

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Jelena Musić

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Bilinogojstvo

Kariotip ječma

Završni rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Jelena Musić

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Bilinogojstvo

Kariotip ječma

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu završnog rada:

1. izv.prof.dr.sc. Sonja Petrović, mentor
2. prof.dr.sc. Sonja Vila, član
3. izv.prof.dr.sc. Andrijana Rebekić, član

Osijek, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda, smjer Bilinogojstvo
Jelena Musić

Završni rad

Kariotip ječma

Sadržaj: Ječam je iza pšenice, kukuruza i riže na svijetu četvrta po redu najznačajnija žitarica koja pripada porodici trava. Cilj ovog rada bio je opisati i prebrojati metafazne kromosome mitoze meristema korijena ječma kako bi proučili morfologiju kromosoma odnosno mogli uočiti razliku u veličini kromosoma, te odrediti vrstu kromosoma to jest položaj njegove centromere. Samo istraživanje se provelo u nekoliko faza: u prvoj fazi naklijano je 30 zrna ječma do željene duljine korijena. U drugoj fazi istraživanja modificiranom metodom gnječenja i specifičnim bojanjem kromosoma napravljen je preparat stanica korijena ječma pomoću kojih su u trećoj fazi pomoću mikroskopa uspješno prebrojani kromosomi ječma i prikazan je kariogram i kariotip.

Ključne riječi: kariotip, kromosomi, ječam, squash metoda

24 stranica, 3 tablica, 14 slika, 17 literaturnih navoda

Završni rad je pohranjen u Knjižnici Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijek i u digitalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek BScThesis
Faculty of agrobiotechnical science Osijek
Professional study Plant production
Jelena Musić

Barley kariotype

Summary: The barley is besides wheat, corn and rice in the world the fourth most important grain belonging to the grass family. The aim of this paper was to describe and quantify the metaphase chromosomes of meristemous tissue of barley root to study the chromosome morphology and to detect the differences in chromosome and to determine the type of chromosome, that is, the position of its centromere. The research was carried out in several phases: in the first stage, 30 grains of barley were preferred to the desired length of root. In the second phase of the study, the modified chickpeas and chromosome, coloring technique was used to produce the barley rootstock preparation by means of which the microscope successfully counted barley chromosomes and displayed a karyogram and karyotype.

Keywords: karyotype, chromosomes, barley, squash method

21 pages, 3 table, 14 pictures, 17 references

Final work is archived in Library of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek and in digital repository of Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. MATERIJALI I METODE	4
2.1. Squash metoda	6
2.1.1. <i>Priprema materijala za bojanje</i>	6
2.1.2. <i>Primjena kolhicina</i>	7
2.1.3. <i>Fiksacija</i>	7
2.1.4. <i>Hidroliza</i>	8
2.1.5. <i>Bojanje</i>	9
2.2. Očitavanje rezultata mikroskopom	13
3. REZULTATI I RASPRAVA	14
4. ZAKLJUČAK	18
5. POPIS LITERATURE	19

1. UVOD

Ječam (*Hordeum vulgare* L.) je iza pšenice, kukuruza i riže na svijetu četvrta po redu najznačajnija žitarica (Poehlman, 1985.) koja pripada porodici trava (Kremer i Benhammouda, 2009.). Ova značajna žitarica jedan je od najranijih usjeva koji se kultivira od početka civilizacije te se velik dio svjetskog ječma proizvodi u regijama sa nepovoljnim klimatskim uvjetima za proizvodnju drugih žitarica (Poehlman, 1985.). Zrno ječma se koristi u proizvodnji alkoholnih pića te je značajno i u hranidbi stoke (Szczo drak i sur., 1992.). Ječam je diploid sa vrlo malim brojem kromosoma ($2n=2x=14$) te se njegovi kromosomi razlikuju u metafazi mitoze pod svjetlosnim mikroskopom uz pomoć korištenja squash metode (Ramage, 1985.). U ovom istraživačkom radu nam je vrlo bitna i značajna sama mitozna odnosno dioba somatskih to jest tjelesnih stanicakod koje od jedne stanice nastanu dvije stanice kćeri koje su kvalitativno i kvantitativno iste odnosno imaju isti genetski materijal.

Stanični ciklus somatskih stanica možemo podijeliti na dva stadija interfazu i mitozu. Kod biljaka mitozna se odvija u svim organima sa meristemskom tkivom kao što je vršak korijena, točke rasta stabla i dr. Ona prolazi kroz 5 osnovnih faza: profazu, prometafazu, metafazu, anafazu i telofazu (Petrović, 1992.). U interfazi se mogu jasno zapaziti jedna ili više jezgri koje su okruglaste ili eliptične forme. U ovoj fazi se odvijaju složeni biokemijski procesi kao što su replikacija molekule DNA, sinteza bjelančevina itd. Kromosomi se u drugoj fazi odnosno u profazipuno bolje vide, kraći su i spiralizirani te se formira diobeno vreteno. Nakon profaze slijedi metafaza kod koje završava prethodno stvaranje diobenog vretena,te se niti vretena spajaju s kromatidama u centromeru. Kromosomi se nalaze u središtu stanice koju nazivamo ekvatorijalna ili metafazna ravnina. U metafazi se najlakše može utvrditi broj kromosoma, forma i građa svakog kromosoma. Treća faza naziva se anafaza kod koje dolazi do diobe centromera te počinje razdvajanje sestrinskih kromatida. Niti diobenog vretena povlače kromatidena polove stanica tako da od jednog kromosoma jedna kromatida ide na jedan, a druga na drugi pol.

Mitoza završava telofazom, kromosomi se despiraliziraju, diobeno vreteno se raspada te započinje citokineza. Kod životinjskih stanica nastaje žlijeb koji se postepeno produbljuje dok ne podijeli stanicu na dvije stanice kćeri, a kod biljnih stanica ne nastaje žlijeb zbog čvrste celulozne stjenke nego se u ekvatorijalnoj ravnini formira fragmoplast odnosno

bačvasto tijelo u kojem se nalaze brojne Golgijeve vezikule sa sastojcima za izgradnju stanične stijenke (Tucović i Isajev, 1988.).

