

# Kariotipovi nekih borova podsekcije Sylvestres

---

**Borzan, Želimir**

*Source / Izvornik:* **Glasnik za šumske pokuse: Annales pro experimentis foresticis, 1988, 24, 1 - 100**

**Journal article, Published version**

**Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:108:382467>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-10-20**



*Repository / Repozitorij:*

[University of Zagreb Faculty of Forestry and Wood Technology](#)



ŽELIMIR BORZAN

KARIOTIPOVI NEKIH BOROVA  
PODSEKCIJE SYLVESTRISKARYOTYPES OF SOME PINES  
OF THE SUBSECTION SYLVESTRIS

Prispjelo 1. II. 1987.

Prihvaćeno 9. XII. 1987.

Primjenom Feulgen squash i Giemsa C metode oprugavanja kromosoma iz endosperma triju stabala crnog bora (*Pinus nigra* Arn.), 2 stabla običnog bora (*P. sylvestris* L.), 1 ramete japanskog crvenog bora (*P. densiflora* Sieb. & Zucc.) i 1 stabla F<sub>1</sub> hibrida između crnog i običnog bora (*P. x nigrosylvis* Vid.), istraživana je individualna varijabilnost morfološke kromosoma uspoređivanjem kariotipova, sa stanovišta inkompatibilnosti crnog i običnog bora. Ustanovljena je raznolikost kariotipova između vrsta i unutar vrste u pogledu morfoloških karakteristika kromosoma, zatim mala količina konstitutivnog heterokromatina u kromosomima borova i mogućnost točnije identifikacije kromosoma primjenom Giemsa C metode oprugavanja, kao i heteromorfnost kromosoma XI u pogledu položaja centromere.

Ključne riječi: analiza kariotipa, *Pinus nigra* Arn., *P. sylvestris* L., *P. densiflora* Sieb. & Zucc., *P. x nigrosylvis* Vid., endosperm, Feulgen squash metoda, Giemsa C metoda oprugavanja kromosoma, sticky kromosomi, citotaksonomija borova, heteromorfnost kromosoma XI.

## UVOD — INTRODUCTION

Istraživanja prof. dr Mirka Vidakovića na problemu inkompatibilnosti između evropskog crnog bora (*Pinus nigra* Arn.) i običnog bora (*Pinus sylvestris* L.) (Vidaković 1963, 1966, 1977a, 1977b; Vidaković & Jurković-Bevilacqua 1970, 1971; Vidaković & Borzan 1973) već su od samog početka imala multidisciplinarni karakter. Već svojim prvim radom na opisu prirodnih hibrida između evropskog crnog i običnog bora 1958. godine, Vidaković ukazuje na važnost citoloških metoda u rješavanju problema taksonomije i, pored opisa morfološko-anatomske karakteristike hibrida, citološki obrađuje istraživana hibridna stabla. Kasnija istraživanja u cilju dobivanja hibrida kontroliranom hibridizacijom, te nastojanja da se utvrde faktori inkompatibilnosti, potvrdila su kompleksnost problema i potrebu za

uključivanjem biokemijskih, embrioloških, imunoloških, fizioloških i citoloških metoda istraživanja. Rezultati tih istraživanja opisani su u radovima članova Katedre za šumarsku genetiku i dendrologiju Šumarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, kao i njihovih suradnika (Đurbabić i sur. 1967, 1973, 1977; Petričević i sur. 1977). Dio tih istraživanja financiran je od Zajedničkog jugoslavensko-američkog odbora za znanstvenu i tehničku suradnju, te Savjeta za naučni rad SR Hrvatske i prikazan je u godišnjim i završnim izvještajima projekata: »Influence of irradiated pollen on the physiology of growth« (Vidaković i sur. 1968—1973), »Effect of micro-environment on species incompatibility in hard pines« (Vidaković i sur. 1974—1977) i »Factors of incompatibility between European black pine and Scots pine and possibilities of mass production of their hybrids« (Vidaković i sur. 1980—1985).

U citologiji borova prekretnicu predstavlja rad Sax i Sax-a (1933) jer je prvi prikazao kariotipove nekih vrsta četinjača koristeći za izradu preparata tkivo endosperma u razvoju. Saylor (1969) ukazuje na važnost citogenetičkih faktora u utvrđivanju inkompatibilnih barijera između raznih vrsta borova. Do 1973. godine, kada smo odlučili pokušati ustanoviti razlike u kariotipovima stabala na kojima smo provodili kontroliranu hibridizaciju između evropskog crnog bora i običnog bora, bili su nam poznati radovi i nekih drugih autora koji su koristili endosperm u citološkim istraživanjima četinjača (Santamour 1960, Sarkar 1963, Mergen & Burley 1964, Illies 1971). Radovi Pedrick-a (1967, 1969, 1970) su se posebno isticali, jer su prikazivali istraživanja detaljne morfologije kromosoma u endospermu borova i naveli su nas da na sličan način istražujemo kariotipove stabala crnog i običnog bora na kojima smo provodili hibridizaciju.

Potreba za utvrđivanjem detaljnih karakteristika kariotipa pojedinačnih stabala, naročito stabla evropskog crnog bora »ni 221« i običnog bora »sy 77«, ukazala se kada su Vidaković & Borzan (1973) utvrdili da upravo ovaj roditeljski par pokazuje osobitu sklonost križanju, odnosno da je redovito, iako u malom postotku, križanjem ovog roditeljskog para moguće uzgojiti  $F_1$  hibride *Pinus x nigrosylvis* Vid. (Vidaković 1977a). Osim ova dva stabla, za kontrolu je bilo potrebno citološki obraditi barem još po jedno stablo evropskog crnog i običnog bora, koja u dosadašnjim pokušajima kontrolirane hibridizacije nisu proizvela hibridno sjeme, niti međusobno niti s nekim drugim stablom. Za takva kontrolna stabla je odabrano jedno stablo evropskog crnog bora »ni 47« i jedno stablo običnog bora »sy 367«. Rezultati karioloških analiza tih stabala prikazani su u magistarskom radu (Borzan 1979) i objavljeni u »Analima za šumarstvo« (Borzan 1981). Nastavak istraživanja proširen je uključivanjem još jednog stabla evropskog crnog bora »ni 366«, jednog stabla japanskog crvenog bora (*Pinus densiflora* Sieb. & Zucc.) »de V 116« i konačno jednog hibridnog stabla (*P. x nigrosylvis* Vid.) »nisy 410«, nastalog križanjem stabala crnog bora »ni 221« i običnog bora »sy 77«.

Tehnika izrade preparata i postupak istraživanja kariotipa svladani su u obradi stabla »ni 47« (Borzan 1977a). Isti sam postupak primijenio i u obradi ostalih stabala: »ni 221«, »ni 366«, »sy 77«, »sy 367«, »de V 116« i »nisy 410«.

Neke rezultate citoloških istraživanja koji su već publicirani (Borzan 1977a, 1977b, 1981; Borzan & Papeš 1978) koristim i ovdje radi cjelovitosti prikaza i mogućnosti komparativne analize kariotipova svih sedam istraživanih stabala. Osim toga, novi kvalitet u tumačenju razlika između kariotipova pojedinih stabala omogućen je obradom podataka elektroničkim računalom. Time je postignuto uočavanje brojnih značajnih razlika u detaljima kariotipova istraživanih stabala (duljinama kromosoma, duljinama krakova, omjeru krakova i centromernim indeksima), a za te bi rezultate bez primjene elektroničkog računala bilo potrebno znatno duže vrijeme računanja i interpretacije rezultata.

Model za statističku obradu citoloških podataka elektroničkim računalom (program) izrađen je na University of California, u Berkeleyu, College of Natural Resources, Department of Forestry and Resource Management. Dobiveni rezultati varificirani su s rezultatima rađenim rukom (kalkulatorom), objavljeni u magistarskom radu (Borzan 1979). Tada je taj model poslužio za izradu novog programa u ROŠ »Slavonska šuma« Vinkovci, Služba za informacijski sistem i automatsku obradu podataka (ISIAOP) u Osijeku, te su tim programom obrađeni i uspoređeni kariotipovi svih stabala prikazanih u ovom radu.

#### MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA — MATERIALS AND METHODS

Svi preparati su rađeni iz tkiva endosperma u razvoju, s tri stabla evropskog crnog bora (*Pinus nigra* Arn.): »ni 47«, »ni 221« i »ni 366«, dva stabla običnog bora (*Pinus sylvestris* L.): »sy 77« i »sy 367«, jednog stabla (ramete) japanskog crvenog bora (*Pinus densiflora* S. & Z.) »de V 116« i jednog hibridnog stabla *Pinus x nigrosylvis* Vid. (»nisy 410«). Stabla su se nalazila u parku oko zgrada Šumarskog i Poljoprivrednog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i u vrtu Katedre za šumarsku genetiku i dendrologiju.

U taksonomskom pogledu, sva tri stabla evropskog crnog bora spadaju, prema klasifikaciji Vidakovića (1955, 1957) u ssp. *austriaca*.

Od stabala evropskog crnog bora, u vrijeme uzimanja uzoraka, stablo »ni 47« bilo je najstarije, približne starosti oko 40 godina. Posječeno je 1979. godine. Stabla »ni 221« i »ni 366« su procijenjena na starost od oko 30 godina. Stablo običnog bora »sy 77« procijenjeno je na oko 30 godina. Srušeno je u oluji 1983. godine. Vegetativno je razmnoženo cijepljenjem 1978. godine. Stablo »sy 367« je u vrijeme uzimanja uzoraka procijenjeno na oko 15 godina, a hibrid »nisy 410« je proizveden kontroliranom hibridizacijom 1966. godine na stablu »ni 221« križanjem s polenom stabla »sy 77«, te je u vrijeme uzimanja uzoraka bilo staro 15 godina. Rameta japanskog crvenog bora »de V 116« je uzgojena nakon cijepljenja 1960. godine na podlogu običnog bora.

## KONTROLIRANA HIBRIDIZACIJA CRNOG I OBIČNOG BORA — CONTROLLED HYBRIDIZATION OF EUROPEAN BLACK AND SCOTS PINE

U radovima na kontroliranoj hibridizaciji crnog i običnog bora, koji se provode na Katedri za šumarsku genetiku i dendrologiju Šumarskog fakulteta u Zagrebu, sudjelujem od 1960. godine kao suradnik prof. dr. Mirka Vidakovića u rješavanju problema inkompatibilnosti između ove dvije vrste. Podatke o kontroliranoj hibridizaciji borova, prikazane u ovom radu, sakupio sam iz godišnjih i finalnih izvještaja projekata financiranih od Zajedničkog jugoslavensko-američkog odbora za znanstvenu i tehničku suradnju te Savjeta za naučni rad SR Hrvatske (spomenutih u Uvodu), iz radova Vidaković & Borzan 1973, Vidaković 1983, te iz evidencije o kontroliranoj hibridizaciji borova koja se vodi na Katedri za šumarsku genetiku i dendrologiju od 1957. godine.

### SAKUPLJANJE MATERIJALA — COLLECTION OF MATERIAL

Stadij razvoja sjemenog zametka pogodnog za citološka istraživanja endospermalnog tkiva, relativno je kratak period, u trajanju od oko dva tjedna na jednom stablu. U ciklusu razvoja sjemena borova, od oprašivanja do zrelog sjemena, ovaj period pada u vrijeme druge vegetacije razvoja češerića, odnosno neposredno prije oplodnje. Taj period varira od stabla do stabla i od vrste do vrste bora. Pederick (1967) ga približe označuje kao vrijeme od 2—3 tjedna nakon trušnja polena na stablu. Naša se zapažanja podudaraju s konstatacijom Pederick-a, pa možemo ustvrditi da u našim klimatskim uvjetima vrijeme od 1—3 tjedna nakon trušnja polena na nekom stablu, korelira s vremenom intenzivnih dioba u endospermu u razvoju. Budući da i unutar tog perioda neki češerići (u istom danu) imaju sjemene zametke s intenzivnim diobama, a neki češerići ne, potrebno je vrijeme za sakupljanje češerića produžiti na tri tjedna, tj. započeti sa sakupljanjem i fiksiranjem materijala tjedan dana nakon trušnja polena na stablu. Za izradu preparata preporučljivo je raditi uzorke od fiksiranog materijala, npr. po pet preparata od svakog datuma sakupljanja. Nakon što se pregledaju preparati, ako nije dobiven dovoljan broj stanica za analizu, izrađuju se preparati od preostalog materijala sakupljenog onog datuma koji je dao najveći broj stanica pogodnih za analizu.

Zapaženo je u stabla »ni 47« da je najveći broj pogodnih preparata za analizu izrađen od sjemenih zametaka kada su gametofiti bili srednje veličine (oko 1 mm), neposredno prije ili tek što su se u fiksiranim gametofitima počeli zamjećivati arhegoniji prostim okom.

Za ova smo istraživanja počeli skupljati češeriće u svibnju 1973. godine. Češerići iz te prve godine, poslužili su za svladavanje radne tehnike i pronalaženje najpogodnije faze razvoja endosperma za kariološke radove. Istom je obrada materijala skupljenog 1974. godine rezultirala izvrsnim preparatima, koji su dali velik broj stanica pogodnih za analizu. U tabeli 1. prikazujem za svaku analiziranu stanicu datume fiksiranja gametofita, koliko analiziranih stanica potječe iz pojedinog češerića, brojeve preparata i kada su analizirani.



Od svakog stabla analizirano je 18 pogodnih stanica. Za stablo »ni 47« sve analizirane stanice potječu iz jednog češerića, koji je fiksiran 29. svibnja 1974. godine, tj. iz ukupno 9 preparata, što znači da je u pojedinim preparatima bilo više pogodnih stanica za analizu. Od stabla »ni 221« i dva stabla običnog bora nisam dobio dovoljan broj stanica iz samo jednog češerića, nego je trebalo sakupljati češeriće i slijedećih godina, kako bi od svakoga analiziranog stabla dobio 18 pogodnih stanica. Tako je npr. za stablo »ni 221« korišteno 5 stanica iz materijala fiksiranog 1974. godine, a 13 stanica iz materijala fiksiranog 1976. godine. Stablo »ni 366« je obrađeno analizom stanica iz 11 preparata (sjemenih zametaka) za koje su 8 sjemenih zametaka iz jednog češera dali 15, 2 sjemena zametka iz drugog češera 2 i 1 sjemeni zametak iz trećeg češera 1 pogodnu stanicu. Za ovo stablo svi su češeri sakupljeni iste godine. Za stablo »sy 367« materijal iz 1974. godine dao je 17 stanica, a jedna potječe od materijala skupljenog 1977. godine, dok su za stablo »sy 77« dvije stanice iz 1974. godine, a 16 stanica iz materijala fiksiranog 1977. godine.

Stablo japanskog crvenog bora analizirano je stanicama iz 12 sjemenih zametaka fiksiranih nakon vađenja iz 2 češera, sakupljena iste, 1974. godine. Za hibridno stablo »nisy 410« sve analizirane stanice potiču iz jednog preparata, tj. jednog sjemenog zametka.

Cešerići su sakupljeni u jutro u 7 sati i neposredno nakon sakupljanja u laboratoriju su odvajane plodne ljuske, zarezivan je svaki normalno razvijen sjemeni zametak skalpelom, izdvajani su gametofiti i fiksirani u smjesi ledene octene kiseline i etanola (1 : 3, V/V). Gametofiti su u fiksativu ostavljeni 24 sata, a zatim 24 sata u 96% -tnom etanolu. Pohranjeni su u 70% -tni etanol i čuvani u frižideru na +4° C do izrade trajnih preparata. Pokazalo se da je moguće dobiti dobre preparate s jasno obojenim, kontrastnim kromosomima i tri godine nakon ovakog čuvanja materijala.

#### TEHNIKA PREPARIRANJA ENDOSPERMA FEULGEN SQUASH METODOM — THE TECHNIQUE OF PREPARING ENDOSPERM WITH THE FEULGEN SQUASH METHOD

Za izradu preparata primjenjena je tehnika prepariranja endosperma Feulgen squash postupkom po Darlington & La Cour-u (1962), modificiran na osnovi radova Pederick-a (1967, 1970) i vlastitih iskustava. Preparati su izrađeni ovako:

1. Pohranjeni je endosperm iz 70% -tnog etanola prenijet u svježe kupelji u kojima su se nalazili:

- a) 70% -tni etanol,
- b) 50% -tni etanol,
- c) 30% -tni etanol,
- d) destilirana voda

i u svakoj je kupelji ostavljen po 10 minuta.

2. Uslijedila je hidroliza u 1M HCl zagrijanoj i držanoj u termostatu na 60° C. Hidroliza je trajala 15 minuta.

3. Matenijal je prebačen u svježe pripremljenu otopinu za bojenje (Feulgen), koja nije bila starija od nekoliko dana. Ta je otopina čuvana u frižideru na  $+4^{\circ}\text{C}$ , zaštićena od svjetla. Za pripremanje otopine za bojenje upotrijebili smo bazični fuksin proizvodnje G. T. G u r r, London. Otopina za bojenje je pripremljena tako da je 1 g bazičnog fuksina premliven s 200 ml kipuće destilirane vode. Nakon miješanja, nastala smjesa je ohlađena do  $50^{\circ}\text{C}$ , i filtrirana. Filtratu je dodano 30 ml 1M HCl i 3 g kalijuskog disulfita,  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ . Otopina je ostavljena 24 sata u mraku, u dobro začepljenoj boci. Uz dodatak 0,5 g aktivnog ugljena, te nakon nekoliko minuta mučkanja i filtriranja, dobivena je bistra slabo žućkasta tekućina, koja je upotrebljena za bojenje.

Cijeli endospermi (jer se prilikom prebacivanja iz kupke u kupku pazilo da se ne ošteti opna koja obavija endospermalno tkivo) bojani su 2 sata, za razliku od P e d e r i c k - a (1967), koji je materijal u otopini za bojenje ostavljao preko noći. Kraće bojenje je dalo jasnije izražene i kontrastnije kromosome.

4. Gametofiti su prebačeni u 45% -tnu octenu kiselinu, odakle je već nakon 5 minuta pod binokularnom lupom na predmetnom staklu odvajana opna gametofita, a stanice (jezgre) endospermalnog tkiva su razdvajane lupkanjem staklenog štapića po predmetnici ili odjeljivanjem na manje skupine pomoću histoloških igala. Nakon polaganja pokrovnog stakalca i pritiskivanja palcem po pokrovnici na koju je položen komadić papira za filtriranje, preparat se lagano zagrijavao na histološkoj ploči za zagrijavanje ili iznad plamenika.

5. Izrada trajnih preparata uslijedila je odvajanjem pokrovnice nakon smrzavanja suhim ledom iz plinske boce s  $\text{CO}_2$  (C o n g e r & F a i r c h i l d 1953), ili provođenjem preparata kroz kupelji 40% -tnog etanola, 80% -tnog etanola i dvije kupelji apsolutnog etanola (D a r l i n g t o n & L a C o u r 1962).

6. Preparati su uklapani u euparal.

#### ANALIZA PREPARATA I FOTOGRAFIRANJE STANICA — SLIDE ANALYSIS AND PHOTOGRAPHING OF CELLS

Ukupno je izrađeno 4710 preparata. U tabeli 1 su navedeni preparati koji su poslužili za ovu analizu kariotipa. Bilješke o izradi preparata vođene su za svaki pojedinačni preparat s opaskama o izgledu materijala, variranjima pojedinih kupelji ili trajanju vremena tretiranja, te o položajima pogodnih stanica za analizu. Pregledavajući preparate, izdvajane su stanice u prometafazi i metafazi, s jasno vidljivim kromosomima koji se po mogućnosti ne preklapaju. Kod prometafaza se pazilo da nemaju fragmenata, jer u stanicama s fragmentima najčešće se nije moglo odrediti kojem kromosomu koji fragment pripada (B o r z a n 1979). Bilježeni su i položaji izvanredno lijepih anafaza s lako prebrojivim kromatidama. Pokazalo se da su takve anafaze (slike 34a i 34b) prikladan materijal za istraživanja kariotipa s obzirom na rezultate dobivene njihovom analizom. Najpogodnije stanice za analizu kariotipa bila su metafaze s



kromosomima koji se još nisu maksimalno spiralizirali i s jasno vidljivim konstrikcijama kao npr. na slikama 1 i 5 (Borzan 1977, 1981).

Za lociranje opaženih pogodnih stanica upotrebljavali smo noniuse na radnom stoliću mikroskopa i »England Finder«, koji omogućuje brzo pronalaženje stanice na nekom drugom mikroskopu.

Odabrane stanice su snimljene na 35 mm film (Ilford, 18° DIN) na mikroskopu »Zeiss« s planachromat objektivom koji povećava 100 puta, uz primjenu faznog kontrasta. Film je razvijen u tvrdom razvijaju. Sve snimke su povećane na isti format, ukupnog povećanja oko 3 300 puta. Fotografije su poslužile za analizu kariotipa.

#### MJERENJE I ANALIZA KROMOSOMA — CHROMOSOME MEASUREMENT AND ANALYSIS

Analiza kariotipa je rađena modificiranim postupcima Saylor-a (1961), Simak-a (1962) i Pederick-a (1967). Mjerenje kromosoma je obavljeno šestarom, nakon što su na slici privremeno bili obilježeni brojevima od 1—12. Izmjerene ukupne duljine svakog kromosoma i duljine svakog kratkog i dugog kraka, ubilježene su na sliku, a potom u odgovarajući formular. Centromera je obilježena poprečnom tankom crtom na svim kromosomima i predstavljena je debljinom traga olovke. U duljinu kromosoma ili kraka nije bila uključena veličina konstrikcije.

Da bi izbjegli variranje rezultata zbog nedosljednosti u radu, uveli smo neke kriterije kojih smo se pridržavali tijekom cijelog rada. Npr.: Na osnovi izmjerenih duljina kromosoma su obilježeni rednim brojevima od I do XII, i to tako da je kromosom I najdulji, a kromosom XII najkraći. U slučaju da su dva ili više kromosoma imali jednaku duljinu, dužim je proglašen kromosom s konstrikcijom, a ako su oba ili više kromosoma iste duljine imali konstrikciju, redni broj prethodnog člana niza dobio je kromosom kojega je kratki krak bio duži.

U početnoj fazi istraživanja, za svaku stanicu izračunata je relativna veličina svakog pojedinog kromosoma, na osnovi veličine prosječnog kromosoma te stanice (= 100). Primjer izračunavanja relativnih duljina kromosoma i odgovarajućih krakova za svaku stanicu donosim u tabeli 2.

Brojčane vrijednosti kariotipa svakog stabla predstavljaju srednje vrijednosti relativnih duljina kromosoma u 18 stanica. Tako je npr. izračunavanje duljine kromosoma I stabla »ni 47« prikazano u tabeli 3. Na sličan su način izračunate i duljine kratkih krakova, duljine dugih krakova, omjeri krakova S/L, gdje je S duljina kratkog, a L duljina dugog kraka i centromerni indeksi  $(S/S + L) \cdot 100$ , gdje je S duljina kratkog kraka, a S + L ukupna duljina kromosoma. Za svaki kromosom su izračunavani i odgovarajući statistički parametri.

U kasnijoj su fazi istraživanja sve relativne duljine kao i brojčane vrijednosti kariotipa svih stabala izračunate elektroničkim računalom. Primjer unošenja podataka u elektroničko računalo, za stablo »ni 47«, donosim u tabeli 4. Izlistavanje relativnih duljina kromosoma, razlika između njih, duljina i omjera krakova te centromernih indeksa, prika-

Tab. 2. Izračunavanje relativnih duljina kromosoma, na osnovi izmjerenih duljina kromosoma sa slike i vrijednosti srednjeg kromosoma za svaku stanicu — Calculation of relative chromosome lengths based on measured chromosome lengths on the photograph and values of the mean chromosome of each cell.

ni 47						
Preparat-Slide:1096; Položaj stanice-Cell position:V 32.1						
Br. krom. Chr. no.	S+L mm	$\frac{(S+L) \cdot 100}{53.4167}$	S mm	$\frac{S \cdot 100}{53.4167}$	L mm	$\frac{L \cdot 100}{53.4167}$
I	60	112.32	28	52.42	32	59.91
II	60	112.32	29	54.29	31	58.03
III	60	112.32	27	50.55	33	61.78
IV	58	108.58	27	50.55	31	58.03
V	57	106.71	28	52.42	29	54.29
VI	56	104.84	28	52.42	28	52.42
VII	55	102.96	26	48.67	29	54.29
VIII	55	102.96	26	48.67	29	54.29
IX	52	97.35	25	46.80	27	50.55
X	49	91.73	24	44.93	25	46.80
XI	41	76.75	18	33.70	23	43.06
XII	38	71.14	15	28.08	23	43.06
$\Sigma$	641		301		340	
$\Sigma/12$	53.4167					
Fiksirano-Fixed:29.V.1974; Češerić br.-Conelet no:40						

zujem u tabeli 5, na primjeru stabla »ni 47«. Na isti način prikazani numerički kariotipovi ostalih stabala nalaze se u tabelama 9, 10, 11, 12, 13 i 14.

Testiranje morfoloških karakteristika kromosoma za svaki par istraživanih stabala F i T testom rađeno je elektroničkim računalom. Rezultati obrade prikazani su primjerom u tabeli 28. Ukupno je izlistano 105 tabela iz kojih su ustanovljene statistički značajne razlike i istaknute u tabelama 18, 19, 20, 21, 22, 23 i 24. Koristeći vjerojatnosti T statistike

Tab. 3. Izračunavanje srednje vrijednosti relativne duljine kromosoma I stabla crnog bora ni 47, na osnovi relativnih duljina kromosoma u 18 stanica i odgovarajuće mjere rasipanja za kromosom I — Calculation of the mean value and other statistical parameters for relative length of chromosome I of the European black pine tree ni 47 on the basis of relative chromosome length in 18 cells.

ni 47	KROMOSOM CHROMOSOME I	Ukupna duljina Total length
Red. br. stanice Cell no.	Relat. duljina krom. Relat. chrom. length x	MJERE RASIPANJA STATISTICAL PARAMETERS
1	117.68	$\sigma^2 = 69.4634804$  $s = 8.5761044$  $s_{\bar{x}} = 2.0214072$  C.V. % = 6.8408778
2	119.36	
3	117.04	
4	112.32	
5	115.80	
6	115.25	
7	120.52	
8	136.53	
9	135.85	
10	135.65	
11	126.43	
12	130.40	
13	127.89	
14	119.52	
15	126.88	
16	127.76	
17	130.23	
18	141.47	
$\Sigma x$	2256.58	
$\bar{x}$	125.3656	
Raspon-Range : 141.47 - 112.32 = 29.15		

047011070739	0750720	0155535	0659133	020137	0682998
047012012664	0743338	0602511	0542180	0512180	0471290
047021122463	0705155	0450354	0694911	0684155	0874255
047022098473	0944252	0964343	0953746	0772750	0832247
0470310254031	0934347	0904558	0804267	0974364	0884046
0470420331432	0912843	0910847	0750140	0852590	0834934
047041082832	0602931	0602733	0582731	0572829	0562828
0470520332820	0352629	0522527	0492427	0411823	0381523
0470810914190	0903951	0834192	0824042	0803941	0793840
0470820781843	0784447	0753720	0723546	0712849	0692748
0470810833335	0671037	0663224	0642193	0622151	0612032
0470820303030	0502842	0392702	0512229	0512081	0301424
0470710851198	0883235	0823023	0832894	0822893	0812893
0470720862832	0344130	0332828	0312522	0301825	0291524
0470810354184	0844045	0813915	0814041	0804104	0723537
047080852223	0845132	0833033	0822927	0812225	0801728
0470810804545	0783842	0773542	0743440	0733136	0652940
0470920924035	0847034	0802832	082731	0811324	0801524
0471010914190	0844143	0703535	0702236	0693336	0683237
0471020953132	0773037	0853134	0862726	0802129	0451221
047011124067	024037	0294759	0284254	0254748	0244547
0471120524547	0863948	0844143	0803842	0783740	0471529
0471210844232	0844742	0793440	0783944	0763738	0753738
0471220732817	0719334	0703337	0692722	0682825	0471028
0471311266063	1215635	1183630	1153558	1054930	1045133
0471321049883	0954334	0914190	0903740	0722547	0682440
0471411285063	1235657	1183832	1145282	1054961	1055259
0471421065254	1034854	1024655	0874057	0773047	0722547
0471511174932	1024833	1024832	0994752	0923351	0914647
0471520982830	0183033	0753839	0652837	0642731	0542139
047161037070	1064250	0944054	0824062	0813449	0803937
0471620230403	0103195	0733725	0733241	0712746	0481830
0471710357392	1308811	1260937	1268977	1268977	1268472
047172103493	1268970	1268956	1145739	1044089	0772552
047181037964	1527093	1427983	1245568	1235163	1155659
0471821105655	1135357	1054653	0884652	0804452	0743242

Tab. 4. Izlistani izvorni podaci o duljinama kromosoma (krakova) za 18 stanica stabla ni 47, kako su učitani s obrađenih fotografija u memoriju elektroničkog računala. Podaci o svakoj stanici se nalaze u dva reda. Npr. u prva dva reda su podaci o duljinama krakova i ukupnoj duljini 12 kromosoma stanice broj 1. U druga dva reda su odgovarajući podaci za stanicu broj 2 itd.; do stanice broj 18. Za lakše praćenje metodike istraživanja debljim su brojevima otisnuti podaci za stanicu broj 4, koji se također nalaze prikazani u tabeli broj 2 a mogu se očitati i sa slike broj 8b. Prvi red podataka za svaku stanicu sadrži u prvom stupcu u prva tri broja broj stabla (047), a slijedeća dva broja su redni broj stanice (01). Zatim slijedi broj 1 (broj 2 u redu ispod) kojim je obilježen prvi red podataka za 6 prvih kromosoma (u redu ispod za slijedećih 6 kromosoma te iste stanice). Slijedeća tri broja obilježavaju ukupnu duljinu kromosoma I (076), a u retku ispod kromosoma VII. Taj je broj uvijek jednak sumi slijedeća dva i dva broja, koji predstavljaju duljine kratkog i dugog kraka tog kromosoma. U drugom stupcu su vrijednosti kromosoma II (ispod za kromosom VIII, u trećem stupcu kromosoma III (ispod za kromosom IX) itd. — Listed data on chromosome (arm) lengths of 18 cells of the tree ni 47 as obtained from the photographs and entered in the computer. Data on each cell are in two lines. For example, the first two lines give data on arm lengths and total lengths of 12 chromosomes of the cell no. 1. The next two lines give data on cell no. 2, and so on up to the last two lines with data on the cell no. 18. Data on the cell no. 4 printed in bold-face, are also presented in Tab. 2 and shown in Fig. 8b. First three numbers in the first line for each cell in first column are tree numbers (047), the next two are cell numbers (01). The next number 1 (number 2 in line below) indicates the first line of data, for chromosomes I—VI (second line of data of the same cell, for chromosomes VII—XII). Next three numbers (076) are total chromosome lengths of chromosome I (in the line below of the chromosome VII) equal to the sum of next two and two numbers, i. e. to the sum of short and long arm of the same chromosome. The second column contains values of the chromosome II (and VIII below) the third of the chromosome III (IX below) etc.

Tab. 5. Numerički kariotip stabla ni 47. Relativne ukupne duljine kromosoma, razlike između susjednih kromosoma i mjere rasipanja — Numerical karyotype of the tree ni 47. Total relative chromosome lengths, differences between adjacent chromosomes and corresponding statistical parameters.

BROJ KROMOSOMA CHROMOSOME NUMBER	d	$\bar{x}$	s	$\bar{s}_x$	C.V. %
1	125.3673		8.5758	2.0213	6.8405
	7.33				
2	118.0387		4.3042	1.0145	3.6464
	5.22				
3	112.8184		4.5375	1.0695	4.0220
	3.77				
4	109.0482		3.5665	0.8406	3.2705
	2.61				
5	106.4348		3.4424	0.8114	3.2343
	2.54				
6	103.8915		2.4067	0.5673	2.3166
	2.17				
7	101.7260		2.7620	0.6510	2.7151
	3.48				
8	98.2429		3.2313	0.7616	3.2091
	4.45				
9	93.7874		3.7479	0.8834	3.9962
	7.30				
10	96.4825		5.4382	1.2818	6.2883
	7.45				
11	79.0233		5.9130	1.3937	7.4827
	13.88				
12	65.1389		5.8840	1.3269	9.0330
	KRATKI KRAKOVI (S)		SHORT ARM		
1	56.5049		5.8956	1.3872	10.4160
2	55.3160		3.0957	0.7297	5.5965
3	52.6715		2.7056	0.6377	5.1360
4	51.1358		3.0419	0.7170	5.9486
5	50.4355		3.3565	0.7911	6.6550
6	48.7416		2.7165	0.6403	5.5732
7	47.9907		3.2617	0.7688	6.7965
8	45.3700		3.0505	0.7190	6.7235
9	44.4462		2.2458	0.5293	5.0529
10	39.6710		3.2332	0.7621	8.1501
11	31.3877		4.4585	1.0509	14.2047
12	24.5864		2.6264	0.6190	10.6821
	DUGI KRAKOVI (L)		LONG ARM		
1	68.8624		6.6301	1.5627	9.6280
2	62.7228		3.5106	0.8275	5.5970
3	60.1469		4.4896	1.0582	7.4644
4	57.9124		2.5316	0.5967	4.3715
5	55.9993		3.2786	0.7720	5.8547
6	55.1499		3.2939	0.7764	5.9726
7	53.7354		4.2181	0.9942	7.8498
8	52.8729		2.8249	0.6658	5.3429
9	49.3412		2.5744	0.6068	5.2175
10	46.8115		3.5629	0.8398	7.5111
11	47.6356		5.2930	1.2476	11.1114
12	40.5525		4.4439	1.0474	10.9553
	OMJERI KRAKOVA (S/L)		ARM RATIO		
1	0.8277		0.1109	0.0261	13.3979
2	0.8849		0.0741	0.0175	8.3744
3	0.8811		0.0867	0.0204	9.6342
4	0.8850		0.0706	0.0166	7.9751
5	0.9048		0.0910	0.0214	10.0534
6	0.8886		0.0906	0.0214	10.1955
7	0.9008		0.1094	0.0253	12.1462
8	0.8516		0.0863	0.0203	10.0168
9	0.9026		0.0586	0.0138	6.4871
10	0.8505		0.0784	0.0185	9.3145
11	0.6697		0.1359	0.0320	20.2909
12	0.6108		0.0733	0.0173	12.0052
	CENTROMERNI INDEKSI (S/S+L) · 100		CENTROMERE INDEX		
1	45.0829		3.5830	0.8445	7.9477
2	46.8679		3.1310	0.5923	4.5469
3	46.7303		2.5436	0.5995	5.4430
4	46.8791		2.0021	0.4719	4.2707
5	47.3815		2.6531	0.6253	5.5994
6	46.9300		2.6367	0.6215	5.6185
7	47.2077		3.3750	0.7955	7.1493
8	46.1715		2.5293	0.5962	5.4781
9	47.3939		1.6424	0.3871	3.4654
10	45.8708		2.3179	0.5463	5.0530
11	39.7344		4.9026	1.1556	12.3385
12	37.7948		2.8701	0.6765	7.5939

iz 105 izlistanih tabela, bilo je moguće tzv. kombiniranim testom (Winer 1970) usporediti kompletne kariotipove svakog para istraživanih stabala.

Rezultati su prikazani u tabeli 26, a detaljno obrazloženje testiranja T testom i kombiniranim testom, kao i tumačenje rezultata opisujem u diskusiji.

Na svakoj su fotografiji ucrtavani položaji sekundarnih i »tercijarnih« konstrikcija, gledanjem odgovarajuće stanice pod mikroskopom. Zbog različite osjetljivosti ljudskog oka i emulzije filma, na fotografijama je često bilo moguće odrediti veći broj »tercijarnih« konstrikcija od broja konstrikcija opaženih pod mikroskopom. Vjerojatno bi denzitometrijska analiza svakoga pojedinog kromosoma na filmu, mogla poslužiti kao objektivna metoda za određivanje prominentnosti svake konstrikcije i za točno utvrđivanje ukupnog broja konstrikcija (metodom koju su koristili Larsen & Kimber 1973). S obzirom da nismo imali na raspolaganju denzitometar, u ovom sam se radu držao kriterija da obilježim i izmjerim samo one konstrikcije koje su bile jasno uočljive za promatranja pod mikroskopom.

Način obilježavanja konstrikcija sličan je onom Pederick-ovom (1967, 1970). Tako npr. V L 59 označuje konstrikciju na kromosomu V, koja se nalazi na dugom kraku kromosoma na oko 59% duljine kraka udaljena od centromere. Slično tome, konstrikcija na kratkom kraku npr. kromosoma X, udaljena oko 56% duljine kraka od centromere, obilježila bi se kao: X S 56. Udaljenosti konstrikcija izračunavane su pojedinačno za svaku konstrikciju i svaka je konstrikcija tada unijeta u shematski zamišljeni idiogram da bi se dobila distribucija frekvencija sekundarnih i tercijarnih konstrikcija svakoga pojedinog kromosoma (slike 27 do 33). Za ucrtavanje u idiogram odabrane su konstrikcije koje su opažene na istom kraku i na približno istom mjestu u barem 8 stanica, ili su barem u 4 stanice registrirane kao prominentne sekundarne konstrikcije.

#### GIEMSA C-BANDING METODA — GIEMSA C-BANDING METHOD

Pojam »C banding« koristim prema definiciji Schweizer & Ehrendorfer (1976), za opis tamno obojenih segmenata kromosoma izazvanih primjenom specifične Giemsa metode.

Da bismo pronašli odgovarajuću »banding metodu«, prve smo pokušaje radili s meristemom korjenčića sjemenki sa stabala »ni 47« i »ni 221«. Primjenili smo nekoliko metoda (C banding i Hy banding) za meristeme korjenčića (Linde-Laurson 1975; Greilhuber 1974) i za cvjetne pupove (Klaštarska & Natarajan 1976), ali nismo dobili zadovoljavajuće rezultate. Metode rada spomenutih autora još nismo primjenili na endospermalno tkivo.

Prvi su ohrabrujući rezultati postignuti C banding tehnikom kada smo koristili endospermalni materijal, primjenom kombiniranih i nešto modificiranih tehnika dvaju autora: Schweizer (1973, 1974), Marks & Schweizer (1974), Marks (1975). Opisani su u radovima Borzan & Papeš (1978) i Borzan (1981).

Pozitivni su rezultati dobiveni primjenom Giemsa C banding metode na endospermu slijedećom tehnikom:

1. Nakon dvadesetčetverosatnog fiksiranja u smjesi ledene octene kiseline i apsolutnog etanola, 1 : 3 V/V, gametofiti su tjedan dana pohranjeni u 90%-tni etanol na +4° C.

2. Preparati su izrađeni squash tehnikom u 45%-tnoj octenoj kiselini na predmetnici, pod binokularnom lupom. Pokrovnica je nakon polaganja na preparat lagano pritisnuta palcem. Preparat je pažljivo zagrijavan.

3. Pokrovnica je odvojena s preparata smrzavanjem ugljičnim dioksidom iz plinske boce. Preparat se zatim sušio preko noći na sobnoj temperaturi.

4. Inkubacija je u 45%-tnoj octenoj kiselini na 60° C trajala 20 minuta.

5. Nakon inkubacije, preparati su ispirani tekućom vodom 15 minuta, a potom uronjeni u destiliranu vodu.

6. Inkubacija s toplom otopinom barijskog hidroksida. Najbolji je rezultat postignut 5%-tnom otopinom barijskog hidroksida ( $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ) na 54—56° C u trajanju od 15 minuta. Nakon toga su preparati uronjeni u destiliranu vodu, a zatim prani 1 sat tekućom vodom.

7. Preparati su držani 1 sat u  $2 \times \text{SSC}$  na 60° C (u smjesi 0,3 M NaCl i 0,03 M trinatrijskog citrata u omjeru 1 : 1, a pH je s pomoću HCl napravljen da bude 7,0).

8. Pošto su preparati uronjeni u destiliranu vodu, bojani su Giemsa bojom 1 sat. Boja je priređena u koncentraciji od 2%, a razrijeđena je u M/15 Sörensen-ovom fosfatnom puferu (pH = 6,9). Pufer je priređen iz otopina M/15 kalijskog primarnog fosfata ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) i M/15 natrijskog sekundarnog fosfata ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) u omjeru 1 : 1.

9. Preparati su ispirani u destiliranoj vodi, sušeni na zraku i sobnoj temperaturi preko noći i uklopljeni u euparal.

U ovom radu ću umjesto tuđica »banding«, »band« i »bandiranje« koristiti naše riječi za opis tamno obojenih segmenata kromosoma izazvanih primjenom ove specifične Giemsa metode, kao npr. oprugavanje kromosoma, pruga na kromosomu i slično.

#### OBRADA PODATAKA ELEKTRONIČKIM RAČUNALOM — COMPUTER DATA PROCESSING

Obrada je rađena na elektroničkom računalu PDT—150, komercijalnog naziva u Jugoslaviji KOPA 1510. Sastoji se od jedne radne stanice VT—100 (KOPA 1000). Procesor je LSI—11 Digital, interna memorija je 64 Kb, a eksterna je na dva meka (floppy) diska. Programi su rađeni pod kontrolom operativnog sistema RT<sup>2</sup> (subset operativnog sistema RT—11). Svi su programi pisani u programskom jeziku FORTRAN—4, a za kontrolu ulaznih podataka su se koristile ekranske maske pisane u FMS—11 (paket uslužnih programa) koji osigurava vizuelnu

kontrolu podataka na ekranu. Sam unos podataka obavljan je pomoću programskog paketa KED—11 (Keypad editor) — editora koji koristi izdvojenu tastaturu na radnoj stanici KOPA—1000.

