

# Pregled metoda upotrebljavanih za preparaciju kromosoma riba

K. AL-Sabti

Povijest i razvitak metoda koje se upotrebljavaju za preparaciju kromosoma kod riba vrlo je zanimljiv zbog toga što je započeo s ograničenim sredstvima, opremom, kemikalijama te mikroskopima s ograničenim kapacitetom povećanja. Najviše poteškoća u ovom polju, a na proučavanju riba, predstavljali su kromosomi riba koji su vrlo mali ali zato mnogobrojni kao i to što se većina ovih metoda koristila do sada samo na određenom broju vrsta riba.

Kromosome kalifornijske pastrve, u fazi njihova ranog embrionalnog razvoja, proučavali su **Svardson** (1945), **Bungenberd de Jong** (1955) i **Wright** (1955). Postupak je u kratkim crtama, bio slijedeći: oplodena jajašca stavljana su u zdjelice obložene gazom i uronjene u tekuću vodu (temperatura 9°C). Sedam dana nakon oplodivanja jaja su fiksirana u Nawashin-Karpechenko fiksativu. Nakon toga fiksirana jaja, u obliku zelenih diskova, sakupljena su pomoću pincete i stavljena u otopinu po Karpechenku. Nakon vadenja iz Karpechenko otopine, da bi se spriječilo oštećivanje germinativnog sloja, diskovi su stavljani u agar i parafin. Blokovi parafin-agar rezani su zatim na vrlo tanke dijelove (15u) i bojani ljubičastom genecianom po Newtenu.

Istu metodu koristili su i **Boothroyd** (1959) i **Simon** (1963) s jedinom razlikom što je Boothroyd za fiksiranje upotrijebio 45% octenu kiselinu, a za bojenje 4% ili 6% acetokarmin. Simon je, međutim, fiksirao s jednim dijelom glacijalne octene kiseline i sa tri dijela 99% isopropilnim alkoholom, a bojava sa svježe filtriranim aceto-orcinom. Ovu tehniku modificirali su također i **Rees** (1967) i **Pegington i sur.** (1967) i to tako da su jaja nakon fertilizacije uronili 4 sata u 0.2% kolhicin te bojali metodom po Feulgen-u.

Dr Kabil Al Sabti, znan. asistent, Centar za istraživanje mora Zagreb, Institut »Ruđer Bošković«, Zagreb.

Do daljnjeg razvoja metode došlo je nakon što su **Ohno** i sur. (1965), **Nygren** i sur. (1968) i **Al-Sabti** (1982) koristili »squash« tehniku za analizu kromosoma bubrega, jajnika, jetre i škruga. Metoda se sastoji u slijedećem: ribi je apliciran intramuskularno (i/m) ili intraperitonealno (i/p) kolhicin (0.8 ml 0.5% na 100 g tjelesne mase). Nakon ekspozicije od 3 sata riba je ubijena, organi izvađeni i hipotonizirani u hipotoničnoj otopini (destilirana voda ili 0.005 N KCl) te fiksirani u 50% octenoj kiselini ili prema Carnoy-u (1:3). Slične tehnike koristili su i drugi znanstvenici uz određene modifikacije. Tako su **McPhail** i **Jones** (1966) aplicirali ribama 0.2-0.4 ml 0.05% kolhicina. Poslije hipotonizacije organi su fiksirani i bojani sa 2% aceto-orcinom. **Sasaki** i sur. (1968) je aplicirao i/p 0.5-2 ml 0.05% kolhicina i hipotonizirao sa 0.075 M KCl. **Fukuoka** (1972) je aplicirao ribama 7 ug/ml g težine kolhicina, a ekspoziciju produžio na 6 do 8 sati. **Marian** i **Krasznai** (1979) koristili su 0.5% kolhicin i to 0.01 ml/g tjelesne težine.

Kao što se iz gore opisanog vidi, većina autora koristila je kolhicin kao inhibitor stvaranja diobenog vretena. **Cuellar** i **Uyeno** (1972) koristili su umjesto kolhicina 0.5 ml 5% Velban i ekspoziciju od 3 sata.