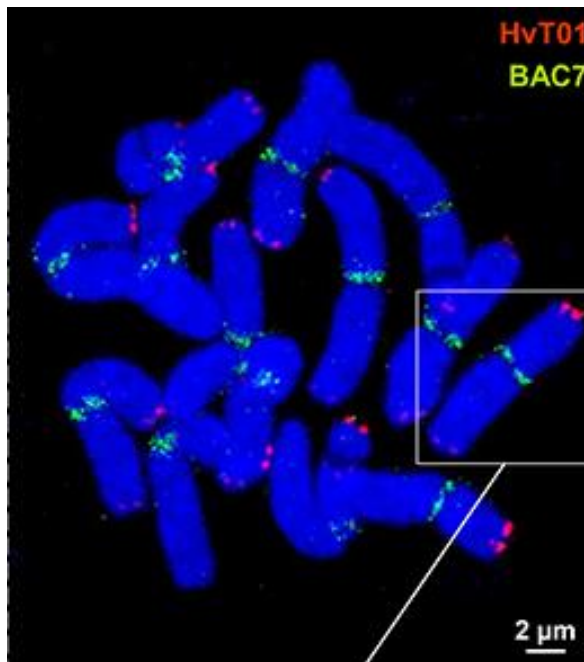
Skup svih kromosoma u jednoj stanici naziva se kariogram, a broj i izgled kromosoma jezgre eukariotske stanice se naziva kariotip (Petrović,1992.). Metode proučavanja kromosoma prije metode gnječenja (squash metoda), koju je prvi primijenio Belling (1921.), obavljano je pomoću mikrotomskih preparata i dobivenih skica stanica. Skice stanica i kromosoma obavljalo se uz pomoć CamereLucide (poznate kao crteži CameraLucida) tehnike koju je u 19. stoljeću (1807.) patentirao William Hyde Wollaston (https://en.wikipedia.org/wiki/William_Hyde_Wollaston).

Proces squash metode teče u nekoliko faza. U prvoj fazi je potrebno naklijati zrno biljne vrste koja se istražuje. Druga faza istraživanja temelji se na specifičnom bojanju kromosoma odnosno bojanju se cijeli korjenčići, no boja ostaje samo na vršnom meristemskom dijelu. Nakon toga slijedi „squash“ odnosno gnječenje meristemskih stanica korijena na predmetnom stakalcu. Prije same squash metode potrebno je prethodno obraditi materijal primjenom kemijskih spojeva tj. citostatika kao što je npr. kolhicin, α -monobromnaftalen, 8-oksikinolin i drugih koji svojim djelovanjem mogu izazvati tip endomitoze pod nazivom C-mitoza. Citostatici se koriste kako bi se spriječilo formiranje diobenog vretena zbog čega u metafazi mitoze u ekvatorijalnoj ravnini izostaje nakupljanje kromosoma to jest dolazi do razdvajanja kromosoma. U trećoj fazi uz pomoć svjetlosnog mikroskopa koji ima ugrađenu kameru slijedi pregledavanje preparata, prebrojavanje i opisivanje metafaznih kromosomi.

Kod istraživanja kromosoma primjenjuju se razne citološke tehnike, a među najboljim tehnikama koriste se FISH (Flourescentna *in situ* hibridizacija) i GISH (Genomska *in situ* hibridizacija). Za korištenja ovakvih tehnika potrebni su flourescentni mikroskopi te im je zajedničko da koriste fluorescencijske sonde koje se vežu samo za određene dijelove kromosoma (Slika 1.) ili genoma odnosno za detekciju specifičnih DNA ili RNA sekvenci unutar genoma (Devi i sur., 2003.).

Cilj ovog rada je opisati i prebrojati metafazne kromosome mitoze meristema korijena ječma kako bi proučili morfologiju kromosomaodnosno mogli uočiti razliku u veličini kromosoma, te odrediti vrstu kromosoma to jest položaj njegove centromere.

Uz pomoć kariotipa odnosno kromosomske karte neke osobe (organizma) može se zaključiti odnosno potvrditi je li ječam diploid te dobiti rezultate vezane za strukturu kromosoma, veličinu te se pomoću kariotipa mogu utvrditi pojedine nepravilnosti na kromosomima.



Slika 1. Prikaz kromosoma uz pomoć FISH tehnike

Izvor: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.00028/full>

2. MATERIJAL I METODE

U ovom istraživanju koristilo se sjeme ječma sorte Rex koja je dobivena iz gen kolekcije strnih žitarica iz Katedre za genetiku, oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo, Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek. Dio istraživanja proveo se u laboratoriju na Odjelu za biologiju, a dio u Laboratoriju za biljnu genetiku i biotehnologiju Katedre za genetiku, oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo. Kako bi provjerili utječe li starost meristemskog tkiva na rezultate, ukupno je naklijano 30 zrna ječma u različitom vremensom periodu.

Tijek naklijavanja tekao je u tri faze. U prvoj fazi u Petrijevu zdijelicu stavljen je filter papir koji je prethodno nakvašen destiliranom vodom te je na klijanje stavljeno deset zrna koja su klijala četiri dana (Slika 2.). Sljedeći dan, u drugoj fazi, su drugih deset zrna stavljena na klijanje na vremenski period od tri dana (Slika 3.). Posljednja faza trajala je dva dana te je također na nakvašeni filter papir stavljeno klijati deset zrna (Slika 4.).



Slika 2. Prva faza: klijanje sjemena kroz 4 dana (Foto original: Jelena Musić)



Slika 3. Druga faza: klijanje sjemena kroz 3 dana
(Foto original: Jelena Musić)



Slika 4. Prva faza: klijanje sjemena kroz 2 dana
(Foto original: Jelena Musić)

Zrna su ostavljena u laboratoriju na sobnoj temperaturi te prirodnoj svjetlosti. Prilikom klijanja trebalo je pripremiti da filter papir nikada ne ostane suh te da ne dođe do pojave patogena kao što su gljivice, kojima su povoljni uvjeti za razvoj vlažna sredina i povišena temperatura. Ukoliko bi došlo do takve situacije trebalo bi ponovno staviti klijeti zrna.