Programi su podijeljeni u tri grupe. Jedna je obuhvaćala unos i formalno-logičku kontrolu, druga je omogućavala statističku obradu (izračunavanje osnovnih statističkih parametara za kariotip svakog stabla) i treća su grupa programa bili testovi koji obuhvaćaju standardni T test, F test i T i F test za slučaj kada pretpostavka o jednakosti varijanci osnovnih skupova (populacije) nije osigurana.

Izlazne liste tiskane su na matričnom printeru LA—36 s malom brzinom pisanja.

## PREGLED LITERATURE — LITERATURE REVIEW

### CITOTAKSONOMSKA ISTRAŽIVANJA BOROVA S POSEBNIM OSVRTOM NA PODSEKCIJU SYLVESTRES — CYTOTAXONOMICAL INVESTIGATIONS OF PINES ESPECIALLY REGARDING THE SUBSECTION SYLVESTRES

U citološkim udžbenicima se kromosomi četinjača spominju vrlo rijetko ili samo kao primjer konzervativnosti i jednoobraznosti u morfologiji i ponašanju tijekom dioba. Borovi u tom pogledu samo potvrđuju pravilo, jer se kromosomi različitih vrsta borova vrlo malo razlikuju. Krajem prošlog i početkom ovog stoljeća osobito je detaljan i opsežan rad Margaret C. Ferguson (1901, 1904) pokazao citološke značajke nekih vrsta borova (*Pinus strobus*, *P. austriaca*, *P. rigida*, *P. resinosa* i *P. montana* var. *uncinata*) i u detalje objasnio razvoj jajne stanice i oplodnju u borova te mikrosporogenezu. Navodi i točan broj kromosoma u haploidnom stanju ( $n = 12$ ) dok Dixon (1894) navodi za *Pinus sylvestris* u vrijeme formiranja arhegonija različite brojeve kromosoma i to: 8, 12, 16 i 24, što je vjerojatno rezultat pogrešne metodike rada i krivog tumačenja mikroskopskih preparata. Unatoč tome rad Dixon-a, kao i nekih drugih autora u to vrijeme (Strasburger 1892, Lewis 1908), ukazuje na interes koji je vladao u otkrivanju i tumačenju procesa oplodnje kod borova. Sax & Sax su 1933. objavili pionirski rad iz područja kariologije golosjemenjača obrađujući 53 vrste svrstanih u 16 rodova. Tim su radom ukazali na prednosti u korišćenju haploidnog endosperma u citološkim istraživanjima golosjemenjača. Za borove su utvrdili da imaju vrlo slične kariotipove i da je jedan od 12 kromosoma heterobrahijalan. Među 14 vrsta borova istraživali su crni i obični bor ali ne iznose njihove detaljnije karakteristike, Mehra & Khoshoo (1956) su opisali citološka istraživanja 41 vrste četinjača, pripadnika 14 rodova, među kojima je *Pinus nigra* jedan od 13 vrsta borova. U većini vrsta nalaze sekundarne konstrikcije na kromosomima s »medijalnom ili submedijalnom« centromerom, ali ih ne registriraju na kromosomima crnog bora. Neke vrste četinjača (*Cedrus deodara* Loudan., *Picea smithiana* (Wallich) Boiss, *Abies pind-*



row Spach, *Thuja orientalis* Linn., *Cupressus funebris* Don. i *C. torulosa* Endlicher) su istraživali izradom squash preparata ženskog gametofita.

Ipak, kariološka istraživanja se najčešće provode prepariranjem meristema korjenčića. Aass (1957) je istraživala kariotipove različitih stabala običnog bora i opisala sekundarne konstrikcije na dva najdulja kromosoma. Iznosi da su tri kromosoma manja od ostalih. Da bi citološki dokazao porijeklo triju stabala, hibrida između crnog i običnog bora, pronađenih u jednoj kulturi u Danskoj, Vidaković (1958) je analizirao kromosome crnog i običnog bora te kromosome korjenčića naklijalih sjemenki s hibridnih stabala. Ustanovljuje razlike u duljini kromosoma između crnog i običnog bora, dok su kromosomi meristema korjenčića klijanaca hibridnih biljaka bili intermedijarni. Navodi da je razlika između najduljeg i najkraćeg somatskog kromosoma crnog bora manja nego u običnog bora.

Radovi Khoshoo-a (1960), Natarajan i sur. (1961), osobito Saylor-a (1961, 1964, 1972), Nagl-a (1962, 1965, 1967), Pederick-a (1967, 1970), Simak-a (1962, 1966) i Matern & Simak-a (1968, 1969) bili su mi vrlo korisni u razradi analize kariotipa. Prve rezultate vlastitih istraživanja pokušavao sam uspoređivati s kariotipovima objavljenim u tim radovima (kao i u radovima Kim (1962), Yim (1963), Tarnavschi & Ciobanu (1965), Fahmy (1966), Shidei & Moromizato (1971), Mihailescu & Dalu (1971, 1972). Korisna su mi bila i kariološka istraživanja nekih azijskih vrsta borova, koja je objavila Muratova (1978a, 1978b, 1979a, 1979b).

Zajednička je značajka svih tih radova da se veoma teško mogu uspoređivati rezultati dvaju radova, čak i onda kada se radi o analizi kariotipa iste vrste. Moguće je usporediti broj kromosoma i eventualno ukupno opaženi broj sekundarnih konstrikcija, ali najčešće nije moguće niti za istu vrstu komparirati relativne duljine kromosoma, njihove kračeve i položaje sekundarnih konstrikcija na pojedinim kromosomima uz primjenu statističkih metoda. Premda pojedini radovi doprinose rješavanju problema identifikacije pojedinog kromosoma i položaja konstrikcija na njima (Natarajan i sur., 1961; Saylor 1964; Pederick, 1967; Mihailescu & Dalu 1972), objavljene rezultate je teško uspoređivati s rezultatima drugih autora i pritom dokazivati signifikantnost eventualno postojećih razlika.

Osnovni razlog tome je različito prikazivanje rezultata vlastitih istraživanja pojedinog autora u odnosu na načine istraživanja i rezultate drugih autora. Sax & Sax (1933) su npr. prikazali kariotip s padajućim nizom kraćeg kraka kromosoma. Vidaković (1958), je prikazao rastući niz od 2n kromosoma, Pederick (1967, 1970) padajući haploidni niz totalne relativne duljine kromosoma. Ostali, već spomenuti autori pokazuju nizanje po jedinim brojčano izraženih karakteristika kariotipa, veoma korisnih za autora koji ih je koristio za donošenje zaključaka na svom materijalu, ali su slabo ili nikako upotrebljivi za uspoređivanje s rezultatima drugih autora, osobito onda kada se primijene statističke metode. Stoga su prijeko potrebne sistematizacije i standardizacije metoda, pa ranijim radovima (Borzan & Papeš 1978, Borzan 1979, 1981) i ovim radom, rezultatima i diskusijom,

ukazujem na neke momente u istraživanjima kariotipa borova, s ciljem da posluže kao prilog unificiranju metoda rada i tumačenju rezultata istraživanja karakteristika kariotipa.

Saylor-ova (1961, 1964, 1972, 1983) kariološka istraživanja borova uključuju ukupno 87 vrsta borova, te u posljednjem radu iz 1983. zaključuje: »Zaista kariotipovi svih vrsta borova imaju očiglednu sličnost u broju kromosoma, njihovoj duljini i položaju centromere. Prema tome se čini da je ovaj rod, koji postoji već milionima godina i koji je bio izložen različitim vidovima selekcionih pritisaka, bio prilično konzervativan u promjeni glavnih obilježja svojih kariotipova. Poliploidija, pa čak i dodatni kromosom ili gubitak pojedinog kromosoma ne postoje u ovom rodu ni na kojoj razini osim kod slučajnih jedinki. Slično tome, evolucija borova je protekla s prilično ograničenim korišćenjem kromosomskih translokacija i inverzija koje uključuju centromeru. Premda se u početku očekivalo mnogo više raznolikosti, svakako je važno opisati osnovne kariotipove vrsta i dokumentirati sličnosti i razlike koje postoje«.

Razdioba roda *Pinus* (prema Little-u & Critchfield-u 1969, usvojenu i od Vidaković-a 1982), prema kojoj od oko 100 vrsta borova u podrod *Pinus*, sekciju *Pinus* spada podsekcija *Sylvestres* sa 19 (ili više) vrsta borova, pokazuje se opravdanom i sa citotaksonomskog gledišta (Saylor 1964, 1983). Prema Saylor-u, sve vrste borova podsekcije *Sylvestres* imaju kromosome XI i XII heterobrahijalne. Sve ostale vrste borova imaju heterobrahijalan samo kromosom XII. Ovaj generalni zaključak Saylor-a biti će češće uspoređivan s rezultatima istraživanja kariotipova pojedinačnih stabala u ovom radu, s obzirom na to da sva istraživana stabla spadaju u vrste svrstane u podsekciju *Sylvestres*.

#### RAZVOJ ŽENSKOG GAMETOFITA BOROVA I OPLODNJA — FEMALE GAMETOPHYTE DEVELOPMENT IN PINES AND FERTILIZATION

Za prikaz i razumjevanje nekih rezultata ovih citoloških istraživanja borova potrebno je opisati biologiju razvoja sjemenih zametaka borova do stadija zrelog jajeta spremnog za oplodnju, osobito tkivo endosperma u razvoju u vrijeme kada se koristi za citotaksonomska istraživanja. S obzirom da su Mc William i Mergen (1958) uspjeli fotografski dokumentirati citološke stadije singamije crnog bora, od trenutka kada spermalne jezgre ulaze u arhegonij pa do formiranja prvih dviju slobodnih jezgara zigote, prikazujem i rezultate njihovih istraživanja, jer se tim činom oplodnje oblikuje kariotip svake novonastale jedinke bora.

Ženski se cvat javlja u našim klimatskim uvjetima na crnom i običnom boru početkom svibnja. Sastoji se od centralnog vretenca oko kojeg su spiralno postrance izrasli plodni listići (makrosporofili). Na plodnim se listićima nalaze po dva sjemena zametka (makrosporangija), koji se sastoje od integumenata koji ovijaju unutrašnji dio ili nucellus. U sredini nucellusa aždvađa se majčinska stanica megaspore obavijena slo-

jem tapetalnih stanica. To je staničje još uvijek diploidno. Sada nastupa mejotička dioba. Od majčinske se stanice megaspore razvijaju četiri haploidne stanice (linearna tetrada) od kojih jedna (najveća) postaje funkcionalna megaspore, a tri degeneriraju.

Funkcionalna megaspore započinje nizom dioba slobodnih jezgara. Po Emig-u (1935), diobe se slobodnih jezgara javljaju u intervalu od 6 dana nakon pojave megaspore. Istovremeno se stanice nucellusa uz megasporu transformiraju u hranjivo tkivo, te metaboličkim produktima rastvaranja omogućuju brojne diobe slobodnih jezgara. Tako nastaje začetak ženskog gametofita, redovito u sredini sjemenog zametka. Gametofit se postupno povećava, proporcionalno sa svakom novom diobom, usporedno s povećanjem šupljine koja nastaje dezintegracijom okolnih stanica nucellusa, Emig (1935) navodi da su krajem prvog mjeseca već 32 jezgre, a da se tijekom drugog mjeseca (nakon oprašivanja) javljaju 64, 128 i 256 slobodnih jezgara.

Po Emig-u (1935) krajem vegetacije, gametofit u *Pinus flexilis* i *P. scopulorum* ima 512 slobodnih jezgara.

Jezgre gametofita skupljene u sredini sjemenog zametka još nisu odjeljene staničnom membranom. Okružene su, bolje rečeno, nalaze se u zajedničkoj citoplazmi, omeđenom tankom opnom. Gametofit se povećava daljnjim diobama početkom druge vegetacije, kada od nucellusa ostaje samo mikropilarni dio kroz koji prodiere (prodiru) polenova mješnica. Ovaj je stadij razvoja (u kojem po Emig-u, 1935., ima oko 2000 slobodnih jezgara) zapravo period razvoja ženskog gametofita najpogodniji za citološka istraživanja, jer već slijedećom diobom dolazi do formiranja stijenki, koje započinje u horizontalnog niza jezgara na mikropilarnom kraju gametofita, a zatim prema središtu. Na mikropilarnom kraju gametofita nalaze se neobično velike interfazne jezgre. Većim jezgrama odgovaraju i veći kromosomi u mitotičkim fazama diobe. Nagl (1966) je za obični bor citofotometrijskim mjerenjem ustanovio da pojedine jezgre imaju dvostruko DNK od količine očekivane za haploidne jezgre, te da postoji pozitivna korelacija između količine DNK u jezgri i volumena kromosoma.

Unutar ovakvog multicelularnog ženskog gametofita (»endosperm«), 2—5 (ili više) stanica diferencira se u arhegonij, koji se sastoji od nekoliko vratnih stanica i velike centralne stanice. Arhegoniji su opkoljeni s tri strane haploidnim stanicama koje su pune hranjivom tvari (endospermalno staničje), a sa mikropilarne strane u području vratnih stanica graniči s nucellusom kroz koji prodiru polenove mješnice. Tijekom ovog razvoja gametofita, vjerojatno je prisutna interakcija (u smislu stimulacije u razvoju gametofita) između nadiruće polenove mješnice i okolnih stanica.

U prikazu ženskih gametofita gimnosperma, Maheswari & Singh (1967) citiraju autore koji su nalazili dvojne gametofite s normalnim arhegonijima u jednom sjemenom zametku. Među ostalima, citiraju Haydon-a (1908) koji u nucellusu običnog bora nalazi pet gametofita u jednom sjemenom zametku.

Centralna stanica arhegonija se jako povećava i postaje vakuolizirana. Dolazi do obilne fiziološke aktivnosti i sinteze bjelančevina (Ward-

law, 1955). Nastaje citoplazmatski retikulum s centripetalnim gradijentom malih do velikih vakuola. Povećana centralna jezgra arhegonija se dijeli, a jedna jezgra kćer postaje jajna jezgra, dok se druga dezorganizira. Citoplazma jajne stanice, poput haustorijalnog procesa, kontaktira s okolnim slojem stanica, koje kao tapetum ovijaju arhegonij i nazivaju se arhegonijski ovoji.

Jezgra jajne stanice prelazi u posljednju fazu dozrijevanja, veoma je velika i pomiče se prema središtu elipsoidnog arhegonija. Citoplazma arhegonija postaje veoma gusta, većina vakuola nestaje, a može se utvrditi postojanje gusto spremljenog pričuvnog materijala, kao što su škrob, ulje i bjelančevine.

To je stanje u kojem jaje čeka oplodnju.

Prema Mc Williamu & Mergenu-u (1958) konačna faza rasta polenove mješnice zbiva se u desetak zadnjih dana tijekom 12 do 13 mjeseci nakon oprašivanja. Kada se polenova mješnica približi arhegonijima, gust citoplazmatski sadržaj je koncentriran u vrhu mješnice i sadrži jezgru mješnice, ostatke stanice drška i dvije istaknute spermalne jezgre, koje su blizu jedna drugoj, ovijene mješnim ovojnica. Veća jezgra obično prethodi manjoj. Nadiruća polenova mješnica kroz tkivo gametofita prolazi kroz vratne stanice i predaje sadržaj polenove mješnice jajetu. Neposredno prije toga u gornjem dijelu jajne citoplazma pojavljuje se receptivna vakuola i traje tijekom narednog razvoja jajeta.

Razlika u veličini dviju spermalnih jezgara se vidi najbolje u vrijeme njihovog prilaza jajetu. Manja ili nefunkcionalna jezgra obično se ne primiče jezgri jajeta, već ostaje u gornjem dijelu jajeta zajedno s jezgrom mješnice i ostatkom stanice drška. Potonje ubrzo nestaju, dok manja spermalna jezgra traje nešto duže vrijeme. Veća, funkcionalna spermalna jezgra se približi jezgri jajeta i nakon kontakta utone u nju, sve dok obrisi dviju jezgara ne stvore trajnu površinu. U to vrijeme obično jezgra jajeta ima izražene nukleoluse, koji ali nisu bili vidljivi ni u jednoj fazi spermalne jezgre. Na mjestu dodira dvije su jezgre odvojene dvostrukom membranom i ostaju tako neizmjenjene u ovoj ranoj fazi oplodnje. Nestankom ovih membrana kromatinska se tvar svake jezgre zgusne i tvori tipičnu konfiguraciju za profazu: nakupinu tankih, smotanih, ogrličastih niti. Ove istanjene niti se ubrzo skraćuju, debljaju i poprimaju izgled kromosoma. U to se vrijeme pojavljuju niti diobenog vretena i premda pomalo nejasno, tvore dva multipolarna mnogostruka vretena. U početku su vretena zasebna, ali se ubrzo stvara uobičajena slika mnogostrukog vretena s dvije grupe kromosoma. Približavanjem tih dviju grupa kromosoma, vreteno se postepeno udvaja i širi. Maternalni i paternalni kromosomi se rasporede u ekvatorijalnu ravninu širokog vretena, te se u tom stadiju kromosomi pojedine grupe ne razlikuju. U toj tipičnoj metafaznoj grupaciji može se nabrojati 24 kromosoma.

U ovoj fazi dolazi do longitudinalne diobe kromosoma i zbog medijalnog položaja pričvršćenih niti diobenog vretena, poprimaju V ili U oblik, pomičući se prema suprotnim polovima. Nakon anafaze, dolazi do telofaze bez stvaranja poprečne membrane, te nastaju prve dvije slobodne jezgre zigote. Druga dioba zigote započinje skoro neposredno

po završetku prve diobe, osim što su kromosomi u metafazi nešto istanjeniji. Nastaju četiri slobodne jezgre u donjem dijelu jajeta i predstavljaju inicijalne stanice proembrija.

## REZULTATI ISTRAŽIVANJA I DISKUSIJA — INVESTIGATION RESULTS AND DISCUSSION

### ANALIZA KARIOTIPA — KARYOTYPE ANALYSIS

#### *Variranja u veličini kromosoma — Chromosome length variation*

Svaki kariotip pojedinačnog stabla prikazan u ovom radu je rezultat obrade 18 izabranih stanica endosperma u razvoju (tabela 1). Jedini kriterij za izbor stanice za obradu je bio da su kromosomi u stanici raspoređeni tako da se mogu lako prebrojati i izmjeriti. Iz tabele 1 je vidljivo da svih 18 analiziranih stanica stabla »nisy 410« potiče iz jednog sjemenog zametka (jednog preparata), te je za očekivati da je varijabilnost u veličini istog kromosoma iz stanice u stanicu mala. Za 18 analiziranih stanica stabla »ni 47« također se može očekivati da će se isti kromosomi iz stanice u stanicu malo razlikovati, premda možda više nego je to slučaj sa kromosomima stabla »nisy 410«, jer stanice stabla »ni 47« potiču doduše iz 9 različitih sjemenih zametaka (različitih preparata) ali su svi sjemeni zamci iz istog češera. Za druga analizirana stabla bi se mogla očekivati veća varijabilnost duljina kromosoma, jer su svi sjemeni zamci iz različitih češera ili fiksirani u različito vrijeme.

S ovakovim pretpostavkama analizirao sam srednje apsolutne vrijednosti kromosoma svih stabala, jer usporedba prosjeka apsolutnih duljina srednjeg kromosoma, na temelju vrijednosti izmjerenih na fotografiji u mm, pokazuje stvarne razlike u veličini kromosoma analiziranih stanica, jer su sve jezgre snimljene istim objektivom i aparaturom, a sve fotografije su rađene tako da imaju isto povećanje.

S obzirom na moguća tumačenja uzroka različitim duljinama kromosoma u stanicama endosperma u razvoju, prikazujem na slici 8 kromosome stanica s najkraćim i najduljim kromosomima stabla »ni 47«, a na slici 9 stabla »nisy 410«.

U tabeli 6 za svako stablo prikazujem srednji kromosom stanice s najduljim i najkraćim kromosomima (raspon od 18 analiziranih stanica), te apsolutnu vrijednost srednjeg kromosoma iz svih 18 analiziranih stanica. Osim apsolutnih vrijednosti u tabeli 6 su i odgovarajuće relativne duljine krakova srednjeg kromosoma (relativna duljina cijelog srednjeg kromosoma = 100).

U prosjeku, stanice s najduljim kromosomima bile su iz endosperma stabla »ni 47«. Stanice s najkraćim kromosomima su iz endosperma hibridnog stabla »nisy 410«, pa je stanica s prosječno najvećim kromosomima stabla »nisy 410« (slika 9a) odgovarala po veličini kromosoma stanici s prosječno najmanjim kromosomima stabla »ni 47« (slika 8b). Može se reći da su u pravilu bili najdulji kromosomi stabala crnog bora, nešto

Tab. 6. Prosječne vrijednosti apsolutnih duljina srednjeg kromosoma na osnovi 18 istraženih stanica svakog stabla, odgovarajuće duljine krakova i rasponi za srednje kromosome stanica s najduljim i najkraćim kromosomima. Postotcima su prikazane izračunate relativne duljine krakova srednjeg kromosoma — The average absolute mean chromosome length based on 18 investigated cells from each tree, corresponding arm lengths and ranges of mean chromosomes from cells with longest and shortest chromosomes. Relative arm lengths of mean chromosomes are given in percentage.

Broj stabla - Tree no.	Prosječni apsolutni duljine srednjeg kromosoma - Average chromosome absolute length		Prosječni apsolutni duljina kratkih krakova srednjeg kromosoma - Average short arm absolute length			Prosječni apsolutni duljina dugih krakova srednjeg kromosoma - Average long arm absolute length		Omjeri krakova srednjeg kromosoma - Arms ratio of the average chromosome	
	mm		mm			μm		%	
ni 47	129.00 53.42	81.77	58.92 25.08	37.30	45.61	70.08 28.33	44.47	54.38	0.839
ni 221	111.50 40.50	61.96	51.42 18.83	28.63	46.20	60.08 21.67	33.33	53.80	0.859
ni 366	90.83 43.33	68.87	40.08 20.25	31.58	45.86	50.75 23.08	37.29	54.14	0.847
sy 367	73.00 31.58	49.15	33.17 14.58	22.73	46.34	39.83 17.00	26.37	53.66	0.864
sy 77	85.25 34.17	49.82	38.67 16.00	23.02	46.20	46.58 18.17	26.80	53.80	0.859
de V 116	70.79 32.42	54.03	33.50 14.83	25.14	46.49	37.29 17.58	28.94	53.51	0.869
nisy 410	58.58 36.17	46.51	26.67 17.25	21.78	46.82	31.92 18.92	24.73	53.18	0.881

kraći kromosomi ramete »de V 116« japanskog crvenog bora, potom slijeđe kromosomi običnog bora, a najkraći su bili kromosomi hibridnog stabla »nisy 410«.

Razlike u veličinama pojedinih stanica treba promatrati u svjetlu istraživanja Nagl-a (1966), koji prikazuje kod običnog bora razlike u veličinama jezgara endosperma u razvoju, navodeći da su jezgre (i kromosomi) najveći neposredno pred oplodnju. Tipove stanica s karakterističnim veličinama kromosoma koji potiču iz različitih dijelova sjemenog zametka običnog bora prikazuje u radu iz 1965. godine.

Uspoređujući duljine srednjih kromosoma stanica fiksiranih krajem mjeseca svibnja i početkom lipnja (u vrijeme kada po prilici nastupa

oplodnja) s onim fiksiranim u prvih 20 dana svibnja, kromosomi stanica ramijskih datuma su u pravilu kraći i kompaktniji, a kasnijih datuma izduženiji i manje kontrahirani. To je ujedno i dokaz diferencijalne aktivnosti stanica endosperma u razvoju tijekom tog kratkog perioda od oko 3 tjedna, za koje vrijeme sam sakupljao i fiksirao materijal za ova istraživanja.

U preparatu broj 184, stabla »sy 77«, iz sjemenog zametka fiksiranog 29. V 1974. godine, bilo je nekoliko stanica s vrlo kratkim kromosomima (slika 10). Ovakove sam stanice nalazio u preparatima u vrijeme koje po Emig-u (1935) odgovara stadiju razvoja ženskog gametofita kada na mikropilarnom kraju u horizontalnom nizu jezgara započinje formiranje membrana. Prema Nagl-u (1965), ovakove se stanice nalaze u sloju tapetuma.

Iako su već mnogi autori istraživali ženski gametofit borova (Ferguson-ova 1901, 1904, Emig 1935, Mc William & Mergen 1958, Nagl 1962, 1965, 1966 i drugi), ostaju otvorena još mnoga pitanja vezana za korelativni odnos veličine jezgara i njihove funkcije u ovom tkivu u razvoju, kako prije, tako i za vrijeme i neposredno nakon oplodnje.

Ovdje je potrebno naglasiti i činjenicu da je praktički nemoguće analizirati stanice koje se sve nalaze u potpuno istom stadiju diobe, pa je za svako analizirano stablo moguće imati stanicu pogodnu za analizu u bilo kojem trenutku diobe od momenta prometafaze do početka anafaze. Ta je činjenica ujedno i najveći nedostatak u korišćenju endospermalnog tkiva golosjemenjača u analizi kariotipa, jer tretiranjem stanica meristema korjenčića citostaticima (kolhicin) prije fiksiranja postizemo ujednačenost duljina kromosoma u metafazi. Za tkivo u endospermu u ovom radu citostatici nisu korišćeni, a autori koji su istraživali endospermalne jezgre, a koje očitiram u ovom radu, također nisu koristili citostatike.

Za ilustraciju razlika u veličini kromosoma u analiziranim stanicama endospermalnog tkiva u razvoju, može poslužiti slika 11, sa stanicama koje vjerojatno potiču od iste stanice majke. Premda se čini da su u trenutku fiksiranja u istoj fazi diobe, veličine apsolutnih duljina srednjeg kromosoma im se razlikuju i iznose 36,17, odnosno 43,17.

U svakom slučaju, s obzirom na razlike u duljinama kromosoma, ovisno o stadiju razvoja ženskog gametofita, potrebno je ukazati na neophodnost kompariranja kariotipova iz jednoobraznog materijala, na eventualne rizike u zaključivanju i na potrebu istraživanja mogućih karioloških razlika između ovakovih jezgara tkiva u razvoju, unatoč prezentiranju karioloških rezultata relativnim odnosima.

#### *Relativne duljine kromosoma — Relative chromosome lengths*

Relativne duljine krakova prosječnog srednjeg kromosoma (srednji kromosom = 100) govore o bazičnoj sličnosti kariotipa borova, što je jedan od čestih zaključaka citiranih autora u istraživanjima kariotipova borova. Iz tabele 6. vidimo da se relativne duljine krakova srednjeg kromosoma bitno ne razlikuju, pa sam za prikazivanje kariotipova idiogra-

mom (slika 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18) za šest stabala zaokružio vrijednosti krakova srednjeg kromosoma na: S = 46<sup>0</sup>/o; L = 54<sup>0</sup>/o; a za stablo »nisy 410« na S = 47<sup>0</sup>/o; L = 53<sup>0</sup>/o.

Na osnovi objavljenih podataka u nekim radovima, mogao sam izračunati odgovarajuće vrijednosti relativnih duljina krakova srednjeg kromosoma, koje su iznosile u radu Tarnavschi & Ciobanu (1965) za:

*Pinus nigra* Arn. var. *banatica* S = 47.26<sup>0</sup>/o; L = 52.74<sup>0</sup>/o

*Pinus nigra* Arn. var. *austriaca* S = 48.74<sup>0</sup>/o; L = 51.26<sup>0</sup>/o

U radu Mihailescu & Dalu (1971) za:

*Pinus nigra* ssp. *Austriaca* S = 47.74<sup>0</sup>/o; L = 52.26<sup>0</sup>/o

*Pinus nigra* var. *Koekaelare* S = 47.46<sup>0</sup>/o; L = 52.54<sup>0</sup>/o

*Pinus nigra* ssp. *Calabrica* S = 47.08<sup>0</sup>/o; L = 52.92<sup>0</sup>/o

u radu Mihailescu & Dalu (1972) za:

*Pinus nigra* Arn. S = 46.65<sup>0</sup>/o; L = 53.35<sup>0</sup>/o

*Pinus sylvestris* L. S = 47.12<sup>0</sup>/o; L = 52.88<sup>0</sup>/o

u radu Pravdin (1964) za:

*Pinus sylvestris* L. S = 47.64<sup>0</sup>/o; L = 52.35<sup>0</sup>/o

u radu Saylor (1964) za:

*Pinus nigra* Arn. S = 47.45<sup>0</sup>/o; L = 52.55<sup>0</sup>/o

*Pinus sylvestris* L. S = 46.96<sup>0</sup>/o; L = 53.04<sup>0</sup>/o

*Pinus densiflora* S = 47.45<sup>0</sup>/o; L = 52.55<sup>0</sup>/o

Relativne duljine kromosoma crnog, običnog i japanskog crvenog bora, koje su različiti autori istraživali, prikazane su u tabeli 7 i predstavljaju još jednu potvrdu bazične sličnosti kariotipova borova.

Zaokružene (približne) vrijednosti razlika u duljinama dvaju susjednih kromosoma za 7 istraživanih stabala prikazujem u tabeli 8. Neslaganja s ranije objavljenim vrijednostima (Borzan 1981) za stabla »ni 47«, »ni 221«, »sy 367« i »sy 77« su iz razloga što su razlike između susjednih kromosoma računane iz cijelih (zaokruženih) brojeva, što je vidljivo ako se u tu svrhu koriste vrijednosti iz tabele 7.

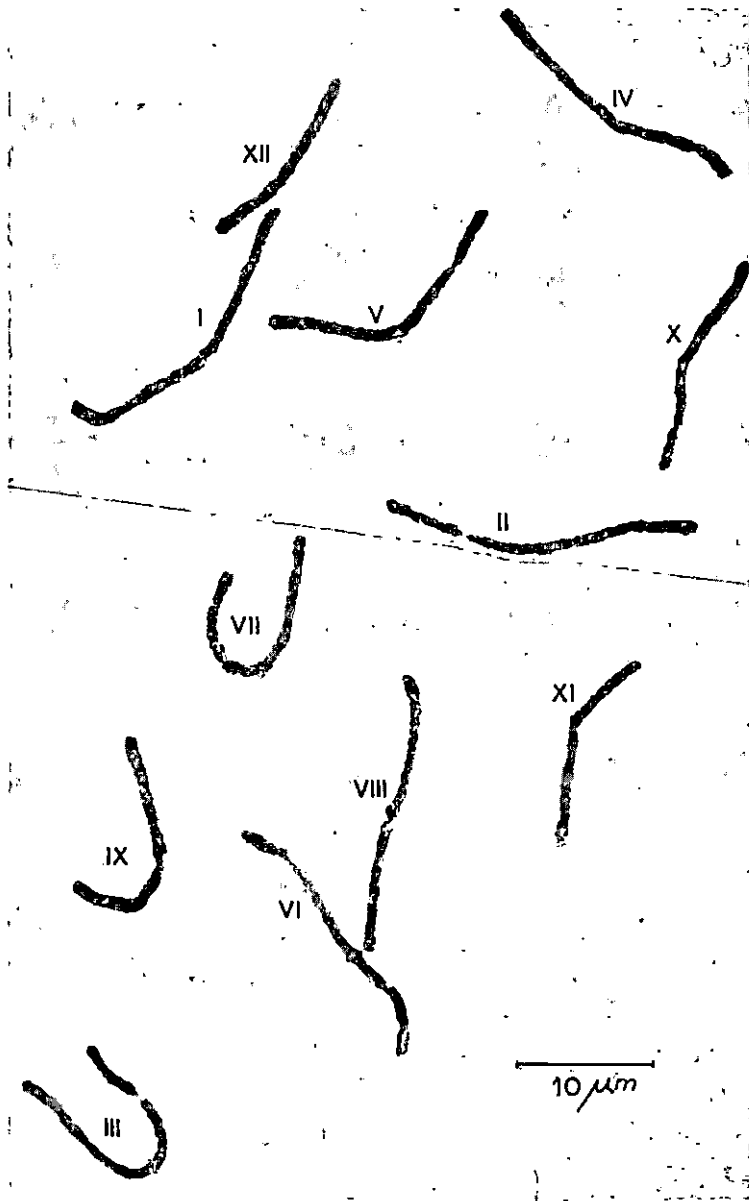
Iz tabele 8 vidimo da su za sva stabla razlike između susjednih kromosoma od rednog broja II do rednog broja IX manje nego razlike u duljinama između susjednih kromosoma I i II, te IX i X, X i XI i XI i XII. Najveće su razlike između kromosoma XI i XII, manje su razlike između kromosoma X i XI i I i II, a samo iznimno se pojavljuje kao veća, razlika između kromosoma IX i X za stablo »sy 367«.



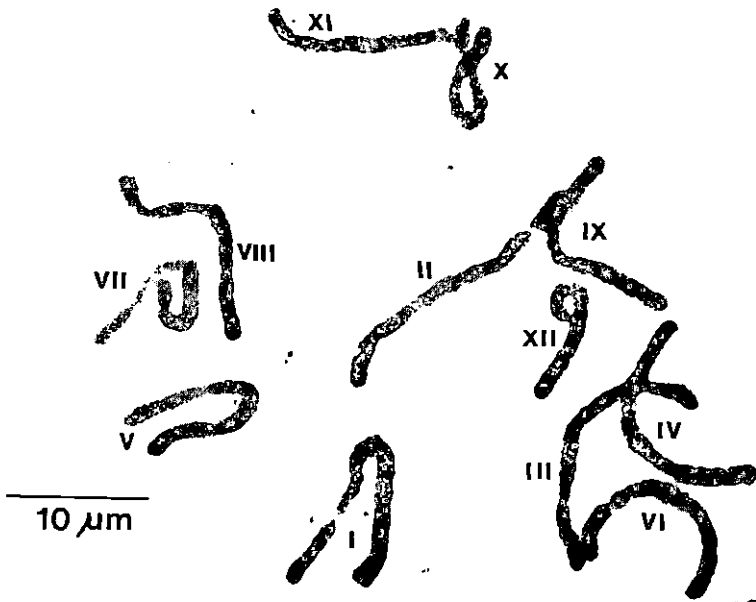
Tab. 7.

VRSTA SPECIES	KROMOSOM - CHROMOSOME NUMBERS												AUTOR AUTHOR
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	
ni 47	125	118	113	109	106	104	102	98	94	86	79	65	BORZAN & PAPEŠ (1978)
ni 221	125	115	111	108	105	103	100	97	94	89	82	69	BORZAN & PAPEŠ (1978)
ni 336	123	117	113	109	106	103	100	97	93	88	80	69	U ovom radu - In this paper
<i>P. nigra</i> Arn. *	121	115	111	110	105	104	100	97	94	89	84	68	PEDERICK (1967)
<i>P. nigra</i> Arn. *	118	113	110	107	106	105	103	98	98	90	81	71	SAYLOR (1964)
<i>P. nigra</i> Arn. var. <i>banatica</i>	131	115	115	107	99	99	99	99	90	82	82	82	TARNAVSCHI & CIOBANU (1965)
<i>P. nigra</i> Arn. var. <i>austriaca</i>	131	121	121	111	111	111	97	97	90	90	60	60	TARNAVSCHI & CIOBANU (1965)
<i>P. nigra</i> ssp. <i>Austriaca</i>	116	112	108	107	105	104	102	97	97	91	84	75	MIHAILESCU et al. (1971)
<i>P. nigra</i> var. <i>Koekaelare</i>	121	116	112	110	106	104	101	97	95	88	81	69	MIHAILESCU et al. (1971)
<i>P. nigra</i> ssp. <i>Calabrica</i>	122	112	110	108	107	104	103	91	95	88	87	72	MIHAILESCU et al. (1971)
<i>P. nigra</i> Arn.	119	113	112	110	109	104	106	101	95	85	78	67	MIHAILESCU et al. (1971)
<i>P. sylvestris</i> L.	120	115	111	109	107	103	102	99	94	88	80	71	MIHAILESCU et al. (1971)
<i>P. sylvestris</i> L. *	120	114	109	109	106	103	101	98	97	89	82	72	SAYLOR (1964)
<i>P. sylvestris</i> L. *	120	114	109	107	107	106	101	101	97	90	79	70	NATARAJAN et al. (1961)
<i>P. sylvestris</i> L.	140	132	127	123	122	123	101	96	72	65	53	46	PRAVDIN (1964)
sy 367	123	116	111	109	106	104	102	98	95	85	79	70	BORZAN (1981)
sy 77	124	116	111	108	106	103	101	98	94	87	80	71	BORZAN (1981)
ni sy 410	125	116	112	108	105	102	99	97	94	88	81	72	U ovom radu - In this paper
<i>P. densiflora</i>	119	112	100	106	106	103	103	101	99	90	84	68	SAYLOR (1964)
de V 116	127	120	113	109	107	103	100	96	92	85	80	68	U ovom radu - In this paper

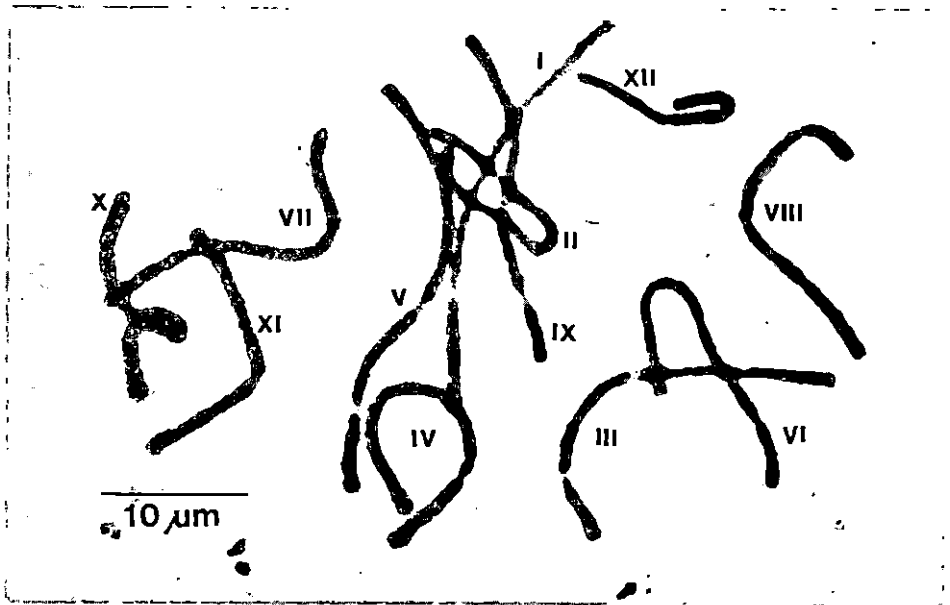
\* Vrijednosti su publicirane u radu Pedericka (1967) — The values are published in Pederick's paper (1967).



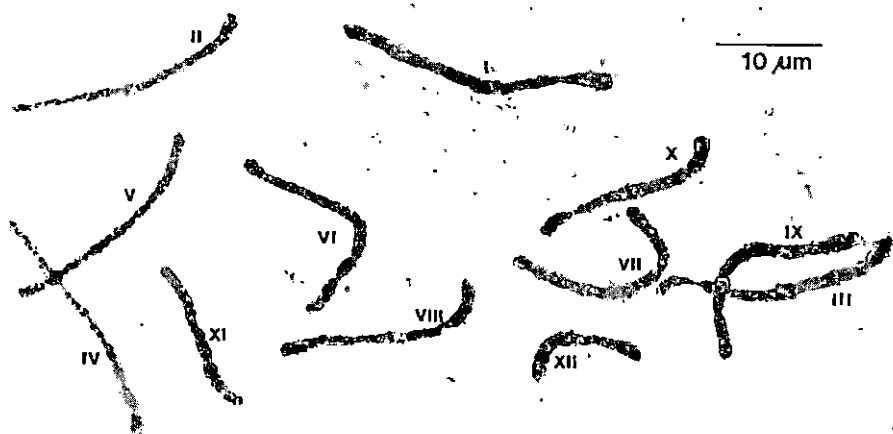
Sl. — Fig. 1. Stanica u endospermu stabla ni 47 s lijepo raspoređenim kromosomima (Borzan 1977a) — Good spreading of the chromosomes in the endosperm of the European black pine tree ni 47 (Borzan 1977a).



