

## Analiza kariotipa žutotrbiš žaba *Bombina variegata* (Anura, Amphibia)

---

Urađena je citogenetička analiza kariotipa žutotrbiš žaba *Bombina variegata* iz neposredne okoline IS Petnica. Za analizu su korišćene metode konvencionalnog bojenja hromozoma, bojenje srebro-nitratom i diferencijalno bojenje hromozoma – metoda C-traka. Urađen je i analiziran kariotip *Bombina variegata*. Utvrđeno je da se sastoji od 24 hromozoma. Dalje, nukleolusni organizatori (NOR) se nalaze na dugim kracima 7. para hromozoma. Mikroskopskom analizom data je distribucija konstitutivnog heterohromatina.

---

### Uvod

Vrste žaba roda *Bombina* su tokom poslednjih dvadeset godina čest objekat istraživanja koja se uglavnom koncentrišu na problematiku hibridizacije dve vrste: *Bombina variegata* (žutotrba žaba) i *Bombina bombina* (crvenotrba žaba). Podaci o kariotipu ovih vrsta su, međutim, oskudni i daje ih Schmid (1987). O distribuciji konstitutivnog heterohromatina, recimo, nema nikakvih podataka u nama dostupnoj literaturi, dok citogenetička analiza *Bombina variegata* sa prostora Jugoslavije, do sada, nije rađena.

Tehnike citogenetike daju mogućnost definisanja kariotipa, tj. određivanja broja i morfologije hromozoma, položaja nukleolusnih organizatora na hromozomima kao i distribucije heterohromatina i euhromatina.

Standardna metoda konvencionalnog bojenja omogućava određivanje broja i morfologije hromozoma. Ova metoda je u širokoj upotrebi i uvek je početni korak u jednoj citogenetičkoj analizi.

Za dobijanje položaja nukleolusnih organizatora koristi se standardna metoda bojenja srebro-nitratom. Nukleolusni organizatori predstavljaju regione na hromozomima koji sadrže uzastopne ponovke gena za sintezu 18S i 28S rRNK. Ovi geni se ponavljaju 200–400 puta i čine klastere gena. Metodom bojenja srebro-nitratom moguće je uočiti samo one nukleolusne organizatore koji su prethodno bili aktivni. Zbog toga se pretpostavlja da specifičnosti bojenja ovih regiona (izrazite tamne tačke na

---

Irena Selaković (1978),  
Valjevo, Milovana  
Glišića 62, učenica 3.  
razreda Valjevske  
gimnazije

Nadežda Apostolova  
(1977), Skopje, Partizan-  
ski odredi 17-III/9,  
učenica 4. razreda Pri-  
rodno-matematičke gim-  
nazije „Nikola Karev  
u Skopju

MENTOR:  
Nikola Tanić  
Institut za biološka is-  
traživanja „Siniša Stank-  
ović u Beogradu

hromozomima) doprinose razni faktori transkripcije kao i neki specifični proteini prisutni u ovim regionima.

Pored konvencionalnog bojenja za analizu kariotipa se koriste i metode diferencijalnog bojenja. Jedna od njih je tehnika C-traka kojom se dobija slika o distribuciji konstitutivnog heterohromatina. On se sastoji od visoko repetitivne DNK za koju se pretpostavlja da ima ulogu u održanju konstitucije hromozoma i jedra, sparivanju homologih hromozoma tokom deobe i u specijaciji. Heterohromatin za razliku od euhromatina ne sadrži aktivne gene i kondenzovaniji je (stoga se koristi za diferencijalno bojenje hromozoma). Homologi hromozomi imaju istovetnu distribuciju konstitutivnog heterohromatina što se koristi za njihovo sparivanje. Distribucija konstitutivnog heterohromatina je i species specifična.

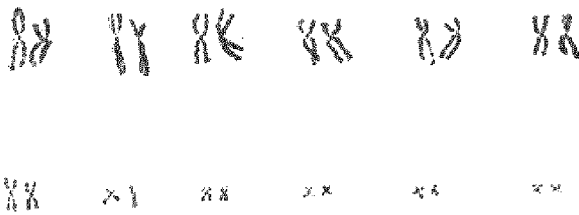
Cilj ovog rada je karakterizacija kariotipa *Bombina variegata* iz neposredne okoline IS Petnica.

## Materijal i metode

Kao biološki materijal korišćene su žutotrbe žabe *Bombina variegata* (*Anura*, *Amphibia*) uzorkovane tokom avgusta 1996. godine u neposrednoj okolini IS Petnica (Rogljević, reka Banja, Petničko jezero). Sakupljeno je 18 primeraka i tretirano kolhicinom  $18^h$ . Svakoј jedinki intraperitonealno je ubrizgano 0.2 ml 0.3% rastvora kolhicina koji sprečava polimerizaciju deobnog vretena zaustavljajući ćelijsku deobu u metafazi. Nakon  $18^h$  jedinke su žrtvovane i za dalju preparaciju korišćena su creva i testisi. Izolovano tkivo je homogenizovano seckanjem i tretirano hipotoničnim rastvorom KCl (0.56%)  $1^h$  na sobnoj temperaturi. Materijal je fiksiran Karnojevim fiksativom (metanol : sirćetna kiselina = 3:1) 2 puta po 15 minuta. Mitotički preparati dobijeni su nanošenjem materijala na pločice zagrejane na temperaturi od oko  $60^{\circ}C$ , dok su mejotički preparati pravljeni flame-drying postupkom.