Na proces klijanja velik utjecaj imaju voda i svjetlost koji mogu ubrzati ili zaustaviti razvoj. Tijekom naklijavanja klijanca su izloženi prirodnoj svjetlosti te je filter papir konstantno bio nakvašen. Vizualno se može procijeniti kada je meristemsko tkivo prestaro odnosno kod kojih klijanaca će možda obojenje biti slabije. S obzirom na duljinu i boju korjenčića i pojavu klice koja je dosta izrasla u prvoj fazi vidljivo je da se radi o starijem meristemskom tkivu.

2.1. Squash metoda

2.1.1. Priprema materijala za bojanje

Klijanci su odrezani škarama kada su dosegli dužinu otprilike 2 cm te su stavljeni u tubice u ledenu vodu i ostavljeni preko noći na 4° C (Slika 5.). Klijance je potrebno staviti u hladnu vodu kako bi se zaustavila mitozna odnosno kako bi se stanica smrznula i prestala se dijeliti. Tubice su prethodno označene brojevima dva, tri i četiri prema danima klijanja kako se uzorci ne bi pomiješali.



Slika 5. Uzorci u ledenoj vodi (Foto original: Jelena Musić)

2.1.2. Primjena kolhicina

Kolhicin je citostatik, alkaloid iz biljke mrazovac (*Colchicum autumnale L.*) koji je vrlo štetan po zdravlje te je potrebna određena zaštita pri rukovanju. Mrazovac je biljka koja ima sve otrovne dijelove, koristi se u pučkoj medicini te u kliničkoj praksi. Sekundarni metabolit bilje mrazovac je alkaloid kolhicin, koji ima i ljekovito i toksično djelovanje. Američka agencija za hranu i lijekove je 2009. godine odobrila korištenje kolhicina za liječenje akutnog napada gihta te za liječenje obiteljske mediteranske groznice (Bušić, 2013.). Prije fiksacije kolhicinom je zaustavljeno formiranje diobenog vretena. Kromosomi koji su dosegli maksimalan stupanj kontrakcije i koji su jasno vidljivi ostali su porazbacani po stanici tj. nisu se smjestili u ekvatorijalnu ravninu tijekom metafaze (Singh, 2018.). Materijal se obrađivao u prikladnim posudicama otprilike 4 sata te je korištena 0,2 % vodena otopina kolhicina. Tijekom obrađivanja obavezano je nositi rukavice te zaštitnu masku.

2.1.3. Fiksacija

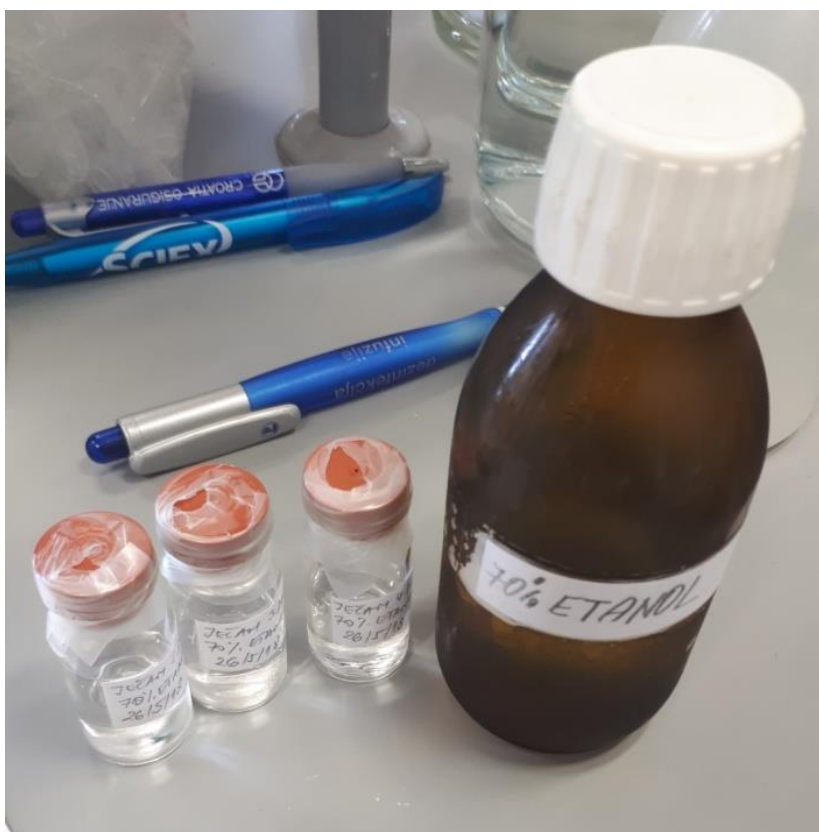
Nakon primjene kolhicina klijanci su kapaljkom prebačeni u nove tubice i obavljena je fiksacija čija je svrha zaustavljanje životnih procesa s minimalnim poremećajima stanica ili izobličenja tkiva, a najčešće se rabi mješavina octene kiseline i alkohola. Alkohol ima ulogu skupljanja tkiva tj protoplazme, dok zbog octene kiseline dolazi do bubrenja kromosoma. Tijekom fiksacija u kombinaciji octene kiseline i alkohola bubrenje tkiva i skupljanje tkiva su izbalansirani. U otopini za fiksiranje je također ostavljeno na 4° C preko noći. Za samo fiksiranje je potrebno 30 mL etanola (95%) koje se dodaje zajedno sa 10 mL octene kiseline u čašicu te se pomiješa sa staklenim štapićem (Tablica 1.).