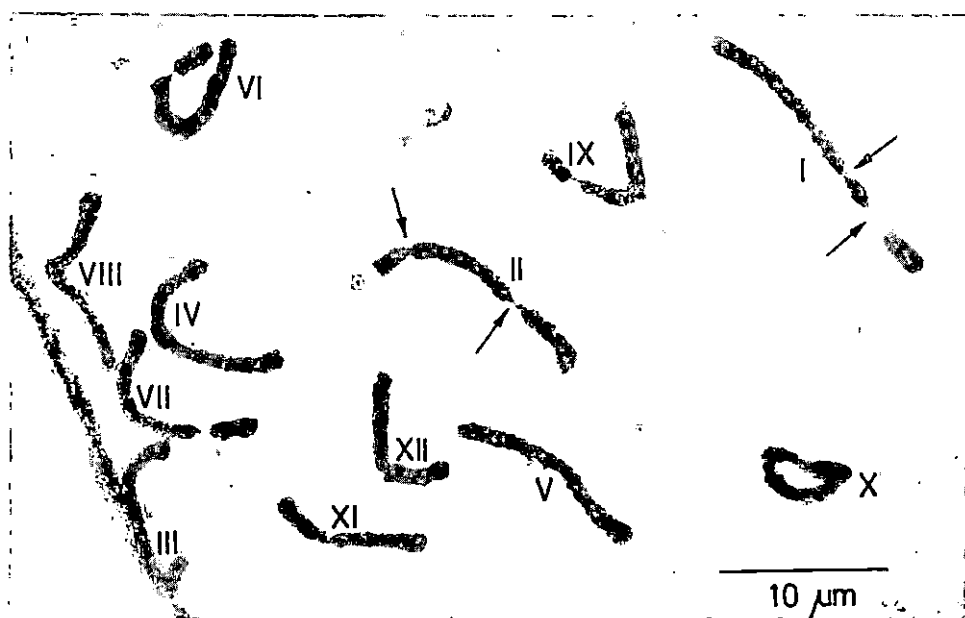
Sl. — Fig. 2. Kromosomi u endospermu stabla evropskog crnog bora ni 221 — Chromosomes in the endosperm of the European black pine tree ni 221.



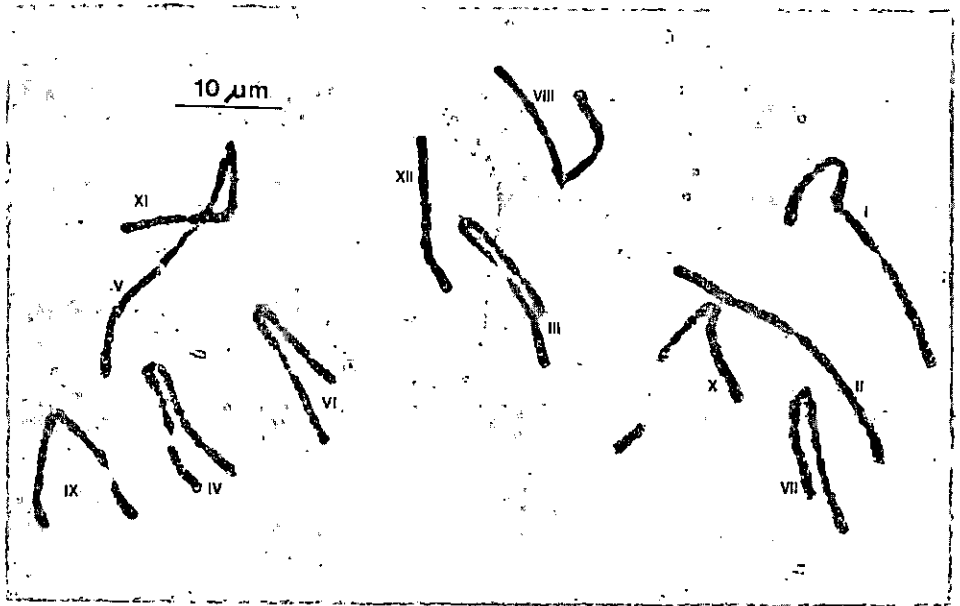
Sl. — Fig. 3. Prometafaza u endospermu stabla ni 366 — Prometaphase in the endosperm of the European black pine tree ni 366.



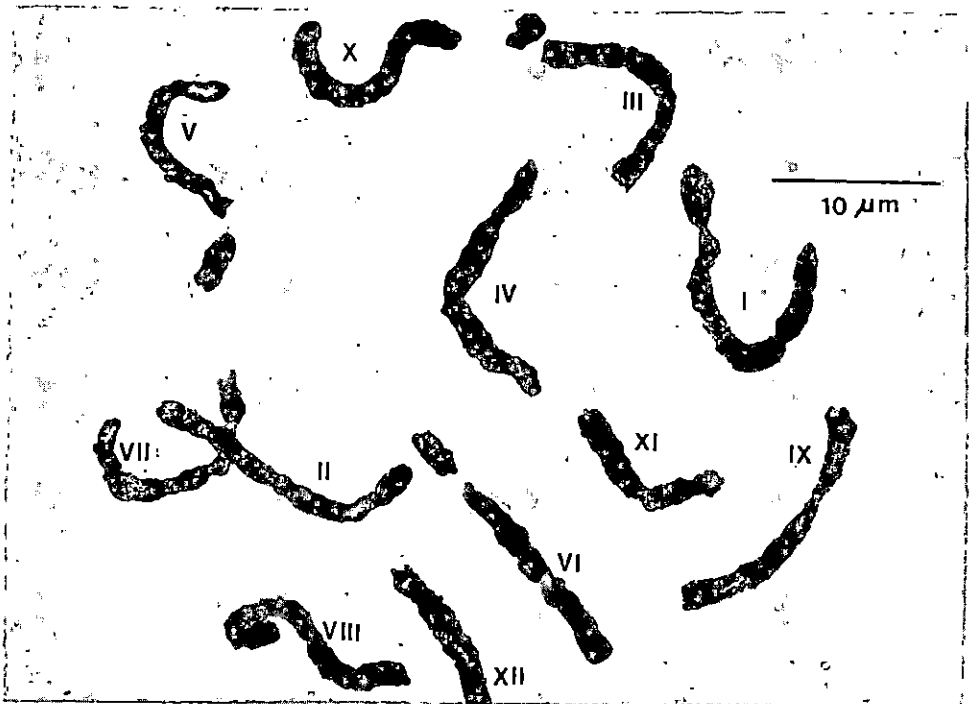
Sl. — Fig. 4. Kromosomi stabla sy 367. U centromerama nekih kromosoma (III, VIII, X) vidljiv je početak razdvajanja kromatida — Chromosomes of the tree sy 367. In the centromere of some chromosomes (III, VIII, X) chromatide separation starts.



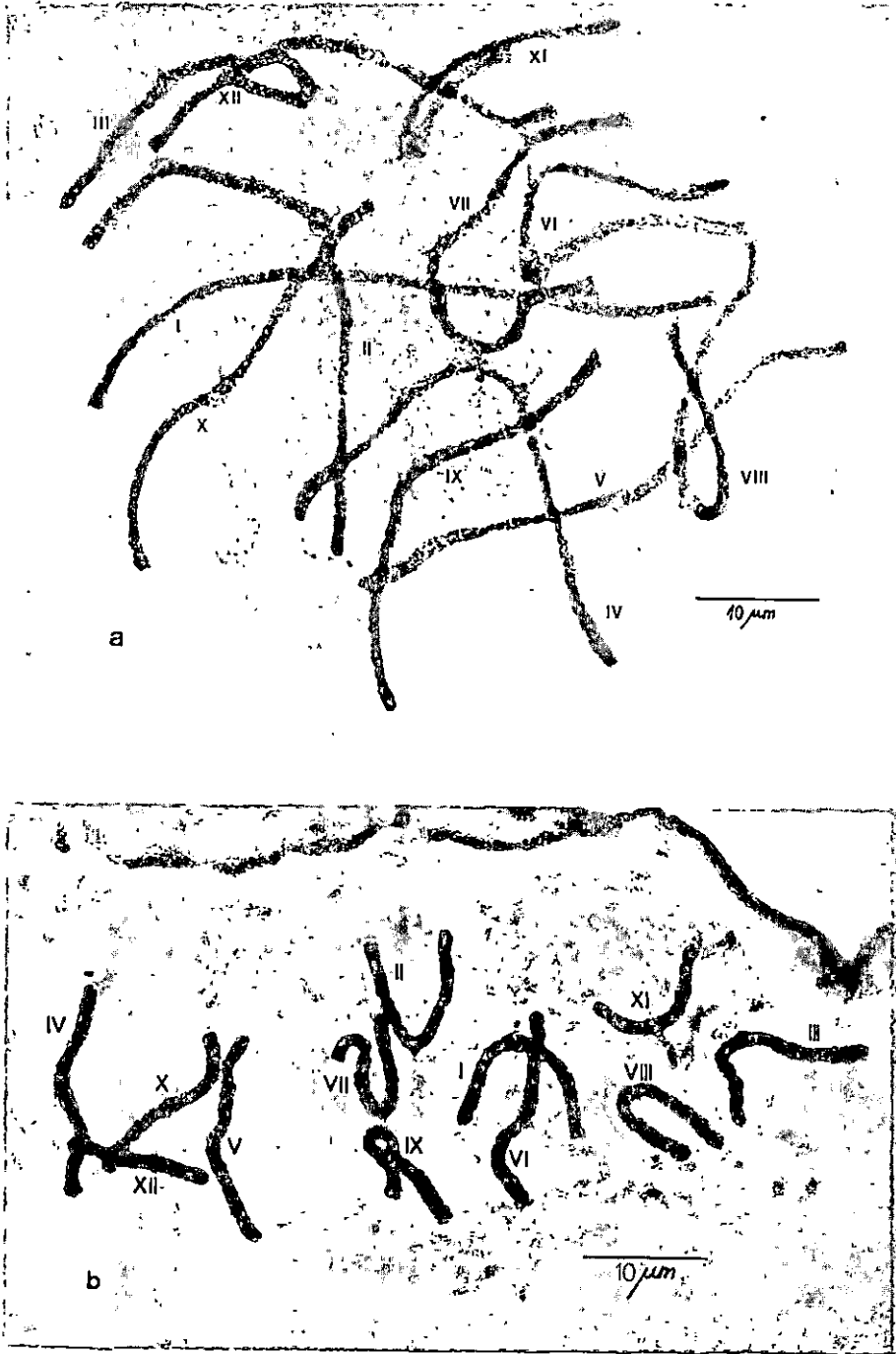
Sl. — Fig. 5. Metafaza s brojnim prominentnim sekundarnim konstrikcijama u endospermu stabla običnog bora sy 77. Na kromosomima I i II vide se po dvije prominentne konstrikcije; na kromosomu I su na istom kraku, a na kromosomu II jedna konstrikcija se nalazi na kratkom, a druga na dugom kraku (Borzan 1981) — Metaphase with numerous prominent secondary constrictions in Scots pine endosperm of the tree sy 77. Two prominent constrictions are evident on both chromosomes I and II; on chromosome I they are on the same arm; on chromosome II one constriction is on the short arm and the other on the longer arm (Borzan 1981).



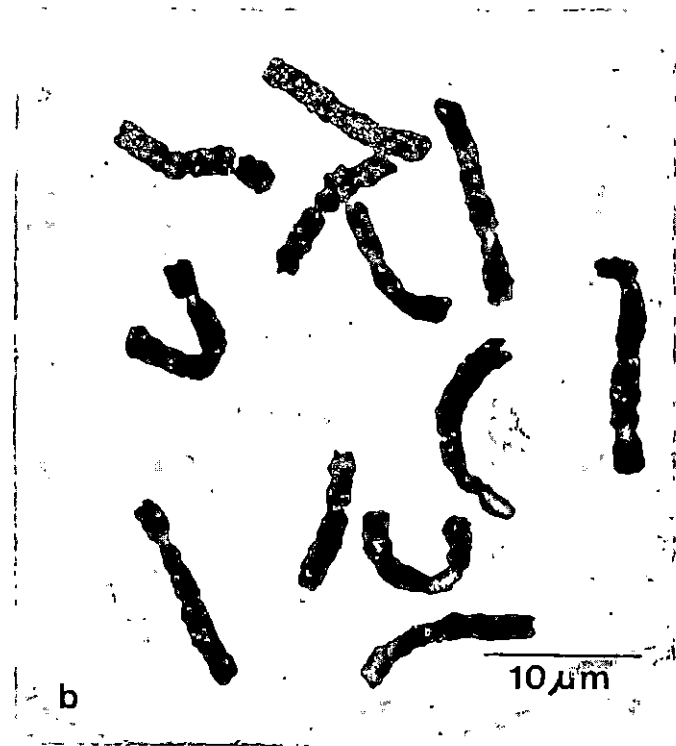
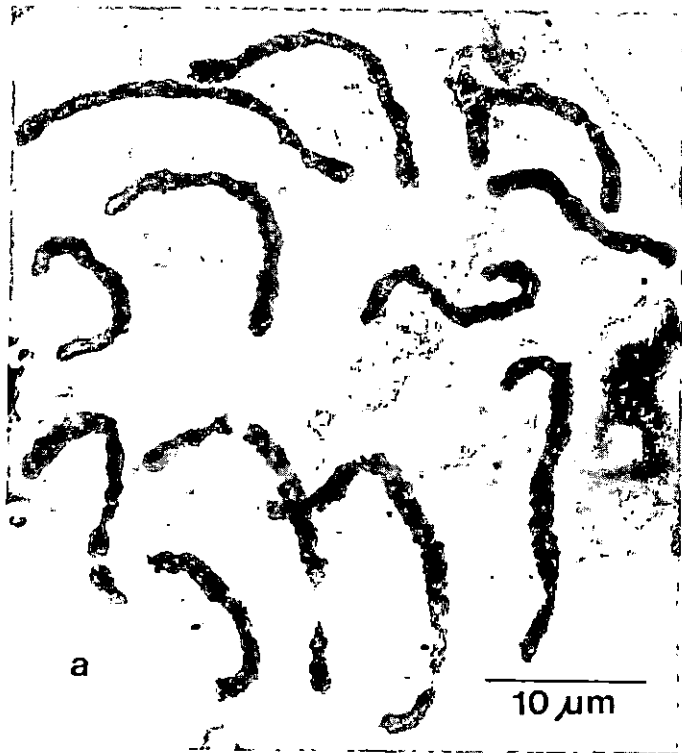
Sl. — Fig. 6. Kromosomi u endospermu stabla de V 116 — Chromosomes in the endosperm of the Japanese red pine ramete de V 116.



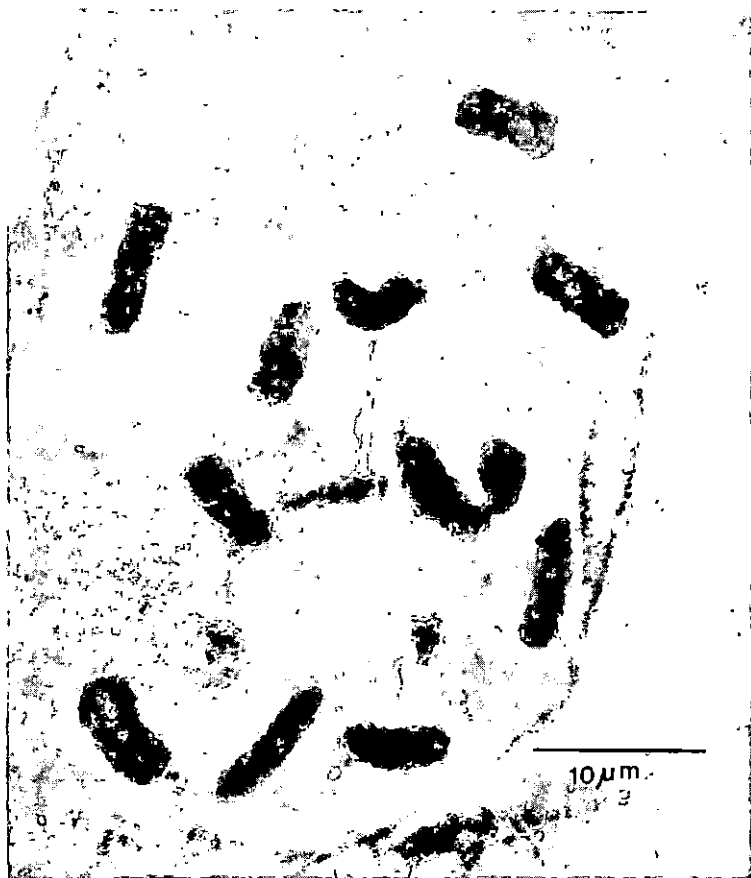
Sl. — Fig. 7. Kromosomi u endospermu hibridnog stabla nisy 410 — Chromosomes in the endosperm of the hybrid tree nisy 410.



Sl. — Fig. 8. Dvije stanice stabla ni 47 s najduljim (a) i najkraćim (b) kromosomima  
— Two cells of the tree ni 47 with longest (a) and shortest (b) chromosomes.

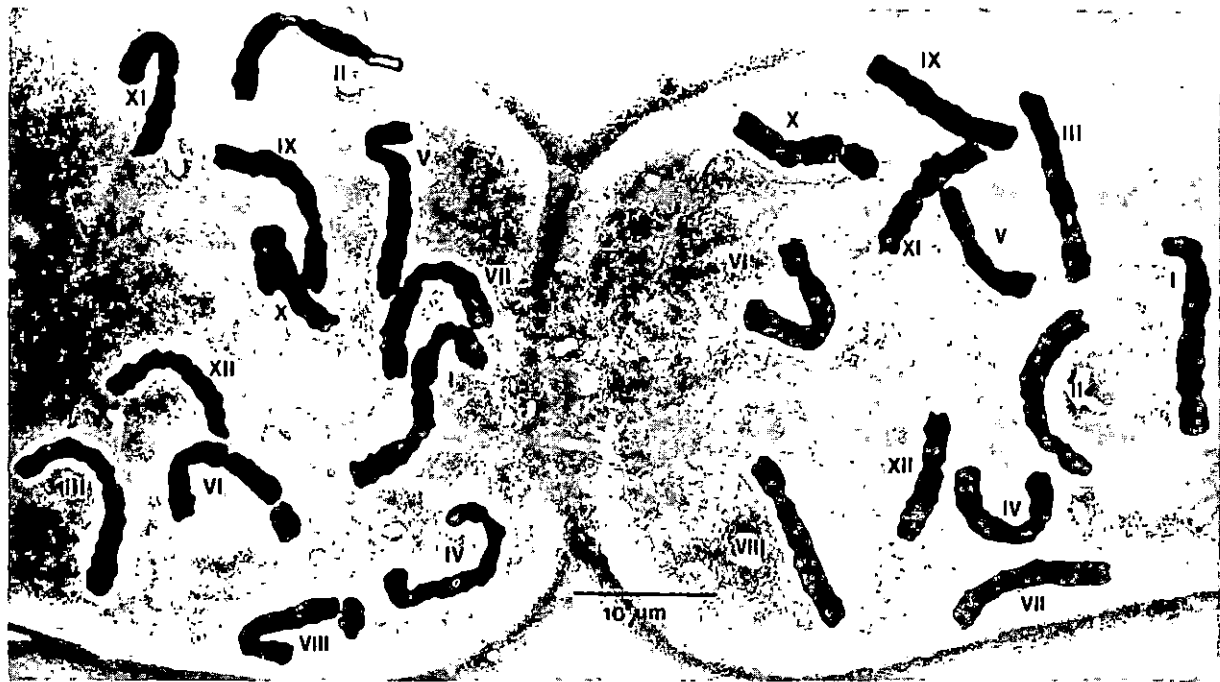


Sl. — Fig. 9. Dvije stanice stabla nisy 410 s najduljim (a) i najkraćim (b) kromosomima — Two cells of the tree nisy 410 with longest (a) and shortest (b) chromosomes.



Sl. — Fig. 10. Stanica endosperma stabla sy 77 s ekstremno kratkim kromosomima  
— Endospermal cell of the tree sy 77 with extremely short chromosomes.





Sl. — Fig. 11. Dvije stanice endosperma hibridnog stabla nisy 410 koje vjerojatno potiču od iste stanice majke. Razlikuju se u apsolutnim duljinama kromosoma. — Two endospermal cells of the hybrid tree nisy 410 most probably originating from the same mother cell, but differing in absolute chromosome lengths.

Tab. 8. Razlike u duljinama dvaju susjednih kromosoma — Approximate differences in the lengths of adjacent chromosomes.

ni 47
1- 7 -11-5-111-4-1V-3-V-3-VI-2-VII-3-VIII-4-IX- 7 - X-7-XI-14-XII
ni 221
1-10-11-4-111-3-1V-2-V-2-VI-3-VII-3-VIII-4-IX- 4 - X-7-XI-13-XII
ni 366
1- 6 -11-4-111-4-1V-3-V-3-VI-3-VII-3-VIII-4-IX- 5 - X-8-XI-12-XII
SY 367
1- 7 -11-4-111-2-1V-3-V-3-VI-2-VII-4-VIII-3-IX-10- X-6-XI- 9 -XII
sy 77
1- 8 -11-5-111-3-1V-2-V-3-VI-2-VII-3-VIII-4-IX- 8 - X-7-XI- 9 -XII
de V 116
1- 6 -11-7-111-4-1V-2-V-4-VI-3-VII-3-VIII-4-IX- 7 - X-6-XI-12-XII
nisy 410
1- 8 -11-6-111-4-1V-2-V-4-VI-3-VII-3-VIII-4-IX- 6 - X-6-XI-11-XII

Veće razlike među susjednim najvećim i susjednim najmanjim kromosomima mogle bi biti karakteristika kariotipova ovih triju vrsta borova, jer je ovo svojstvo vezano za tzv. rizik zamjene u redosljedju kromosoma (o čemu ću diskutirati nešto kasnije) kojem riziku upravo ovi kromosomi najmanje podliježu. Citirani autori u tabeli 7 su također dobili slične vrijednosti razlika susjednih kromosoma. Izuzetak su relativne duljine kromosoma običnog bora u radu Pravdin-a (1964) gdje su prikazane najveće razlike između susjednih kromosoma VI i VII te VIII i IX. Bilo bi zanimljivo, stoga, istražiti dobivene razlike između susjednih kromosoma u kariotipovima svih vrsta borova, tj. na temelju do sada objavljenih kariotipova preračunati objavljene podatke s idiograma ili iz apsolutnih vrijednosti u relativne i ustanoviti da li se sistematske grupe borova razlikuju u ovoj karakteristici.

Numerički kariotip svakog od istraživanih stabala složio sam u tabele 5, 9, 10, 11, 12, 13 i 14. U svakoj tabeli su izlistani podaci izmjera obrađeni elektroničkim računalom. Podaci predstavljaju relativne ukupne duljine kromosoma, relativne duljine kratkih krakova (S), relativne duljine dugih krakova (L), vrijednosti omjera krakova (S/L) i centromerne indekse  $(S/S + L) \cdot 100$ , te za svaku od ovih morfoloških karakteristika za svaki kromosom odgovarajuće statističke parametre: standardne devijacije (s), greške aritmetičke sredine ( $s_{\bar{x}}$ ) i koeficijente varijabilnosti (C. V.). U gornjem dijelu tabele, između srednjih vrijednosti dvaju susjednih kromosoma upisane su njihove razlike.

Pored relativnih duljina kromosoma i krakova koji će poslužiti za komparativnu analizu kariotipova, uz svaku morfološku karakteristiku kariotipa osobitu analitičku vrijednost nam pruža koeficijent varijabil-

Tab. 9. Numerički kariotip stabla ni 221. Relativne ukupne duljine kromosoma, razlike između susjednih kromosoma i mjere rasipanja — Numerical karyotype of the tree ni 221. Total relative chromosome lengths, differences between adjacent chromosomes and corresponding statistical parameters.

BROJ KROMOSOMA CHROMOSOME NUMBER	$d$	$\bar{x}$	$s$	$\bar{s}$	C.V.†
1	125.2443		8.7063	2.0521	6.9515
	9.79				
2	115.4553		3.5769	0.8431	3.0981
	4.40				
3	111.0592		2.9371	0.6923	2.6447
	3.26				
4	107.7982		2.5757	0.6071	2.3894
	2.40				
5	105.3936		2.1727	0.5121	2.0615
	2.16				
6	103.2336		2.2567	0.5319	2.1860
	3.29				
7	99.9444		2.8734	0.6773	2.8750
	2.57				
8	97.3790		2.8878	0.6807	2.9655
	3.56				
9	93.8235		3.3913	0.7993	3.6146
	4.44				
10	89.3849		4.8858	1.1516	5.4661
	7.47				
11	81.9157		4.2435	1.0002	5.1803
	12.55				
12	69.3685		6.1697	1.4542	8.8942
		KRATKI KRAKOVI (S)		SHORT ARM	
1	58.9522	4.2711	1.0067	7.2451	
2	54.5827	2.3995	0.5656	4.3962	
3	52.7324	2.0617	0.4860	3.9098	
4	51.0318	2.2073	0.5203	4.3254	
5	49.4393	2.6331	0.6206	5.3259	
6	49.7743	1.5669	0.3693	3.1480	
7	47.2609	2.4837	0.5854	5.2552	
8	46.0523	2.2912	0.5400	4.9752	
9	43.4492	2.9955	0.7060	6.8942	
10	40.0198	4.2303	0.9971	10.5705	
11	34.7726	2.6652	0.6282	7.6647	
12	26.5257	3.6601	0.8627	13.7964	
		DUGI KRAKOVI (L)		LONG ARM	
1	66.2921	5.7948	1.3658	8.7413	
2	60.8726	3.2820	0.7736	5.3916	
3	58.3268	2.5520	0.6015	4.3754	
4	56.7664	2.4429	0.5758	4.3034	
5	55.9543	3.1223	0.7339	5.5801	
6	53.4593	1.8841	0.4441	3.5244	
7	52.6834	1.6394	0.3864	3.1117	
8	51.3266	3.0010	0.7073	5.8469	
9	50.3744	3.0674	0.7230	6.0892	
10	49.3650	3.9458	0.9300	7.9931	
11	47.1431	3.4234	0.8069	7.2617	
12	42.6427	4.4247	1.0429	10.3277	
		OMJERI KRAKOVA (S/L)		ARM RATIO	
1	0.8930	0.0694	0.0164	7.7729	
2	0.8995	0.0676	0.0159	7.5153	
3	0.9060	0.0571	0.0135	6.3019	
4	0.9011	0.0622	0.0147	6.9020	
5	0.8879	0.0888	0.0209	10.0055	
6	0.9323	0.0466	0.0110	5.0005	
7	0.8980	0.0563	0.0133	6.2739	
8	0.9011	0.0806	0.0190	8.9424	
9	0.8668	0.0908	0.0214	10.4769	
10	0.8170	0.1175	0.0277	14.3851	
11	0.7413	0.0765	0.0180	10.3183	
12	0.6239	0.0963	0.0227	15.4399	
		CENTROMERNI INDEKSI (S/S+L) · 100		CENTROMERE INDEX	
1	47.1031	2.0564	0.4847	4.3657	
2	47.2913	1.9230	0.4532	4.0662	
3	47.4880	1.5827	0.3730	3.3338	
4	47.3435	1.7812	0.4198	3.7622	
5	46.9200	2.5274	0.5957	5.3867	
6	48.2191	1.2670	0.2986	2.6276	
7	47.2683	1.6066	0.3787	3.3989	
8	47.3071	3.2718	0.5355	4.8022	
9	46.2076	2.6903	0.6341	5.6097	
10	44.7413	3.6778	0.8669	8.2202	
11	42.4641	2.5739	0.6064	6.0590	
12	38.2153	3.6306	0.8557	9.5003	

Tab. 10. Numerički kariotip stabla ni 366 — Numerical karyotype of the tree ni 366.

BROJ KROMOSOMA CHROMOSOME NUMBER	$\bar{x}$	s	$\frac{s}{\bar{x}}$	C.V. %
1	122.6720 5.56	7.1216	1.6706	5.8054
2	117.1081 4.00	5.8175	1.3712	4.9677
3	113.1056 3.89	3.4867	0.8218	3.0827
4	109.2197 3.08	2.6725	0.6299	2.4469
5	106.1374 2.70	1.4226	0.3353	1.3404
6	103.4410 3.17	2.4393	0.5750	2.3582
7	100.2710 2.90	3.4437	0.8117	3.4344
8	97.3752 3.98	3.5843	0.8448	3.6809
9	93.3999 5.13	3.9222	0.9245	4.1993
10	89.2671 8.00	4.2647	1.0052	4.8316
11	80.2708 11.54	6.1347	1.4460	7.6425
12	68.7323	7.3056	1.7220	10.6291
KRATKI KRAKOVI (S) SHORT ARM				
1	57.6111	4.9856	1.1751	8.6539
2	55.6228	3.7551	0.8851	6.7511
3	53.2503	2.8283	0.6666	5.3134
4	51.3768	3.2058	0.7556	6.2393
5	49.8802	2.2481	0.5299	4.5070
6	49.0606	2.3919	0.5638	4.8753
7	46.4915	2.9268	0.6898	6.2953
8	44.8001	3.1712	0.7475	7.0786
9	44.1299	2.2302	0.5257	5.0537
10	39.6155	3.3318	0.7853	8.4104
11	32.9965	4.9774	1.1732	15.0847
12	25.8497	4.6812	1.1034	18.1091
DUGI KRAKOVI (L) LONG ARM				
1	65.0609	4.6175	1.0894	7.0972
2	61.4854	3.7189	0.8765	6.0484
3	59.8753	2.9663	0.6992	4.9541
4	57.8409	3.7518	0.8843	6.4864
5	56.2572	2.3284	0.5488	4.1389
6	54.3804	2.6552	0.6258	4.8827
7	53.7794	3.6106	0.8510	6.7138
8	52.5751	2.7912	0.6579	5.3090
9	49.2701	3.7293	0.8790	7.5691
10	48.6516	4.2289	0.9968	8.6923
11	47.2743	4.9693	1.1713	10.5116
12	42.8825	4.3931	1.0355	10.2446
OMJERI KRAKOVA (S/L) ARM RATIO				
1	0.8889	0.9884	0.0208	9.9494
2	0.9071	0.0715	0.0168	7.8804
3	0.8917	0.0726	0.0171	8.1392
4	0.8939	0.0986	0.0232	11.0268
5	0.8892	0.0710	0.0167	7.9843
6	0.9052	0.0745	0.0176	8.2301
7	0.8694	0.0921	0.0217	10.5932
8	0.8553	0.0845	0.0199	9.8847
9	0.9010	0.0857	0.0202	9.5075
10	0.8221	0.1122	0.0264	13.6459
11	0.7081	0.1441	0.0340	20.3443
12	0.6056	0.1057	0.0249	17.4552
CENTROMERNI INDEKSI (S/S+L) · 100 CENTROMERE INDEX				
1	46.9441	2.5843	0.6091	5.5050
2	47.4920	2.0096	0.4737	4.2315
3	47.0650	2.0634	0.4863	4.3843
4	47.0553	2.9311	0.6909	6.2390
5	46.9967	2.0056	0.4798	4.3313
6	47.4350	2.1193	0.4995	4.4679
7	46.2312	2.7143	0.6398	5.8522
8	45.6913	2.5169	0.5932	5.4727
9	47.2921	2.4502	0.5775	5.1810
10	44.9132	2.5186	0.8294	7.8347
11	41.0641	4.9298	1.1620	12.0051
12	37.4668	4.0368	0.9515	10.7744

Tab. 11. Numerički kariotip stabla sy 367 — Numerical karyotype of the tree sy 367.

BRJ KROMOSOMA CHROMOSOME NUMBER	$\bar{x}$	$s$	$s_x$	C.V. %
1	122.6350 7.03	4.8088	1.1335	3.9206
2	115.6251 4.08	4.1703	0.9830	3.6068
3	111.5443 2.37	3.5362	0.8335	3.1702
4	109.1750 2.61	2.5285	0.5960	2.3160
5	106.5622 2.55	1.7895	0.4218	1.6793
6	104.0136 2.26	1.9873	0.4684	1.9106
7	101.7514 3.72	2.7167	0.6403	2.6700
8	98.0293 2.59	4.4089	1.0392	4.4975
9	95.4430 10.19	3.9390	0.9284	4.1271
10	85.2558 5.69	4.1533	0.9789	4.8715
11	79.5638 9.18	4.4689	1.0533	5.6168
12	70.3816	5.1295	1.2088	7.2867
KRATKI KRAKOVI (S) SHORT ARM				
1	58.0804	3.2891	0.7753	5.6630
2	54.4050	3.0102	0.7095	5.5329
3	53.1191	2.7083	0.6384	5.0986
4	51.6387	2.5272	0.5957	4.8940
5	50.2923	2.6650	0.6282	5.2991
6	49.0960	3.5400	0.8344	7.2103
7	47.2533	2.7256	0.6424	5.7681
8	45.4876	3.0949	0.7295	6.8038
9	45.2610	2.8125	0.6629	6.2139
10	39.4508	3.1948	0.7530	8.0982
11	33.1627	3.5723	0.8420	10.7720
12	29.7012	3.0947	0.7294	10.4193
DUGI KRAKOVI (L) LONG ARM				
1	64.5746	3.5916	0.8466	5.5628
2	61.2202	2.8285	0.6667	4.6202
3	58.4252	3.2399	0.7637	5.5454
4	57.5362	2.5715	0.6061	4.4693
5	56.2700	2.4810	0.5848	4.4092
6	54.9176	3.4952	0.8238	6.3644
7	54.4980	3.2005	0.7544	5.8727
8	52.5417	4.3612	1.0279	8.3004
9	50.1820	2.5021	0.5897	4.9860
10	45.8050	3.2334	0.7621	7.0591
11	46.4010	3.4153	0.8050	7.3605
12	40.6804	3.7800	0.8909	9.2919
OMJERI KRAKOVA (S/L) ARM RATIO				
1	0.9021	0.0710	0.0167	7.8674
2	0.8904	0.0640	0.0151	7.1644
3	0.9124	0.0746	0.0176	8.1738
4	0.9001	0.0718	0.0169	7.9788
5	0.8968	0.0787	0.0185	8.7722
6	0.9002	0.1085	0.0256	12.0479
7	0.8712	0.0836	0.0197	9.5927
8	0.8727	0.1036	0.0244	11.8728
9	0.9039	0.0692	0.0163	7.6565
10	0.8655	0.0918	0.0216	10.6044
11	0.7189	0.0964	0.0227	13.4082
12	0.7354	0.0960	0.0226	13.0550
CENTROMERNI INDEKSI (S/S+L) · 100 CENTROMERE INDEX				
1	47.3534	2.0042	0.4724	4.2323
2	47.0447	1.8047	0.4354	3.8361
3	47.6303	2.1500	0.5068	4.5139
4	47.2986	2.0329	0.4792	4.2981
5	47.1907	2.2644	0.5337	4.7984
6	47.1995	3.2501	0.7661	6.8860
7	46.4510	2.5573	0.6028	5.5055
8	46.4417	3.0705	0.7257	6.6115
9	47.4079	1.9568	0.4612	4.1276
10	46.2662	2.7663	0.6520	5.9791
11	41.6464	3.3606	0.7921	8.0693
12	42.2108	3.1968	0.7535	7.5735

Tab. 12. Numerički kariotip stabla sy 77 — Numerical karyotype of the tree sy 77.

BROJ KROMOSOMA CHROMOSOME NUMBER	$\bar{x}$ d	$s$	$\sigma_R$	C.V.%
1	123.9739 7.89	8.3164	1.9602	6.7082
2	116.0796 5.43	4.4278	1.0436	3.8145
3	110.6449 2.57	2.9153	0.6871	2.6348
4	108.0727 2.15	2.6048	0.6140	2.4102
5	105.9224 2.63	2.7627	0.6512	2.6082
6	103.2879 2.32	2.4248	0.5715	2.3476
7	101.0662 2.66	3.4137	0.8046	3.3777
8	98.4110 3.92	3.3890	0.7988	3.4427
9	94.4889 7.58	4.1208	0.9713	4.3611
10	86.9059 6.84	3.9162	0.9231	4.5062
11	80.0680 8.99	4.4165	1.0410	5.5159
12	71.0785	6.0041	1.4152	8.4472
KRATKI KRAKOVI (S) SHORT ARM				
1	58.3464	4.8334	1.1392	8.2840
2	55.1547	3.1698	0.7471	5.7471
3	52.1101	2.9462	0.6944	5.6539
4	51.4108	2.5617	0.6038	4.9829
5	49.5821	2.4539	0.5784	4.9492
6	48.9807	2.0823	0.4908	4.2514
7	47.1899	2.3421	0.5520	4.9631
8	46.3743	3.0312	0.7145	6.5363
9	44.2933	3.9882	0.9400	9.0042
10	40.7389	3.4555	0.8145	8.4820
11	34.1637	2.7094	0.6386	7.9306
12	28.0366	3.2589	0.7681	11.6237
DUGI KRAKOVI (L) LONG ARM				
1	65.6275	6.0812	1.4334	9.2663
2	60.9249	3.6242	0.8542	5.9487
3	58.5348	2.1413	0.5047	3.6581
4	56.6619	2.5687	0.6054	4.5333
5	56.3402	2.9886	0.7044	5.3046
6	54.3072	2.6131	0.6159	4.8117
7	53.8763	3.5977	0.8480	6.6777
8	52.0367	2.4991	0.5890	4.8026
9	50.1956	3.3485	0.7892	6.6709
10	46.1670	2.8716	0.6768	6.2199
11	45.9044	2.9770	0.7017	6.4852
12	43.0419	4.1301	0.9735	9.5954
OMJERI KRAKOVA (S/L) ARM RATIO				
1	0.8952	0.0973	0.0229	10.8632
2	0.9087	0.0785	0.0185	8.6413
3	0.8920	0.0683	0.0161	7.6518
4	0.9100	0.0734	0.0172	8.0634
5	0.8835	0.0784	0.0185	8.8716
6	0.9048	0.0704	0.0166	7.7761
7	0.8803	0.0788	0.0186	8.9565
8	0.8939	0.0809	0.0191	9.0480
9	0.8878	0.1104	0.0260	12.4319
10	0.8866	0.0980	0.0231	11.0530
11	0.7464	0.0677	0.0160	9.0748
12	0.6551	0.0832	0.0196	12.7025
CENTROMERNI INDEKSI (S/S+L) · 100 CENTROMERE INDEX				
1	47.0963	2.8976	0.6830	6.1524
2	47.5233	2.2220	0.5237	4.6756
3	47.0791	1.9541	0.4606	4.1507
4	47.5690	2.0633	0.4863	4.3374
5	46.8201	2.2369	0.5272	4.7776
6	47.4317	1.9528	0.4603	4.1171
7	46.7226	2.3647	0.5574	5.0612
8	47.1047	2.3174	0.5462	4.9196
9	46.8403	3.4057	0.8027	7.2710
10	46.8492	2.9586	0.6974	6.3152
11	42.6569	2.2102	0.5210	5.1814
12	39.4371	3.0155	0.7108	7.6463

Tab. 13. Numerički kariotip stabla de V 116 — Numerical karyotype of the tree de V 116

	$\bar{x}$	$s$	$\frac{s}{\bar{x}}$	C.V. %
1	126.8525	8.8232	2.0797	6.9555
	6.36			
2	120.4959	7.1763	1.6913	5.9556
	7.31			
3	113.1867	3.6355	0.8569	3.2120
	4.27			
4	108.9148	3.2046	0.7553	2.9423
	1.96			
5	106.9522	2.8154	0.6636	2.6324
	4.16			
6	102.7963	3.6364	0.8571	3.5375
	3.12			
7	99.6717	4.2509	1.0019	4.2649
	3.26			
8	96.4128	4.3090	1.0156	4.4693
	4.32			
9	92.0929	4.2474	1.0011	4.6121
	6.74			
10	85.3535	4.1835	0.9861	4.9014
	5.72			
11	79.6374	4.5255	1.0667	5.6826
	12.00			
12	67.6334	6.3702	1.5015	9.4187
	KRATKI KRAKOVI (S) SHORT ARM			
1	59.1924	3.9295	0.9262	6.6385
2	57.2692	3.4353	0.8097	5.9984
3	53.4232	2.8638	0.6750	5.3606
4	51.5279	2.7868	0.6568	5.4083
5	50.7693	1.8076	0.4261	3.5604
6	48.1169	2.5246	0.5950	5.2467
7	47.2142	2.9409	0.6932	6.2289
8	45.1135	2.7161	0.6402	6.0206
9	43.1586	2.6926	0.6346	6.2388
10	38.6120	3.0023	0.7076	7.7756
11	33.4598	3.0955	0.7296	8.7297
12	28.7000	4.0552	0.9558	14.1296
	DUGI KRAKOVI (L) LONG ARM			
1	67.6601	6.5128	1.5351	9.6258
2	63.2267	4.6886	1.1051	7.4155
3	59.7634	3.4287	0.8082	5.7372
4	57.3870	2.5841	0.6091	4.5030
5	56.1829	2.6028	0.6135	4.6328
6	54.6793	2.7717	0.6533	5.0690
7	52.4525	2.6598	0.6269	5.0704
8	51.2993	3.0151	0.7107	5.8775
9	48.9343	3.0688	0.7233	6.2713
10	46.7415	3.6012	0.8488	7.7044
11	44.1776	3.6498	0.8603	8.2616
12	38.9334	3.1563	0.7439	8.1068
	OHLJERI KRAKOVA (S/L) ARM RATIO			
1	0.8804	0.0815	0.0192	9.2581
2	0.9082	0.0577	0.0136	6.3494
3	0.8976	0.0811	0.0191	9.0393
4	0.9003	0.0713	0.0168	7.9154
5	0.9057	0.0574	0.0135	6.3334
6	0.8823	0.0657	0.0155	7.4508
7	0.9018	0.0660	0.0156	7.3201
8	0.8818	0.0672	0.0158	7.6171
9	0.8850	0.0733	0.0173	8.2834
10	0.8315	0.0963	0.0227	11.5815
11	0.8085	0.1033	0.0244	12.7770
12	0.7374	0.0841	0.0198	11.4008
	CENTROMERNI INDEKSI (S/S+L) · 100 CENTROMERE INDEX			
1	46.7237	2.3289	0.5489	4.9845
2	47.5492	1.5884	0.3744	3.3405
3	47.2093	2.2761	0.5365	4.8214
4	47.3043	2.0133	0.4745	4.2561
5	47.4814	1.6014	0.3775	3.3727
6	46.8105	1.8707	0.4409	3.9963
7	47.3565	1.8527	0.4367	3.9133
8	46.7948	1.9316	0.4553	4.1277
9	46.8709	2.1420	0.5049	4.5700
10	45.2533	2.9733	0.7008	6.5704
11	44.5372	3.1505	0.7426	7.0738
12	42.3171	2.7579	0.6501	6.5173

Tab. 14. Numerički kariotip stabla nisy 410 — Numerical karyotype of the tree nisy 410.