Konvencionalno bojenje mitotičkih hromozoma urađeno je 10% Giemsa-om, a mejotičkih 5% Giemsa-om. Za dobijanje NOR-a korišćena je metoda bojenja srebro-nitratom po Howell i Black-u (1980).

Tehnika C-traka je urađena modifikacijom metode po Schmid-u (1978). Modifikacije se odnose na dužinu tretmana preparata 5% barijum hidroksidom (5 minuta tretmana po Schmid-u zamenjeno je tretmanom od 20, 25, 28, 30, 32, 35 i 60 sekundi) i bojenja Giemsa-om (10% rastvor Giemsa-e u trajanju od  $1^h$  umesto 8% rastvora u trajanju od 15 minuta). Sam mehanizam nastanka C-traka nije u potpunosti razjašnjen. Tretiranjem preparata barijum hidroksidom vrši se denaturacija proteina. HCl vrši depurinizaciju tako što se purini protonizuju te se deo lanca lomi i oslobađa purinske baze. U nastanku C-traka depurinizacija je završena kada se eliminiše jedan purin na 300bp nakon čega deterđžent ( $2 \times SSC$ ) rena-



Slika 1.  
Kariogram *Bombina*  
variegata.

Figure 1.  
Karyogram *Bombina*  
variegata.

turiše DNK. Visoko repetitivne sekvence se brzo renaturišu i bolje primaju boju u odnosu na euhromatinske regione.

Pomenutim metodama dobijeni su preparati spremni za mikroskopsku analizu. Kompletne i dobro raspršene mitoze se fotografišu. Sa fotografija se isecaju hromozomi i slažu u parovima po opadajućoj veličini. Na taj način se dobija kariogram.

## Rezultati i diskusija

Tehnikom konvencionalnog bojenja hromozoma utvrđeno je da se kariotip *Bombina variegata* sastoji od 24 hromozoma koji se arbitrarno mogu podeliti u dve grupe: 6 parova velikih i 6 parova srednjih i malih hromozoma (slika 1). Ovo je u saglasnosti sa podacima koje iznosi Schmid (1987). Metacentrični su 1, 6, 9, 10, i 11. par, submetacentrični su 2, 3, 4, 5, 7. i 12. par dok je 8. par hromozoma izraziti submetacentrik. Ovi podaci su potvrđeni izračunavanjem centromernog indeksa, odnosa krakova i relativne dužine svakog hromozoma. Statistički podaci za svaki hromozomski par dati su u tabeli.

Dobijeni statistički podaci za hromozomske parove			
Par	Centromerni indeks	Odnos krakova	Relativna dužina hromozoma
1	183.9	1.13	1.84
2	182.8	0.82	1.83
3	193.5	0.66	1.94
4	173.6	0.76	1.73
5	154.4	0.54	1.54
6	166.7	1.05	1.67
7	133.9	0.78	1.34
8	92.5	0.45	0.93
9	200.0	1.00	2.00
10	200.0	1.00	2.00
11	200.0	1.00	2.00
12	150.0	0.50	1.50

centromerni indeks = dužina hromozoma  $\times$  100 : dužina većeg kraka  
odnos krakova = dužina manjeg : dužina većeg kraka  
relativna dužina hromozoma = dužina hromozoma : dužina većeg kraka



Slika 2.  
Položaj nukleolusnog organizatora.

Na dužim kracima sedmog para hromozoma uočene su sekundarne konstrikcije koje korespondiraju sa nukleolusnim organizatorom. Položaj NOR-a je potvrđen i mikroskopskom analizom preparata dobijenih metodom bojenja srebro-nitratom kao i mikroskopskom analizom C-traka gde se na istom položaju nalaze heterohromatinske trake. Kako fotografije C-traka još uvek nisu urađene, o distribuciji konstitutivnog heterohromatina će biti reči samo opisno na osnovu direktnog posmatranja pod mikroskopom. Najbolji rezultati dobijeni su na preparatima koji su tretirani 28–35 sekundi barijum hidroksidom i to najviše pri tretmanu od 32 s. Utvrđeno je da se konstitutivni heterohromatin nalazi centromerno i pericentromerno na oba kraka na svim velikim i srednjim hromozomima. Osim toga, ima ga na svim velikim hromozomima i telomerno. Na dužim kracima najvećeg hromozomskog para postoje još dve intersticijalne trake, dok se na kratkim kracima uočavaju jedna intersticijalna i jedna telomerna traka. Na najmanjim hromozomima postoje centromerne i telomerne trake. Date rezultate za distribuciju C-traka nije moguće diskutovati sa drugim autorima jer u raspoloživoj literaturi nema objavljenih podataka.