Tablica 1. Kemikalije i pribor potrebni za Farmerov fiksativ

KEMIKALIJA	KOLIČINA	PRIBOR
Etanol (95 %)	30 ml	Čašica
Octena kiselina	10 ml	Stakleni štapić

2.1.4. Hidroliza

Korijenčići su sutra dan pincetom pohranjeni u 70 % etanol u hladnjak pri 4° C na 24 sata (Slika 6.). Nakon pohranjivanja je provedena hidroliza (Slika 7.) koja ocijepljuje purinske baze u DNA molekuli, te tkivo nakon hidrolize postaje mekše što omogućava bolju obojenost kromosoma. Korijenčići su prebačeni iz etanola (70 %) u čiste tubice s 1N HCL u termomikser koji je namješten na temperaturu od 60°C i na vrijeme od 30 minuta. Vrijeme hidrolize može varirati odnosno ukoliko tkivo nakon hidrolize prilikom usitnjavanja bude pretvrdo potrebno je vratiti uzorke na hidrolizu. Iz ovakvih razloga kod same pripreme potrebno je osigurati dovoljnu količinu materijala odnosno staviti klijeti dovoljan broj zrna te škarama izrezati po mogućnosti što veći broj korijenčića.



Slika 6. Uzorci u etanolu (Foto original: Jelena Musić)



Slika 7. Uzorci stavljeni na hidrolizu pri 60° C (Foto original: Jelena Musić)

2.1.5. Bojanje

Dok su uzorci bili na hidrolizi pripremljena se boja koja je potrebna za bojanje vršnog meristema korijena ječma. U 20 ml kipuće destilirane vode dodan je 0,1g bazični fuksin, te je stavljeno na hlađenje na temperaturu od 50° C (Slika 8.) i filtrirano u tamnu bocu u kojoj je još dodano 3 mL 1N HCL i 0,3g $K_2S_2O_5$. Boja je ostavljena na 24-48 sati na sobnoj temperaturi i tamnom mjestu kako bi se obezbojila. Kada se boja obezbojila dodano je 0,5 g aktivnog ugljena, sve zajedno je pomiješano, filtrirano i pohranjeno u čistu tamnu bocu (Tablica 2.). Ovakva boja može stajati i do mjesec dana, ako se pravilno pohrani.



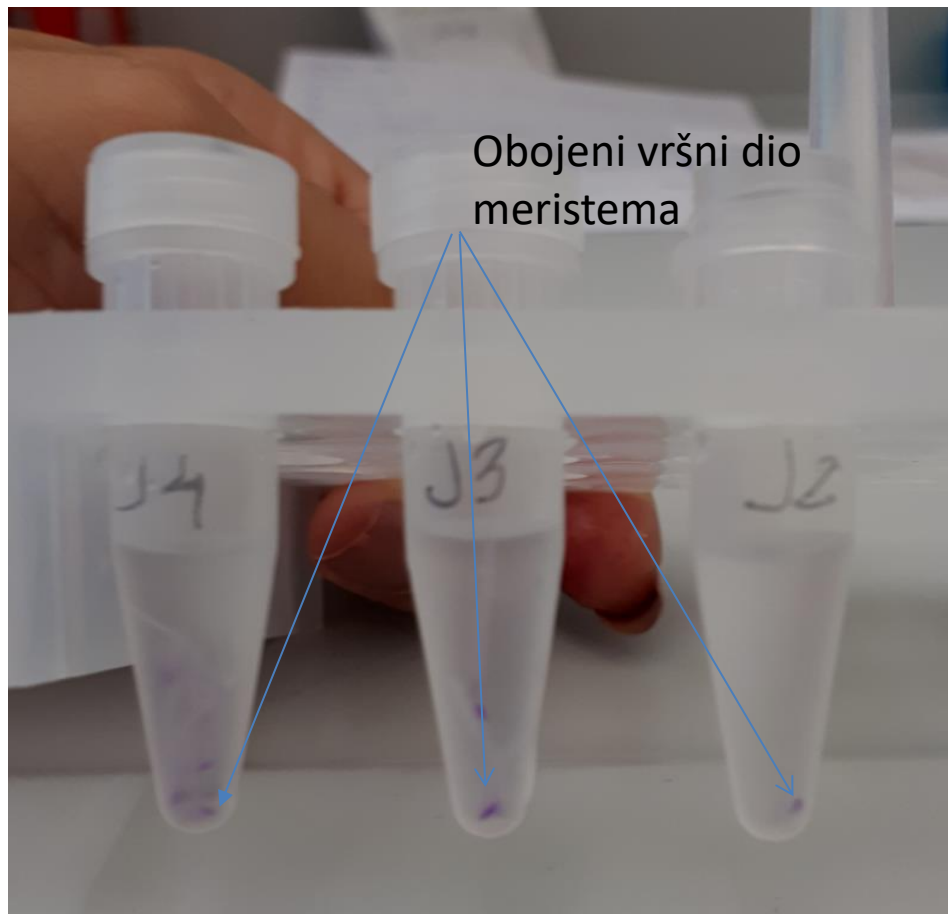
Slika 8. Boja stavljena na hlađenje (Foto original: Jelena Musić)

Tablica 2. Kemikalije i pribor potrebni za pravljenje boje

KEMIKALIJE	SASTAV	PRIBOR
Voda	20 ml	2 Staklene čašice
Bazični fuksin	0.1g	Stakleni štapić
1N HCL	3ml	2 tamne bočice
$K_2S_2O_5$	0.3g	Vaga
Aktivni ugljen	0.5g	Žličica
		Kapaljka

Nakon što su uzorci završili sa hidrolizom kapaljkom je uklonjena klorovodična kiselina te je u čiste 3 tubice dodana destilirana voda u kojoj su uzorci isprani od klorovodične kiseline laganim lupkanjem prsta o tubicu. Korjenčićima koji su isprani od HCL-a dodana je Schiff-ov reagens te su pohranjeni na tamno mjesto kako bi se obojali. Bojanje može

trajati od 10-20 minuta, što se duže boja obojenje će biti bolje. Nakon 20 minuta kada je bojanje završeno može se primijetiti jače obojenje vršnog korijena meristema ljubičastom bojom (Slika 9.). Metodu specifičnog bojanja poznatu kao Feulgenova reakcija još su 1924. uveli su Feulgen i Rossenbeck. Nakon blage hidrolize HCL-om oslobađaju se aldehidne skupine koje reagiraju sa Schiffovim reagensom dajući crveno do ljubičasto obojen spoj (Smojver-Ježek, 2009.). Schiffov reagens se dobije tretmanom bazičnog fuksina sa sulfatnom kiselinom transformirajući reagens u bezbojnu tvar (sulfitni fuksin ili Schiff-ov reagens). Kad Schiff-ov reagens (sa svojom OH skupinom) reagira s dvije susjedne aldehidne skupine, dvostruka veza (kromoforna skupina) promijeni oblik što je vidi prema karakterističnoj crvenoljubičastom bojom.