BROJ KROMOSOMA CHROMOSOME NUMBER	d	x	s	$s_x$	C.V. %
1	125.2576	7.9706	1.8787	6.3634	
2	8.94 116.3189	5.1581	1.2158	4.4344	
3	4.38 111.9406	3.6239	0.6542	3.2373	
4	3.54 108.4029	3.0494	0.7187	2.8130	
5	2.94 105.4667	2.8412	0.6697	2.6940	
6	3.21 102.2609	2.5134	0.5924	2.4578	
7	3.23 99.0319	1.9966	0.4706	2.0161	
8	2.32 96.7123	3.0631	0.7220	3.1672	
9	3.21 93.5043	3.1809	0.7516	3.4104	
10	5.67 87.8332	4.9788	1.1735	5.6685	
11	6.36 81.4711	5.3872	1.2698	6.6124	
12	9.67 71.7997	6.0141	1.4175	8.3762	
KRATKI KRAKOVI (S) SHORT ARM					
1	59.8713	4.2414	0.9997	7.0843	
2	55.3004	2.2567	0.5319	4.0800	
3	52.5129	2.5956	0.6118	4.9427	
4	51.5995	2.9379	0.6925	5.6936	
5	50.9304	1.5632	0.3684	3.0692	
6	49.1946	1.8676	0.4402	3.7964	
7	46.6747	3.2095	0.7565	6.8763	
8	45.2660	2.9007	0.6837	6.4080	
9	43.9166	2.1576	0.5085	4.9129	
10	40.7885	4.1425	0.9764	10.1560	
11	38.0515	2.9333	0.6914	7.7087	
12	28.4405	4.6357	1.0926	16.2995	
DUGI KRAKOVI (L) LONG ARM					
1	65.3864	4.7279	1.1144	7.2308	
2	61.0184	4.5704	1.0772	7.4902	
3	59.4276	4.2048	0.9811	7.0755	
4	56.8033	2.7036	0.6972	4.7596	
5	54.5363	1.9652	0.4632	3.6034	
6	52.0663	2.3933	0.5641	4.5100	
7	52.3573	3.2906	0.7756	6.2849	
8	51.4463	3.2835	0.7739	6.3824	
9	49.5877	2.4408	0.5753	4.9223	
10	47.0447	1.7507	0.4126	3.7213	
11	43.4196	3.8840	0.9155	8.9452	
12	43.3592	4.3781	1.0319	10.0973	
OMJERI KRAKOVA (S/L) ARM RATIO					
1	0.9174	0.0560	0.0132	6.0991	
2	0.9105	0.0702	0.0165	7.7084	
3	0.8869	0.0865	0.0204	9.7341	
4	0.9112	0.0776	0.0189	8.5201	
5	0.9347	0.0373	0.0088	3.9873	
6	0.9292	0.0605	0.0143	6.3080	
7	0.8972	0.1036	0.0244	11.5425	
8	0.8852	0.0999	0.0235	11.2812	
9	0.8877	0.0619	0.0146	6.9781	
10	0.8672	0.0866	0.0204	9.9892	
11	0.8615	0.0867	0.0204	9.8323	
12	0.6631	0.1342	0.0316	20.2351	
CENTROMERNI INDEKSI (S/S+L) · 100 CENTROMERE INDEX					
1	47.8022	1.5785	0.3721	3.3022	
2	47.5895	1.9940	0.4700	4.1900	
3	46.9488	2.5721	0.6063	5.4786	
4	47.5927	2.2155	0.5222	4.6552	
5	48.2958	1.0057	0.2371	2.0825	
6	48.1160	1.6963	0.3998	3.5255	
7	47.1331	3.1032	0.7314	6.5840	
8	46.8129	2.8333	0.6678	6.0524	
9	46.9707	1.7960	0.4233	3.8237	
10	46.3264	2.6687	0.6290	5.7607	
11	46.7389	2.5538	0.6019	5.4640	
12	39.5059	4.8335	1.1393	12.2348	



nosti (C. V.). Za svih sedam stabala iz tabela 5, 9, 10, 11, 12, 13 i 14, možemo vidjeti da su koeficijenti varijabilnosti najveći za relativne ukupne duljine kromosoma XII. Za kromosom I je manji, ali u pravilu veći od C. V. vrijednosti kromosoma II. Kromosomi X i XI također imaju u pravilu veće koeficijente varijabilnosti od kromosoma III do uključivo kromosoma IX. Koeficijent varijabilnosti je mjera rasipanja koja prikazuje variranje neke mjerene dužine (u ovom slučaju kromosoma). Stoga iz dobivenih rezultata zaključujem da kromosomi II do IX imaju male koeficijente varijabilnosti, tj. malo variranje duljine u odnosu na varijabilnost duljine koju pokazuju kromosomi I, X, XI i XII. Zanimat nas uzrok tog pojavi koja očito može biti prirodna, dakle da se stvarno radi o maloj varijabilnosti duljina kromosoma II do IX ili može biti rezultat metodike istraživanja. Recimo odmah da je ovo drugo tumačenje vjerojatnije iz slijedećih razloga:

Uobičajeni način istraživanja kariotipa je da se kromosomi svrstaju u niz od I do XII, na osnovi duljine koju imaju na fotografiji. Ovakova metoda ne uzima potpuno u obzir stadij diobe stanice koja se analizira. Pojedine stanice mogu biti npr. u stadiju prometafaze (što za endospermalno tkivo preporuča P e d e r i c k 1967), najčešće se analizira stadij metafaze, a mogu se analizirati i stanice u anafazi (B o r z a n 1977a). Smatra se, da se izračunavanjem relativnih duljina kromosoma izbjegava varijabilnost u duljini pojedinog kromosoma uvjetovana različitim stadijima diobe analiziranih stanica ili različitim razvojnim stadijima tkiva, te da je stoga na taj način moguće uspoređivati različite stanice. Međutim, jedna od najvećih poteškoća u analizi kariotipa borova je zamjena u redoslijedu kromosoma i zamjena krakova, do koje dolazi uslijed variranja u duljini svakog pojedinog kromosoma (M a t e r n & S i m a k 1968, 1969). Stoga je identifikacija pojedinih kromosoma koji su podjednake duljine znatno otežana (u ovom radu to su kromosomi II do IX), naročito ako su im na fotografiji izmjerene potpuno iste duljine, jednako dugački krakovi i ako nemaju sekundarnih konstrikcija. Razlozi zbog čega se u svim istraživanim stanicama jednog stabla (ili vrste) ne pojavljuju npr. uvijek ista dva kromosoma jednake duljine, jednakih krakova i sa ili bez sekundarnih konstrikcija mogu biti:

1. Različiti tipovi jezgara (kromosoma), ovisno o dijelu tkiva ženskog gametofita iz kojega potiče analizirana stanica.
2. Diferencijalna aktivnost pojedinog kromosoma.
3. Različiti stadiji diobe analiziranih stanica.
4. Pojava »sljepljivanja« kromosoma (sticky pojava, strana 74), koju sam otkrio u endospermalnom tkivu borova (B o r z a n 1977a).
5. Vjerojatno i neki drugi razlozi kao npr. razlike u fiksiranju materijala i u tehnici izrade preparata, loš raspored kromosoma i drugo.

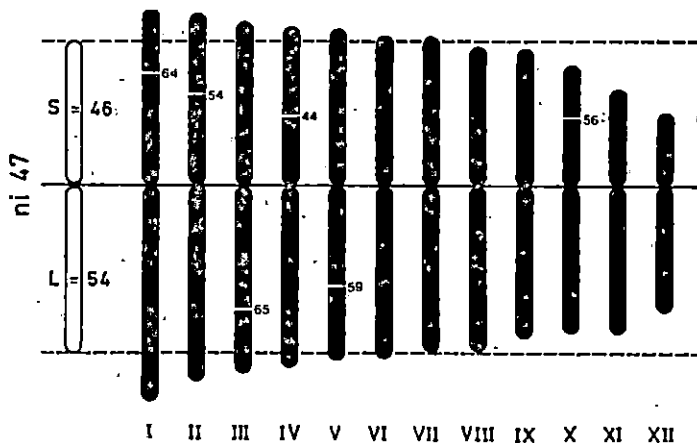
Analiza anafaznih stanica je pokazala (B o r z a n 1977a) da se i sestrinske kromatide mogu znatno razlikovati po duljini. Svi ovi razlozi

dovode neizbježno do zamjene u redosljedu kromosoma koji su slični po duljini, a kod metacentričkih kromosoma do zamjene krakova. Zato, ako se samo na osnovi izmjerene vrijednosti nekog kromosoma u svakoj stanici, uvijek npr. treća vrijednost u padajućem nizu od 12 izmjerenih duljina kromosoma smatra duljinom kromosoma III, varijabilnost tog kromosoma bit će vrlo mala. Varijabilnost će biti to manja što se susjedni kromosomi manje razlikuju po svojoj duljini. Stoga se može zaključiti da su i koeficijenti varijabilnosti kromosoma I, X, XI i XII u kariotipovima istraživanih stabala (tabele 5, 9, 10, 11, 12, 13, 14 i 16) najveći, jer je za te kromosome najmanji rizik od zamjene u redosljedu, budući se od susjednih kromosoma znatno razlikuju po svojim apsolutnim i relativnim duljinama.

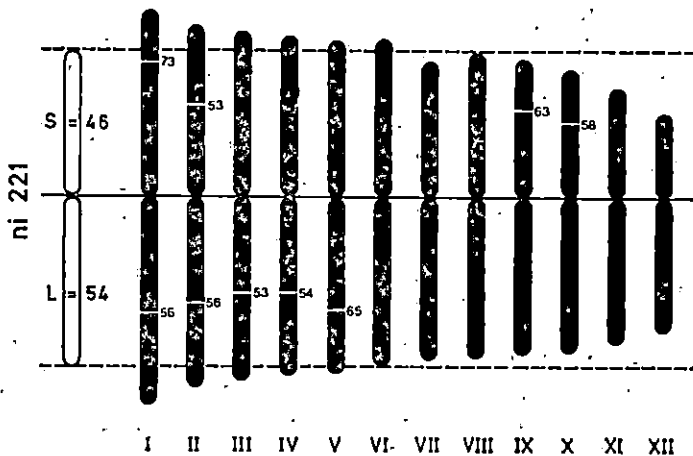
O vjerojatnosti rizika zamjene u redosljedu kromosoma, detaljno su istraživali Matern & Simak (1968, 1969) u *Larix decidua* Mill. i Chetty i sur. (1970) u *Pinus roxburghii* Sarg. Zaključak je njihovih istraživanja da se rizik zamjene u redosljedu ne može zanemariti ako je prosječna razlika manja od 11% prosječne duljine dva kromosoma ariša, odnosno da se rizik zamjene u redosljedu ne može zanemariti u *Pinus roxburghii* ako su prosječne razlike duljina dvaju kromosoma manje od 34% prosječne duljine dvaju kromosoma.

Rezultati njihovih istraživanja, osobito s *Pinus roxburghii* upućuju na neizbježan oprez u donošenju zaključaka prilikom komparativne analize kariotipa, osobito s kromosomima koji podliježu visokom riziku zamjene u redosljedu ili s krakovima metacentričkih kromosoma koji podliježu visokom riziku zamjene krakova. Možda su rezultati dobiveni u radu Chetty i sur. (1970) malo prestrogi, jer po njihovom kriteriju svi kromosomi istraživanih stabala u ovom radu bi podliježali riziku zamjene u redosljedu, jer npr. najveća razlika između dva susjedna kromosoma iznosi 13,88 (tabela 5) između kromosoma XI i XII. Kako je prosječna duljina tih dvaju kromosoma 72,08, to u ovom slučaju prosječna razlika duljine tih dvaju kromosoma iznosi 19,26% njihove prosječne duljine. Prema tome ako za istraživane borove u ovom radu vrijedi isti rizik zamjene u redosljedu kao i za *Pinus roxburghii*, tada i kromosomi XI i XII stabla »ni 47« (a ostali pogotovo) podliježu visokom riziku zamjene u redosljedu. Po koeficijentima varijabilnosti ovih kromosoma u svih 7 stabala vidimo, međutim, da je rizik zamjene u redosljedu ovih kromosoma međusobno ili s nekim drugim kromosomom ipak znatno manji nego za kromosome II do IX. Stoga će i zaključci komparativne analize ovih kromosoma za 7 istraživanih stabala biti vjerodostojniji nego za druge kromosome, tj. imati će veću težinu.

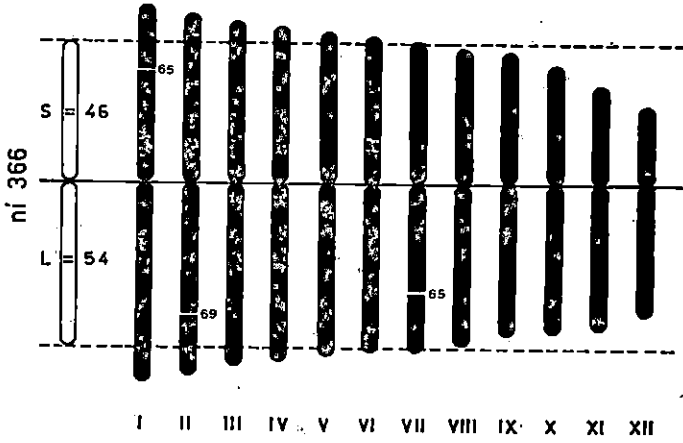
Uobičajeno je da se kariotipovi grafički prikazuju idiogramom. Stoga na slikama 12, 13, 14, 15, 16, 17 i 18 prikazujem pojedinačne idiograme stabala »ni 47«, »ni 221«, »ni 366«, »sy 367«, »sy 77«, »de V 116« i »nisy 410«. Iz već diskutiranih razloga, posebno radi relativno visokog rizika zamjene u redosljedu kromosoma i zamjene krakova, te posljedica koje te zamjene imaju na točnu registraciju i prikazivanje morfoloških karakteristika kromosoma (dimenzije krakova i položaji konstrikcija), idiograme možemo smatrati samo vjerojatnim prikazom kariotipa. Simak (1966) naziva takav idiogram »apparent idiogram«.



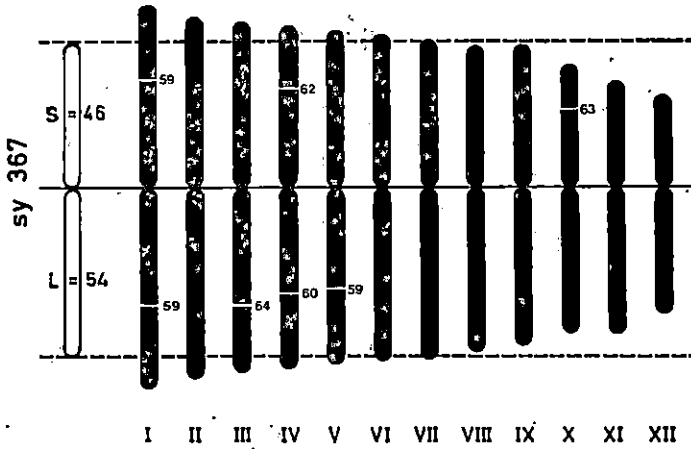
Sl. — Fig. 12. Idiogram stabla evropskog crnog bora ni 47, raden na osnovi analize 18 jezgara endospermalnog tkiva u razvoju. Način prikazivanja idiograma je kombiniran po Simaku (1962) i Pedericku (1967). Duljine kromosoma su prikazane relativno u odnosu na srednji kromosom ( $S + L = 100$ ), a konstrikcije su ucrtane na osnovi njihove udaljenosti od centromere prema ukupnoj duljini kraka na kojem se nalaze. Udaljenost konstrikcije od centromere izražena je u % — The idiogram of the European black pine tree ni 47, based on the analysis of 18 nuclei of endospermal tissue in development. The presentation of the idiogram is a combination of Simak's (1962) and Pederick's (1967) approach. The chromosome lengths are given relatively in terms of the mean chromosome ( $S + L = 100$ ), and the constrictions are drawn in on the basis of their distance from the centromere in terms of the total length of the arm on which they are located. The distance of constrictions from the centromere is given in %.



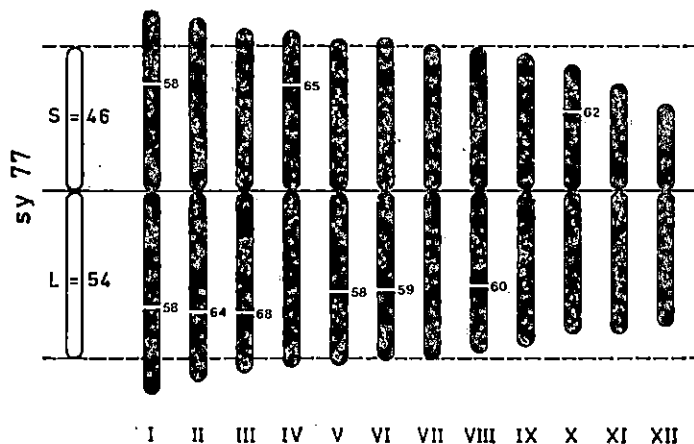
Sl. — Fig. 13. Idiogram stabla crnog bora ni 221. — The idiogram of the European black pine tree ni 221.



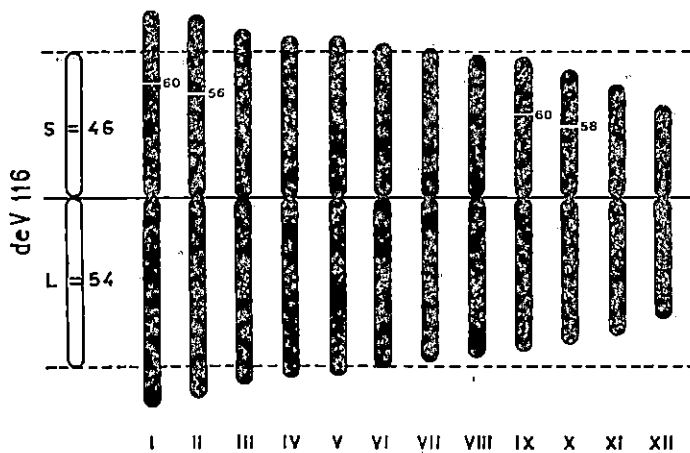
Sl. — Fig. 14. Idiogram stabla crnog bora ni 366 — The idiogram of the European black pine tree ni 366.



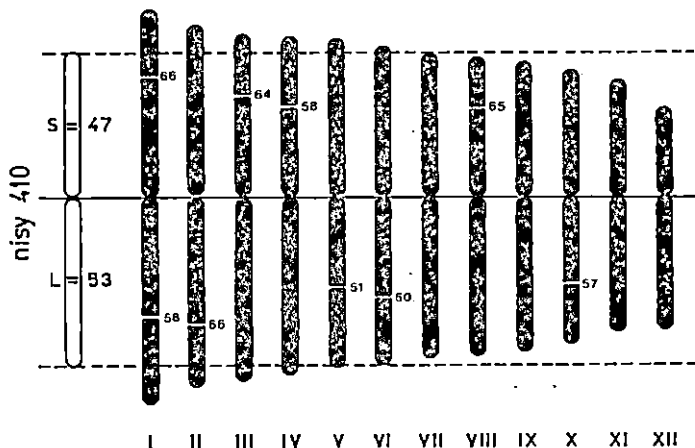
Sl. — Fig. 15. Idiogram stabla običnog bora sy 367 — The idiogram of the Scots pine tree sy 367.



Sl. — Fig. 16. Idiogram stabla običnog bora sy 77 — The idiogram of the Scots pine tree sy 77.



Sl. — Fig. 17. Idiogram ramete japanskog crvenog bora de V 116 — The idiogram of the Japanese red pine ramete de V 116.



Sl. — Fig. 18. Idiogram  $F_1$  hibrida *Pinus x nigrosylvis* Vid. (nisy 410), nastalog križanjem stabala ni 221 x sy 77 — The idiogram of the  $F_1$  hybrid nisy 410, offspring of the cross ni 221 x sy 77.

Već na prvi pogled iz idiograma se vidi da su dva posljednja kromosoma najmanja. Taj podatak objavljuje većina autora kao karakteristiku kariotipa crnog i običnog bora, premda neki (K o r m u t a k 1975) ističu tri posljednja kromosoma kao najmanje. Procjena da li su tri ili dva kromosoma najmanji, očito je rezultat nepostojanja kriterija kojih bi se istraživači dogovorno pridržavali, odnosno nepostojanje standardizacije u analizi kariotipa i u prezentiranju rezultata. Mjerenja duljina kromosoma pokazala su u ovom radu da se kromosom X po duljini redovito znatnije razlikuje od kromosoma IX, odnosno da je razlika među njima veća nego u grupi kromosoma II do IX. Vjerojatno činjenica da se kromosomi XI i XII u preparatu ili na fotografiji lako identificiraju kao najmanji (što nije tako čest slučaj s kromosomom X), preteže u odluci da se samo kromosomi XI i XII nazivaju »najmanji«.

#### *Položaj centromere — Centromere position*

Položaj centromere sam definirao prema Saylor-u (1961, 1964) omjerom krakova — kratki krak (S) : dugi krak (L). Centromera je u metacentričkoj regiji ako je vrijednost omjera krakova između 0,75 i 1,00, a submetacentrička je ako je taj omjer između 0,50 i 0,75. Prema klasifikaciji Levan-a i sur. (1964), svi bi kromosomi prezentirani u kariotipovima ovih stabala imali medijalno smještenu centromeru. Radi lako uočljive razlike u duljini krakova kromosoma XI i XII, smatram da je pogodnije se služiti klasifikacijom Saylor-a (1961, 1964).

Dva se posljednja kromosoma u crnog, običnog i japanskog crvenog bora ističu time što centromeru imaju u submetacentričnoj regiji, za razliku od prvih deset kromosoma koji centromeru imaju u metacen-

tričnoj regiji (Saylor 1964, 1983), te se u tom pogledu ponašaju kao i preostalih 16 istraživanih vrsta podsekcije *Sylvestres*. Drugi autori, međutim, navode različito ovu karakteristiku kariotipa. Sax & Sax (1933) su za crni i obični bor naveli da je samo jedan od 12 kromosoma heterobrahijalan. Natarajan i sur. (1961) su za svih 12 kromosoma običnog bora naveli da je centromera medijalno smještena. Kormutak (1975) je kromosome XI i XII crnog bora također svrstao među one sa submedijalnom centromerom, a kod običnog bora još i kromosom X. Martinović (1978) osim kromosoma XI i XII crnog i običnog bora, navodi da u crnog bora kromosom IV ima ekstremno submedijalno lociranu centromeru, premda to sa slike u radu nije evidentno. Tarnavski & Ciobanu (1965) za *Pinus nigra* var. *banatica* navode IV, V, IX, X i XI kromosom kao heterobrahijalan, a IV, XI i XII su takovi u *Pinus nigra* var. *austriaca*, a da ne navode kriterije za heterobrahijalnost. Prema idiogramu u radu Pederick-a (1970) kromosomi XI i XII crnog bora su također submetacentrični.

Čini se da bi se uz Saylor-ov (1961) kriterij definiranja položaja centromere za crni i obični bor moglo tvrditi da imaju submetacentrične kromosome XI i XII. Takav sam rezultat dobio za stabla »ni 47«, »ni 221«, »ni 366«, »sy 367« i »sy 77«, dok je kod ramete japanskog crvenog bora »de V 116« samo kromosom XII bio submetacentričan a kromosom XI samo djelomično (što ću prodiskutirati nešto kasnije). Za hibridno stablo »nisy 410« rezultati istraživanja pokazuju da je samo kromosom XII submetacentričan, što je neočekivani rezultat s obzirom da je hibridno stablo »nisy 410« dobiveno križanjem stabla crnog bora »ni 221« i običnog bora »sy 77«. Za tumačenje ovog rezultata morati ćemo imati na umu da svih 18 analiziranih stanica potiče iz jednog sjemenog zametka (jednog preparata).

Kako tumačiti tako različite rezultate osnovne morfološke karakteristike svakog kromosoma — položaja centromere? Odgovor je u ne-definiranim ili različito definiranim kriterijima položaja centromere (ovisno o pojedinim autorima), zatim u korišćenju različitog materijala za istraživanje (meristem korjenčića ili endosperm), u nedovoljno velikim uzorcima, u poteškoćama prilikom određivanja položaja centromere u preparatima bez primjene predtretiranja citostaticima i drugo.

Metacentričnost kromosoma XI ramete japanskog crvenog bora »de V 116« može se tumačiti time što je kariotip tog stabla odraz genotipa tog stabla (klona). Za pretpostaviti je radi moguće heterozigotnosti endosperma različitih sjemenih zametaka jednog stabla bora (naročito hibridnog), da rezultati mogu biti različiti, ovisno o tome da li se analiza kariotipa radi iz jednog ili više sjemenih zametaka. U analizi kariotipa neke vrste većina autora se koristi meristemom korjenčića, gdje je svaki preparat odraz genotipa te sjemenke, a ako se koristi endosperm, tada su istraživači češere (sjemene zametke) ubirali i fiksirali s nekoliko stabala, da bi bolje reprezentirali vrstu. Cilj ovog rada bio je ustanoviti kariotipove pojedinačnih stabala na kojima se provodi kontrolirana hibridizacija, te i s tog stanovišta treba pokušati protumačiti dobivene rezultate.

### *Heteromorfnost kromosoma XI — Heteromorphy of the chromosome XI*

Spomenuo sam poteškoće u određivanju položaja centromere u preparatima endospermalnog tkiva. Do tih je poteškoća dolazilo kada nije bilo moguće vidjeti na kromosomu mjesto pričvršćivanja niti diobenog vretena (mikrotubuli).

U tom je slučaju određeno vjerojatno mjesto položaja centromere na temelju savijenosti kromosoma u oblike U ili V, ili na temelju utajenja na mjestima za koje se pretpostavilo da pripadaju centromeri. Učestalost ovakvih diskontinuiranih utvrđivanja položaja centromere bila je ipak rijetka i u pravilu izbjegavao sam koristiti za analizu stanice u kojima nije bilo moguće sa sigurnošću odrediti položaj centromere na svim kromosomima. Međutim, moguće je, da je u pojedinim slučajevima centromera krivo određena. Razlog tome je ponekad bila i sticky pojava, koja je uzrokovala da je kromosom u nekom svom kraku bio izduženiji ili kontrahiraniji, te je uslijed toga moglo doći do izračunavanja ekstremno različitih omjera krakova (što definira položaj centromere određenog kromosoma), koji su znatno odstupali od prosječno dobivenih vrijednosti omjera krakova.

Za očekivati je bilo da su se takove poteškoće odražavale u slučajevima kada su od 18 stanica pojedini kromosomi rednog broja I do X imali omjere krakova koji su odgovarali submetacentričnima ili u slučaju kad kromosomi XI i XII nisu bili submetacentrični.

Da bih istražio frekvenciju takovih izvora grešaka u zaključivanju, izračunao sam ta odstupanja i prikazujem ih u tabeli 15, kao broj i postotak submetacentričnih kromosoma I do XII u uzorcima (stablama) od 18 analiziranih stanica i sveukupno. Da bih provjerio pretpostavku da se karakteristike pojedinačnog kariotipa (jednog stabla) »gube«, »utapaju« u masi rezultata (npr. u skupnom kariotipu vrste, populacije ili neke druge sistematske jedinice) prikazujem i numerički skupni kariotip za svih 7 istraživanih stabala (tabela 16), gdje vidimo da je kromosom XI submetacentričan, premda se njegova vrijednost nalazi upravo na granici za to svojstvo (omjer krakova iznosi 0,7535, a centromerni indeks 42,6917). Osim toga i iz tabele 15 vidimo da je od 126 istraženih stanica sedam stabala borova koji spadaju u sekciju *Sylvestres*, u 66 stanica (52,38%) kromosom XI bio submetacentričan.

Za rametu japanskog crvenog bora »de V 116« numerički kariotip (tabela 13) nam govori da je kromosom XI metacentričan (omjer krakova = 0,8085, a centromerni indeks = 44,5372), pa je takovo stanje uočeno i na idiogram (slika 17). Međutim iz tabele 15 je vidljivo da je čak u 9 stanica (50%) kromosom XI bio submetacentričan, što je prevelik broj da bi se mogao tumačiti greškom u radu ili krivom procjenom položaja centromere. Zaključio sam da je numerička metacentričnost kromosoma XI dobivena samo radi toga jer je izračunata vrijednost iz 9 stanica s metacentričnim kromosomom XI u statističkom smislu »prikрила« submetacentričnost kromosoma XI u preostalim 9 stanica. Ako pretpostavimo da sam (slučajno, po principu pismo/glava) za uzorak mogao imati u svih 18 stanica samo submetacentrični kromo-



Tab. 15. Broj i postotak submetacentričkih kromosoma u uzorcima od 18 stanica i sveukupno iz 126 stanica — Number and percent of submetacentric chromosomes in 18-cell-samples and out of a total of 126 cells.

Redni broj krom. Chromosome Serial Number	ni 47		ni 221		ni 366		sy 367		sy 77		de V 116		nisy 410		Ukupno-Total	
	n	%	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

Tab. 16. Sumarni numerički kariotip za 7 istraživanih stabala — Summarized numerical karyotype of 7 investigated trees.

BROJ KROMOSOMA CHROMOSOME NUMBER	$\bar{x}$	$s$	$\frac{s}{\bar{x}}$	C.V. %
1	124.5747	7.0142	0.0561	6.2727
2	117.0174	5.2187	0.0444	4.4598
3	112.0428	3.6000	0.0320	3.2131
4	108.6617	2.8874	0.0257	2.6572
5	106.1242	2.5426	0.0226	2.3959
6	103.2750	2.5696	0.0228	2.4881
7	100.4947	3.2111	0.0281	3.1953
8	97.5089	3.5794	0.0318	3.6708
9	93.7914	3.0307	0.0320	4.0229
10	87.0690	4.6839	0.0417	5.3795
11	80.2786	5.0379	0.0448	6.2755
12	89.1618	6.3645	0.0670	9.2013
KRATKI KRAKOVI (S) SHORT ARM				
1	58.3655	4.5644	0.0406	7.8204
2	55.3787	3.1081	0.0279	5.6124
3	52.8285	2.6554	0.0266	5.0265
4	51.3891	2.7121	0.0246	5.2777
5	50.1899	2.4514	0.0218	4.8843
6	48.9950	2.4425	0.0217	4.9853
7	47.1536	2.8257	0.0251	5.9926
8	45.4948	2.8816	0.0257	6.3398
9	44.0935	2.8020	0.0249	6.3546
10	39.8424	3.5267	0.0312	8.6516
11	34.2819	4.0191	0.0580	11.7226
12	27.4057	4.0574	0.0615	14.8048
DUGI KRAKOVI (L) LONG ARM				
1	66.2091	5.5745	0.0496	8.4196
2	61.6387	3.8080	0.0392	6.1779
3	59.2143	3.3742	0.0306	5.6984
4	57.2736	2.7452	0.0246	4.7932
5	55.9343	2.7146	0.0248	4.8533
6	54.2800	2.7965	0.0249	5.1557
7	53.3410	3.2779	0.0292	6.1432
8	52.0141	3.1445	0.0281	6.0455
9	49.6979	2.9674	0.0264	5.9708
10	47.2266	3.5369	0.0316	7.4764
11	45.5937	4.2055	0.0374	9.1436
12	41.7561	4.3222	0.0380	10.3510
OMJERI KRAKOVA (S/L) ARM RATIO				
1	0.8864	0.0859	0.0077	9.6953
2	0.9013	0.0683	0.0061	7.5806
3	0.8957	0.0747	0.0067	8.3412
4	0.9002	0.0744	0.0066	8.2674
5	0.9004	0.0739	0.0066	8.2050
6	0.9061	0.0764	0.0068	8.4283
7	0.8884	0.0851	0.0076	9.5753
8	0.8758	0.0862	0.0077	9.8063
9	0.8907	0.0794	0.0071	8.9093
10	0.8486	0.0987	0.0088	11.6322
11	0.7535	0.1216	0.0108	16.1417
12	0.6616	0.1055	0.0097	16.3951
CENTROMERNI INDEKSI (S/S+L)·100 CENTROMERE INDEX				
1	46.8725	2.5753	0.2294	5.4943
2	47.3368	1.9329	0.1722	4.0832
3	47.1641	2.1528	0.1918	4.5646
4	47.2918	2.1359	0.1909	4.5165
5	47.2980	2.1145	0.1884	4.4705
6	47.4485	2.2030	0.1963	4.6428
7	46.9313	2.5428	0.2266	5.4202
8	46.5606	2.4991	0.2236	5.3559
9	47.0119	2.3372	0.2082	4.9715
10	45.7458	3.0334	0.2702	6.6310
11	42.6917	4.0702	0.3626	9.5398
12	39.5640	3.9264	0.3498	9.9241

som XI (ili obratno), dolazim do zaključka da se u ovom slučaju može govoriti samo o vjerojatno (ne i sigurno) metacentričnom kromosomu XI ramete »de V 116«, te da su potrebna daljnja istraživanja za odgovor na pitanje:

Da li je moguće da se u pojedinim sjemenim zamecima nalazi jedan određeni kromosom kao submetacentrični, a u drugim sjemenim zamecima istog stabla kao metacentrični?

Potvrdu za opravdanost ovog pitanja našao sam upoređujući izračunate omjere krakova kromosoma XI iz svake pojedine stanice sa rednim brojem preparata (priпадnim sjemenim zametkom) i dobio sljedeći odgovor u tabeli 17:

S obzirom da je po jedan sjemeni zametak poslužio za izradu pojedinačnog preparata, sve stanice korišćene za izradu kariotipa bi u jednom preparatu morale imati ili submetacentrične ili samo metacentrične kromosome XI. Iz tabele 17 vidimo da je odgovor na postavljeno pitanje potvrđan, osim u slučaju stanica 8 i 9, koje su iz preparata broj 635. U stanici 9 kromosom XI ima upravo graničnu vrijednost kojom je definiran pojam submetacentričnosti i već debljina traga olovke, kojom je na fotografiji obilježena centromera, je dovoljna da predstavlja izvor greške u klasifikaciji tog kromosoma. Vjerojatno je da se i u ovom slučaju radi o metacentričnom kromosomu. Mislim stoga, da se može tvrditi da se različiti kromosomi XI nalaze u pojedinim sjemenim zamecima ramete japanskog crvenog bora »de V 116«, kao rezultat mejoitičke diobe i slobodnog razvrstavanja kromosoma na polove. Sjemeni će zametak u endospermu imati onaj kromosom XI, koji će se nalaziti u funkcionalnoj megaspori (nakon provedene mejoitičke diobe) iz koje će se mitotičkim diobama razviti haploidni endosperm.

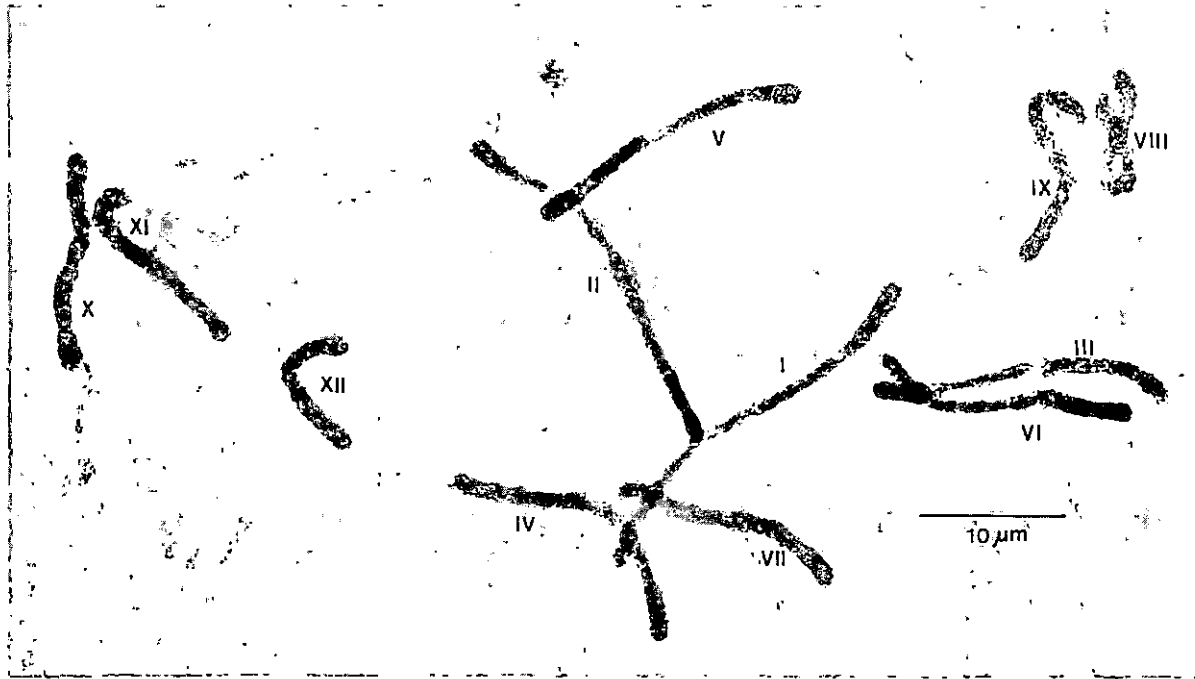
Na slici 6 je stanica sa submetacentričnim, a na slici 19 sa metacentričnim kromosomom XI, stabla »de V 116«.

Nakon ovakovog zaključka za kromosom XI ramete »de V 116«, pokušao sam pažljivom analizom omjera krakova kromosoma XI u preostalim 6 stabala, uz ponovnu kritičku procjenu položaja centromere kromosoma XI na fotografiji svake stanice, zaključiti kako ovaj kromosom izgleda u pojedinim preparatima drugih stabala.

Prije svega iz tabele 15 vidimo da se u svim kariotipovima osim hibrida »nisy 410«, nalazi tek nešto više od 50% submetacentričnih kromosoma XI, a da se sveukupno u 126 analiziranih stanica nalazilo 52,38% submetacentričnih kromosoma XI. Već ovaj podatak baziran na velikom uzorku, ukazuje na mogućnost da se u 50% sjemenih zametaka nalazi submetacentrični ili metacentrični kromosom XI.

Podatak da je u hibrida »nisy 410« samo u dvije stanice od 18 stanica jednog sjemenog zametka, kromosom XI submetacentričan, otvara pitanje da li bi u nekom drugom sjemenom zametku tog stabla kromosom XI mogao biti submetacentričan u cjelosti.

Pažljivom analizom pojedinačnih preparata (sjemenih zametaka) ostalih stabala nisam uvijek dobio tako lijep rezultat kao u tabeli 17. Za točniju analizu bilo bi potrebno imati veći broj preparata s više stanica pojedinog stabla, jer npr. iz tabele 1 vidimo da je analiza bila moguća za kariotip »ni 47« samo iz preparata broj 1089, 1090, 1096,



Sl. — Fig. 19. Stanica iz endosperma ramete japanskog crvenog bora de V 116 s metacentričnim kromosomom XI —  
The endospermal cell of the Japanese red pine ramete with metacentric chromosome XI.

Tab. 17. Definiranje položaja centromere kromosoma XI u rameti japanskog crvenog bora de V 116, ovisno o sjemenom zametku u kojem se nalazila pojedina analizirana stanica (kromosom XI), a na temelju 18 analiziranih stanica — Determination of centromere position of chromosome XI in the Japanese red pine ramete de V 116, depending on the ovule from which the analysed cell (chromosome XI) originated. A total of 18 cells were analyzed.

