In «Fish Physiology» (W. S. Hoar, D. J. Randall and J. R. Brett, eds.). Vol. VIII, pp. 354—405. Academic Press, New York and London.
- Hickling, C. F. (1971): *Fish Culture*. Faber and Faber, London.
- Hooftman, R. N. (181): The induction of chromosomal aberrations in *Notobranchius rachowi* Pisces: Cyprinodontidae) after treatment with ethyl methanesulfonate or benzo(a)pyrene. *Mutata. Res.* 91, 347—352.
- Hooftman, R. N., de Raat, W. K. (1982): Induction of nuclear anomalies (micronuclei in the peripheral blood erythrocytes of the Eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulfonate. *Mutat. Res.* 104, 147—152.
- Jenssen, D., Ramel, C. (1980): The micronucleus test as a part of a short-term mutagenicity test program for the prediction of carcinogenicity evaluated by 143 agents tested. *Mutat. Res.* 75, 191—202.
- Kligerman, A. D., Bloom, S. E., Howell, W. M. (1975): *Umbra limi*: A model for the study of chromosome aberrations in fishes. *Mutat. Res.* 31, 225—233.
- Kligerman, A. D. (1979): Induction of sister chromatid exchanges in the central mudminnow following in vivo exposure to mutagenic agents. *Mutat. Res.* 64, 205—217.

- Kocan, R. M., Landolt, M. L., Bond, J. A., Benditt, E. P. (1981): In vitro effect of some mutagens (carcinogens on cultured fish cells. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 10, 663—671.
- Landolt, M. L., Kocan, R. M. (1983): Fish cell cytogenetic: a measure of the genotoxic effects of environmental pollutants. In »Aquatic Toxicology« (J. O. Nriagu, ed), pp. 225—352. John Wiley and Sons Inc.
- Lepori, N. G. (1980): Sex differentiation, hermaphroditism, and intersexuality in vertebrates including man. Piccin, Padua.
- Lodi, E. (1979): *Experientia* 35, 1440—1441.
- Maddock, M. B., Kelly, J. J. (1980): A sister chromatid exchange assay for detecting genetic damage to marine fish exposed to mutagens and carcinogens. In »Water Chlorination: environmental impact and health (R. L. Jolly, W. A. Brunes, R. B. Cumming and V. A. Jacobs, eds), pp. 835—844. Ann Arbor, Michigan.
- Ohno, S. (1967): Sex chromosomes and sex-linked genes (A. Labhart, T. Mann, L. T. Samuels, and J. Zander, eds.), Monographs on Endocrinology, Vol. 1. Springer Verlag, Berlin and New York.
- Ojima, Y. (1982): Fish cytogenetic. In »Chromosomes in evolution of eukaryotic groups« (A. K. Sharma and A. Sharma, eds). CRC Press.
- Post, A. (1965): Vergleichende untersuchungen der chromosomenzahlen bei süßwasser-teleosteern. Z. Zool. Syst. Evolutionsforsch 3, 47—93.
- Potter, I. C., Rothwell, B. (1970): The mitotic chromosomes of the lamprey, *Petromyzon marinus* L. *Experientia* 26, 429—430.
- Prein, A. E., Thie, G. M., Alink, G. M., Koeman, J. H. (1978): Cytogenetic changes in fish exposed to water of the river Rhine. *Sci. Total Environ.* 9, 287—291.
- Purdom, C. E., Lincoln, R. F. (1973): Chromosome manipulation in fish. In »Genetics and Mutagenesis of Fish« (J. H. Schröder, ed.), pp.
- Refstie, T. (1981): Tetraploid rainbow trout produced by Cytochalasin B. *Aquaculture* 25, 51—58.
- Sofradžija, A., Vuković, T., Hadžiselimović, R. (1980): Effect of some pesticides and detergents on the fish chromosomes sets — results of the preliminar investigations. *Ichthyologia* 12, 71—76.
- Stromberg, P. T., Landolt, M. L., Kocan, R. M. (1981): Alterations in the frequency of sister chromatid exchanges in flatfish from puget sound. Washington following experimental and natural exposure to mutagenic chemicals. NOAA Technical Memorandum, Office of Marine Pollution Assessment-10, pp. 1—43, Boulder, Colorado — U.S.A.
- Yamamoto, T. (1969): Sex differentiation. In »Fish Physiology« (W. S. Hoar and D.J. Randall, eds.), Vol. 3, pp. 117—175. Academic Press, New York.