Slika 9. Obojeni vršni meristem korijena (Foto original: Jelena Musić)

Najbolje obojenje bilo je kod klijanaca koji su klijali tri dana, a najslabije obojenje kod klijanaca koji su klijali četiri dana što potvrđuje da starost meristenskog tkiva utječe na obojenje rezultata. Nakon bojanja pincetom su se prvo izvadili korijenčići koji su klijali dva dana te su stavljeni na predmetno stakalce. Za squash metodu bitan je vršni meristem korijena koji je na predmetnom stakalcu odvojen pincetom, a ostatak korijena je bačen. Na predmetnom stakalcu se nalazilo između tri do četiri vršna meristema kojima je staklenim štapićem dodana jedna kapljica 45% octene kiseline (Tablica 3.).

Vršni korijen meristema staklenim štapićem je usitnjen na predmetnom stakalcu. Pokrovnim stakalcem se prekrije usitnjeni uzorak koji se nalazi između predmetnog i pokrovnog stakalca. Pomoću filter papira snažnim prelaskom palca preko pokrovnog stakalca se primjeni squash metoda. Prilikom primjene squash metode uzorak je potrebno dobro prilijepiti na pokrovno stakalce, a opet treba pripaziti na jačinu pritiska kako nebi došlo do pucanja predmetnog stakalca.

Istim postupkom se obrađuju i uzorci koji su klijali tri i četiri dana. Tijekom prethodnog bojanja trebalo je pripaziti da se pribor koji je bio u kontaktu s bojom ne ostavi na čistoj površini ili u dodiru sa drugim priborom koji nije bio u dodiru s bojom iz razloga što je boja u početku bezbojna te se nakon određenog vremena pojavi te ju je vrlo teško oprati.

Tablica 3. Kemikalije i pribor potrebni za bojanje i squash metodu

KEMIKALIJA	KOLIČINA	PRIBOR
Feulgenova boja	10-15 kapi	Predmetno stakalce
Octena kiselina (45%)	1-2 kapi	Pokrovno stakalce
		Stakleni Štapić
		Pinceta
		Filter papir

2.2. Očitavanje rezultata mikroskopom

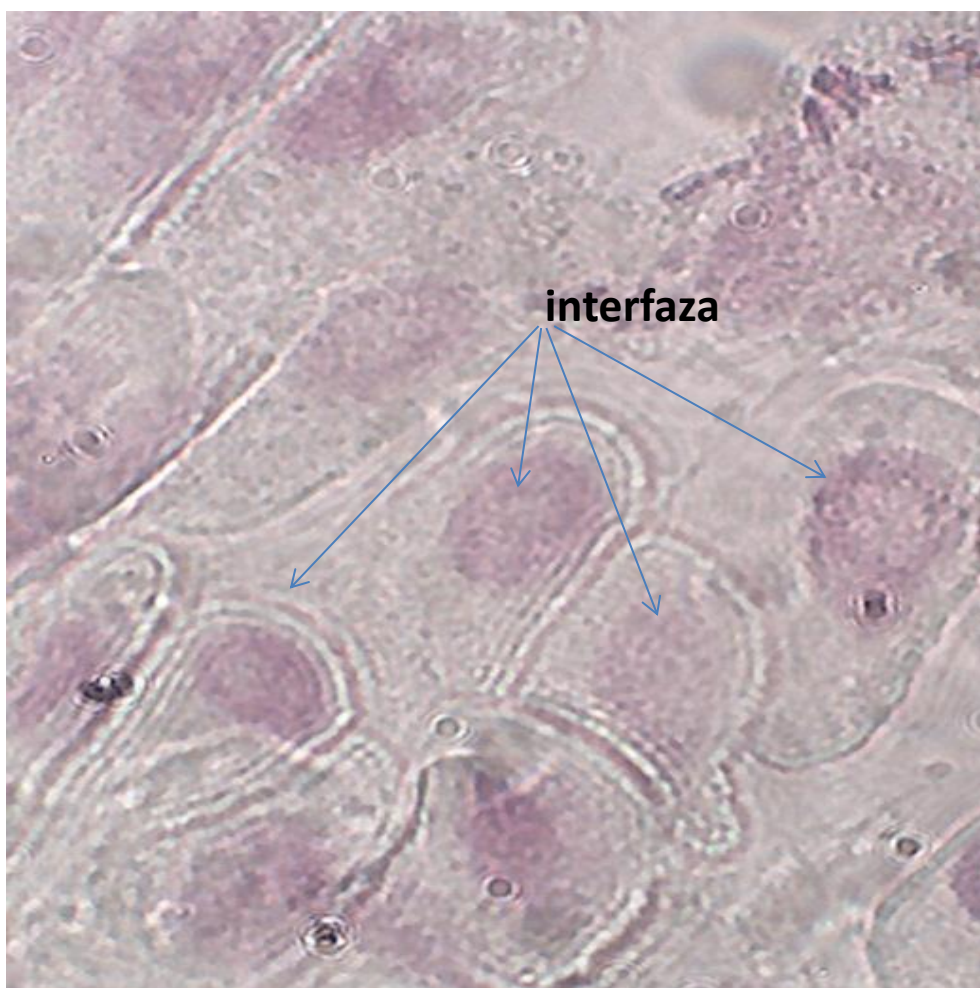
Nakon što je preparat pripremljen na predmetnom stakalcu odnesen je na očitavanje rezultata na Odjelu za biologiju. Rezultat je očitao Carl Zeiss mikroskopom (Slika 10.) te su rezultati fotografirani pomoću programa MoticImages Plus (Motic,China Group) pri povećanju od 1000 puta.