Redni broj stanice Cell number	Broj preparata Slide number	Omjer krakova Arm ratio	Položaj centromere Position of centromere
1	1838	0.8947	Metacentričan Metacentric
2	1844	0.7143	Submetacentričan Submetacentric
3	"	0.7391	"
4	"	0.6667	"
5	1845	0.7241	Submetacentričan Submetacentric
6	1847	0.6667	Submetacentričan Submetacentric
7	628	0.8800	Metacentričan Metacentric
8	635	0.8400	Metacentričan Metacentric
9	"	0.7500	"
10	645	0.7400	Submetacentričan Submetacentric
11	648	0.6957	Submetacentričan Submetacentric
12	"	0.7391	"
13	651	0.9167	Metacentričan Metacentric
14	657	0.8750	Metacentričan Metacentric
15	"	0.9000	"
16	"	0.9310	"
17	660	1.0000	Metacentričan Metacentric
18	675	0.8800	Metacentričan Metacentric

1097 i 1108. U obje stanice preparata 1089 kromosom XI je bio submetacentričan, u 1090 su bili različiti, u 1096 su isti, u 1097 tri su bila submetacentrična a jedan metacentričan, dok su u 1108 tri submetacentrična a dva metacentrična. Pregledavanjem fotografija ovih stanica, bilo je moguće uočiti da su neslaganja u pretpostavci (da u jednom preparatu mora biti samo submetacentričan ili metacentričan kromosom XI) bila u slučajevima kada je centromera bila prekrivena drugim kromosomom, pa bi pomjeranje traga olovke, kojom je obilježen položaj centromere, za jedan milimetar u lijevo ili u desno mijenjao i »status« kromosoma XI, najčešće tako da bi se pretpostavka mogla uvažiti. Prisutne su bile i druge pojave koje su uticale na rezultat, kao npr. sticky pojava, istegnut krak kromosoma i slično. Sigurno je i da kromosom XI podliježe izvjesnom riziku zamjene u redosljedu, pa je i to jedan od elemenata kojim se mogu tumačiti odstupanja u očekivanoj pojavi tipa kromosoma XI u nekom sjemenom zametku. Kod drugih stabala je bila slična situacija, s tom razlikom što se kod stabla »sy 367« samo u jednoj stanici (kao kod »de V 116«) od 9 mogućih status kromosoma XI nije slagao s pretpostavljenim.

Zaključujući diskusiju o dobivenim rezultatima položaja centromere na kromosomu XI, želio bih istaknuti da bi i kod drugih borova podsekcije *Sylvestres* trebalo obratiti pažnju na mogućnost da su u pojedinim sjemenim zamecima kromosomi XI (ili u sjemenkama homologni par kromosoma XI) različiti, odnosno heteromorfni po vrijednosti omjera krakova ispod ili iznad granične vrijednosti koja iznosi 0,75.

Za pretpostaviti je također i da postoje homozigotna stabla s obzirom na to svojstvo (stabla sa samo submetacentričnim ili samo metacentričnim kromosomom XI).

Pod pojmom heteromorfni kromosomi Rieger i sur. (1976) navode dva tipa heteromorfni bivalenata: jedan je tip nejednakog para kromosoma koji zbog delecije ili različitih tipova translokacije imaju nejednake duljine a drugi je asimetričan par kromosoma koji su podjednake duljine ali se razlikuju u položaju centromere. U našem bi slučaju bivalente stabala s heteromorfni kromosomima mogli nazvati asimetričnima.

Različiti vidovi heteromorfni biljnih kromosoma opisani su u literaturi. Tako npr. Marchant & Brighton (1971) opisuju u četiri divlje populacije *Ranunculus ficaria* povećani satelit jednog od četiri SAT-kromosoma, ističući neobično i nepravilno ponašanje (fragmentiranje i tvorba mostova) ovog tijela za vrijeme mitotičkih anafaza. Smatraju da je nepotpuna ili zakašnjela replikacija heteromorfni segmenata uzrok ovim anomalijama. U radu iz 1980. godine Brighton opisuje kariotip jednog uzorka *Crocus cotschyanus* subsp. *kotschyanus* s izrazito heteromorfni satelitom, vrlo sitnim u jednom kromosomu, a vrlo velikim satelitom u njegovom homologu. Brighton i sur. (1982) su izvjestili o mogućoj pericentričnoj inverziji u paru velikih metacentričnih kromosoma *Crocus speciosus* subsp. *speciosus*, kao i o drugim oblicima heteromorfije različitih podvrsta šafrana. Papeš & Bosiljevac (1984) su otkrile heteromorfiju kromosoma višegodiš-

njeg ječma (*Hordeum bulbosum*) u paru kromosoma s različitim oblikom centromernih pruga i na kratkom kraku jednog para kromosoma sa satelitom, kao i na drugim kromosomima kod kojih bi jedan iz para imao prugu na jednom od krakova, a drugi nije. Ova razlika u količini konstitutivnog heterokromatina između homolognih kromosoma, otkrivena je zahvaljujući primjeni diferencijalnog bojenja kromosoma specifičnom Giemsa tehnikom.

Stebáns (1971) pretpostavlja da današnje gimnosperme, koje imaju vrlo asimetrične kariotipove, nisu u evolucionom pogledu primitivne već arhaične i specijalizirane, a da su njihovi manje specijalizirani, sada izumrli preci, imali relativno simetrične kariotipove.

Međutim, borovi su se očuvali do današnjih dana sa svojim simetričnim kariotipovima (s metacentričnim i submetacentričnim kromosomima) ili zbog njihove sposobnosti da se lako prilagođavaju svim mogućim promjenama životnih uvjeta koji su ih snalazili tijekom milenija, ili stoga što su se održavali u područjima koja nisu bila zahvaćena ekstremnim promjenama životnih uvjeta koja bi zahtjevala drastične promjene kariotipa. Ne samo da nisu izumrli, već predstavljaju grupu drveća koje već milionima godina nastava zemlju, danas pokrivajući široka šumska prostranstva sjeverne polutke. Prema tome, jedan od prirodno mogućih načina prilagodbe na različite uvjete okoline bio bi i da simetrični kariotipovi nose u sebi potencijal za prilagođavanje na uvjete koji prema današnjem klimatu i tipovima tla vladaju od granica šumske vegetacije na sjeveru do subtropskih područja, od vlažnih do pustinjaških predjela, od nizinskih područja do granice šumske vegetacije visokih planina, te da bazično slični kariotipovi različitih vrsta borova zahtjevaju samo minorne promjene (koje tada karakteriziraju vrstu, populaciju, ekotip) kojima se neka sistematska grupa prilagođava okolini.

S obzirom da je ova diskusija o simetriji kariotipova borova s evolucionog stanovišta moguća samo hipotetički, dozvolimo si pretpostavku da postojanje para kromosoma XI kod kojega sam ustanovio heteromorfiju, barem što se položaja centromere tiče, ima određeni značaj, te si možemo postaviti pitanje i o karakteru njegove heterogenosti. Njegovo učešće kod istraživanih stabala može podsjetiti na tip para kromosoma koji kontrolira determinaciju spola, i čini se kao da predstavlja potencijal za divergenciju u evolucionom smislu s monoecičnim na diecične oblike. Činjenica je da je stablo »de V 116« uvijek rađalo obilnije sa ženskim cvatovima, a da pored njega raste klon »de V 115« kojega nazivamo »funkcionalno muškim«, jer rijetko donosi ženske cvatove a obilato rađa muškima. Stoga bi jedan od narednih zadataka bio istražiti kariotip ramete »de V 115« klasičnom Feulgen metodom, a obje ramete Giemsa C metodom oprugavanja ili nekom fluorescentnom tehnikom u cilju utvrđivanja eventualne razlike u učešću konstitutivnog heterokromatina, posebno na kromosomu XI.

Želio bih ovdje još istaknuti kompleksnost citoloških istraživanja borova, jer je to osnovni razlog kojega treba naglasiti za razumijevanje ovakvih rezultata (neslaganje u rezultatima istraživanja, pretpostavke koje je potrebno dokazivati daljnjim istraživanjima) budući je skoro nemoguće sveobuhvatno i u pojedinostima obraditi kariologiju borova.

Za ilustraciju je dovoljno navesti da radovi Saylor-a predstavljaju kontinuirana istraživanja od kojih je prvi rad publiciran 1961., a posljednji 1983. godine. U ovom radu se prikazuju rezultati istraživanja koja traju već punih 12 godina.

Na temelju iznesenog, o položaju centromere na kromosomima moglo bi se zaključiti slijedeće:

Položaj centromere na kromosomima borova, morfološka je karakteristika kariotipa vjerojatno varijabilna, ovisna prvenstveno o genotipu, potom o svim ostalim faktorima koji mogu uticati na rezultat istraživanja — heterozigotnosti pojedinog genotipa (naróčito ako se za istraživanja koristi endospermalno tkivo), tehnici istraživanja (primjeni predtretiranja ili ne), vremenu sakupljanja uzoraka (kod endospermalnog tkiva ovisno o fazi razvoja ženskog gametofita), greškama u mjerenju (uslijed manje ili veće kontrahiranosti pojedinog kraka kromosoma, sticky pojave, faze diobe stanice, prekrivenosti drugim kromosomom i drugo).

### *Polikariogrami — Polykaryograms*

Ruski autori (Iljčenko 1975, Muratova 1978a, 1978b, 1979a, 1979b), koriste u svojim radovima grafički prikaz centromernog indeksa svakog kromosoma, tako da na os apscise nanose vrijednosti centromernog indeksa, a na ordinatu odgovarajuću duljinu kromosoma. Nazivaju ga polikariogram. Ovakav grafički prikaz vrlo je prikladan jer su svi kromosomi sa svojim centromernim indeksima iz svih istraživanih stanica predstavljeni točkama, koje grupirane zorno daju karakteristiku svakog kariotipa. Na slikama 20, 21, 22, 23, 24, 25 i 26 prikazujem polikariograme istraživanih stabala na način sličan onome u radovima Muratove (1978b, 1979a, 1979b), s tom razlikom da sam kružićem u polikariogramu obilježio položaj srednjeg kromosoma.

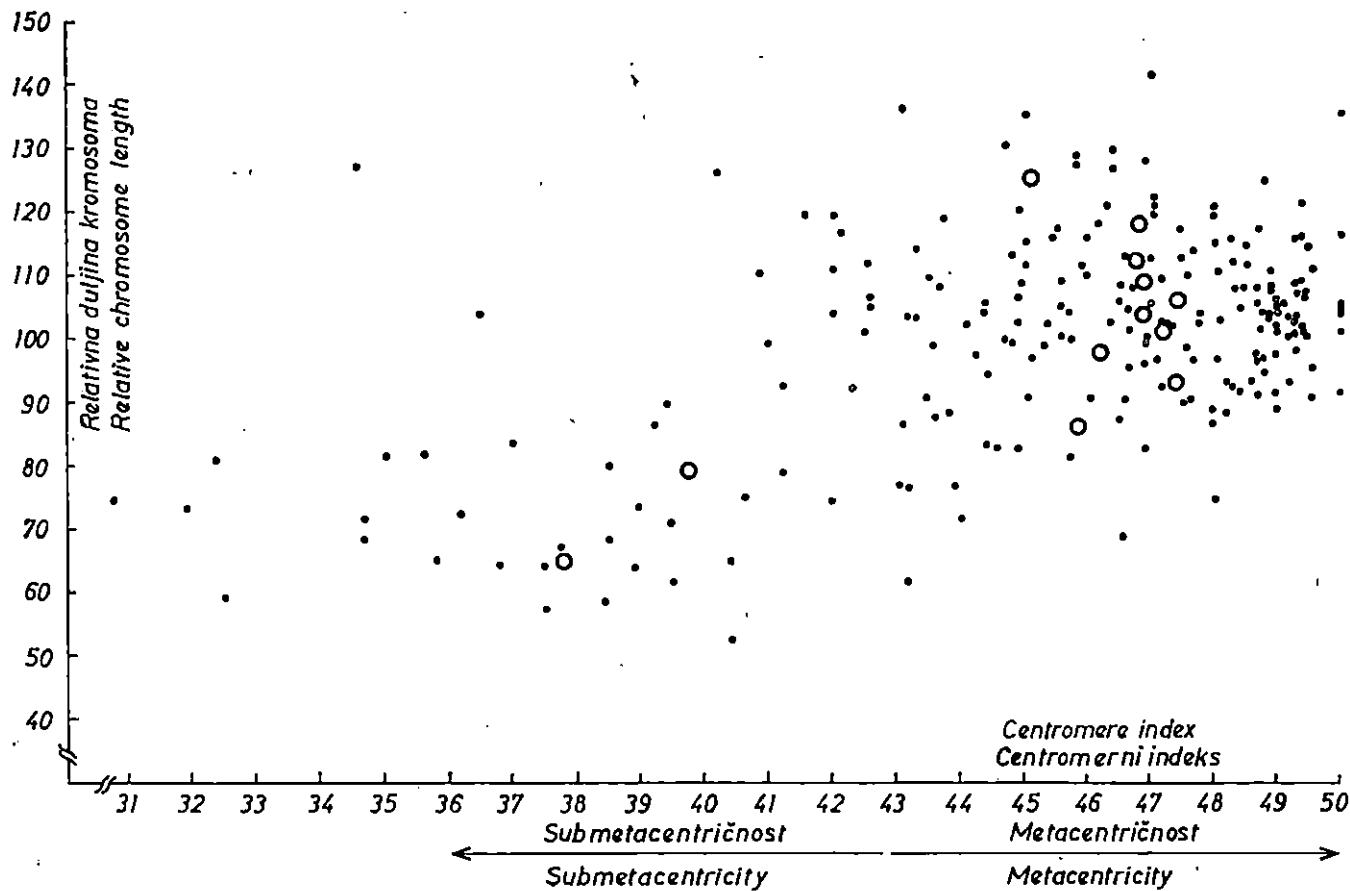
Iz ovih polikariograma može se zaključiti slijedeće:

1. Kod sva tri stabla crnog bora kromosomi XI i XII predstavljeni su populacijom točaka razvučenih u lijevu stranu prema ishodištu (smjer submetacentričnosti za sve točke manje od 42,8571), u odnosu na veću kompaktniju grupu točaka koje predstavljaju ostale metacentrične kromosome I do X (smjer metacentričnosti za sve točke apscise veće od 42,8571). Polikariogrami za tri stabla crnog bora su prikazani na slikama 20, 21 i 22.

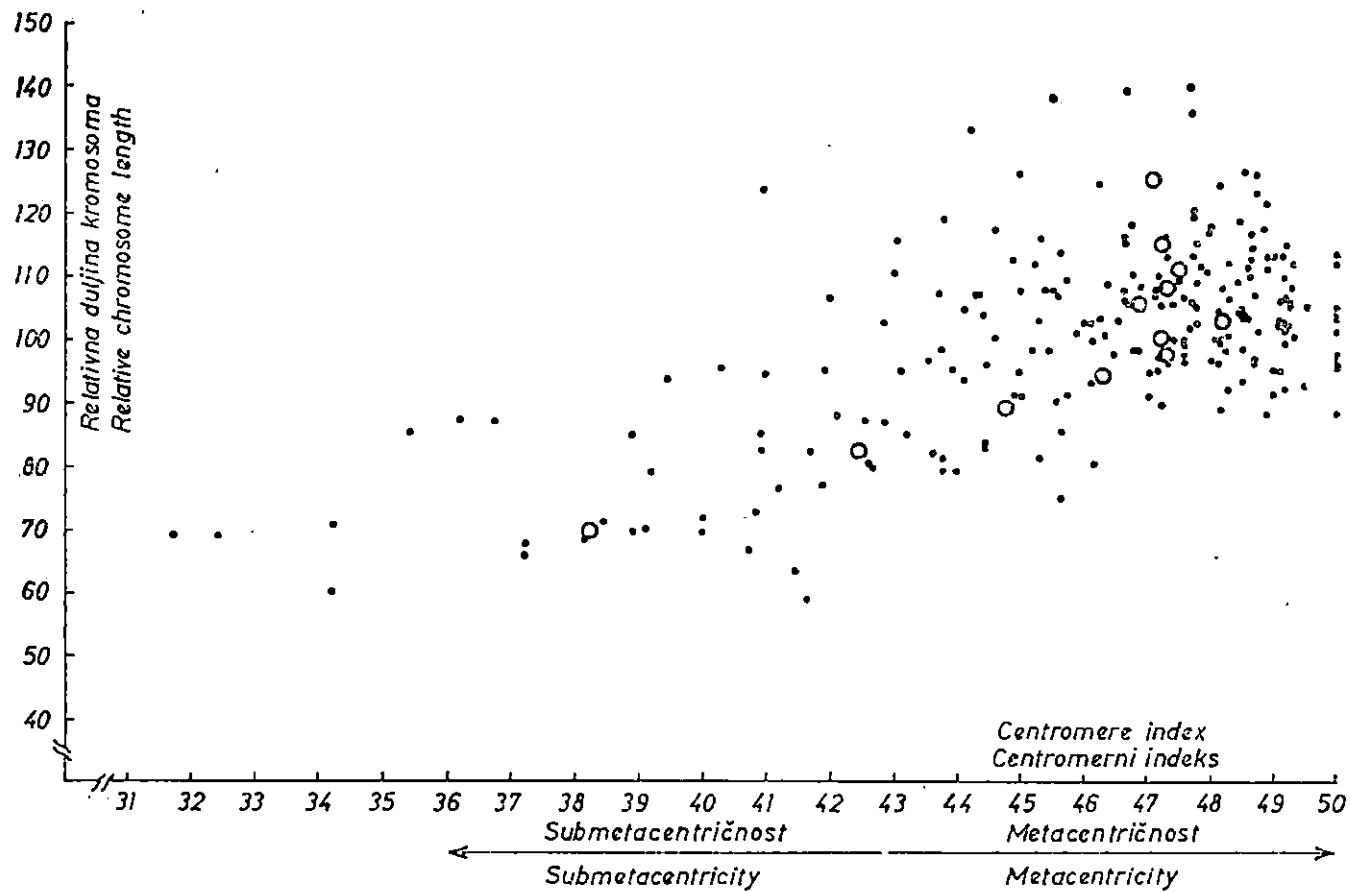
2. Za dva stabla običnog bora (slike 23 i 24), zanimljivo je da je na polikariogramu stabla »sy 367« srednja vrijednost kromosoma XI smještena u lijevo u odnosu na kromosom XII, što znači da je submetacentričnost kromosoma XI jače izražena nego kromosoma XII (što je jedini takav slučaj među ovih 7 stabala). Ova se karakteristika ne vidi tako lijepo na idiogramu (slika 15), jer polikariogram slikovitije ističe ovu osobinu. Za stablo »sy 77« može se reći da su kromosomi XI i XII predstavljeni točkama koje su u koordinatnom sistemu polikariograma slično dispergirane kao i u stabla »ni 221«.

3. Polikariogram ramete japanskog crvenog bora »de V 116« (slika 25) se razlikuje od ostalih, jer su točke »zgnusnutije« nego za ostala stabla,

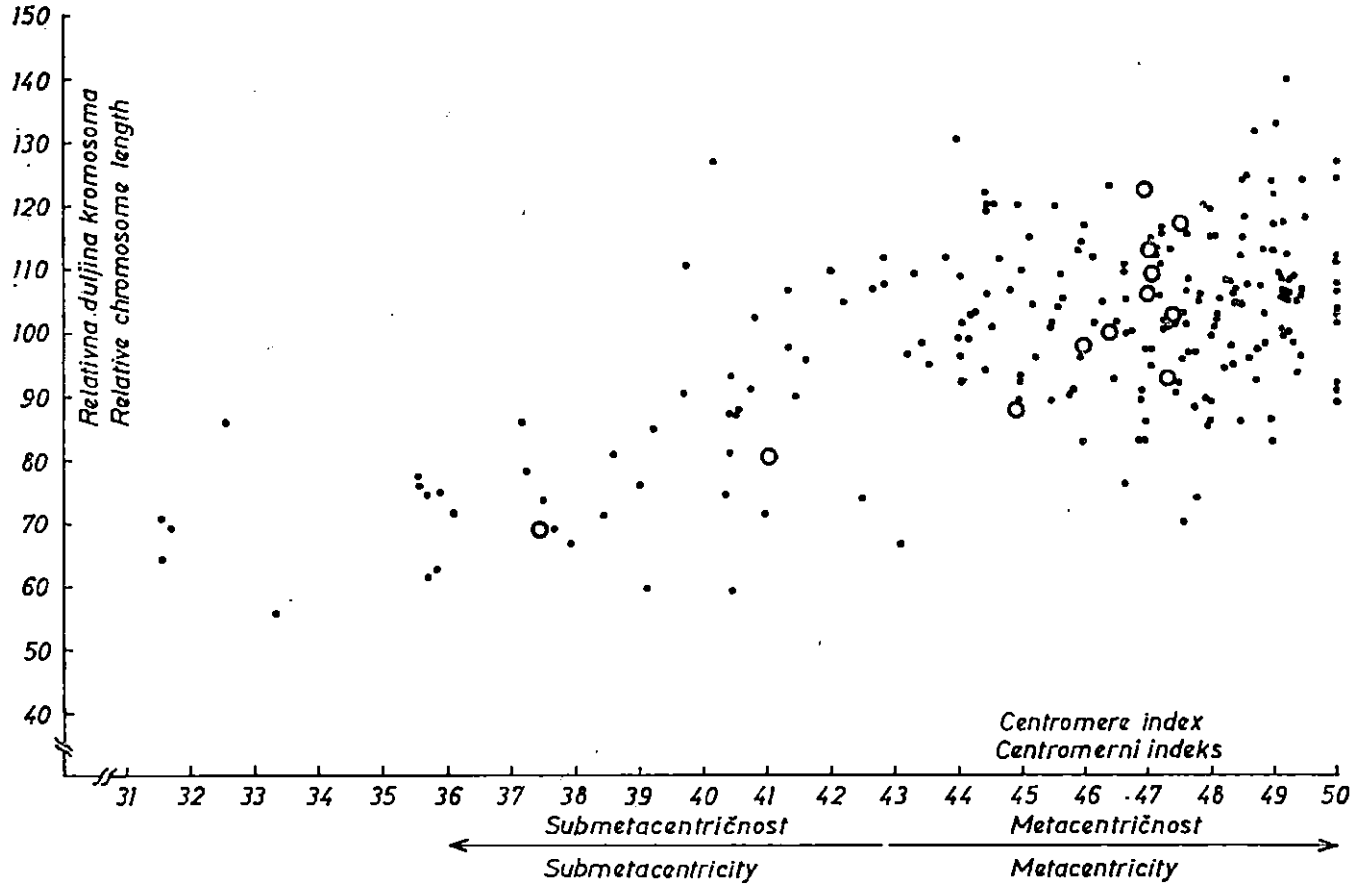




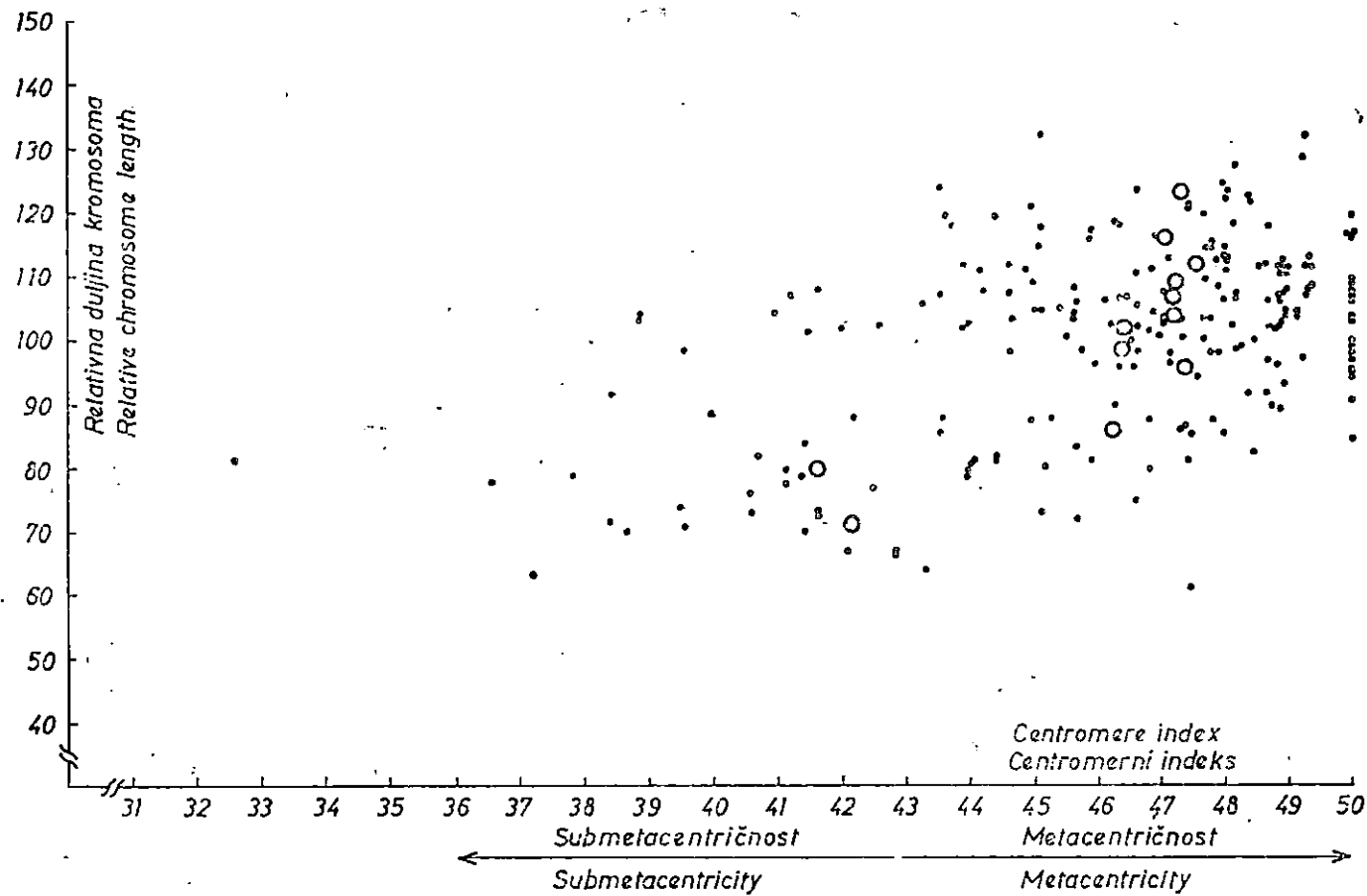
Sl. — Fig. 20. Polikariogram stabla crnog bora ni 47. Na polikariogramu su prikazani svi kromosomi svake od 18 istraživanih stanica. Kromosomi su prikazni točkom koja na osi apscise ima vrijednost centromernog indeksa a na ordinati odgovarajuću duljinu kromosoma. Kružićem su u polikariogramu obilježeni položaji srednjeg kromosoma. — The polykaryogram of the European black pine tree ni 47. All the chromosomes from 18 investigated cells are presented with one dot representing the total length along the ordinate, and centromeric index along the abscissa. The circle represents the corresponding value of the average chromosome.



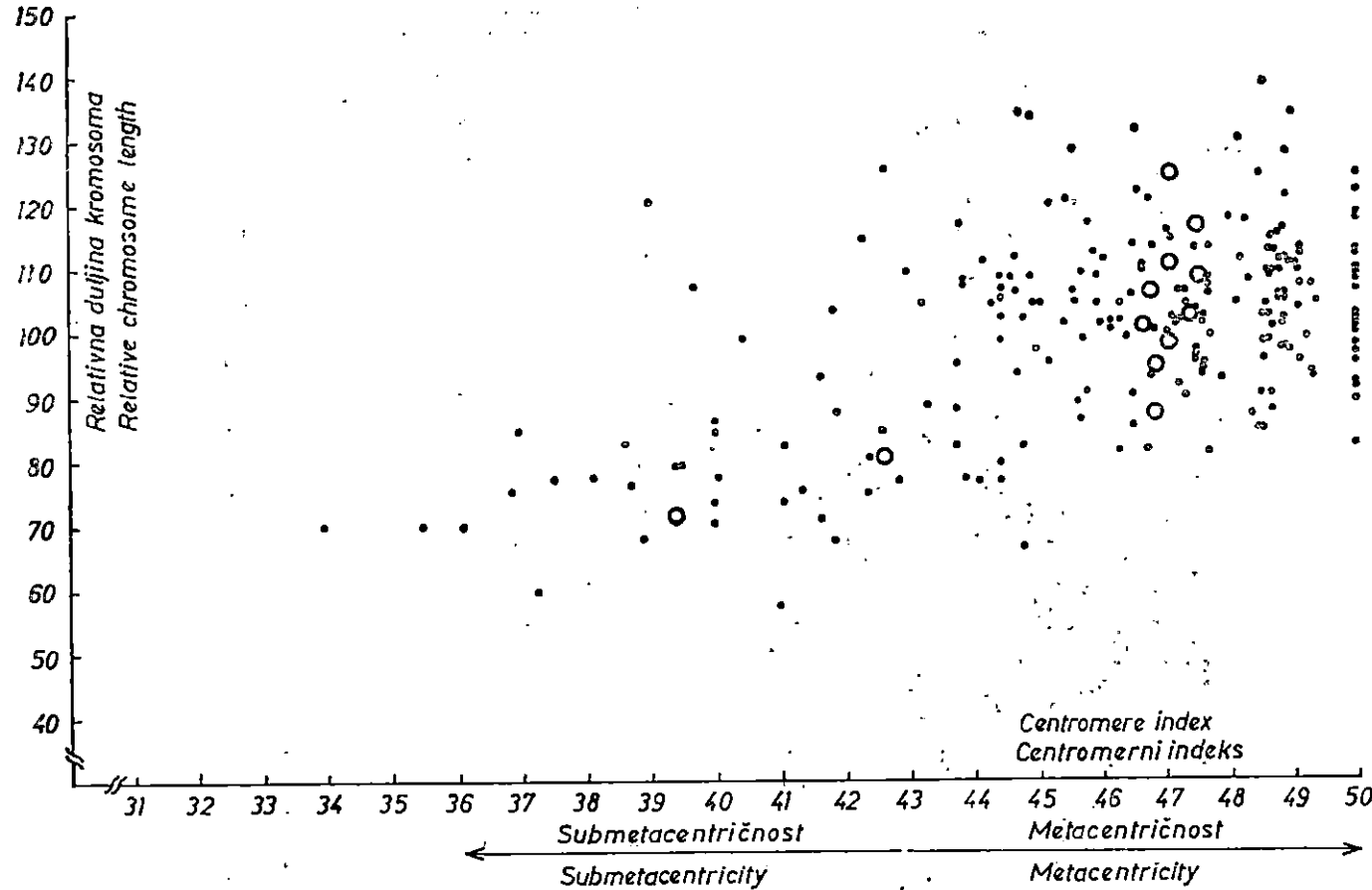
Sl. — Fig. 21. Polikariogram stabla crnog bora ni 221. — The polykaryogram of the European black pine tree ni 221.



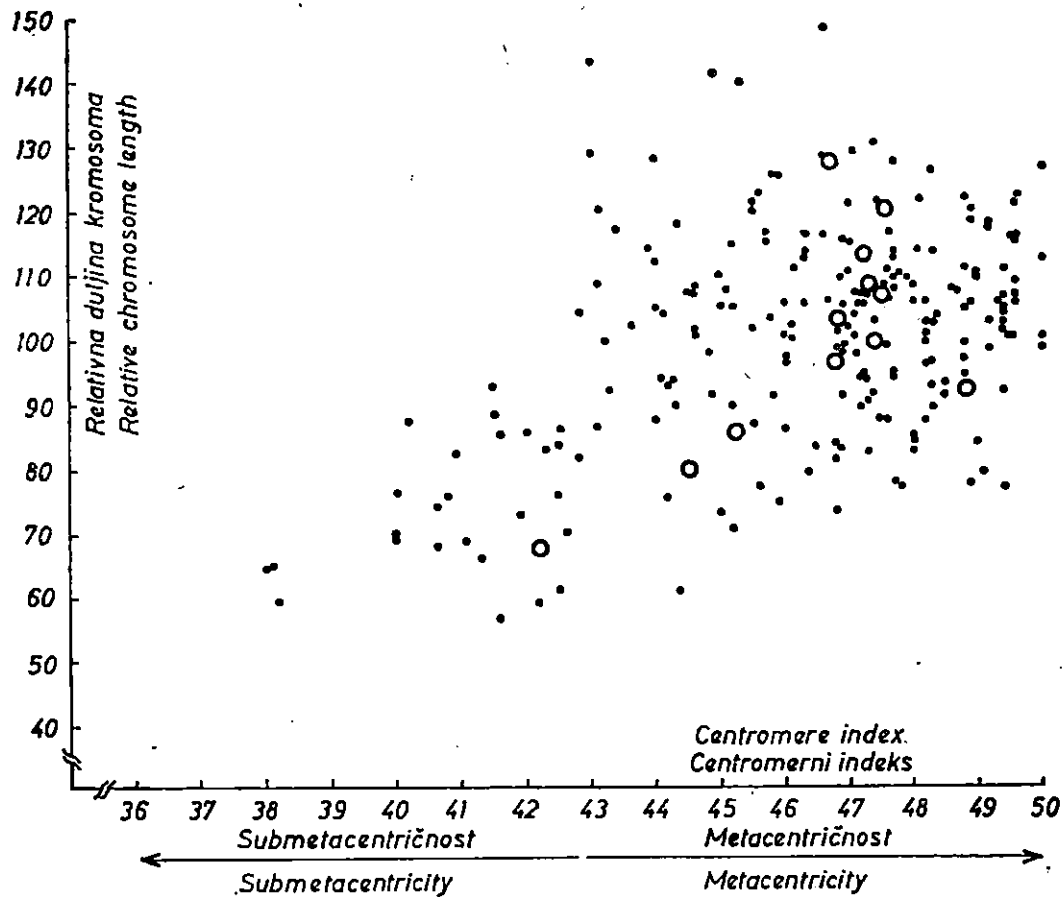
Sl. — Fig. 22. Polikariogram stabla crnog bora ni 366. — The polykaryogram of the European black pine tree ni 366.



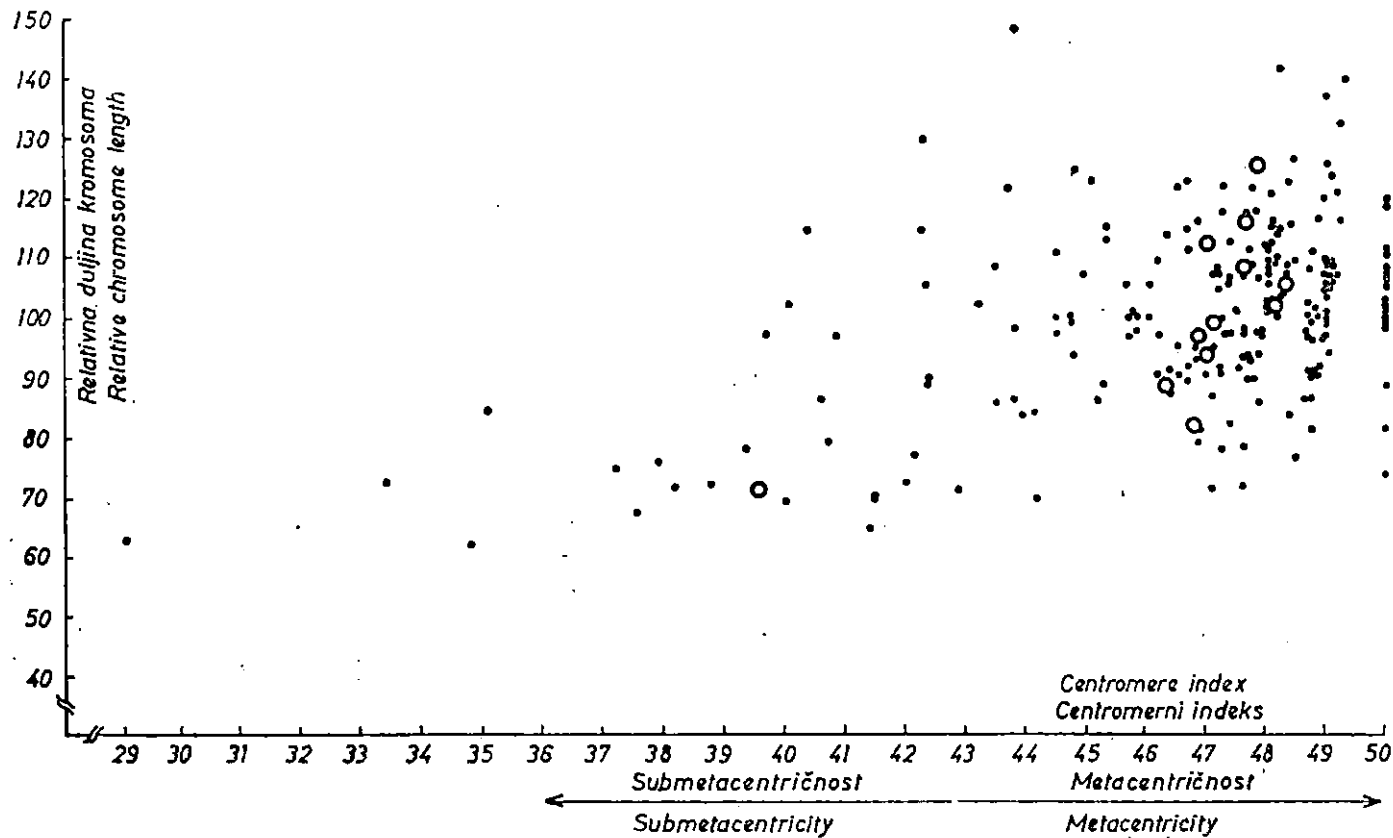
Sl. — Fig. 23. Polikariogram stabla običnog bora sy 367. — The polykaryogram of the Scots pine tree sy 367.



Sl. — Fig. 24. Polikariogram stabla običnog bora sy 77. — The polykaryogram of the Scots pine tree sy 77.



Sl. — Fig. 25. Polikariogram ramete japanskog crvenog borova de V 116. — The polykaryogram of the Japanese red pine ramete de V 116.



Sl. — Fig. 26. Polikariogram hibridnog stabla nisy 410. — The polykaryogram of the hybrid tree nisy 410.

te možemo reći da su razlike između pojedinih kromosoma ovog stabla manje izražene nego u ostalih stabala. Samo kromosom XII je submetacentričan, te su točke koje predstavljaju ovaj kromosom okupljene gušće oko kružića (srednje vrijednosti kromosoma XII). U toj regiji se nalazi i 9 točaka koje predstavljaju 9 submetacentričnih kromosoma XI iz 9 stanica, o čemu je diskutirano na stranicama 39 i 42.

4. Za hibridno stablo »nisy 410« polikariogram (slika 26) pokazuje malu varijabilnost duljine kromosoma XII (sve su točke spljošteno položene i razvučene duž osi apscise, a položaj srednje vrijednosti te distribucija točaka za taj kromosom je skoro identična onoj kod stabla »sy 77«, koje je stablo je otac hibridnom stablu. Ostali kromosomi, uključujući i kromosom XI su metacentrični.

*Testiranje nekih morfoloških karakteristika kromosoma različitih stabala pomoću T testa — T test of some morphological characteristics of chromosomes of investigated trees*

Komparativna analiza kariotipa rađena je elektroničkim računalom testiranjem morfoloških karakteristika kromosoma (ukupne relativne duljine kromosoma, relativne duljine kratkog i dugog kraka, omjeri krakova i centromerni indeksi) za par istraživanih stabala F i T testom.

Poznato je iz teorije uzoraka da je testiranje pomoću T varijable moguće uz pretpostavku da su odgovarajuće F vrijednosti nesignifikantne. Isto tako je poznato da za slučaj kada su F vrijednosti signifikantne, testiranje se provodi pomoću varijable koja je približno distribuirana po T razdiobi, a koja koristi tzv. procjenu separirane varijance (SEPARATE VARIANCE ESTIMATE u tabeli 28). Iz toga razloga su u svim izlistanim tabelama računane paralelno vrijednosti F varijable, T varijable na osnovu procjene zajedničke varijance (slučaj kada F nije signifikantan: POOLED VARIANCE ESTIMATED) i T varijable na osnovu procjene separirane varijance (slučaj kada je F signifikantan: SEPARATE VARIANCE ESTIMATED). Tako je omogućena analiza T testom, bez obzira na rezultate F testa.

Rezultati obrade elektroničkim računalom prikazani su primjerom, jednom od 105 izlistanih tabela (tabela 28). Svaka tabela sadrži u naslovu podatak o broju para stabala kojih se kariotip u tabeli obrađuje, te morfološku karakteristiku koja se testira (TOT LNG označava ukupne duljine kromosoma, SHORT LN su duljine kratkih krakova, LONG LNG su duljine dužih krakova, RS/RL su omjeri krakova, a CENTR IN oznakom su obilježene tabele u kojima se testiraju vrijednosti centromernih indeksa). U tabelama su navedeni redni brojevi kromosoma, veličine pojedinačnih uzoraka (NUMBER OF CASES), njihove aritmetičke sredine (MEAN), standardne devijacije (STANDARD DEVIATION) te standardne greške (STANDARD ERROR). Za svaki kromosom su statistički parametri grupirani u parove onako kako ih se koristilo za izračunavanje T odnosno F varijabli. Za svaku vrijednost F i T varijable navedena je i pripadna vjerojatnost (2-TAIL PROB.), a za vrijednost T varijable navedeni su još i stupnjevi slobode (DEGREES OF FREEDOM). Svi su testovi dvostrani.



U svim testovima smatrao sam da je vrijednost varijable testiranja signifikantna ako je pripadna vjerojatnost manja ili jednaka 0,05. Kod toga razlikujem tri slučaja: ako je ta vjerojatnost 0,05 označio sam ju s jednom zvjezdicom (\*), ako je 0,01 s dvije zvjezdice (\*\*) i ako je 0,001 ili manja, s tri zvjezdice (\*\*\*). Ove ću oznake koristiti u tabelama koje sumarno prikazuju rezultate izlistanih 105 tabela (tabele 18, 19, 20, 21, 22, 23 i 24) i koje će poslužiti za diskusiju. Na taj će način biti istaknute signifikantne morfološke razlike između kromosoma dvaju ispitivanih kariotipova.