Kulture tkiva također su se koristile za preparaciju kromosoma u riba i to s različitim modifikacijama. **Roberts** (1970) je, na primjer, isjeckao tkivo i isprao ga u BSS (Balance Salt Solution), digestirao ga u tripsinu i suspendirao u mediju za rast. Nakon 5-6 dana dodao je kolcemid i tkivo inkubirao 4-6 sati. Nakon toga BSS zamjenjen je 0.9% natrijevim citratom. **Chen** (1970) suspendira tkivo ovarija u tripsinu, tretira sa kolhicinom i konačno kipotonizira i fiksira. On je također izolirao tkivo bubrega, usitnio ga škarama u fine fragmente i suspendirao u BSS. Nakon toga dodao je 1 ug/ml kolcemida i pohranio na sobnoj temperaturi. Stanice su zatim skupljene centrifu-



giranjem i resuspendirane u 0.075 M KCl. Gold (1974) se poslužio sličnom tehnikom. Ribama je aplicirao 0.8 ml/0.5% 100 g kolhicina. Uspoređujući njegovu metodu s ostalim metodama jasno je da je ona preskupa i preduga.

**Denton i Howell** (1969) proučavali su kromosome epitela ljuski i peraja riba. Mali primjerci riba stavljani su u 0.01% aeriranu soluciju kolhicina, a zatim je odstranjenim ljuskama izvršena hipotonizacija i fiksacija.

Najznačajniji napredak u citološkim studijama započeo je kada su **Moorhead** i sur. (1960) uzgojili kulturu ljudskih leukocita. Nakon toga započela su i citološka istraživanja na ribama uzgajanjem kulture njihovih leukocita. **Heckman** i **Brubaker** (1970) koriste su phytohemaglutinin (PHA) kako bi stimulirali metafaze leukocita kod ciprinida. Ustanovili su da se ne postiže nikakav ili tek minimalan rast u slučajevima kad se PHA ne koristi. Grameltvedt (1975) je uzeo uzorke krvi te izdvojio leukocite centrifugiranjem pri 10 x g/5 min. Bijele stanice sa plazmom te nešto crvenih stanica su izdvojene nakon čega je 0.1 ml ove smjese inkubirano u mediju za rast. Nakon 5 do 7 dana dodana je jedna kap kolhicina i to 16-20 h prije »sakupljanja«. Sličnu metodu koristio je i **Thoergaard** (1977) jedino s tom razlikom što je dodao kolhicin u koncentraciji od 5 ug/ml. Kultura je bila sakupljena nakon 4 sata. Različiti autori koristeći istu tehniku ponešto su je modificirali. Na primjer, uzimane su različite količine krvi ili različiti sastavi medija koji se koriste za kulturu leukocita.

Možemo zaključiti da je najuobičajena metoda koja se do sada koristila »squash tehnika« zbog toga što nije skupa i što se s njom lako radi za razliku od metode kulture leukocita. Ipak, metoda kulture leukocita daje u preparaciji kromosoma najbolje rezultate.

## SUMMARY

### Review of methods used for chromosomal preparations in fishes.

The paper presents the history of the techniques used to date for the chromosome preparation of the fish. Briefly it is as follows: In the period 1934-1960 most of the chromosome preparation techniques were more or less the same, i.e. fertilized eggs discs were used. Ohno et al. (1965) improved the method using the squash technique for the chromosome preparations from the kidney, liver, gonads and the gills. This technique has been extensively used because it yields good results. Roberts (1970) cultured the cells of the kidney, gonads and liver. Many advantages came from using the leukocyte chromosome preparation in the fish. In comparison with some other techniques, this technique has many advantages - chromosomes are well spread and the morphology is clear. There are also some disadvantages - the technique is very expensive and time consuming as well. Technique used most often by scientists in this field is the squash technique because it is fast, cheap and easy to work with.