Slika 10. Carl Zeiss mikroskop (Foto original: Jelena Musić)

3. REZULTATI I RASPRAVA

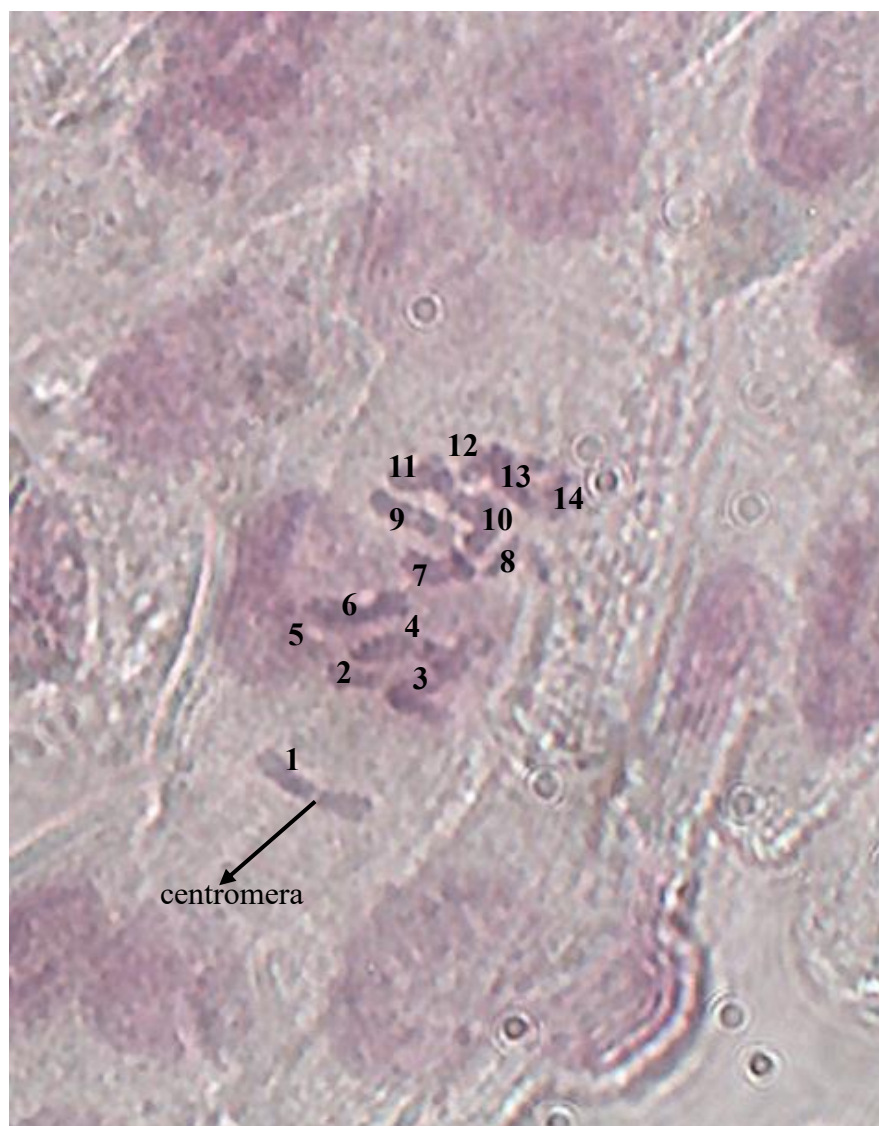
Tijekom ovog istraživanja uspješno je obavljena obrada kromosoma odnosno uspješno je obojan vršak korijena, napravljena squash metoda, fiksacija, izrada preparata te je potvrđeno da starost meristenskog tkiva ima velik utjecaj na obojenje te očitavanje rezultata. Najbolji rezultati dobiveni su koristeći klijance koji su klijali tri dana, a najlošiji s klijancima koji su klijali četiri dana. Najveći broj stanica nalazio se u interfazi (Slika 11.) koja ujedno i najduže traje no uspješno su uočene i druge faze mitoze od kojih je najvažnija metafaza kod koje su kromosomi maksimalno kontrahirani te je kromosome u toj fazi najlakše istražiti i opisati.



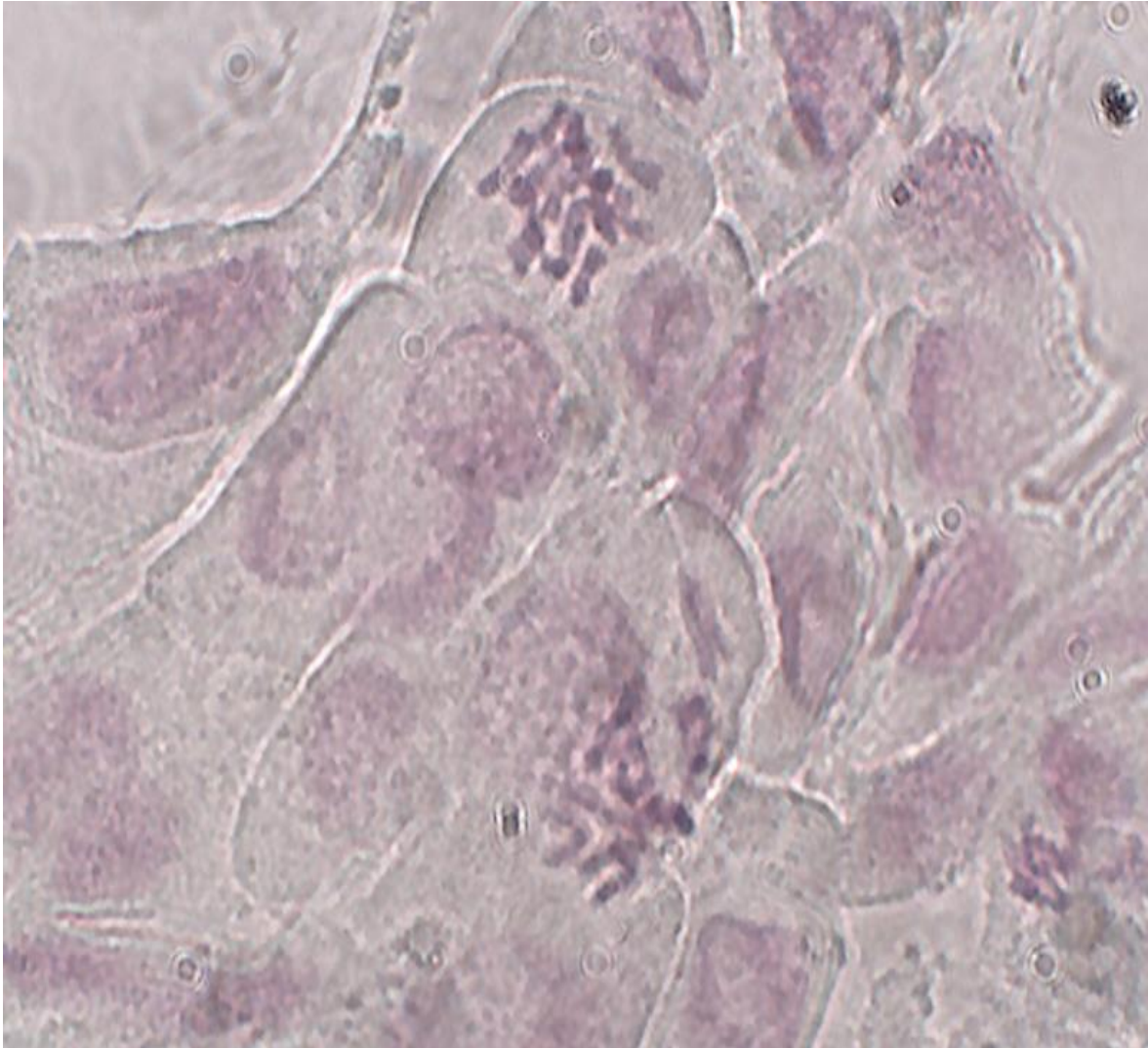
Slika 11. Interfaza (Foto original: Jelena Musić)