105 izlistanih tabela (primjer je tabela 28) poslužilo je za donošenje zaključaka (prikazanih sumarno u tabelama 18—24) na slijedeći način:

Ako je F vrijednost nesignifikantna, tada se zaključak o morfološkoj razlici donosi pomoću T vrijednosti dobivene procjenom zajedničke varijance (POOLED VARIANCE ESTIMATE). Smatrat će se da morfološke razlike nema ako T vrijednost nije signifikantna, a ako je T vrijednost signifikantna i morfološke razlike su značajne (signifikantne). U slučaju da je F vrijednost signifikantna, zaključak o morfološkoj razlici donosi se na isti način pomoću T vrijednosti dobivene procjenom separirane varijance (SEPARATE VARIANCE ESTIMATE).

U tabeli 20 su istaknute razlike kromosoma između stabala »ni 366« i ostalih stabala, te vidimo npr. da se stablo »ni 47« i »ni 221« ne razlikuju od stabla »ni 366«. Iz toga bi bio pogrešan zaključak da se radi toga kariotipovi stabala »ni 47« i »ni 221« također ne razlikuju, jer vidimo iz tabele 18 da se kariotip ta dva stabla razlikuje u 4 (5) morfološke karakteristike: ukupnoj duljini kromosoma XII, kratkom kraku kromosoma XI, dugom kraku kromosoma X i omjeru krakova kromosoma I (centromernom indeksu kromosoma I i IX). To je iz razloga jer se morfološke karakteristike kariotipa stabla »ni 366« nalaze po svojim numeričkim vrijednostima između odgovarajućih numeričkih vrijednosti kariotipova »ni 221« i »ni 47«. Dakle, veće su razlike između »ni 47« i »ni 221«, nego između »ni 47« i »ni 366« ili između »ni 221« i »ni 366«. Ovakovo zaključivanje se podudara sa ponašanjem ovih stabala prilikom kontrolirane hibridizacije u odnosu na stablo »sy 77«, jer je stablo »ni 47« u periodu od 1958. do 1969. godine oprášeno u 304 vrećice sa 7 različitih stabala običnog bora, 1976. godine u 24 vrećice s polenom stabla »sy 367« i 1977. godine u 49 vrećica s polenom stabla »sy 77« i nikada nije dalo hibridnu biljku, dok se kod kombinacije križanja »ni 221« × »sy 77« iz 265 vrećica od 1966. do 1978. godine dobilo ukupno 28 hibridnih biljaka. Križanjem »ni 366« × »sy 77« iz 127 oprášenih vrećica nije proizvedena niti jedna hibridna biljka, ali se križanjem »ni 366« × »sy 367« u periodu od 1972. do 1980. godine iz 150 vrećica dobilo 3 hibridne biljke (Borzan 1986b).

Ako pogledamo tabelu 22 u kojoj su istaknute razlike između kariotipa stabla »sy 77« i ostalih stabala, vidimo da se kariotip »sy 77« najmanje razlikuje od stabla »ni 221«, nešto više od kariotipa stabla »ni 366«, a najviše od kariotipa stabla »ni 47«.

Tab. 18. Značajne razlike u morfologiji kromosoma između stabla ni 47 i ostalih istraživanih stabala — Significant differences in morphological characteristics of chromosomes between the tree ni 47 and other investigated trees.

USPOREĐIVANA STABLA COMPARED TREES	UKUPNA DULJINA KROMOSOMA TOTAL RELATIVE CHROMOSOME LENGTH	KRATKI KRAK SHORT ARM	DUGI KRAK LONG ARM	OMJER KRAKOVA ARM RATIO	CENTROMERNI INDEKS CENTROMERE INDEX
	S + L	S	L	S/L	100 S: (S+L)
KROMOSOMI KOJI SE RAZLIKUJU - DISSIMILAR CHROMOSOMES					
ni 47 ni 221	XII*	XI**	X*	I*	I*; XI*
ni 47 ni 366	-	-	-	-	-
ni 47 sy 77	XII**	XI*; XII***	-	XI*	XI*
ni 47 sy 367	XII**	XII***	I*	I*; XII***	I*; XII***
ni 47 de V 116	-	XI**; XII***	XI*	XI**; XII***	XI***; XII***
ni 47 ni sy 410	VII**; XII**	XI***; XII**	VI*; XI**	I**; XI***	I**; XI***

\* Statistički značajna razlika utvrđena s pouzdanosti od 95%; \*\* 99% i \*\*\* 99.9%  
— Significant differences at the 95%; \*\* 99% and \*\*\* 99.9% level.

Tab. 19. Značajne razlike u morfologiji kromosoma između stabla ni 221 i ostalih istraživanih stabala — Significant differences in morphological characteristics of chromosomes between the tree ni 221 and other investigated trees.

USPOREĐIVANA STABLA COMPARED TREES	UKUPNA DULJINA KROMOSOMA TOTAL RELATIVE CHROMOSOME LENGTH	KRATKI KRAK SHORT ARM	DUGI KRAK LONG ARM	OMJER KRAKOVA ARM RATIO	CENTROMERNI INDEKS CENTROMERE INDEX
	S + L	S	L	S/L	100 S: (S+L)
KROMOSOMI KOJI SE RAZLIKUJU - DISSIMILAR CHROMOSOMES					
ni 221 ni 47	XII*	XI**	X*	I*	I*; XI*
ni 221 ni 366	-	-	-	-	-
ni 221 sy 367	X**	XII**	VII*; X**	XII***	XII***
ni 221 sy 77	-	-	X**	-	-
ni 221 de V 116	II*; X*	II**; VI*	X*; XI*; XII**	VI*; XI*; XII***	VI*; XI*; XII***
ni 221 ni sy 410	-	V*; XI***	X*; XI**	V*; XI***	V*; XI***

\* Statistički značajna razlika utvrđena s pouzdanosti od 95%; \*\* 99% i \*\*\* 99.9%  
— Significant differences at the 95%; \*\* 99% and \*\*\* 99.9% level.

Tab. 20. Značajne razlike u morfologiji kromosoma između stabla ni 366 i ostalih istraživanih stabala — Significant differences in morphological characteristics of chromosomes between the tree ni 366 and other investigated trees.

USPOREDIVANA STABLA COMPARED TREES	UKUPNA DULJINA KROMOSOMA	KRATKI KRAK	DUGI KRAK	OMJER KRAKOVA	CENTROMERNI INDEKS
	TOTAL RELATIVE CHROMOSOME LENGTH	SHORT ARM	LONG ARM	ARM RATIO	CENTROMERE INDEX
	S + L	S	L	S/L	100 S:(S+L)
KROMOSOMI KOJI SE RAZLIKUJU - DISSIMILAR CHROMOSOMES					
<u>ni 366</u> <u>ni 47</u>	-	-	-	-	-
<u>ni 366</u> <u>ni 221</u>	-	-	-	-	-
<u>ni 366</u> <u>sy 367</u>	X*	XII**	X*	XII***	XII***
<u>ni 366</u> <u>sy 77</u>	III*	-	X*	-	-
<u>ni 366</u> <u>de V 116</u>	X*	-	XI*;XII**	XI*;XII***	XI*;XII***
<u>ni 366</u> <u>nisy 410</u>	-	XI***	V*;XI*	V*;XI***	V*;XI***

\* Statistički značajna razlika utvrđena s pouzdanošću od 95%; \*\* 99% i \*\*\* 99,9%  
— Significant differences at the 95%; \*\* 99% and \*\*\* 99,9% level.

Tab. 21. Značajne razlike u morfologiji kromosoma između stabla sy 367 i ostalih istraživanih stabala — Significant differences in morphological characteristics of chromosomes between the tree sy 367 and other investigated trees.

USPOREDIVANA STABLA COMPARED TREES	UKUPNA DULJINA KROMOSOMA	KRATKI KRAK	DUGI KRAK	OMJER KRAKOVA	CENTROMERNI INDEKS
	TOTAL RELATIVE CHROMOSOME LENGTH	SHORT ARM	LONG ARM	ARM RATIO	CENTROMERE INDEX
	S + L	S	L	S/L	100 S:(S+L)
KROMOSOMI KOJI SE RAZLIKUJU - DISSIMILAR CHROMOSOMES					
<u>sy 367</u> <u>sy 77</u>	-	-	-	XII*	XII*
<u>sy 367</u> <u>ni 47</u>	XII**	XII***	I*	I*;XII***	I*;XII***
<u>sy 367</u> <u>ni 221</u>	X**	XII**	VII*;X**	XII***	XII***
<u>sy 367</u> <u>ni 366</u>	X*	XII**	X*	XII***	XII***
<u>sy 367</u> <u>de V 116</u>	II*;IX*	II*;IX*;XI*	VII*	XI*	XI*
<u>sy 367</u> <u>nisy 410</u>	VI*;VII**	XI***	V*;XI*	XI***	XI***

\* Statistički značajna razlika utvrđena s pouzdanošću od 95%; \*\* 99% i \*\*\* 99,9%  
— Significant differences at the 95%; \*\* 99% and \*\*\* 99,9% level.

Tab. 22. Značajne razlike u morfologiji kromosoma između stabla sy 77 i ostalih istraživanih stabala — Significant differences in morphological characteristics of chromosomes between the tree sy 77 and other investigated trees.

USPOREDIVANA STABLA COMPARED TREES	UKUPNA DULJINA KROMOSOMA TOTAL RELATIVE CHROMOSOME LENGTH	KRATKI KRAK SHORT ARM	DUGI KRAK LONG ARM	OMJER KRAKOVA ARM RATIO	CENTROMERNI INDEKS CENTROMERE INDEX
	S + L	S	L	S/L	100 S: (S+L)
KROMOSOMI KOJI SE RAZLIKUJU - DISSIMILAR CHROMOSOMES					
sy 77 sy 367	-	-	-	XII <sup>b</sup>	XII <sup>a</sup>
sy 77 ni 47	XII <sup>aa</sup>	XI <sup>a</sup> ; XII <sup>aaa</sup>	-	XI <sup>a</sup>	XI <sup>b</sup>
sy 77 ni 221	-	-	X <sup>ab</sup>	-	-
sy 77 ni 366	III <sup>a</sup>	-	X <sup>a</sup>	-	-
sy 77 de V 116	II <sup>a</sup> ; III <sup>a</sup>	-	XII <sup>ab</sup>	XI <sup>b</sup> ; XII <sup>ab</sup>	XI <sup>a</sup> ; XII <sup>aaa</sup>
sy 77 nisy 410	VII <sup>a</sup>	XI <sup>aaa</sup>	V <sup>a</sup> ; XI <sup>b</sup>	V <sup>a</sup> ; XI <sup>aaa</sup>	V <sup>a</sup> ; XI <sup>aaa</sup>

\* Statistički značajna razlika utvrđena s pouzdanošću od 95 %; \*\* 99 %; i \*\*\* 99.9 %  
— Significant differences at the 95 %; \*\* 99 % and \*\*\* 99.9 % level.

Tab. 23. Značajne razlike u morfologiji kromosoma između stabla de V 116 i ostalih istraživanih stabala — Significant differences in morphological characteristics of chromosomes between the tree de V 116 and other investigated trees.

USPOREDIVANA STABLA COMPARED TREES	UKUPNA DULJINA KROMOSOMA TOTAL RELATIVE CHROMOSOME LENGTH	KRATKI KRAK SHORT ARM	DUGI KRAK LONG ARM	OMJER KRAKOVA ARM RATIO	CENTROMERNI INDEKS CENTROMERE INDEX
	S + L	S	L	S/L	100 S: (S+L)
KROMOSOMI KOJI SE RAZLIKUJU - DISSIMILAR CHROMOSOMES					
de V 116 nisy 410	-	II <sup>a</sup> ; XI <sup>a</sup>	V <sup>a</sup> ; XII <sup>aaa</sup>	VI <sup>a</sup> ; XI <sup>a</sup>	VI <sup>a</sup> ; XI <sup>b</sup> ; XII <sup>a</sup>
de V 116 ni 47	-	XI <sup>aa</sup> ; XII <sup>aaa</sup>	XI <sup>a</sup>	XI <sup>aa</sup> ; XII <sup>aaa</sup>	XI <sup>aaa</sup> ; XII <sup>aaa</sup>
de V 116 ni 221	II <sup>a</sup> ; X <sup>a</sup>	II <sup>aa</sup> ; VI <sup>a</sup>	X <sup>a</sup> ; XI <sup>a</sup> ; XII <sup>ab</sup>	VI <sup>a</sup> ; XI <sup>a</sup> ; XI <sup>aaa</sup>	VI <sup>a</sup> ; XI <sup>a</sup> ; XII <sup>aaa</sup>
de V 116 ni 366	X <sup>a</sup>	-	XI <sup>a</sup> ; XII <sup>ab</sup>	XI <sup>b</sup> ; XII <sup>aaa</sup>	XI <sup>a</sup> ; XII <sup>aaa</sup>
de V 116 sy 367	II <sup>a</sup> ; IX <sup>a</sup>	II <sup>a</sup> ; IX <sup>a</sup> ; XI <sup>a</sup>	VII <sup>b</sup>	XI <sup>a</sup>	XI <sup>b</sup>
de V 116 sy 77	II <sup>a</sup> ; III <sup>a</sup>	-	XII <sup>ab</sup>	XI <sup>a</sup> ; XII <sup>ab</sup>	XI <sup>a</sup> ; XII <sup>ab</sup>

\* Statistički značajna razlika utvrđena s pouzdanošću od 95 %; \*\* 99 %; i \*\*\* 99.9 %  
— Significant differences at the 95 %; \*\* 99 % and \*\*\* 99.9 % level.

Tab. 24. Značajne razlike u morfologiji kromosoma između stabla nisy 410 i ostalih istraživanih stabala — Significant differences in morphological characteristics of chromosomes between the tree nisy 410 and other investigated trees.

USPOREĐIVANA STABLA COMPARED TREES	UKUPNA DULJINA KROMOSOMA TOTAL RELATIVE CHROMOSOME LENGTH	KRATKI KRAK SHORT ARM	DUGI KRAK LONG ARM	OMJER KRAKOVI ARM RATIO	CENTROMERNI INDEKS CENTROMERE INDEX
	S + L	S	L	S/L	100 S: (S+L)
	KROMOSOMI KOJI SE RAZLIKUJU — DISSIMILAR CHROMOSOMES				
<u>nisy 410</u> ni 47	VII**; XII**	XI***; XII**	VI <sup>a</sup> ; XI**	I <sup>a</sup> ; XI***	I <sup>a</sup> ; XI***
<u>nisy 410</u> ni 221	-	V <sup>a</sup> ; XI***	X <sup>a</sup> ; XI**	V <sup>a</sup> ; XI***	V <sup>a</sup> ; XI***
<u>nisy 410</u> ni 366	-	XI***	V <sup>a</sup> ; XI <sup>a</sup>	V <sup>a</sup> ; XI***	V <sup>a</sup> ; XI***
<u>nisy 410</u> sy 367	VI <sup>a</sup> ; VII**	XI***	V <sup>a</sup> ; XI <sup>a</sup>	XI***	XI***
<u>nisy 410</u> sy 77	VII*	XI***	V <sup>a</sup> ; XI <sup>a</sup>	V <sup>a</sup> ; XI***	V <sup>a</sup> ; XI***
<u>nisy 410</u> dc V 116	-	II <sup>a</sup> ; XI <sup>a</sup>	V <sup>a</sup> ; XII***	VI <sup>a</sup> ; XI <sup>a</sup>	VI <sup>a</sup> ; XI <sup>a</sup> ; XII <sup>a</sup>

\* Statistički značajna razlika utvrđena s pouzdanošću od 95 %; \*\* 99 % i \*\*\* 99.9 %  
— Significant differences at the 95 %; \*\* 99 % and \*\*\* 99.9 % level.

Da li se na osnovi tako lijepog podudaranja i sličnosti odnosno razlika pojedinih kariotipova može i smije zaključivati o mogućnosti ili nemogućnosti križanja tih stabala?

Mišlim da u ovom slučaju to ipak ne smijemo, i to iz slijedećih razloga:

1. Premalen je uzorak obrađenih kariotipova stabala koja se mogu križati međusobno i tvoriti hibride i onih stabala crnog bora koja s običnim borom ne tvore hibride. Kada bi istom ovom metodom na više stabala crnog bora dobili razlike u kariotipovima u odnosu na stablo »sy 77« na istim kromosomima kao u slučaju stabala »ni 47« ili »ni 221«, tek bi to bila potvrda mogućnosti korišćenja citologije u rješavanju problema inkompatibilnosti, ako bi se ta stabla i u prirodi prilikom kontrolirane hibridizacije ponašala na način kao što se ponašaju stabla »ni 47« i »ni 221«, tj. da je stablo »ni 47« potpuno, a stablo »ni 221« djelomično inkompatibilno u odnosu na stablo »sy 77«. S druge strane povećanje uzorka značilo bi produžetak ovih istraživanja, a već je spomenuto da je obrada za ovih 7 stabala (izrada perparata, mikroskopiranje, fotografiranje, mjerenje kromosoma, analiza izmjera) trajala punih 12 godina. To je i odgovor na pitanje zašto se u ovom radu nije obradio veći broj stabala.

2. Stablo »sy 367« odabrano je za citološka istraživanja 1974. godine kao kontrolno stablo za usporedbu s kariotipom stabla »sy 77« u vrijeme kada nakon prvih pokušaja križanja sa stablom »sy 367« nismo dobili hibridne biljke. Međutim 1978. godine križanjem »ni 366« × »sy

367« dobili smo 3 biljke, koje su 1981. verificirane kao hibridne. Ako sada pogledamo kako se međusobno odnose kariotipovi stabala »ni 47«, »ni 366« i »ni 221« prema stablu »sy 367«, vidimo uspoređujući tabele 21 i 22, da se, doduše, kariotip stabla »sy 367« u većem broju karakteristika razlikuje od kariotipova stabala »ni 47«, »ni 366« i »ni 221« nego kariotip stabla »sy 77«, ali da sa stanovišta inkompatibilnosti nije uočena korelacija u ponašanju tih stabala prilikom križanja i morfologije njihovih kromosoma, jer stabla koja nisu dala hibride (»ni 366« × »sy 77«) se manje razlikuju po kariotipu od stabala koja su proizvela hibridne biljke (»ni 366« × »sy 367«).

Jedini zaključak do kojega vodi ovakova analiza jest da su faktori inkompatibilnosti između borova karakterizirani molekularnom razinom, te da nisu izraženi (vidljivi) u morfologiji kromosoma, tj. da se ne mogu spoznati istraživanjem razlika samo u morfologiji kromosoma.

Svaki kromosom je nosilac toliko brojnih osobina genotipa (gena koji pojedinačno ili u interakciji kontroliraju neko svojstvo genotipa), te bi bila zaista sretna okolnost kad bi sposobnost križanja sa nekim stablom druge vrste bora bila u korelaciji s nekom morfološkom karakteristikom cijelog jednog ili više kromosoma.

Potvrdu ovakovom zaključivanju, barem kada je u pitanju sklonost križanju između tvrdih borova, nalazimo u radovima Mc William-a (1959), Knox-a i sur. (1972), Kriebel-a (1973), Vidaković-a (1977b), Petričević-a i sur. (1977) i drugih, koji ukazuju na to da su faktori inkompatibilnosti vezani za prisustvo, odnosno odsustvo specifičnih enzima u različitim fazama razvoja ženskog gametofita, vjerojatno od momenta oprašivanja pa do razvoja embrija.

Uspoređujući kariološke razlike između roditeljskih stabala »ni 221« i »sy 77« te hibrida »nisy 410«, već sam istaknuo (Borzan 1984), da su razlike u morfologiji kromosoma između roditeljskih stabala manje izražene, nego razlike istih morfoloških karakteristika svakog od roditeljskih stabala uspoređenog sa potomstvom — stablom »nisy 410«. To vidimo iz tabela 19 i 24, jer npr. u tabeli 19 se kariotipovi stabala »ni 221« i »sy 77« signifikantno razlikuju samo u dugom kraku kromosoma X, a u tabeli 24, »nisy 410« se od majčinskog stabla »ni 221« razlikuje u kratkom kraku kromosoma V i XI, dugom kraku kromosoma X i XI, te u omjeru krakova kromosoma V i XI (kao i centromernim indeksima), dok se od roditelja »sy 77« (polinatora) kariotip hibrida razlikuje u ukupnoj duljini kromosoma VII, kratkom kraku kromosoma XI, dugom kraku kromosoma V i XI i omjeru krakova kromosoma V i XI. Ako svoju pažnju usmjerimo na razlike u kromosomima koji najmanje podliježu pogrešnoj identifikaciji radi rizika zamjene u redosljedju, tj. na kromosom XI (eventualno X), te se stoga mogu smatrati pouzdanim zaključkom, dobivamo još jednu potvrdu logičnosti ovog rezultata radi metacentričnosti kromosoma XI u hibrida, kojega je kariotip bio izrađen samo na temelju jednog sjemenog zametka. Ujedno je to i upozorenje da se komparacija karioloških analiza mora provoditi na način da se kariotipovi baziraju na reprezentativnom uzorku od dovoljnog

broja stanica za potrebnu statističku obradu, ali i iz više sjemenih zametaka s pojedinačnog stabla radi moguće heteromorfности kromosoma XI.

Iz kombiniranog testa (tabela 26), u kojem su uspoređivani jednim testom svi kromosomi dvaju stabala vidimo, međutim, da nema razlike između kariotipova stabala »ni 221« i »sy 77«, kao niti između svakog od ovih stabala i njihovog potomka »nisy 410«.

Ako se heteromorfność ovog kromosoma potvrdi u kasnijim istraživanjima na širem planu, to neće umanjiti vrijednost radova npr. Mihailescu & Dalu (1971) koji su utvrdili signifikantne razlike u duljini kromosoma IX i XII između različitih provenijencija crnog bora, ili Saylor-a (1964) koji navodi da nije bilo značajne razlike unutar kariotipa pojedine vrste od 19 istraživanih vrsta borova grupe *Lariciones*, što mu je dalo opravdanje da radi skupne kariotipove za pojedine vrste, te donosi i skupni idiogram za borove grupe *Lariciones*. Simak (1962) u 8 različitih provenijencija ariša *Larix decidua* Mill. nije utvrdio razlike u kariotipu, te je koristio podatke dobivene analizom svih 8 provenijencija za izradu jednog zajedničkog kariotipa, naglašavajući u svom radu taj podatak i imajući na umu heterozigotnost takvog materijala. Rezultati istraživanja ovih autora i brojni drugi koje sam do sada već citirao, imaju svoje opravdanje u načinu istraživanja, primjenjenoj tehnici, pristupu i slično, te su vrijedan prilog znanosti. Informacija o citotaksonomskim obilježjima neke sistematske skupine može poslužiti u budućnosti za detaljnija molekularna istraživanja na nivou nukleinskih kiselina ili primjenu nekih do sada nepoznatih metoda rada na području biotehnologije.

S obzirom da su ili omjeri krakova ili centromerni indeksi u pojedinim citološkim radovima često korišćeni kao karakteristika kariotipa koja definira položaj centromere na kromosomima, u svojim sam istraživanjima izračunavao obje ove vrijednosti, zato da mogu komparirati rezultate vlastitih istraživanja s rezultatima istraživanja autora koji u svom radu koristi odnosnu karakteristiku. U prvi mah bi se moglo zaključiti da je dovoljno odlučiti se za jednu od ove dvije karakteristike kariotipa da bi se mogli izvesti zaključci o centromeri na osnovu dobivenih rezultata, odnosno, da prilikom uspoređivanja rezultata dvaju kariotipova dobivenih računskom obradom omjera krakova ili centromernih indeksa, moramo dobiti identične sličnosti ili razlike, na istim kromosomima. Iz pojedinih tabela (18 i 23), gdje su istaknute statistički značajne razlike pojedinih morfoloških karakteristika kariotipova dvaju stabala, vidimo da se omjeri krakova i centromerni indeksi uglavnom podudaraju, ali i da se mogu razlikovati, tj. da se ne radi o morfološkoj karakteristici koja uvijek u nekom slučaju na isti način definira položaj centromere nekog kromosoma.

U većini slučajeva došlo se do istih zaključaka korišćenjem omjera krakova i (ili) centromernih indeksa, ali npr. u tabeli 18 se razlikuju rezultati ispitivanja  $S/L$  i  $(S/S + L) \cdot 100$  vrijednosti između stabala »ni 47« i »ni 221« te »ni 47« i »de V 116« za kromosom XI, te u tabeli 23, kod usporedbe stabala »de V 116« i »nisy 410« za kromosom XII. Premda je tačno da i omjer krakova i centromerni indeksi definiraju istu

morfološku karakteristiku (položaj centromere pojedinog kromosoma), ipak rezultati testiranja omjerom krakova i centromernim indeksom se mogu razlikovati jer u svojim vrijednostima (po definiciji) sadrže druge mjere koje, koji puta, dovode do različitih rezultata testiranja položaja centromere definiranog omjerom kratkog i dugog kraka od položaja centromere definiranog omjerom kratkog kraka u odnosu na cijelu dužinu kromosoma. Te se razlike mogu tumačiti utjecajem greške mjerenja koja se u većoj mjeri odražava u vrijednosti centromernog indeksa jer je u izmjerenoj vrijednosti cijele dužine kromosoma ponekad sadržana greška koja svojom (makar neznatnom) veličinom prelazi prag signifikantnosti, tj. vrijednost određenu dogovorom. Iz toga bi mogli zaključiti da je u kariološkim istraživanjima i u ovom slučaju nužna standardizacija i dogovor o izboru samo jedne od ovih dviju mjera za definiranje položaja centromere. Omjer krakova bi na osnovi ovakovog zaključivanja bila pogodnija mjera i dovoljna za definiranje položaja centromere, ukoliko bi se dogovorno uvijek ta računaska morfološka karakteristika prezentirala u kariološkim radovima. Smatram je pogodnijom za kariologiju borova jer je manje opterećena sistematskom greškom mjerenja.

#### *Kombinirani test — Combining test*

Nakon provedenog T testa za svaki pojedinačni kromosom svakog para istraživanih stabala i detaljne analize uočenih razlika, testirani su kompletni kariotipovi svakog para stabala tzv. kombiniranim testom, kojim je testirana hipoteza o nepostojanju razlike između parova kariotipova na osnovu međusobno nezavisnih T statistika koje su testirale istu hipotezu. Test je proveden samo za ukupne duljine kromosoma i predstavlja »grubi« uvid u razlike između kariotipova. Služi za donošenje generalne odluke o razlikama između kariotipova dvaju stabala na osnovu prethodno obavljene analize razlike pojedinačnih kromosoma dvaju stabala T-testom, a zasnovan je na slijedećem (Winer 1970):

Imamo, za testiranje iste hipoteze seriju eksperimenata provedenih na različitim mjestima ili u različito vrijeme. (U ovom slučaju to predstavlja hipotezu da se dva stabla u kariotipu međusobno ne razlikuju, a hipoteza se ispituje testiranjem razlika svakog od 12 kromosoma dvaju stabala, te je npr. kromosom I eksperiment broj 1, kromosom II eksperiment broj 2 itd. Ukupno imamo dakle 12 različitih eksperimenata kojima testiramo istu hipotezu — da li se dva stabla razlikuju po svojim kariotipovima). Pretpostavimo da su uzorci u svakom od ovih eksperimenata nezavisni (u svakom eksperimentu odgovarajući kromosom potiče iz druge stanice tj. uzorka). Ako su  $P_1, P_2, \dots, P_k$  (u našem primjeru to su »2-TAIL PROB.« vrijednosti obilježene i izračunate elektroničkim računalom u npr. tab. 28) vjerojatnosti rezultata eksperimenta uz istinitost hipoteze  $H_0$ , za donošenje generalne odluke može se u tom slučaju koristiti slijedeća statistika:

$$\chi^2 = 2 \sum_{i=1}^k u_i, \quad \text{gdje je } u_i = -\ln P_i \quad (1)$$



Pod pretpostavkom da su dobivene vjerojatnosti slučajni uzorak iz populacije vjerojatnosti s prosjekom 0,5 (tj. da su simetrično distribuirani oko te vrijednosti),  $\chi^2$  statistika u (1) je varijabla približno distribuirana po hi-kvadrat distribuciji sa stupnjem slobode 2 k.

Primjer testiranja kombiniranim testom razlike između dva kariotipa (ukupnih duljina kromosoma dvaju stabala) je u tabeli 25. Tabela sadrži rezultate dvanaest nezavisnih testova i to: broj kromosoma,  $t_i$  vrijednosti T statistike za svaki od njih i njihove pripadne vjerojatnosti  $P_i$ . Za svaki  $P_i$  izračunata je vrijednost  $u_i = -\ln P_i$ . Dvostruka suma  $u_i$  vrijednosti je  $2 \cdot 19,607742 = 39,215484$  i predstavlja  $\chi^2$  vrijednost. Broj stupnjeva slobode za hi-kvadrat distribuciju je  $2k = 2 \cdot 12 = 24$ . Uz taj broj stupnjeva slobode tablična  $\chi^2$  vrijednost uz vjerojatnost  $P > 0,95$  iznosi 36,415, a za  $P > 0,99$  iznosi 42,980. Kako je dobivena vrijednost  $\chi^2 = 39,22$  između tih dviju, možemo tvrditi da je nul-hipoteza, koja tvrdi da nema bitne razlike u kariotipovima dvaju istraživanih stabala, odbačena. Ovaj zaključak u analizi ukupnih duljina kromosoma ovih dvaju stabala donosimo s pouzdanošću većom od 95%, a manjom od 99%.

Kombinirani test proveden je za svaki par istraživanih stabala za ukupne duljine kromosoma. Rezultati su prikazani u tabeli 26. Vidimo da se općenito može reći kako se kariotipovi pojedinačnih istraživanih stabala razlikuju, osim u slučaju stabla »ni 366« koje se bitno ne razlikuje po kariotipu niti od jednog od ostalih stabala. Ovaj test također pokazuje da se najviše razlikuju kariotipovi stabala »de V 116« i »nisy 410« od ostalih kariotipova, ali ne govori o tome u čemu su te razlike. Na osnovu ranije izloženih rezultata, detaljnije analize i diskusije (tabele 23 i 24) znamo u kojim pojedinostima se kariotipovi tih stabala razlikuju od ostalih kariotipova. Zanimljivo je međutim, da nema razlike između roditeljskih stabala »ni 221« i »sy 77« i njihovog potomka »nisy 410«.

#### *Položaj i broj sekundarnih konstrikcija — The position and number of secondary constrictions*

Značajka kariotipa koja u radu često služi za identifikaciju kromosoma je pojavljivanje sekundarnih konstrikcija na određenom kraku nekog kromosoma. Mehra & Khoshoo (1956) su već pokazali da postoji različit broj sekundarnih konstrikcija između pojedinih vrsta borova. Međutim oni nisu utvrdili postojanje sekundarnih konstrikcija u meristemu korjenčića crnog bora. Vidaković (1958) u kariološkoj analizi meristema korjenčića sjemena crnog bora, običnog bora i njihovih hibrida, navodi da se u sekundarnim konstrikcijama nije mogla ustanoviti vjerodostojna razlika između navedenih vrsta. Natara-jan i sur. (1961) nazivaju dijelove kromosoma prema terminalnom kraju kraka koji su odijeljeni sekundarnom konstrikcijom — satelitom. Sve konstrikcije u običnog bora nalaze na kratkim krakovima kromosoma I, II, VI, VII i X. U interfaznim jezgrama nalaze nekoliko do 8—9 nukleolusa. Nekonzistentnost u pojavljivanju sekundarnih konstrikcija spominje i Yim (1963), prikazujući kariotip iz korjenčića *Pinus rigida* Mill.

Tab. 25. Primjer testiranja ukupnih duljina kromosoma stabala ni 47 i ni 221 primjenom kombiniranog testa — Combining test of total chromosome lengths for the trees ni 47 and ni 221.

Kromosom Chromosome No.	$-t_i$	$P_i$	$u_i = -\ln P_i$
1	0.04	0.966	0.0345914
2	1.96	0.058	2.8473123
3	1.38	0.176	1.7372713
4	1.21	0.236	1.4439235
5	1.09	0.285	1.2552661
6	0.85	0.403	0.9088187
7	1.90	0.066	2.7181005
8	0.85	0.404	0.9063404
9	-0.03	0.976	0.0242927
10	-1.68	0.101	2.2926348
11	-1.69	0.101	2.2926348
12	-2.10	0.043	3.1465552
			$\Sigma = 19.6077419$

Hipoteza  $H_0$  - Hypothesis  $H_0$  : Nema bitne razlike u kariotipovima stabala ni 47 i ni 221 - There is no difference between ni 47 and ni 221 tree karyotypes.

Hipoteza  $H_1$  - Hypothesis  $H_1$  : Kariotipovi stabala se razlikuju - Tree karyotypes differ.

Hipoteza  $H_0$  se prihvaća kao istinita ako je izračunata vrijednost varijable  $\chi^2$  nesignifikantna, tj. ako je manja od praga signifikantnosti  $\chi^2_{0.95} = 36.415$  uz broj stupnjeva slobode  $2k=24$ . Pouzdanost ovakovog zaključivanja je 95 %. -  $H_0$  hypothesis is considered to be true if calculated  $\chi^2$  is insignificant, i.e. if it less than  $\chi^2_{0.95} = 36.415$  level of significance with  $2k=24$  degrees of freedom. Reliability of such conclusion is 95 %.

Ako je izračunati  $\chi^2$  signifikantan, tj. veći od praga signifikantnosti  $\chi^2_{0.95} = 36.415$ , prihvaćamo hipotezu  $H_1$  - If calculated  $\chi^2$  is significant, larger than  $\chi^2_{0.95} = 36.415$  level of significance, hypothesis  $H_1$  is accepted.

Budući da je u ovom primjeru izračunati  $\chi^2 = 2 \cdot 19.6077419 = 39.22$ , a to je veće od  $\chi^2_{0.95}$ , zaključujemo da je istinita hipoteza  $H_1$  - Since calculated  $\chi^2$  is  $\chi^2 = 2 \cdot 19.6077419 = 39.22$ , larger than  $\chi^2_{0.95}$ , hypothesis  $H_1$  is accepted.

Tab. 26. Testiranje kariotipova (ukupnih duljina kromosoma) za svaki par istraživanih stabala tzv. kombiniranim testom — Testing of karyotypes (total chromosome lengths) of each pair of investigated trees, using the combining test.

Broj stabla Tree no.	ni 47	ni 221	ni 366	sy 367	sy 77	de V 116	nisy 410	Tablične $\chi^2$ vrijednosti Table values of $\chi^2$ Stupanj slobode = 24 Degree of freedom = 24
ni 47		39.215*	19.525	25.792	28.370	24.497	46.675**	$\chi^2_{0.95} = 36.415$
ni 221	39.215*		22.957	39.832*	19.646	44.414**	17.104	
ni 366	19.525	22.957		26.149	23.273	24.899	22.541	
sy 367	25.792	39.832*	26.149		18.185	40.036*	44.844**	
sy 77	28.370	19.646	23.273	18.185		40.699*	24.787	
de V 116	24.497	44.414**	24.899	40.036*	40.699*		32.426	
nidy 410	46.675**	17.104	22.541	44.844**	24.787	32.426		$\chi^2_{0.999} = 51.179$

\* Razlika u kariotipu (ukupnoj duljini kromosoma) istraživanih stabala s pouzdanošću od 95% i \*\* 99% — Significant karyotype differences (total chromosome lengths) at the 95% and \*\* 99% level.

Saylor (1964), prikazuje kariotip crnog, običnog i japanskog crvenog bora (uz brojne druge vrste borova) na osnovi 6 stanica iz korjenčića 6 klijanaca crnog bora, 13 stanica iz korjenčića 8 klijanaca običnog bora i 10 stanica iz korjenčića 6 klijanaca japanskog crvenog bora. Za crni bor navodi konstrikcije na medijalnom dijelu kraćeg kraka kromosoma I, medijalnom dijelu duljeg kraka kromosoma II, IV i V i na proximalnom dijelu duljeg kraka kromosoma VI. Ukupno navodi 5 sekundarnih konstrikcija za crni bor. Obični bor varira u pojavljivanju sekundarnih konstrikcija kada komparira vlastite rezultate s rezultatima Aass (1957) i Natarajan-a i sur. (1961). Iznosi da je sekundarne konstrikcije nalazio na kratkom kraku kromosoma I i X, i na dugom kraku kromosoma II, te da su konstrikcije na medijalnom dijelu krakova. Za japanski crveni bor navodi samo dvije sekundarne konstrikcije na medijalnom dijelu dužih krakova kromosoma I i II.

Pravdin (1964) prikazuje kariotip običnog bora idiogramom sa sekundarnim konstrikcijama na kromosomima I, II i VI.

Pederick (1970), prikazuje brojne konstrikcije (sekundarne i »tercijarne«) na svakom pojedinom kromosomu na osnovi desetak stanica endosperma s jednog stabla crnog bora, demonstrirajući vrijednosti sekundarnih i tercijarnih konstrikcija za analizu kariotipa i identifikaciju kromosoma. U radu Borzan (1977a), prikazao sam komparativne rezultate vlastitih istraživanja, Pederick-a (1970) i Saylor-a (1964) o broju i položaju sekundarnih konstrikcija na kromosomima crnog bora.

Tarnavski i Ciobanu (1965) su objavili rezultate istraživanja dvaju varijeteta crnog bora. Njihovi se rezultati veoma razlikuju od rezultata istraživanja drugih autora. Za *Pinus nigra* Arn. ssp. *nigricans* Host var. *banatica* Georg. et Ionescu navode da ima 7 pari izobrahijalnih (kromosomi I, II, III, VI, VII, VIII i XII) i 5 pari heterobrahijalnih (kromosomi IV, V, IX, X i XI) kromosoma, ne navodeći u radu kriterije za heterobrahijalnost, niti broj stanica na osnovu kojih su radili analizu. Kromosome I, II, III i IX nazivaju SAT-kromosomima, jer imaju sekundarnu konstrikciju, koja je na kromosomu IX locirana na kratkom kraku. Za *Pinus nigra* Arn. var. *austriaca* Hoess navode 9 izobrahijalnih i 3 heterobrahijalna kromosoma (IV, XI i XII), a SAT-kromosomi su I, II, III i V. Indikativno je da je u tom radu kromosom XII varijeteta *banatica* svrstan među izobrahijalne, a varijeteta *austriaca* među heterobrahijalne, dok se ostali autori slažu u tome da kromosom XII svrstaju među heterobrahijalne (= submetacentrične ili sa submedijalno smještenom centromerom).

Fahmy (1966), prikazuje za obični bor »četiri para kratkih (7—10  $\mu\text{m}$ ) kromosoma, bez sekundarnih konstrikcija sa submedijalnom centromerom (kromosomi IX, X, XI i XII), zatim šest pari srednje velikih (11—13  $\mu\text{m}$ ) kromosoma, od kojih su dva para s medijalnom, a četiri sa submedijalno smještenom centromerom. Među potonjima tri para kromosoma imaju sekundarnu konstrikciju. Dva preostala para kromosoma (I i II) su 13 do 15  $\mu\text{m}$  dugi sa submedijalno smještenom

centromerom, a jedan par ima sekundarnu konstrikciju«. Isti autor spominje i da interfazne jezgre imaju 6—8 nukleolusa.

Mihailescu i Dalu (1972), analizirali su dvije provenijencije običnog bora, zatim jedan mješoviti uzorak običnog bora i jedan uzorak crnog bora. Zaključuju da su kromosomi crnog bora u pravilu kraći od kromosoma običnog bora i navode razlike u duljini pojedinih krakova kromosoma I, II, VI i XII. U dvije provenijencije običnog bora nalaze sekundarne konstrikcije na kratkim krakovima kromosoma I, II, III, V, VI, IX i X, te na dugom kraku kromosoma IV. U »mješanom« uzorku običnog bora nalaze iste konstrikcije, osim na kromosomu V, koji je bez konstrikcije. Na crnom boru su našli samo 6 sekundarnih konstrikcija na kratkim krakovima kromosoma I, II, III, IV, IX i X.

Kormutač (1975), piše da crni bor nema sekundarnih konstrikcija, dok obični bor ima dvije sekundarne konstrikcije.

Martinović (1978), je objavio da je od vrsta *Pinus sylvestris*, *P. nigra*, *P. mugo*, *P. baksiana* i *P. flexilis* samo na jednom paru kromosoma bora *P. flexilis* našao sekundarnu konstrikciju.

Muratova (1978a) je objavila da broj sekundarnih konstrikcija u borova *Pinus sibirica* Du Tour, *P. pumila* Rgl., *P. koraiensis* Sieb. et Zucc. i *P. sylvestris* L. varira od 4 (u *P. koraiensis*) do 7 (u *P. sibirica*).