Figure 2.  
Position of the nucleolar organizer.

## Zaključak

Kariotip žutotrbih žaba *Bombina variegata* sastoji se od 24 hromozoma. Nukleolusni organizatori se nalaze na dužim kracima 7. para hromozoma. Što se tiče distribucije konstitutivnog heterohromatina kod

*Bombina variegata* uočeno je da tehnika C-traka daje dobre rezultate ukoliko su preparati izloženi dejstvu barijum hidroksida u vremenu od 32 (4) sekunde. Izloženi podaci o distribuciji konstitutivnog heterohromatina do sada nisu objavljeni, te rezultati ovog rada mogu biti interesantni za dalja istraživanja.

---

## Literatura

- [ 1 ] Babu, A., Verma, R.S. 1989. *Human chromosomes, manual of basic techniques*. Pergamon Press.
- [ 2 ] Black, D.A., Howell, W.M. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a one step method. *Experientia*, 36.
- [ 3 ] Comings, D. E. at al. 1973. The mechanism of C- and G-banding of chromosomes, *Experimental Cell Research*, 77: 469-93.
- [ 4 ] Diklić, V., Kosanović, M., Dukić, S., Nikoliš, J. 1991. *Biologija sa humanom genetikom*. Gornji Milanovac: Dečije novine.
- [ 5 ] Dumanović, J., Marinković, D., Denić, M. 1995. *Genetički rečnik*. Beograd: Naučna knjiga.
- [ 6 ] Hernandez-Verdun, D. 1983. The Nucleolar Organizer Regions. *Biology of the Cell*, 43: 191-202.
- [ 7 ] Hsu, T.S. 1975. A possible function of constitutive heterochromatin: the bodyguard hypothesis. *Genetics*, 73: 137-50.
- [ 8 ] Mišić, P. 1977. *Genetika*. Beograd: Zavod za udžb. i nast. sredstva.
- [ 9 ] Kučić, M., Krajčinčić, B. 1989. *Medicinska genetika*. Beograd
- [ 10 ] Schmid, M. 1978. Chromosome Banding in Amphibia. *Chromosoma*, 66: 361-88.
- [ 11 ] Schmid, M. 1978. Chromosome Banding in Amphibia. *Chromosoma*, 68: 131-48.
- [ 12 ] Schmid, M. 1982. Chromosome Banding in Amphibia. *Chromosoma*, 87: 327-344.
- [ 13 ] Yunis, J. 1971. Satellite DNA and Cell Function. *Science*, 174: 1200-206.

---

Irena Selaković

## Karyotype analysis of yellow-bellied toads *Bombina variegata* (Anura, Amphibia)

The study of toads of the genus *Bombina* in Europe has a long history, and for much of it debate has centered around whether the two species, *Bombina variegata* (yellow-bellied) and *Bombina bombina* (fire

bellied toad), hybridize in nature. However, the facts about the karyotype of these species are meager. There are no facts in available literature about the distribution of constitutive heterochromatin, while the whole cytogenetic analysis of *Bombina variegata* hasn't been done yet in the Yugoslav territory.

Conventional cytogenetic methods were used for the analysis of the number and morphology of chromosomes. This method is often used and it is always the first step in one cytogenetical analysis. Ag staining (Howell and Black) was used for the localization of the nucleolar organizer regions (NORs) (location of genes for 18S + 28S rRNA). The technique used for the labeling of C-bands was performed according to Schmid (1978), but this standard technique was modified. The modifications are: the slides are incubated for 20-60 sec. (instead of standard 5 min.) in 5% Ba(OH)<sub>2</sub>; the staining was done in 8% Giemsa (pH 6.8 15 min.) and the standard in this case is a 10% Giemsa (pH 6.8 1h). This procedure gave slides ready for analysis. After that, the usually procedure was used: the photographs were made from the whole and dispersed mitosis; chromosomes were cut from the photos and arranged in the couples in the slider size; in this way the karyogram was made.

By using a conventional cytogenetic method, it was found that the karyotype of *Bombina variegata* contains 12 pairs of chromosomes: 6 pairs of macrochromosomes and 6 pairs of medium-sized and small chromosomes (Fig. 1). This is in accordance with results done by Schmid (1987). The secondary constrictions which are corresponding with NORs were noticed on the long arms in chromosome pair 7 (Fig. 2). This result is the same as the result which is obtained by a microscope analysis of C-band, where a heterochromatin region was found on the same location.

It turned out that the C-bands are the most legible on the slides which are treated with Ba(OH)<sub>2</sub> during 32 (4) sec. It was established that the constitutive heterochromatin is localized on the centromeric and pericentromeric regions on both arms of all macrochromosomes and medium-sized chromosomes. It occupies the telomeric positions at all macrochromosomes too. The heterochromatin is localized on two interstitial positions on the long arms of the biggest chromosome pair, but there are one interstitial and one telomeric position of the constitutive heterochromatin on the short arms. There are centromeric and telomeric bands on the small chromosomes.

We can't discuss these results with other authors, because there are no facts for this species in the available literature. Thus, they can be interesting for the future researches.