Tijekom obrade kromosoma treba obratiti pozornost i na hidrolizu koja je u ovom radu uspješno odrađena te je omekšala tkivo i omogućila dobro obojenje meristenskog vrška. Ukoliko je tkivo pretvrdo treba produžiti hidrolizu do trenutka kada će tkivo biti dovoljno mekano kako bi se boja dobro prilijepila na DNA materijal.

Kohlicinom je uspješno je zaustavljeno formiranje diobenog vretena prethodnom obradom tj. fiksacijom te je uspješno potvrđen broj kromosoma ($2n=2x=14$), odnosno uspješno je prebrojano svih četrnaest kromosoma što potvrđuje da su biljke diploidi kao što je i kod Pejčinović (1993.) uspješno potvrđeno kod vrste *Allium subhirsutum* L. Mikroskopiranjem su pronađene stanice u kojima je bilo moguće prebrojati kromosome odnosno dobiveni su kariogrami stanica ječma (Slika 12a i Slika 12b.), a također je uočena je razlika u veličini kromosoma te je bilo moguće djelomično sastaviti kariotip ječma. Zbog nedostatka opreme nije se mogao utvrditi točan raspon od najkraćeg do najdužeg kromosoma kao što se kod Pejičević (1992.) može govoriti o rasponu koji se kreće od 8,05—12,53 μ m.



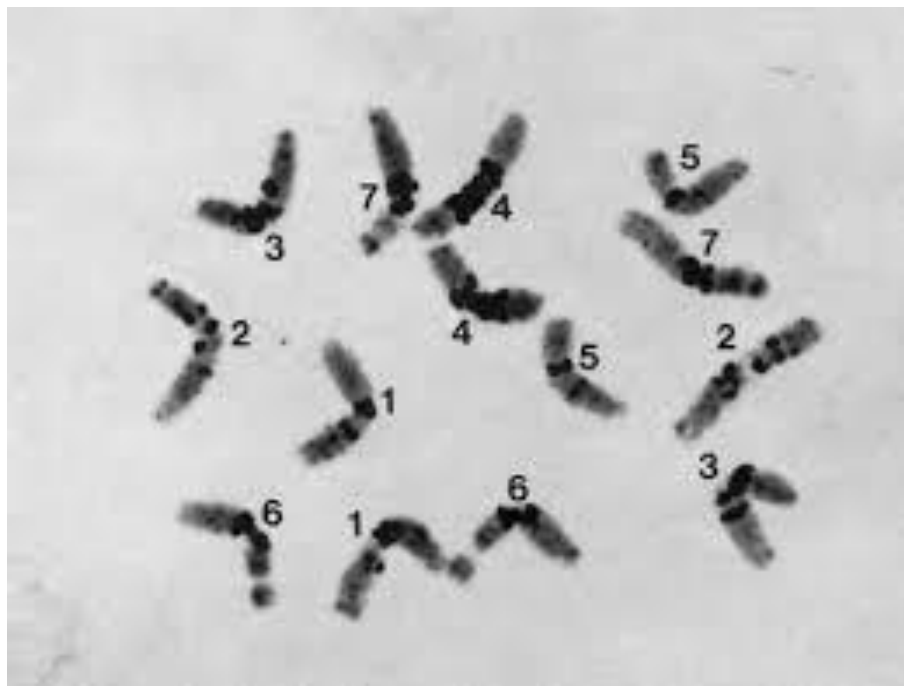
Slika 12a. Prikaz kariograma jedne stanice ječma (Foto original: Jelena Musić)



Slika 12b. Prikaz kariograma dvije stanice ječma (Foto original: Jelena Musić)

S obzirom na dovoljnu količinu biljnog materijala i na mogućnosti u sklopu istraživanja napravljeni su i rezultati sa kupovnom bojom, te je utvrđeno da su kromosomi jednako dobro obojani kao i sa pripremljenom bojom. Tijekom rada napravljeni su i preparati koji nisu obrađeni kolhicinom. Rezultat rada bile su stanice koje su imale više slojeva te su kromosomi bili jedni preko drugih. Iz tog razloga bilo je nužno korištenje citostatika koji je spriječio formiranje diobenog vretena te metafazne kromosome ostavio razbacane po stanici. Zbog djelovanja kolhicina i squash metode uspješno je dobiven jedan sloj stanica koji se promatrao pod mikroskopom. Zbog vrlo male veličine kromosoma ječma trebao je duži vremenski period kako bi se pod mikroskopom uspješno pronašli metafazni kromosomi.