Mac Pherson i Filion (1981), prikazuju na idiogramu crnog bora četini kromosoma sa sekundarnom konstrikcijom na dugom kraku, dva s konstrikcijom na kratkom kraku, jedan kromosom s dvije konstrikcije na dugom kraku, jedan kromosom s dvije konstrikcije na kratkom kraku i jedan kromosom (X) s po jednom konstrikcijom na kratkom i na dugom kraku. Ukupno 12 konstrikcija, a kromosomi I, VI i XII nemaju konstrikcije. Njihov je rad vrlo interesantan, jer pored klasične metode rada koriste i Giemsa C-banding metodu, te nalaze da je konstitutivni heterokromatin vezan za sekundarne konstrikcije, ali da ima sekundarnih konstrikcija uz koje nije bilo C-pruganja (konstitutivnog heterokromatina). Nukleolusi su uvijek bili uz sekundarne konstrikcije, ali im je broj bio manji od ukupnog broja konstrikcija (ima ih 6). Nažalost, autori ovog rada ne navode broj analiziranih stanica na temelju kojih su izradili idiograme sa sekundarnim konstrikcijama i sa C-prugama. Preparate su radili iz meristema korjenčića i iz endosperma u razvoju.

Na temelju sedam analiziranih stanica japanskog crvenog bora i deset analiziranih stanica *Pinus thunbergii* Parl., Shidei & Moromizato (1965), prikazuju sekundarne konstrikcije na slici somatskih stanica *Pinus thunbergii*, ali ne i u kariotipu prikazanom numerički i idiogramom. Veću pažnju obraćaju na razlike u duljinama krakova kromosoma X i XI pa navode da je kromosom XI japanskog crvenog bora kraći od kromosoma X, ali da su im dugi krakovi jednake duljine. Iz idiograma (slika 17) naznačio sam položaje četiriju konstrikcija na kratkim krakovima kromosoma I, II, IX i X, a sve opažene konstrikcije u ramete »de V 116« na shematskom prikazu u slici 32. Na idiogramu (slika 17) je dugi krak kromosoma XI neznatno kraći od dugog kraka kromosoma X što se slaže s navodom Shidei-a & Moromizato-a.

Moromizato, Shidei & Yamashita (1972), su detaljno analizirali kariotip japanskog crvenog bora i japanskog crnog bora (*Pinus thunbergii* Parl.) uz primjenu statističkih metoda obrade podataka. Idiogram japanskog crvenog bora prikazuju prema morfološkim karakteristikama kromosoma, pa su im prva tri kromosoma sa sekundarnom konstrikcijom, slijedećih sedam kromosoma je podjednakih krakova, a dva kromosoma su submetacentrična. Konstrikcije se nalaze na dugim krakovima kromosoma I i IV i kratkom kraku kromosoma VIII, ako bi redosljed bio uređen prema padajućem nizu ukupne duljine kromosoma.

Ovaj pregled kroz literaturu ukazuje na velika neslaganja u pojavljivanju, broju i položaju sekundarnih konstrikcija u crnog i običnog bora (premda to nije karakteristično samo za ove dvije vrste borova), od najranijih pa sve do najnovijih istraživanja, ovisno o autoru koji je radio na analizi kariotipa. Karakteristično je da većina autora ističe nekonzistentnost u pojavljivanju konstrikcija u vlastitom materijalu, pa Saylor (1961), naglašava da su sekundarne konstrikcije poslužile samo za dodatnu determinaciju parova kromosoma, ali da nisu mogle poslužiti kao glavni kriterij za identifikaciju, jer ih nije bilo moguće dosljedno otkrivati.

U idiograme (slike 12, 13, 14, 15, 16, 17 i 18) ucrtao sam sekundarne konstrikcije na kromosomima na kojima su se najčešće javljali na istom kraku i na približno istom mjestu u barem 8 stanica od 18 analiziranih, ili su barem u četiri stanice registrirane kao prominentne sekundarne konstrikcije. Vodio sam računa da u idiogram ne ucrtam veći broj konstrikcija od najvećeg broja jasno opaženih konstrikcija u pojedinoj stanici. Za svih sedam stabala u tabeli 27 prikazujem za svaku stanicu broj prisutnih prominentnih konstrikcija. Vidimo da taj broj varira od 0 do 10 (u granicama do 9 se često kreće i broj opaženih nukleolusa). U dvije do tri stanice (od 18 analiziranih) svakog stabla, nalazio sam po jedan do dva kromosoma s dvije jasne konstrikcije, od kojih je redovito jedna bila izrazito prominentna, a druga nešto slabije izražena. Takvu stanicu prikazujem na slici 5, gdje kromosom II na dugom kraku pokazuje jasnu, prominentnu konstrikciju, a na kratkom kraku nešto slabije izraženu sekundarnu konstrikciju.

Ove nedosljednosti u pojavljivanju konstrikcija na nekom određenom kromosomu kao i razlike broja konstrikcija iz stanice u stanicu proizlaze zbog podjednakih duljina većine kromosoma i variranja u duljini pojedinog kromosoma što zajedno povlači kao posljedicu zamjenu u redosljedu kromosoma ili zamjenu krakova, odnosno netočnu identifikaciju. Česta pojava da se kromosomi u pojedinim preparatima preklapaju na mjestima gdje se eventualno nalaze konstrikcije, također je jedan od razloga da se u stanicama registrira različit broj konstrikcija. Ipak, vjerojatno najčešći razlog da se ne mogu u svim stanicama na istom kromosomu, na istim mjestima registrirati konstrikcije je u različitim stadijima diobe analiziranih stanica, tj. zbog različitog stupnja kontrakcije pojedinih kromosoma. To, a i razlike u obojenosti pojedinih

Tab. 27. Prikaz ukupnog broja prominentnih konstrikcija opaženih u svakoj analiziranoj stanici pojedinog stabla. Broj prominentnih konstrikcija (jasno uočljivih sekundarnih suženja) se kretao od 0 do 10 po stanici — Presentation of the total number of prominent constrictions noted in every analysed cell of each tree. The number of prominent constrictions (clearly visible secondary constrictions) varied from 0 to 10 per cell.

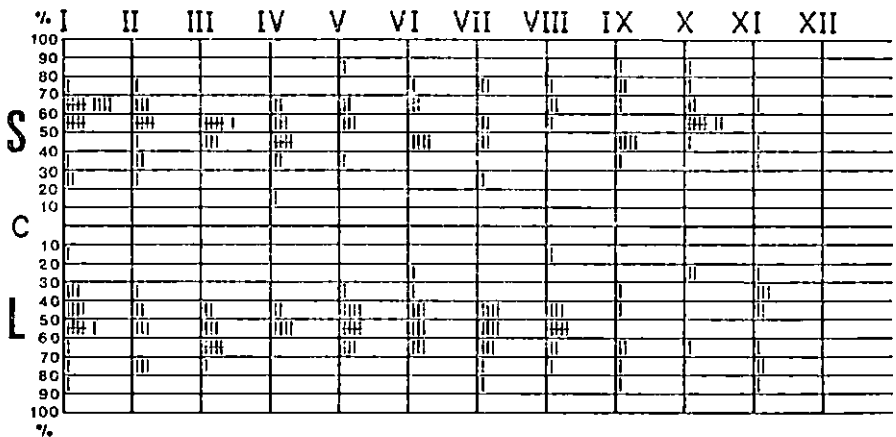
Red. br. stanice Cell no.	Ukupan broj prominentnih konstrikcija Total number of prominent secondary constrictions						
	ni 47	ni 221	ni 336	sy 367	sy 77	de V 116	nisy 410
1	8	6	6	6	2	8	4
2	6	7	4	2	4	8	8
3	8	6	2	2	5	3	7
4	3	6	3	3	6	4	5
5	4	6	2	3	7	4	2
6	6	6	0	3	5	3	10
7	7	7	0	4	3	3	6
8	6	5	3	1	5	3	6
9	5	4	0	3	7	2	5
10	7	5	2	4	2	8	8
11	6	8	1	4	4	2	4
12	6	4	0	2	5	5	5
13	1	4	4	5	7	2	5
14	4	5	2	3	4	3	4
15	5	6	2	7	7	6	10
16	5	7	7	3	2	5	3
17	6	8	2	7	4	4	8
18	3	7	9	6	6	6	3
$\Sigma$	96	107	49	68	85	79	103
Prosjek Average	5.33	5.94	2.72	3.78	4.72	4.39	5.72

nih preparata (stanica) uvjetovale su da u nekim stanicama nisu niti opažene prominentne konstrikcije (kod stabla »ni 366« npr., što se vidi iz tabele 27).

Međutim, unatoč ovim poteškoćama, teoretski je moguće na osnovi distribucije frekvencija odrediti kromosome koji imaju konstrikcije kao i položaje tih konstrikcija na mjestima gdje se najčešće javljaju, ako je rizik zamjene u redosljedu manji od 50%, a analizirani uzorak dovoljno velik.

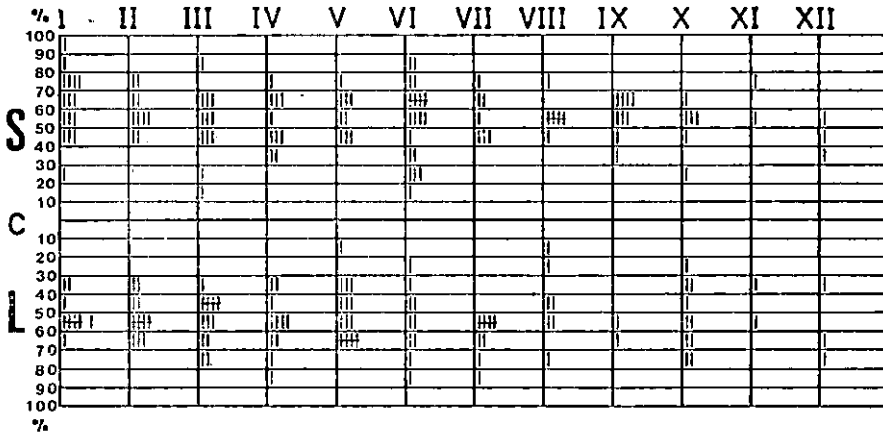
To je i odgovor na pitanje: »što učiniti kad se ustanovi da je ista konstrikcija jednom na kromosomu IX, a drugi put na kromosomu VI ili na nekom drugom kromosomu?« Logično je tada pripisati konstrikciju kromosomu na kojem se najčešće javlja, jer nisam uspio u pokušaju da samo na osnovi pojavljivanja konstrikcija na kromosomima pripisujem iste konstrikcije nekom kromosomu, te da nakon toga klasificiram kromosome u niz od I do XII. Stoga sam smatrao opravdanim da prikazem konstrikcije kao distribuciju frekvencija njihovog javljanja na kromosomima (slike 27, 28, 29, 30, 31, 32 i 33), smatrajući da će takav prikaz »uvažiti« rizik zamjene u redosljed u kromosoma, karakterističan za borove. Prema tome, rizik u pripisivanju konstrikcije nekom kromosomu neće biti veći od rizika zamjene u redosljed u kromosoma i zamjene krakova, pa konstrikcije koje se najčešće javljaju na nekom položaju, možemo smatrati onima koje su karakteristične za odnosni kromosom.

Nemogućnost identifikacije kromosoma samo na osnovi sekundarnih i tercijarnih konstrikcija proizlazi i iz činjenice da se prominentne konstrikcije redovito javljaju na medijalnom dijelu kraka, što znatno otežava identifikaciju. Ako bi se neka prominentna konstrikcija nalazila proksimalno ili distalno, identifikacija takvog kromosoma bila bi lakša i rizik zamjene u redosljed bi se mogao zanemariti. Čini se da će metoda oprugavanja (str. ??) pružiti tu mogućnost, jer se na pojedinim kromosomima (za sada sam to zapazio samo u crnog bora na jednom kromosomu) heterokromatinske regije nalaze ne samo oko centro-

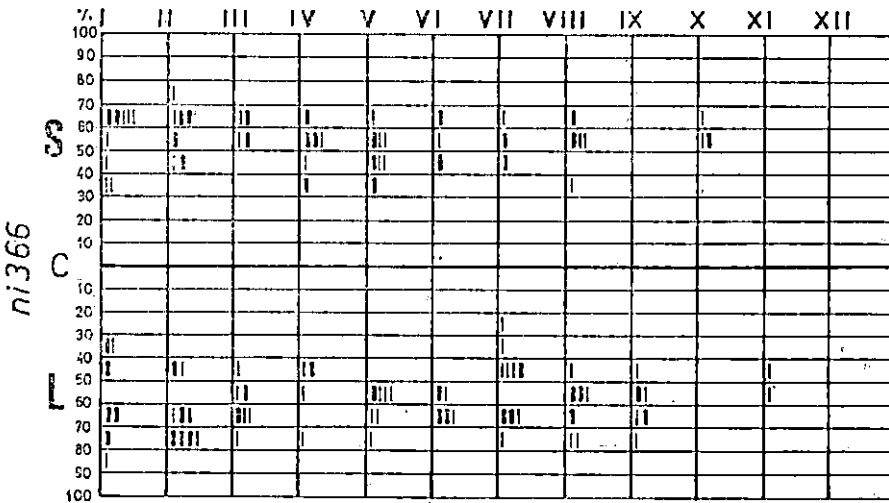


Sl. — Fig. 27. Shematski prikaz distribucije frekvencija sekundarnih i tercijarnih konstrikcija stabla crnog bora ni 47. Sve opažene konstrikcije bilježene su na osnovi analize kromosoma u 18 stanica endospermalnog tkiva u razvoju, na osnovi njihove relativne udaljenosti od centromere, kao postotak duljine kraka na kojem se nalaze (Borzan 1981) — A schematic presentation of the frequency distribution of secondary and tertiary constrictions of the European black pine tree ni 47. All noted constrictions in 18 endospermal cells are recorded as to their relative location (i. e. as a percentage of their distance from the centromere in relation to the entire length of the arm on which they are located (Borzan 1981).

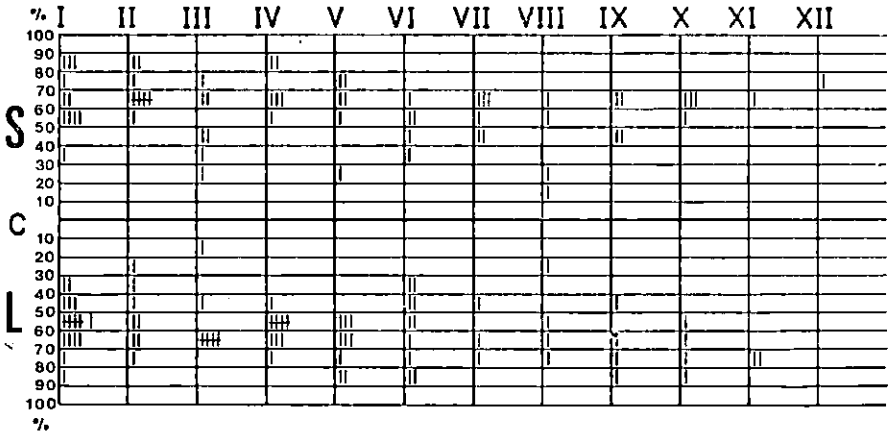




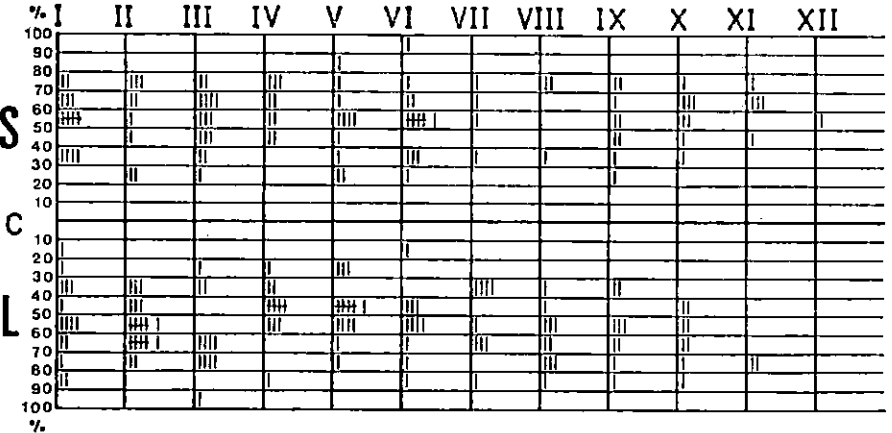
Sl. — Fig. 28. Shematski prikaz distribucije frekvencija konstrikcija na kromosomima u endospermu stabla crnog bora ni 221 (Borzan 1981) — A presentation of the frequency distribution of constrictions on chromosomes in the endosperm of the European black pine tree ni 221 (Borzan 1981).



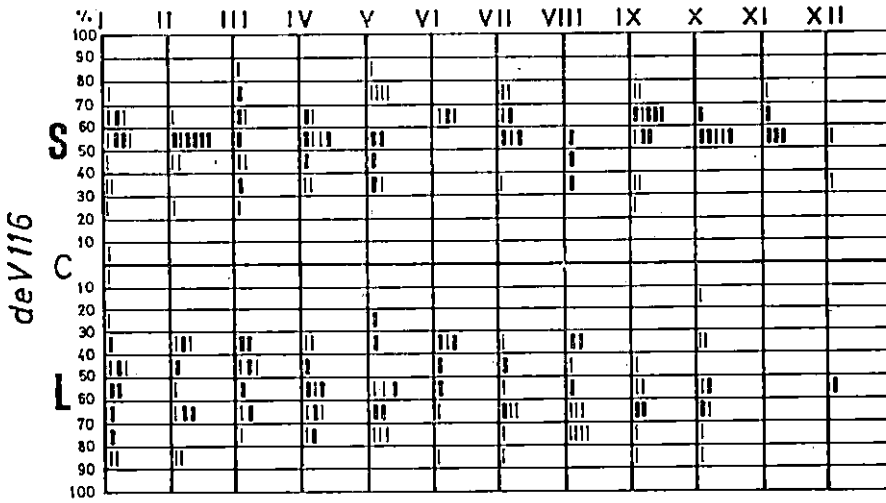
Sl. — Fig. 29. Shematski prikaz distribucije frekvencija konstrikcija na kromosomima u endospermu stabla crnog bora ni 366. Debljom linijom predstavljene su prominentne konstrikcije — A presentation of the frequency distribution of constrictions on chromosomes in the endosperm of the European black pine tree ni 366. The bar in bold-face presents prominent constriction.



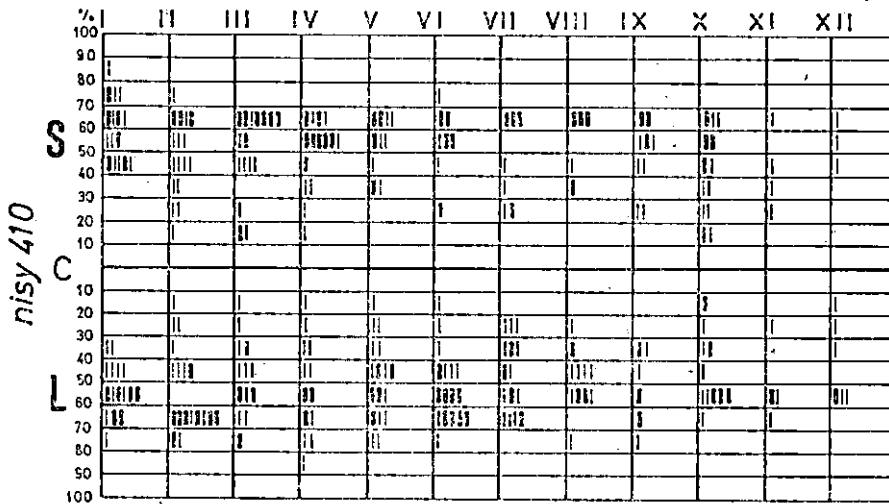
Sl. — Fig. 30. Shematski prikaz distribucije frekvencija konstrikcija na kromosomima u endospermu stabla običnog bora sy 367 (Borzan 1981) — A presentation of the frequency distribution of constrictions on chromosomes in the endosperm of the Scots pine tree sy 367 (Borzan 1981).



Sl. — Fig. 31. Shematski prikaz distribucije frekvencija konstrikcija na kromosomima u endospermu stabla običnog bora sy 77 (Borzan 1981) — A presentation of the frequency distribution of constrictions on chromosomes in the endosperm of the Scots pine tree sy 77 (Borzan 1981).



Sl. — Fig. 32. Shematski prikaz distribucije frekvencija konstrikcija na kromosomima u endospermu ramete japanskog crvenog bora de V 116. Debljom linijom su predstavljene prominentne konstrikcije — A presentation of the frequency distribution of constrictions on chromosomes in the endosperm of the Japanese red pine ramete de V 116. The bar in bold-face presents prominent constriction.



Sl. — Fig. 33. Shematski prikaz distribucije frekvencija konstrikcija na kromosomima u endospermu hibridnog stabla bora nisy 410. Debljom linijom su predstavljene prominentne konstrikcije — A presentation of the frequency distribution of constrictions on chromosomes in the endosperm of the hybrid pine tree nisy 410. The bar in bold-face presents prominent constriction.

mere i sekundarnih konstrikcija (Borzan & Papeš 1978, Mac Pherson & Filion 1981), nego se mogu javiti i na drugim dijelovima kromosoma (Borzan 1981). Na slici 35 jasno se vidi C pruga terminalno smještenog heterokromatina u stanici crnog bora.

### *Analiza anafaznih stanica — Analysis of the anaphase cells*

Detaljnju, uspješnu analizu anafaznih stanica prikazao sam ranije (Borzan 1977a, 1977b, Borzan & Papeš 1978), za crni bor i za obični bor (Borzan 1981). Rezultati analize se mogu na osnovi slika 34 a i b sažeti u sljedeće zaključke:

1. Kromatide istog para kromosoma mogu se nakon razdvajanja znatno razlikovati po svojim ukupnim duljinama.

2. Moguće su sticky veze između homolognih kromatida, između nehomolognih kromatida koje se kreću prema različitim polovima ili između nehomolognih kromatida koje ostaju u istoj stanici kćeri.

3. Posljedica sticky veze između homolognih kromatida ili nehomolognih kromatida koje putuju na razne polove mogu biti tzv. mostovi uočljivi u kasnim anafazama.

4. Anafazne stanice pogodne su također za analizu kariotipa, a osim karioloških podataka mogu pružiti i niz dodatnih informacija.

### STICKY KROMOSOMI — STICKY CHROMOSOMES

Analizom trajnih preparata tkiva ženskog gametofita u razvoju u cilju pronalaženja jezgara pogodnih za analizu kariotipa, otkrio sam povezanost nehomolognih kromosoma u preparatima evropskog crnog bora, običnog bora i japanskog crvenog bora (Borzan 1977b). Pojava je alternativno nazvana »sljepljivanje kromosoma« (stickiness) prema Rieger i sur. (1976) koji ovu pojavu definiraju kao vrst aglutinacije kromosoma koja rezultira piknotičkim ili ljepljivim izgledom kromosoma, a može dovesti do sljepljivanja (sticky adhesions) dvaju ili više kromosoma i nastajanja »sticky mostova« u anafazi.

Pojam »sticky kromosomi« upotrijebio je prvi Beadle (1932) smatrajući sticky kromosome tijekom mejoze i mitoze u nekim biljkama kukuruza odgovornim za aneuploidiju, fragmentacije kromosoma, translokacije i mutacije gena. Jedan od razloga isticanja alternativne upotrebe pojma sticky, leži i u tome da su neki autori za sličnu pojavu u mitozu koristili druge nazive. Melander (1963a, 1963b, 1963c), upotrebljava pojam »pseudo-hijazme«, a u radu iz 1965. godine »adhezije«, smatrajući pojavu sljepljivanja kromosoma normalnom među anafaznim kromosomima. Iznosi vjerojatnim tumačenje »pseudohijazmi« kao jednom od prvih stepenica u diferencijaciji stanice, jer je anafaze sa spojenim kromosomima nalazio u ranim stadijima razvoja embrija nekih planarija (*Paludicola*, *Tricladida*).

Sticky kromosome sam nalazio gotovo u svim preparatima crnoga, običnog, japanskog crvenog bora i hibrida *Pinus x nigrosylvis*. Ova je pojava činila poteškoće u točnom određivanju položaja centromere,

Tab. 28.

## T-TESTS BETWEEN TREES 47 &amp; 221 TOT LNG

CHR	TREE	NUMBER OF CASES	MEAN	STANDARD DEVIATION	STANDARD ERROR	F VALUE	2-TAIL PROB.	POOLED VARIANCE ESTIMATE			SEPARATE VARIANCE ESTIMATE		
								T VALUE	DEGREES OF FREEDOM	2-TAIL PROB.	T VALUE	DEGREES OF FREEDOM	2-TAIL PROB.
CHR 1	TREE 47	18	125.3673	8.576	2.021	1.03	0.851	0.04	34	0.866	0.04	33.99	0.808
	TREE 221	18	125.2443	8.706	2.052								
CHR 2	TREE 47	18	118.0387	4.304	1.015	1.45	0.453	1.58	34	0.058	1.96	32.90	0.059
	TREE 221	18	115.4583	3.577	0.843								
CHR 3	TREE 47	18	112.8184	4.537	1.068	2.39	0.082	1.38	34	0.178	1.38	29.12	0.178
	TREE 221	18	111.0582	2.937	0.692								
CHR 4	TREE 47	18	109.0482	3.568	0.841	1.92	0.180	1.21	34	0.235	1.21	30.94	0.237
	TREE 221	18	107.7382	2.576	0.507								
CHR 5	TREE 47	18	106.4348	3.442	0.811	2.51	0.088	1.08	34	0.285	1.09	28.89	0.287
	TREE 221	18	105.3836	2.173	0.512								
CHR 6	TREE 47	18	103.8315	2.407	0.587	1.14	0.794	0.85	34	0.403	0.83	33.88	0.404
	TREE 221	18	103.2336	2.237	0.532								
CHR 7	TREE 47	18	101.7260	2.762	0.651	1.08	0.872	1.90	34	0.088	1.90	33.95	0.087
	TREE 221	18	99.3144	2.673	0.677								
CHR 8	TREE 47	18	98.2429	3.231	0.782	1.25	0.648	0.85	34	0.404	0.85	33.58	0.404
	TREE 221	18	97.3700	2.898	0.681								
CHR 9	TREE 47	18	95.7874	3.748	0.883	1.22	0.685	-0.03	34	0.976	-0.03	33.67	0.976
	TREE 221	18	93.8235	3.331	0.789								
CHR 10	TREE 47	18	86.4825	3.438	1.282	1.21	0.664	-1.68	34	0.101	-1.68	33.62	0.102
	TREE 221	18	93.3349	4.868	1.152								
CHR 11	TREE 47	18	79.0233	5.913	1.394	1.94	0.182	-1.69	34	0.101	-1.69	30.84	0.102
	TREE 221	18	81.9157	4.244	1.000								
CHR 12	TREE 47	18	65.1369	5.884	1.387	1.10	0.847	-2.10	34	0.043	-2.10	33.82	0.043
	TREE 221	18	69.3685	6.170	1.454								

a čini se da je i jedan od uzroka istežanja ili kontrakcije pojedinih dijelova kromosoma. Stoga je osnovni kriterij za izbor jezgre pogodne za istraživanje, osim dobro raspoređenih kromosoma, bio i odsustvo sticky veza koje su dovodile u sumnju položaj centromere na pojedinim kromosomima.

Na osnovi opisa u radu, čini se da su sticky pojavu zapazili Sax & Sax (1933) u endospermu *Pseudolarix-a*: »U haploidnom kompleksu endospermalnog tkiva nekih stanica u diobi, zamijećena je homologija nekoliko kromosoma. U jednoj metafazi dva su kromosoma bila u kontaktu na svim mjestima, a nekoliko drugih kromosoma su bili blisko združeni u parove.«

Detaljno je ta pojava istražena i opisana za crni, obični i japanski crveni bor u radu Borzan (1977b). Karakteristično je da se sticky veze javljaju u profazama, metafazama i anafazama, te da im broj i jačina varira iz stanice u stanicu. Na slikama 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 11 i 19 mogu se zapaziti različiti oblici sljepljivanja kromosoma. Najčešće je spoj između dva kromosoma širok koliko iznosi debljina kromosoma ili je tanji. Često nalikuje na niti diobenog vretena pričvršćenog uz različite dijelove kromosoma (slika 1, kromosomi VI i VIII). Povezani mogu biti terminalni dijelovi dva kraka jednog kromosoma, medijalni dijelovi krakova različitih kromosoma, a moguća je i čvrsta veza između dva kromosoma, koja spaja više od 50% duljine oba kromosoma.

Vidljivo je povezivanje nekoliko kromosoma i postojanje dviju sticky veza na jednom kromosomu. Na mjestu postojanja veze dolazi do fleksije kromosoma. Ova činjenica govori u prilog prirodnog karaktera pojave, odnosno da se ne radi o artefaktu.

Koristeći se identificiranim kromosomima u analizi kariotipa crnog bora, pokušao sam ustanoviti da li se sticky veza javlja između određenih kromosoma. Nisam utvrdio nikakovu pravilnost ni ponavljanje, jer je u svakoj analiziranoj stanici bio povezan neki drugi par nehomolognih kromosoma (Borzan 1977b i 1977a).

Dosadašnja saznanja nisu pružila odgovor o naravi ove veze između nehomolognih kromosoma haploidnog tkiva endosperma u razvoju. Pojavu su često opisivali u mejozi (Andersson 1947, Klášterska & Natarajan 1975), smatrajući ju posljedicom mutacije gena (Beadle 1932) ili pojavom koju je moguće inducirati gama-zračenjem (Rao & Rao 1977). McGill i sur. (1974) su pokazali da je jedan od uzroka čestog pojavljivanja sticky kromosoma u kulturi tkiva stanica sisavaca — etidium bromid. Istražujući elektronskim mikroskopom oni utvrđuju da su kromosomi bili povezani submikroskopskim kromatinskim nitima različite širine. Stoga opisuju stickiness kao ispreplitanje kromatinskih niti između nehomolognih kromosoma. Slične rezultate su dobili Pathak i sur. (1975), kada su stanice kulture tkiva tretirali aktinomycinom D. Nasuprot ovim rezultatima, Marks (1973) je naveo da u mnogih vrsta, kada bi tijekom procesa izrade kromosomskih preparata iz korjenčića izostavio fiksiranje smjesom octene kiseline i etanola, u preparatima se nalazio manji broj sticky metafaza.

Indikativno je da je sticky veza vidljiva u preparatima rađenim Feulgen reakcijom, koja je specifična za DNK, te da u pojedinim sluča-

jevima slični na nit diobenog vretena. Stoga smatram da se radi o normalnoj pojavi u endospermu borova (a možda i drugih četinjača), za sada opaženoj u jezgrama cmog bora, običnog bora i japanskoga crvenog bora. S obzirom na to da se javlja u specijaliziranom staničju u razvoju, vrijedno je citirati Nagl-a (1966), koji pripisuje prekobrojnu DNK ovom tkivu kratkog vijeka, karakterizirajući ga u ontogenetskom razvoju doduše fiziološki visoko aktivnim, ali bez genetičke budućnosti. Za obični bor je citofotometrijskim mjerenjem ustanovio da pojedine jezgre imaju dvostruko veći sadržaj DNK od količine očekivane za haploidne jezgre, te da postoji pozitivna korelacija između sadržaja DNK u jezgri i volumena kromosoma. Čini se da se radi o politeniji (diteniji) kromosoma i možda bi s tog stanovišta trebalo usmjeriti istraživanja u pokušaju tumačenja sticky veza. Svakako da će daljnja istraživanja ovog fenomena biti usmjerena na korišćenje drugih načina fiksiranja, bojenja i prepariranja sjemenih zametaka u cilju utvrđivanja radi li se o pojavi arteficiojnelne prirode ili o refleksiji fiziološke aktivnosti ovog tkiva u razvoju. Razvoj raznih tehnika istraživanja na molekularnom nivou vjerojatno će također dati prilog tumačenju ove pojave. Već i dosadašnja saznanja iz ove oblasti dozvoljavaju pretpostavke i hipoteze kojima se sticky veze mogu tumačiti »prepoznavanjem« identičnih, homolognih dijelova repetitivnih sekvenci DNA u nehomolognim kromosomima.

#### GIEMSA METODA OPRUGAVANJA KROMOSOMA — GIEMSA C-BANDING PATTERNS OF CHROMOSOMES

S obzirom na poteškoće u identifikaciji pojedinih kromosoma borova (posebno iz grupe kromosoma II do IX), činilo se vrijednim primijeniti jednu od metoda diferencijalnog bojenja kromosoma, koje su se razvile posljednjih godina. Brojne metode bojenja s različitim quinacrin bojama koje fluoresciraju izložene UV svjetlu, kao i bojenje preparata Giemsa bojom postale su rutinske u citološkim istraživanjima, omogućavajući točnu identifikaciju pojedinih kromosoma i analizu polimorfizma kromosoma unutar i između vrsta. Osobito su razvijene ove metode u humanoj i animalnoj citogenetici. Neke od njih, kao npr. G-banding metodu, nije moguće primijeniti na biljne kromosome jer su ovi znatno kontrahirani od kromosoma viših vertebrata (Greilhuber 1977). Ove tvrdnje pobija novijim radom Drewry (1982) koji na primjeru *Pinus resinosa* primjenom tripsin Giemsa tehnike dokazuje mogućnost demonstriranja G pruganja kromosoma, izražavajući mišljenje da će se izmjenom metodologije i na biljnim kromosomima demonstrirati G bandovi.

Na osnovi dostupne literature bio sam upoznat s fluorochrom i Giemsa tehnikama bojenja (za preferencijalno bojenje konstitutivnog heterokromatina u kromosomima, »C-banding«), koje su primjenjivane za diferencijalno bojenje kromosoma nekih kritosjemenjača. Uočavajući prednosti tih metoda, odlučili smo pokušati primijeniti Giemsa C-banding metodu (Giemsa metodu oprugavanja) na kromosome borova,

da bi se izbjegle zamjene u redosljedu kromosoma, a time i pojednostavila analiza kariotipa i omogućila točna identifikacija pojedinih kromosoma. Tako bi imali na raspolaganju metodu za unutarvrstu i međuvrstu komparativnu analizu kariotipa borova, koja bi mogla biti važna sa stajališta inkompatibilnosti i kontrolirane hibridizacije, a osobito sa stajališta taksonomije i za kasniju komparaciju s rezultatima istraživanja na molekularnom nivou.

Primjenom metoda Greilhuber-a (1974), Linde-Laurse-n-a (1975) i Klačterska & Natarajan-a (1976) na meristem korjenčića proklimalnih sjemenaka borova, nisam uspio izazvati oprugavanje kromosoma. Zadovoljavajući je rezultat postignut primjenom metode opisane na strani 14, na endospermalni materijal stabla »ni 221« (Borzan & Papeš 1978). Od ukupno 10 preparata iz endosperma crnog bora koje smo tada izradili opisanom metodom, jasno izražene C pruge našli smo samo u dva preparata, dok su u ostalima, kromosomi bili prejak obojeni ili neobojeni. Zanimljivo je da su jezgre s prejak obojenim ili neobojenim kromosomima nađene i u dva spomenuta preparata koji su sadržavali kromosome s izdiferenciranim prugama. O sličnom variranju obojenosti kromosoma u različitim stanicama istog preparata ili u različitim preparatima iste serije (izrade) kada se primjenjuje metoda diferencijalnog bojenja, izvjestio je Schweizer (1974).

U raspravi o pitanju zašto se C metoda oprugavanja uspješno može primijeniti na kromosome u endospermu borova a ne i na kromosome u stanicama meristema korjenčića, potrebno je citirati Natarajan & Natarajan-a (1972), koji pišu da je za primjenu Giemsa ili quinacrine fluorescenc tehnike potrebno imati raspršene kromosome u jezgri oslobođenoj citoplazme, što je teško postići u stanicama korjenčića bez primjene hidrolize klorovodičnom kiselinom (HCl), a da hidroliza onemogućuje primjenu diferencijalnog bojenja kromosoma. Ipak, barijera koju predstavljaju membrane, može se ublažiti primjenom enzimskog tretiranja nakon hidrolize klorovodičnom kiselinom, kao što je učinio Merker (1973) koristeći 10%-tnu otopinu pektinaze u trajanju od 3—4 sata za stanice *Triticale* ili Sachan & Tanaka (1976) koji su koristili mješavinu otopine celulaze i pektinaze za stanice kukuruza. Slijedeća mogućnost leži u pronalaženju i primjeni pogodnih temperatura ili duljine tretiranja kemikalijama, koji faktori bi mogli biti dovoljni za izazivanje C pruga na kromosomima u stanicama meristema korjenčića, jer i Marks (1975) prikazuje rezultate diferencijalnog bojenja primjenjujući hidrolizu na korjenčice *Nigella damascena* u trajanju od 20 minuta s 45%-tnom otopinom kiselinom na temperaturi od 60° C. Smatra da je upravo ovaj korak bitan i najvažniji u primjeni Giemsa tehnike.

U borova, stadij slobodnih jezgara u diobi u endospermu u razvoju, lakše je izložiti djelovanju kemikalija za izazivanje pruga, jer nema membrana koje bi predstavljale prepreku. Iako je relativno mali broj preparata koje smo do sada izradili primjenom Giemsa C metode oprugavanja (10 za crni bor, 109 za obični i 61 za japanski crveni bor) i dobili mali broj preparata i stanica sa vidljivim heterokromatinskim



prugama (2 preparata za crni bor, 1 za obični i 2 za japanski crveni bor), dokazali smo, da je metodom koju smo koristili moguće diferencijalno bojiti kromosome borova. Ova metoda primijenjena na endospermalni materijal običnog bora 1979. godine, razlikovala se od opisane metode za crni bor, tako da je korišten fiksirani materijal čuvan u frižideru na  $+4^{\circ}\text{C}$  u 70%-tnom etanolu duže od 6 mjeseci. Preparati japanskog crvenog bora rađeni su 1981. godine na svježem materijalu.

Analiza preparata pokazala je da heterokromatina ima relativno malo, da se javlja centromerno na svim i u području sekundarnih konstrikcija na nekim kromosomima (slike 35, 36 i 37). Barem jedan od metacentričnih kromosoma crnog bora pokazuje terminalno smještenu prugu heterokromatina, što se vidi u metafazi na slici 35. Jasno je da takova terminalna pruga predstavlja »znak raspoznavanja« za taj kromosom, te bi u analizi kariotipa ovom metodom za ovaj kromosom bilo moguće ustanoviti točnu varijabilnost morfoloških karakteristika. Na drugom kraku tog istog kromosoma nalazi se heterokromatinska pruga u području sekundarne konstrikcije. Naravno da će se izradom većeg broja uspješnih preparata moći naći i analizirati jezgre s lijepo raspoređenim kromosomima koji se ne pokrivaju i za koje će biti moguće obaviti kompletniju analizu.

Premda su u japanskog crvenog bora kromosomi lijepo raspoređeni (slika 37), samo na temelju jedne stanice nije moguće sa sigurnošću načiniti idiogram ovog stabla sa naznačenim položajima pruga na pojedinim kromosomima. C heterokromatin oko centromera je slabije izražen, nalazi se i u području sekundarnih konstrikcija, a čini se i telomerno na barem jednom kromosomu (vjerojatno kromosomu X).

Kod običnog bora (slika 36), nisam bio u mogućnosti utvrditi prisustvo heterokromatina na terminalnom dijelu kromosoma. U preparatima je centromera diferencijalno obojena Giemsa C metodom oprugavanja često u obliku dvije jasno izražene tamne točke smještene okomito na os kromosoma. Sličan oblik diferencijalnog bojenja centromere opisuje i Marks (1977) kod *Nigella* kromosoma, razlikujući takav »pravi« centromerni »band« od pericentromeričkih, uz zaključak da se vjerojatno fundamentalno razlikuju. Na slici 37 centromerne pruge na kromosomima japanskog crvenog bora vezane za niti diobenog vretena na nekim kromosomima nisu deblje od niti diobenog vretena, te se vjerojatno i njih može uvrstiti u »prave« centromerne »bandove«.

Submetacentrični kromosomi se lako identificiraju (kromosomi XI i XII) u preparatima crnog, običnog i japanskog crvenog bora (slike 35, 36 i 37). Karakterizirani su jasno izraženom centromernom prugom i odsustvom pruga na krakovima. To se slaže s rezultatima analize kariotipa od prije (Borzan 1977a), kad je utvrđeno da kromosomi crnog bora XI i XII nemaju sekundarnu konstrikciju. Prikazane konstrikcije kromosoma XI i XII na slikama 27, 28, 29 i 30, javile su se u malom broju preparata. Njihova učestalost je veoma niska i slabo su vidljive. S tog razloga se mogu tumačiti i subjektivnim momentom u istraživanju ili zamjenom u redosljed s nekim prethodnim kromosomom, do čega ipak kod kromosoma XI i XII dolazi vrlo rijetko.