## LITERATURA

- Al-Sabti, K.* (1982): Utjecaj nekih kemijskih zagađivanja na kromosome Kalifornijske pastve (*Salmo gairdneri*, Rich). Disertacija, Veterinarski fakultet — Zagreb.
- Boothroyd, E. R.* (1959): Chromosome studies on three Canadian population of Atlantic salmon (*S. salar* L.). *Can. J. Genet. Cytol.*, 1 : 161-172.
- Bungenberg de Jong, C. M.* (1955): Cytological studies on *Salmo irideus*. *Genetica*, 27 : 472-483.
- Chen, T. R.* (1970): Fish chromosome preparation: Air-Dried Displays of cultured Ovarian cells in two killifishes (*Fundulus*). *J. Fish. Res. Bord. of Canada*, vol. 27, no. 1 : 158-161.
- Denton, T. E. and Howell, W. M.* (1969): A scale epithelium of teleost fishes. *Copeia*, no. 2 : 4-392.
- Fukuoka, H.* (1972): Chromosomes of the sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Jap. J. Genet.*, 47 (6) : 459-461.
- Gold, J. R.* (1974): A fast and easy method for chromosome karyotyping in adult teleosts. *Prog. Fish-Cult.* 36 : 169-171.
- Heckman, J. R. and Brubaker, P. E.* (1970): Chromosome preparation from fish blood leukocyte. *Prog. Fish-Cult.*, vol. 32, no. 4 : 206-208.
- Cuellar, O. and Uyeno, T.* (1972): Triploid in rainbow trout. *Cytogenetics*, 11 : 508-515.
- Marian, T. and Kraszna, Z.* (1979): Comparative karyological studies on Chinese carps. *Aquaculture*, 18 : 325-336.
- McPhail, J. D. and Jones, R. L.* (1966): A simple technique for obtaining chromosomes from teleost fishes. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 23 (5) : 767-768.
- Moorhead, S. P., Nowell, P. C., Mellman, W. J., Battips D. M. and Hungerford, D. A.* (1960): Chromosome preparation of leukocytes culture from human peripheral blood. *Experimental Cell Res.*, 20 : 613-616.
- Nygren, A., Nilsson, B. and Jahnke, M.* (1968): Cytological studies in Atlantic salmon (*S. salar*). *Ann. Acad. Reg. Sci. Uplasiens*, 12 : 21-52.
- Ohno, S., Stenius, C., Faisst, E. and Zenzes, M. T.* (1965): Post-Zygotic chromosomal rearrangements in rainbow trout (*S. irideus* Gib.). *Hereditas*, 81 : 55-62.
- Pegington, C. J. and Rees, H.* (1967): Chromosome size in salmon and trout. *Chromosoma*, 21 : 475-477.
- Rees, H.* (1967): The chromosomes of *S. salar*. *Chromosoma*, 21, 472-474.
- Roberts, F. L.* (1970): Atlantic salmon (*S. salar*) chromosomes and speciation. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 99 : 105-111.
- Sasaki, M., Hitsumachi, S., Makine, S. and Terao, T.* (1968): A comparative study of the chromosomes in the chum salmon, the kokanee salmon and their hybrids. *Caryologia*, 21 : 389-394.
- Simon, R. C.* (1963): Chromosome morphology and species evolution in five American species of Pacific salmon (*Oncorhynchus*) *J. Morph.*, 112 : 77-97.
- Svardson, G.* (1945): Chromosome studies on salmonidae. Rept. Swedish. state inst. Freshwater Fishery Res Drettingholm 23 : 1-151.
- Thoergaard, G. H.* (1976): Robertsonian polymorphism and constitutive heterochromatin distribution in chromosomes of the rainbow trout (*S. gairdneri*). *Cytogenet. Cell Genet.*, 17 : 174-184.
- Wright, J. E.* (1955): Chromosome number in trout. *Prog. Fish-Culturist*, vol. 17, no. 4 : 172-176.
- Grameltvedt, A. F.* (1977): Chromosomes of salmon (*S. salar*) by leukocyte culture. *Aquaculture*, 5 : 205-209.