Pomoću kariotipa može također utvrditi i sama struktura kromosoma odnosno radi li se o metacentričnom, submetacentričnom, akrocentričnom ili telocentričnom kromosomu koji pokazuje položaj centromere. U ovom radu se nije mogao odrediti točan položaj centromere svih kromosoma s obzirom na mogućnosti i na ograničenje same tehnologije koju smo imali na raspolaganju u laboratorijima. Bedalov (1969.) je uspješno utvrdio da se radi o metacentričnim, submetacentričnim te satelitnim kromosomima kod vrste *Biarum tenuifolium* L.



Slika 14. Kariotip kromosoma ječma (Giemsa C-banding)

(Izvor:Singh, 2018.)

Na Slici 14. prikazano je četrnaest kromosoma između kojih je moguće uočiti razliku u veličini. Nastojat će se optimizirati uređaje te izvršiti kromosomsko pruganje kao što je prikazano na slici iznad. Uvid u kromosomsku strukturu omogućile su tehnike kromosomskog pruganja. Postoje tri tehnike: G-pruganje, C-pruganje i R-pruganje. Na slici iznad prikazano je Giemsa C-bojanje koje prikazuje razliku između heterokromatina i eukromatina (Singh, 2018.). Eukromatin je transkripcijski aktivan kromatin dok heterokromatin može biti konstitutivni (centromerni, satelitna DNA) te interkalarni koji je smješten duž krakova kromosoma (<http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/pogl15.html>).

4. ZAKLJUČAK

Ječam je diploid odnosno u stanicama je prebrojano 14 kromosoma. Svaka vrsta ima određen broj kromosoma u stanicama, paran je i relativno konstantan. U svakom nasljednom materijalu se nalaze kromosomi koji su sposobni samoreproducirati se te se pojedinim tehnikama mogu vidjeti. Najduži kromosomi nalaze se u interfazi, a najkraći u anafazi i metafazi. S obzirom na mogućnosti i s obzirom na mikroskop koji je bio dostupan tijekom ovog istraživačkog rada moguće je bilo uvidjeti razliku u veličini nekih kromosoma. Za samu strukturu kromosoma potreban je puno bolji mikroskop te tanji preparat kako bi dobili bolje rezultate. Tijekom bilo je potrebno pripaziti na klijanje sjemena kako ne bi došlo do patogena te da meristemsko tkivo ne stoji predugo odnosno da ne bude prestaro. Obrada kromosoma se odvijala u više stupnjeva, a to su: prethodna obrada, fiksacija, pohranjivane materijala, bojanje i izrada preparata. U slučaju kraćeg vremenskog roka za izradu preparata, preparat se može bojati kupovnom bojom te boja može ujedno biti fiksativ, pa se bojanje i priprema obave istodobno. Kod bojanja kromosoma uočeno je jače obojenje vršnog meristema korijena ječma te je naklijano 30 zrna različitog vremenskog perioda kako bi se utvrdilo s kojim klijanjima će biti najbolje obojenje i najbolji rezultati. Potvrđeno je da su najbolji rezultati dobiveni sa klijanjima od 2 dana. Kolhicinom je uspješno bio zaustavljeno stvaranje diobenog vretena te je bilo moguće izbrojati kromosome ječma. Za nastavak istraživanja potrebno je optimizirati metodu te istražiti mogućnost korištenja mikroskopa koji bi nam omogućio da bolje vidimo kromosome i složiti kariotip ječma.

5. POPIS LITERATURE

1. Asghari-Zakaria, R. (2007.): Karyotype and C-banding Patterns of Mitotic Chromosomes in *Heterantheium piliferum* L. Pakistan Journal of Biological Sciences (10): 4160-4163.
2. Bedalov, M. (1969.): Broj kromosoma vrste *Biarum tenuifolium* (L.) Schott. Acta Botanica Croatica, 28 (1); 39-41
3. Belling, J. (1921.): On counting chromosomes in pollen-mother cells. The American Naturalist. 55 (641): 573-574.
4. Bušić, M. (2013.): Mrazovac - trovanje kolhicinom i zamjena za medvjedi luk. Završni rad. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet. 1-38.
5. Devi, J., Ko, J. M., Seo, B. B. (2003.): FISH and GISH: Modern cytogenetic techniques. Indian Journal of Biotechnology, 4; 207-315
6. Kremer, R., Ben-hammouda M. (2009.): Allelopathic Plants. 19. Barley (*Hordeum vulgare* L). Allelopathy Journal 24; 226
7. Pejčinović, M. (1993.): Diploidni kariotipovi vrste *Allium Subhirsutum* L. u hrvatsko-jadranskim populacijama. Acta Botanica Croatica, 52 (1) ; 17-23
8. Petrović S. (1992.): Citogenetika. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad; 20-36
9. Poehlman J. M. (1985.): Adaptation and Distribution. Rasmusson, D.C. (editor); Barley. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Publishers Madison, Wisconsin; 1-17
10. Ramage R. T. (1985.): Cytogenetics. Rasmusson, D. C. (editor); Barley. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Publishers Madison, Wisconsin; 127-128
11. Singh, R.J. (2018.): Practical manual on plant cytogenetics. CRC press: 14-33
12. Smojver-Ježek, S. (2009.): Morfometrija i statička DNA citometrija krofaga u bronhoalveolarnom ispirku bolesnika sa sarkoidozom. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 28
13. Szczodrak, J., Czuchajowska, Z., Pomeranz Y. (1992.): Characterization and estimation of barley polysaccharide by near-infrared spectroscopy. II. Estimation of total β -D glucans. Cereal Chemistry 69 (4); 413-418

14. Tucović, A. R., Isajev, V. V. (1988.): Praktikum iz genetike sa oplemenjivanjem biljaka. IRO „Naučna knjiga“, Beograd ; 3-11
15. https://en.wikipedia.org/wiki/William_Hyde_Wollaston
16. <https://wheat.pw.usda.gov/ggpages/bgn/12/12pref.html>
17. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.00028/full>
18. <http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/pogl15.html>