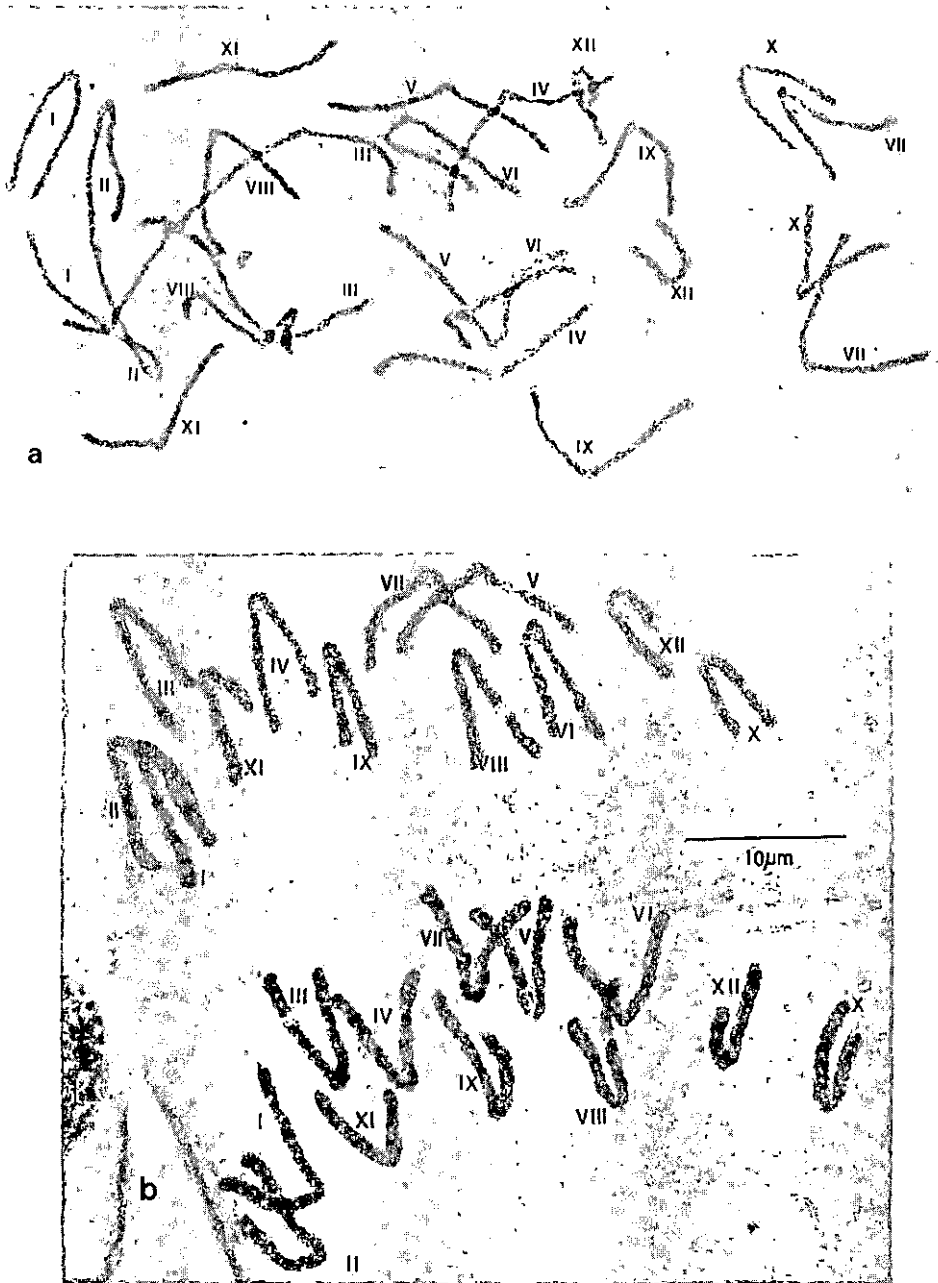
Diferencijalno obojenje kromosoma kriptomerije (*Cryptomeria japonica*) izazvano niskim temperaturama tijekom predtretiranja demonstriraju Schlarbaum & Tsuchiya (1981) s jasno obojenim tamnijim telomerama i područjem oko centromere na svim kromosomima, uglavnom istovjetnim u paru homologa. Giemsa C pruganje i oprugavanje kromosoma ove vrste fluorescentnim bojama (chromomycin A<sub>3</sub> i 4'-6-diamidino-2-phenylindole) postigli su Kondo & Hizume (1982) zaključivši da C pruge oko sekundarnih konstrikcija sadrže pretežno guanin, a da centromerne točke sadrže pretežno A—T bogatu DNA. Pruganje kromosoma u radu Kondo & Hizume-a (1982) pokazuje odsustvo telomernih bandova i bitno drugačije pruganje nego u radu Schlarbaum & Tsuchiya (1981) što je i razumljivo s obzirom na različito primijenjene metode rada. Kondo, Hizume & Kubota (1985) su utvrdili međuklonsko variranje japanskog crvenog bora u oprugavanju kromosoma VI i X primjenom fluorescentne boje chromomycin A<sub>3</sub>. Homologni par kromosoma VI je kod nekih klonova bio heteromorfan u pogledu pojavljivanja sekundarne konstrikcije (= fluorescentne pruge).

Hizume, Ohgiku & Tanaka (1983) su primijenili fluorescent metodu oprugavanja somatskih kromosoma crnog bora (*Pinus nigra* var. *maritima*) koristeći guanin specifičnu fluorokrom boju chromomycin A<sub>3</sub> i adenin — thymine specifičnu boju DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole). Smatraju da je ovom metodom moguće identificirati s pouzdanošću pojedinačne kromosome ove vrste. DAPI bojenjem su kromosomi pokazivali osim centromernih i interkalarnih pruga oko sekundarnih konstrikcija veći broj malih pruga interkalarno smještenih za koje pretpostavljaju da bi mogle odgovarati tercijarnim konstrikcijama.

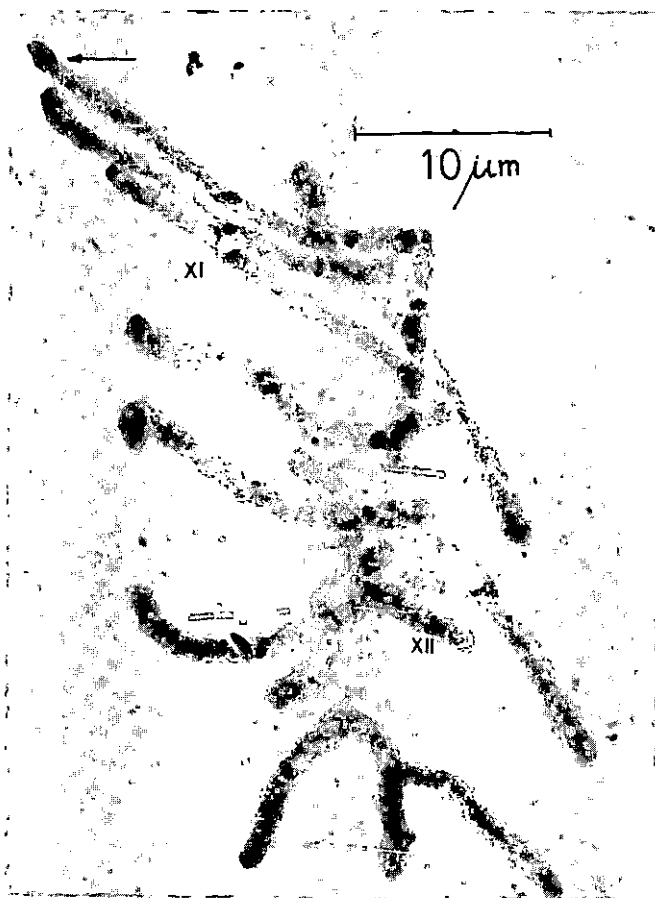
Čini se da je Muratova (1978) uspješno primijenila Giemsa C metodu oprugavanja na korjenčiće borova, jer u sažetku svog rada prezentiranog na XIV međunarodnom kongresu genetičara u Moskvi navodi da kromosomi borova pokazuju veoma uske heterokromatske regije u području centromere i nukleolarnih organizatora. Njezin opis odgovara rezultatima naših istraživanja na primjeni Giemsa C metode oprugavanja u tkivu endosperma.

Osim radova Borzan & Papeš (1978), Borzan (1979, 1981), Muratova (1978a), s uspješno primijenjenim Giemsa C oprugavanjem kromosoma crnog i običnog bora i kromosoma japanskog crvenog bora u ovom radu, Mac Pherson & Filion (1981) su ovu metodu uspješno primijenili na kromosome pet vrsta borova: *Pinus koraiensis*, *P. strobus*, *P. resinosa*, *P. nigra* i *P. banksiana*. Uspoređujemo li rezultate istraživanja u ovim radovima uočava se neslaganje u detaljima, jer Mac Pherson & Filion (1981) navode da kromosomi crnog bora II, IV, V, VI, VIII i XII nemaju pruge u području centromere, te da su interkalarne pruge vezane isključivo uz pojavljivanje sekundarnih konstrikcija, što naša istraživanja opovrgavaju, jer se u našim preparatima (slika 35) vidi interkalarna pruga u području telomere.

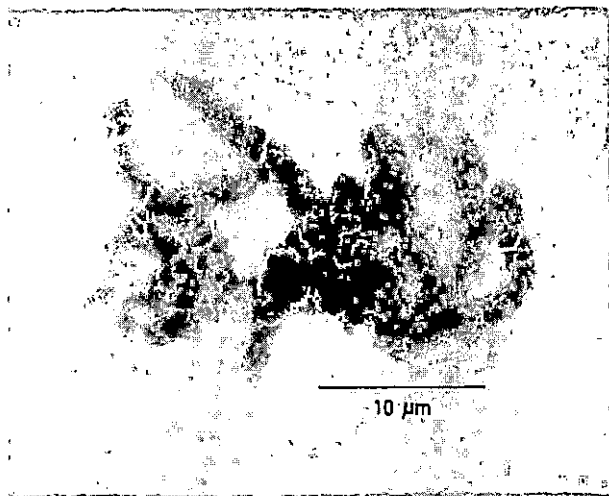
Na temelju izrađenih preparata pet vrsta borova grupe *Haploxylon* (navode poimenično samo *Pinus koraiensis* i *P. strobus*, te za ove dvije



Sl. — Fig. 34. Anafaza s identificiranim kromatidama u endospermu crnog bora (a) i običnog bora (b) — Anaphase with identified chromatids in the endosperm of the European black pine (a) and Scots pine (b) tree.



Sl. — Fig. 35. Pruganje kromosoma u endospermu crnog bora stabla ni 221 izazvano primjenom Giemsa C metode oprugavanja — Giemsa C banding patterns of chromosomes in the endosperm of the European black pine tree ni 221.



Sl. — Fig. 36. Pruganje kromosoma u endospermu običnog bora stabla sy 367 izazvano primjenom Giemsa C metode oprugavanja — Giemsa C banding patterns of chromosomes in the endosperm of the Scots pine tree sy 367.



Sl. — Fig. 37. Pruganje kromosoma u endospermu ramete japanskog crvenog bora de V 116 izazvano primjenom Giemsa C metode oprugavanja. Strelicom je obilježena terminalno smještena pruga vjerojatno na kromosomu X — Giemsa C banding patterns of chromosomes in the endosperm of the Japanese red pine ramete de V 116. Arrow indicates terminal heterochromatic band most probably on the chromosome X.

vrste prikazuju i idiograme s distribucijom C heterokromatina, a ne navode (koje su preostale tri vrste) smatraju da podrod *Strobis* nema pericentromeričkog heterokromatina u području centromere, te da se vjerojatno po ovoj karakteristici grupa *Haploxyton* razlikuje od grupe *Diploxyton*.

Tanaka & Hizume (1980) su u svom radu prikazali oprugavanje kromosoma *Cycas revoluta*, *Ginkgo biloba* i *Pinus densiflora*. Za japanski crveni bor navode da se pruge pojavljuju u centromernim regijama svih kromosoma i u medijalnom dijelu jednog od kračkovia kromosoma I, II, III, V, VI i X, te smatraju da su vjerojatno na položaju sekundarnih konstrikcija.

Ova istraživanja i istraživanja drugih autora se uglavnom slažu u tome da kromosomi borova imaju relativno malo konstitutivnog heterokromatina u odnosu na ukupnu duljinu kromosoma. Mislím da u ovoj fazi istraživanja još nije moguće generalizirati i zaključivati o distribuciji heterokromatina niti na nivou vrste, a pogotovo ne na nivou neke populacije ili sistematske grupe borova. Dosadašnja istraživanja bazirana su na premalenom broju preparata i malom broju stabala da bi mogli sa sigurnošću proširivati zaključke na nivou vrste, ali su vrlo značajna kao početna istraživanja ovom metodom i poticaj za daljnji rad. Smatram da metoda još uvijek nije u potpunosti usavršena, jer agresivnost kemikalija, dugotrajnost i kompliciranost metode rezultiraju malim brojem uspješnih preparata. Pretpostavljam da je to razlog što se u nekim stanicama ne može sa sigurnošću odrediti pruga na nekom kromosomu jer se često nalaze stanice s nekim kromosomima bolje i kontrastnije obojenim od drugih te je moguće da se neka pericentromerička, centromerna ili tanja interkalarna pruga slabije obojena, ne registriira kao C heterokromatin, ali će biti vidljiva u nekoj drugoj stanici ili preparatu istog stabla (uzorka). Radi malog broja uspješnih preparata s opruganim kromosomima ni za jedno stablo nisam načinio idiogram s distribucijom C heterokromatina na kromosomima.

Tijekom 1984. godine, boraveći u Jodrell Laboratory, radio sam s Giemsa C metodom oprugavanja koju je modificirala dr Ann Kenton prema Schwarzscher i sur. (1980). Izradio sam nekoliko preparata i uočivši prednosti ove metode, donosim je u cjelosti:

1. Sjemeni zamci se drže u 45% octenoj kiselini 15 minuta na sobnoj temperaturi.

2. Preparati se izrađuju squash tehnikom u kapi 45% octene kiseline. Pokrovnica se ukloni smrzavanjem ugljičnim dioksidom iz plinske boce, a predmetnice se odlažu preko noći.

3. Inkubacija preparata u 45% octenoj kiselini na 60° C, 25 minuta. Slijedi ispiranje tekućom vodom u trajanju od 15 minuta.

4. Inkubacija u 5% barijskom hidroksidu 10 minuta, svježe pripremljenom i filtriranom. Prilikom pripremanja barijskog hidroksida potrebno ga je mješati 1 sat prije upotrebe i filtrirati direktno na preparate u Coplin posudi. Kada se Coplin posuda prepuni, ovršina (površinski tanki sloj, film, barijskog hidroksida) se ukloni tako da se posuda pokrije petri poklopcem kliznim pokretom i ostavi pokrivena.

5. Pranje tekućom vodom 15—30 minuta i u destiliranoj vodi.
6. Inkubacija u  $2 \times SSC$  na  $60^{\circ}C$ , 1 sat i 50 minuta, a potom kratko ispiranje u tekućoj i destiliranoj vodi.
7. Bojenje 3—4% Giemsa bojom pripremljenom s kupovnim fosfatnim puferom (pH 6,8) u trajanju 30 minuta ili dulje.

S obzirom da je eksperimentalni dio istraživanja (izrada preparata i analiza) za ovaj rad bio dovršen 1983. godine, detaljnije praktične studije o prednosti jedne ili druge metode biti će moguće ukoliko se nastavi istraživanje kariotipova pojedinačnih stabala borova na Katedri za šumarsku genetiku i dendrologiju ili u nekom drugom laboratoriju.

#### ZAKLJUČAK — CONCLUSION

1. Statističkom obradom rezultata izmjere morfoloških karakteristika kromosoma borova na dovoljno velikom uzorku, moguće je razlikovati pojedinosti u kariotipovima pojedinačnih stabala.

2. Citotaksonomska istraživanja borova zahtijevaju sistematizaciju u radu i dogovor istraživača radi definiranja metoda i standardizacije rada, od izbora ožiljeva istraživanja, tkiva za izradu preparata, metode prepaniranja, načina obrade rezultata, definiranja fenotipskih karakteristika kromosoma koji se istražuju i slično. U suprotnom, i nadalje će biti teško uspoređivati rezultate istraživanja dva autora, a ocjena vrijednosti i interpretacija rezultata biti će moguća isključivo autorima pojedinog rada.

3. Za istraživana stabla ustanovljen je visok rizik zamjene u redosljedu kromosoma i zamjene krakova za kromosome II do IX, na temelju vrijednosti koeficijenata varijabilnosti, koji su za ove kromosome u svih sedam stabala najmanji, radi malih razlika u duljinama susjednih kromosoma i podjednake duljine krakova koju imaju navedeni kromosomi. Stoga razloga kromosomi I, XI i XII podliježu najmanjem riziku zamjene u redosljedu, jer su razlike u duljinama između njih ili između njih i susjednih kromosoma najveće, lako se identificiraju pa su i koeficijenti varijabilnosti njihovih duljina viši nego za kromosome II do IX. Iz tih razloga su i zaključci o rezultatima istraživanja koji se odnose na ove kromosome vredniji i značajniji za citotaksonomiju borova.

4. Poteškoće u identifikaciji pojedinih kromosoma i razlike prvenstveno u apsolutnim duljinama, a potom i u relativnim duljinama i položaju sekundarnih konstrikcija su izazvane: Različitim tipovima jezgara (kromosoma), ovisno o dijelu tkiva ženskog gametofita iz kojeg potiče analizirana stanica; diferencijalnom aktivnosti pojedinog kromosoma; različitim stadijama diobe analiziranih stanica; sticky pojavom koja može biti uzrok izmjenjenoj morfologiji kromosoma; razlikama u tehnici izrade preparata; fiksiranju materijala; lošem rasporedu kromosoma i drugo.

5. Kromosom XII u svih 7 istraživanih stabala je submetacentričan (uz definiciju Saylor-a (1961), da su kromosomi submetacentrični ako im je omjer krakova S/L manji od 0,75).



Tab. 29.

Broj stabla Tree number	Omjer krakova i klasifikacija Arm ratio and classification			
	Kromosom XI Chromosome XI		Kromosom XII Chromosome XII	
ni 47	0.670	Submetacentričan Submetacentric	0.611	Submetacentričan Submetacentric
ni 221	0.741	"	0.624	"
ni 366	0.708	"	0.606	"
sy 77	0.746	"	0.655	"
sy 367	0.719	"	0.735	"
de V 116	0.809	Metacentričan Metacentric	0.737	"
nisy 410	0.882	"	0.663	"

6. Kromosom XI je po svojim numeričkim vrijednostima omjera krakova za sva tri stabla crnog bora i oba stabla običnog bora submetacentričan, a metacentričan za rametu japanskog crvenog bora »de V 116« i hibridno stablo *Pinus x nigrosylvis* »nisy 410« (tabela 29). Na temelju detaljne analize morfologije kromosoma XI u pojedinačnim sjemenim zamecima, ustanovljeno je da se u pojedinim sjemenim zamecima mogu nalaziti metacentrični, a u drugim (istog stabla) submetacentrični kromosomi XI (tabela 30). Zaključeno je da je kromosom XI heteromorfan po vrijednosti omjera krakova ispod ili iznad granične vrijednosti 0,75, te je za pretpostaviti da mogu postojati i homozigotna stabla s obzirom na to svojstvo. Kod hibridnog stabla »nisy 410« u 16 od 18 analiziranih stanica, koje potiču sve iz istog ženskog gametofita, kromosom XI je metacentričan, a submetacentričnost kromosoma XI u preostale dvije stanice je protumačena nekom od »grešaka« u mjerenju (zbog manje ili veće kontrahiranosti pojedinog kraka kromosoma, sticky pojave, prekrivenosti drugim kromosomima i slično).

Heteromorfnost kromosoma XI mogla bi biti od značaja za citotaksonomiju borova.

7. Polikariogrami su prikladan grafički prikaz položaja centromere na kromosomima, osobito kada su veće razlike u morfologiji pojedinih kromosoma nekog kariotipa. Za svih 7 istraživanih stabala kromosom XII je kao submetacentričan izrazito izdvojen, kromosom XI kod pojedinih stabala, a ostali kromosomi (II do X) su za sva stabla grupirani u području metacentričnosti, u desnom dijelu grafičkog prikaza, što ukazuje na njihovu bazično sličnu morfologiju.

8. Testiranje karakteristika svakog kromosoma svakog para stabala F i T testom, ukazala je na statistički značajne razlike između pojedinih stabala u morfološkim karakteristikama pojedinih kromosoma. Analizom dugogodišnjih rezultata kontrolirane hibridizacije između pojedinih stabala crnog i običnog bora, nije se mogla ustanoviti korelacija

Tab. 30. Položaj centromere kromosoma XI za 4 istraživana stabla, ovisno o sjemenom zametku iz kojega je poticala analizirana stanica — Determined centromere positions of chromosome XI in four of investigated trees, depending on the ovule from which the analysed cell (chromosome XI) originated.

Broj stanice	Broj prep.	Omjer krakova	Položaj centromere	Broj prep.	Omjer krakova	Položaj centromere	Broj prep.	Omjer krakova	Položaj centromere	Broj prep.	Omjer krakova	Položaj centromere			
Cell number	Slide number	Arm ratio	Centromere position	Slide number	Arm ratio	Centromere position	Slide number	Arm ratio	Centromere position	Slide number	Arm ratio	Centromere position			
ni 221				sy 77				nisy 410				de V 115			
1	64	0.8400	Metacent.	125	0.8696	Metacent.	4598	0.9500	Metacent.	1838	0.8947	Metacent.			
2	"	0.7143	Submetac.	127	0.7143	Submetac.	"	0.7826	"	1844	0.7143	Submetac.			
3	"	0.7857	Metacent.	2864	0.8125	Metacent.	"	0.9091	"	"	0.7391	"			
4	75	0.6364	Submetac.	2865	0.7778	Metacent.	"	0.9524	"	"	0.6667	"			
5	118	0.7000	Submetac.	"	0.6538	Submetac.	"	0.6818	Submetac.	1845	0.7241	Submetac.			
6	2303	0.6923	Submetac.	2866	0.8000	Metacent.	"	1.000	Metacent.	1847	0.6667	Submetac.			
7	2332	0.5806	Submetac.	2881	0.6667	Submetac.	"	0.9474	"	628	0.8800	Metacent.			
8	2342	0.7419	Submetac.	2882	0.7778	Metacent.	"	0.8235	"	635	0.8400	Metacent.			
9	2350	0.6923	Submetac.	"	0.8636	"	"	0.8824	"	"	0.7500	Submetac.			
10	2358	0.8276	Metacent.	2973	0.6667	Submetac.	"	0.8261	"	645	0.7400	Submetac.			
11	2416	0.7273	Submetac.	2974	0.7368	Submetac.	"	1.0000	"	648	0.6957	Submetac.			
12	2417	0.7200	Submetac.	3030	0.6970	Submetac.	"	0.8824	"	"	0.7391	"			
13	2418	0.7778	Metacent.	3086	0.7826	Metacent.	"	0.9375	"	651	0.9167	Metacent.			
14	"	0.8400	Metacent.	"	0.6970	Submetac.	"	0.6636	"	657	0.8750	Metacent.			
15	2419	0.8000	Metacent.	3087	0.7368	Submetac.	"	0.8889	"	"	0.9000	"			
16	"	0.8438	"	"	0.6500	"	"	0.9167	"	"	0.9310	"			
17	2425	0.7778	Metacent.	"	0.7419	"	"	0.8947	"	660	1.0000	Metacent.			
18	2437	0.6452	Submetac.	"	0.7895	Metacent.	"	0.7273	Submetac.	675	0.8800	Metacent.			

u sklonosti pojedinih stabala ka međuvrсноj hibridizaciji i ustanovljenim razlikama ili sličnostima pojedinih morfoloških karakteristika kromosoma tih istih stabala. Faktori inkompatibilnosti između crnog i običnog bora karakterizirani su molekularnom razinom, te vjerojatno nisu izraženi u morfologiji kromosoma.

9. Pojavljivanje sekundarnih konstrikcija nije se moglo koristiti za identifikaciju pojedinih kromosoma, već se distribucijom frekvencije pojedinih konstrikcija na kromosomima i na temelju njihovog grupiranja, unosilo te vrijednosti u idiogram. Broj prominentnih sekundarnih konstrikcija je varirao u pojedinim stanicama od 0 do 10, ovisno uglavnom o stadiju diobe analizirane stanice ili dijelu tkiva ženskog gametofita iz kojeg je analizirana stanica poticala. Na pojedinim kromosomima mogu se nalaziti dvije jasno izražene konstrikcije.

10. Na temelju analize anafaznih stanica crnog i običnog bora može se zaključiti sljedeće:

— Anafazne stanice su također pogodne za analizu kariotipa, a osim toga mogu pružiti i niz dodatnih informacija.

— Kromatide istog para kromosoma mogu se nakon razdvajanja znatno razlikovati po svojim ukupnim duljinama.

— Moguće su sticky veze između homolognih kromatida, između nehomolognih kromatida koje se kreću prema različitim polovima ili između nehomolognih kromatida koje ostaju u istoj stanici kćeri.

— Posljedica sticky veze između homolognih kromatida ili nehomolognih kromatida koje putuju na razne polove mogu biti tzv. mostovi uočljivi u kasnim anafazama.

11. Sticky pojava kod ovih borova (otkrivena i opisana u ranijem radu, Borzan 1977b) se javlja u gotovo svim preparatima endospermalnog tkiva korištenom za ova istraživanja. Vjerojatno se radi o normalnoj pojavi u endospermu borova (a možda i drugih četinjača), tog fiziološki veoma aktivnog staničja u razvoju.

12. Na kromosome endospermalnog tkiva u razvoju crnog, običnog i japanskog crvenog bora uspješno je primjenjena metoda diferencijalnog bojenja kromosoma (Giemsa C banding metoda). S obzirom na veličinu kromosoma borova, u njima je relativno malo konstitutivnog heterokromatina (C heterokromatin). U metafazama stabla crnog bora »ni 221« heterokromatin se javlja u području centromera i sekundarnih konstrikcija, te barem u jednom kromosomu interkalarno na terminalnom dijelu kromosoma. Na drugom kraku tog istog kromosoma nalazi se heterokromatinska pruga u području sekundarne konstrikcije.

13. Kromosomi XI i XII se lako identificiraju u preparatima. Karakterizirani su jasno izraženim centromernim prugama u sve tri vrste borova i odsustvom pruga na krakovima kromosoma.

CITIRANA LITERATURA — REFERENCES

- Aass, I., 1957: A cytological analysis of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) from Skjåk, Norway. Det norske Skogforsøksvesen 48, 93—109.
- Andersson, E., 1947: A case of asyndesis in *Picea abies*. Hereditas 33, 301—347.
- Beadle, G. W., 1932: A gene for sticky chromosomes in *Zea mays*. Ztschr. f. ind. Abst. Vererbungslehre 63, 195—217.
- Borzan, Z., 1977a: Contribution to the karyotype analysis of the European black pine (*Pinus nigra* Arn.). Ann. Forest. 8/3, 29—50.
- Borzan, Z., 1977b: Sticky chromosomes in the endosperm of European black pine and Scots pine. Genetika 9 (2), 139—147.
- Borzan, Z., 1979: Kariotip iz endosperma crnog i običnog bora. Magistarski rad, Sumarski fakultet Zagreb, 1—80.
- Borzan, Z., 1981: Karyotype Analysis from the Endosperm of European Black Pine and Scots Pine. Ann. Forest. 10/1: 1—42.
- Borzan, Z., 1984: Hybridization between *Pinus nigra* and *Pinus sylvestris* and morphology of chromosomes. Proc. of the 8th international symposium on sexual reproduction in seed plants, ferns and mosses. Wageningen. p. 181.
- Borzan, Z. & D. Papeš, 1978: Karyotype analysis in *Pinus*: A contribution to the standardization of the karyotype analysis and review of some applied techniques. Silvae Genetica 27 (3—4), 144—150.
- Brighton, C. A., 1980: Cytology of *Crocus vallicola* and its allies (*Iridaceae*). Notes R. B. G. Edinb. 38 (3): 399—412.
- Brighton, C. A., B. Mathew & P. Rudall, 1982: A detailed study of *Crocus speciosus* and its ally *C. pulchellus* (*Iridaceae*). Pl. Syst. Evol. 142, 187—206.
- Chetty, C. K. R., L. P. Upadhaya & S. Kedharnath, 1970: Estimation of risk of reversal of arms and order of chromosomes in karyotype analysis of *Pinus raxburghii* Sarg. Indian Forester 96, 811—816.
- Conger, A. D. & L. M. Fairchild, 1953: A quick-freeze method for making smear slides permanent. Stain Technology 28 (6), 281—283.
- Darlington, C. D. & L. F. La Cour, 1962: The handling of chromosomes. Georg Allen & Unwin Ltd., London, 263 pp.
- Dixon, H. H., 1894: Fertilization of *Pinus sylvestris*. Annals of Botany 8:21—34.
- Đurbabić, B., M. Vidaković & D. Kolbach, 1967: Effect of irradiation on the properties of pollen in Austrian and Scots pine. Experientia 23, 296.
- Đurbabić, B., M. Vidaković & D. Kolbach, 1973: Contents of various sugars in the pollen of some two-needle pines. Acta Pharmaceutica Jugoslavica 23 (3), 157—160.
- Đurbabić, B., M. Vidaković, D. Kolbach & Z. Borzan, 1977: Quantitative analysis of soluble proteins extracted from pollen of some incompatible pine species. Genetika 9 (2), 149—157.
- Drewry, A., 1982: G-banded chromosomes in *Pinus resinosa* J. Hered. 73:305—306.
- Emig, W. H., 1935: The megagametophyte of *Pinus*. I. Introduction. American Journal of Botany 22, 500—503.
- Fahmy, T. Y., 1966: Chromosome number and morphology in certain Conifers. Alexandria Journal of Agric. Res. 14, 205—221.
- Ferguson, M., 1901: The Development of the Egg and Fertilization in *Pinus Strobus*. Annals of Botany XV (LIX): 435—479.
- Ferguson, M., 1904: Contribution to the knowledge of the life history of *Pinus* with special reference to sporogenesis, the development of the gametophytes and fertilization. Proc. Wash. Acad. Sci. 6, 1—202.
- Greilhuber, J., 1974: Hy-banding: A new quick technique for heterochromatin staining in plant chromosomes. Naturwissenschaften 61, 170—171.
- Greilhuber, J., 1977: Why plant chromosomes do not show G-bands. Theor. Appl. Genet. 50, 121—124.
- Hizume, M., A. Ohgiku & A. Tanaka, 1983: Chromosome Banding in the Genus *Pinus*. I. Identification of Chromosomes in *P. nigra* by Fluorescent Banding Method. Bot. Mag. Tokyo 96:273—276.
- Hsu, T. C., 1973: Longitudinal differentiation of chromosomes. Ann. Rev. Genet. 7, 153—176.

- 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  $C_n$  *Larix leptolepis*. Ann. Univ. et A.R.E.R.S. 9, 12—15.
- Iljčenko, T. P., 1975: Sravniteljno-kariologičeskoe issledovanie listvenic primorja. Akademija nauk SSSR, Krasnojarsk, 1—34.
- Kho'shoo, T. N., 1960: Chromosome numbers in Gymnosperms. *Silvae Genetica* 10 (1), 1—8.
- Kim, C. S., 1962: The karyotype analysis in *Pinus rigida* Mill., *Pinus taeda* L. and their  $F_1$  hybrid. Inst. For. Genet., Suwon (Korea) 6, 21—28.
- Kláštorská, I. & A. T. Natarajan, 1975: Stickiness in *Rosa* meiosis induced by hybridization. *Caryologia* 28, 81—88.
- Kláštorská, I. & A. T. Natarajan, 1976: A modified C-band technique for staining of diffuse diplotene chromosomes. *Stain Technology* 51, 209—211.
- Knox, R. B., R. R. Willing & L. D. Pryor, 1972: Interspecific Hybridization in Poplars using Recognition Pollen. *Silvae Genetica* 21:65—69.
- Kondo, T. & M. Hizume, 1982: Banding for the Chromosomes of *Cryptomeria japonica* D. Don. J. Jap. For. Soc. 64 (9): 356—358.
- Kondo, T., M. Hizume & R. Kubota, 1985: Variation of Fluorescent Chromosome Bands of *Cryptomeria japonica* J. Jap. For. Soc. 67 (5): 184—189.
- Kormutak, A., 1975: Karyological structure of some *Pinus* species. *Biologia (Bratislava)* 30 (7), 545—550.
- Kriebel, H. B., 1973: Interspecific incompatibility and inviability problems in forest trees. Proc. Fourteents Meeting Canad. Tree Improvement Association, Part 2:67—79.
- Larsen, J. & G. Kimber, 1973: Chromosome length and arm ratio of *Triticum turgidum* and *T. Tauschii* studied by a new method. Proc. 4th Int. Wheat Gen. Symp. Missouri Agr. Exp. Sta., Columbia, Mo., 691—696.
- Levan, A., K. Fredga & A. A. Sandberg, 1964: Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52, 201—220.
- Lewis, I. M., 1908: The behaviour of the chromosomes in *Pinus* and *Thuja*. *Annals of Botany* 22:529—556.
- Linde-Laursen, I., 1975: Giemsa C-banding of the chromosomes of »Emir« barley. *Hereditas* 81, 285—289.
- Little E. L. Jr. & W. B. Critchfield, 1969: Subdivisions of the genus *Pinus* (pines). U. S. Dept. of Agriculture Misc. Pub. 1144, 51 pp.
- MacPherson, P. & W. G. Filion, 1981: Karyotype analysis and the distribution of constitutive heterochromatin in five species of *Pinus*. *Hered.* 72:193—198.
- Maheshwari, P. & H. Singh, 1967: The female gametophyte of gymnosperms. *Biol. Rev.* 42, 88—130.
- Marchant, C. J. & C. A. Brighton, 1971: Mitotic instability in the short arm of a heteromorphic SAT-chromosome of tetraploid *Ranunculus ficaria* L. *Chromosoma (Berl.)* 34:1—18.
- Marks, G. E., 1973: A rapid HCl/toluidine blue squash technic for plant chromosomes. *Stain Technology* 48 (5), 229—231.
- Marks, G. E., 1975: The Giemsa-staining centromeres of *Nigella damascena*. *J. Cell. Sci.* 18, 19—25.
- Marks, G. E., 1977: The nature of centromeric dots in *Nigella* chromosomes. *Chromosoma (Berl.)* 62, 369—373.
- Marks, G. E. & D. Schweizer, 1974: Giemsa banding: Karyotype differences in some species of *Anemone* and in *Hepatica nobilis*. *Chromosoma (Berl.)* 44, 405—416.
- Martinovič, V., 1978: Predbežné výsledky štúdia karyologických pomerov pri vybraných druhoch rodu *Pinus*. *Folia dendrologica* 4:78, 149—157.
- Matern, B. & M. Simak, 1968: Statistical problems in karyotype analysis. *Hereditas* 59, 280—288.
- Matern, B. & M. Simak, 1969: On some statistical problems connected with the identification of chromosomes. Research Note 11, from Dept. of For. Biometry, Royal Col. of For. Stockholm, 81 pp.

- McGill, M., S. Pathak, & T. C. Hsu, 1974: Effects of ethidium bromide on mitosis and chromosomes: A possible material basis for chromosome stickiness. *Chromosoma* (Berl.) 47, 157—166.
- McWilliam, J. R., 1959: Interspecific incompatibility in *Pinus*. *Am. J. Bot.* 46 (6): 425—433.
- McWilliam, J. R. & F. Mergen, 1958: Cytology of Fertilization in *Pinus*. *The Botanical Gazette* 119 (4): 246—249.
- Mehra, P. N. & T. N. Khoshoo, 1956: Cytology of Conifers I. *J. Genetics* 54, 165—180.
- Melander, Y., 1963a: Chromatid tension and fragmentation during the development of *Calliphora erythrocephala* Meig. (Diptera). *Hereditas* 49:91—106.
- Melander, Y., 1963b: Cytogenetic aspects of embryogenesis in *Paludicola*, *Tricladida*. *Hereditas* 49, 119.
- Melander, Y., 1963c: Cell differentiation and delayed separation of anaphase chromosomes. *Hereditas* 49, 277.
- Melander, Y., 1965: Mitotic events in animal embryogenesis and alterations of genetic activity. *Hereditas* 52, 387.
- Mergen, F. & J. Burley, 1964: *Abies* karyotype analysis. *Silvae Genetica* 13 (3), 63—68.
- Merker, A., 1973: A Giemsa technique for rapid identification of chromosomes in *Triticale*. *Hereditas* 75, 280—282.
- Mihailescu, A. & M. Dalu, 1971: Comparative study on the karyotype of different provenances of *Pinus nigra* of the Şeşu Sinaia nursery. *Rev. Roum. Biol. — Botanique* 16, 319—327.
- Mihailescu, A. & M. Dalu, 1972: Comparative karyotype study in different provenances of *Pinus silvestris* and *Pinus nigra*. *Rev. Roum. Biol. — Botanique* 17, 343—353.
- Morimizato, S. T. Shidei & K. Yamashita, 1972: Kariological studies on the genus *Pinus* III. Karyotype analysis of the Japanese red and black pines (*Pinus densiflora* S. et Z. and *P. thunbergii* Parl.) *La Kromosomo* 90:2823—2838.
- Muratova, E. N., 1978a: Polykaryogram analysis and differential staining of chromosomes of some representatives of *Pinus* species. Abstract. Proc. XIV Int. Congress of Genetics, Moscow, 300 pp.
- Muratova, E. N., 1978b: Kariotipi kedrovih sosn. I Kariotip *Pinus sibirica* Du Tour. *Citologija* 20 (8): 972—976, Leningrad.
- Muratova, E. N., 1979a: Kariotipi kedrovih sosn. II Kariotip *Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc. *Citologija* 21 (7): 849—855, Leningrad.
- Muratova, E. N., 1979b: Kariotipi kedrovih sosn. III Kariotip *Pinus pumila*. *Citologija* 21 (10): 1194—1199, Leningrad.
- Nagl, W., 1962: Über Endopoliploidie, Restitutionskernbildung und Kernstrukturen im Suspensor von Angiospermen und einer Gymnosperme. *Österr. Bot. Z.* 109, 431—494.
- Nagl, W., 1965: Karyologische Anatomie der Samenanlage von *Pinus silvestris*. *Österr. Bot. Z.* 112, 359—370.
- Nagl, W., 1967: Mikrophotometrische DNS-Messungen an Interphase- und Ruhekerne sowie Mitosen in der Samenanlage von *Pinus silvestris*. *Z. Pflanzenphysiol.* 56, 40—56.
- Natarajan, A. T., K. Ohba & M. Simak, 1961: Karyotype analysis of *Pinus silvestris*. *Hereditas* 47:379—382.
- Natarajan, A. T. & S. Natarajan, 1972: The heterochromatin of *Rhoeo discolor*. *Hereditas* 72, 323—330.
- Papés, D. & V. Bosiljevac, 1984: Tetraploid populations of bulbous barley (*Hordeum bulbosum* L.). *Acta. Bot. Croat.* 43:335—340.
- Pathak, S., M. McGill, & T. C. Hsu, 1975: Actinomycin D effects on mitosis and chromosomes: Sticky chromatids and localized lesions. *Chromosoma* (Berl.) 50, 79—88.
- Pederick, L. A., 1967: The structure and identification of the chromosomes of *Pinus radiata* D. Don. *Silvae Genetica* 16, 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, 1—6.

- Federick, L. A., 1970: Chromosome relationships between *Pinus* species. *Silvae Genetica* 19, 171—180.
- Petričević, S., M. Vidaković, I. Bilić & Ž. Borzan, 1977: Immunological identity of pollen-wall proteins in some incompatible Pine species. *Genetika* 9 (3), 271—280.
- Pravdin, L. F., 1964: *Sosna obyknovennaja. Izmenčivost, vnutrividovaja sistematika i selekcija*. Izd. Nauka, Moskva: 1—191.
- Rao, P. N. & R. N. Rao, 1977: Gamma-ray induced meiotic chromosome stickiness in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 50, 247—252.
- Rieger, R., A. Michaelis & M. M. Green, 1976: *A glossary of genetics and cytogenetics*. Springer Verlag, Berlin—New York, 506 pp.
- Sachan, J. K. S. & R. Tanaka, 1976: A banding method for *Zea* chromosomes. *Japan. J. Genetics* 51, 139—141.
- Santamour, F. S. Jr., 1960: New chromosome counts in *Pinus* and *Picea*. *Silvae Genetica* 9, 87—88.
- Sarkar, P., 1963: Chromosome studies on *Pinus* species. (Abstr.). *Canad. J. Genet. Cytol.* 5, 107.
- Sax, K. & H. J. Sax, 1933: Chromosome number and morphology in the Conifers. *J. Arnold Arb.* 14, 356—375.
- Saylor, L. C., 1961: A karyotypic analysis of selected species of *Pinus*. *Silvae Genetica* 10, 77—84.
- Saylor, L. C., 1964: Karyotype analysis of *Pinus* group *Lariciones*. *Silvae Genetica* 13, 165—170.
- Saylor, L. C., 1969: Chromosomal differentiation as a barrier to interspecific hybridization among Pines. 2nd FAO/IUFRO World Consult. For. Tree Breed., Wash., No FO-FTB-69-8/10, 1—6.
- Saylor, L. C., 1972: Karyotype analysis of the genus *Pinus*- subgenus *Pinus*. *Silvae Genetica* 21, 155—163.
- Saylor, L. C., 1983: Karyotype Analysis of the Genus *Pinus*- subgenus *Strobus*. *Silvae Genetica* 32 (3—4): 119—124.
- Schlarbaum, S. E. & T. Tsuchiya, 1981: Differential reactivity to staining in tree chromosomes. *Hered.* 72: 62—63.
- Schweizer, D., 1973: Differential staining of plant chromosomes with Giemsa. *Chromosoma (Berl.)* 40, 307—320.
- Schweizer, D., 1974: An improved Giemsa C-banding procedure for plant chromosomes. *Experientia* 30, 570—571.
- Schweizer, D. & F. Ehrendorfer, 1976: Giemsa banded karyotypes, systematics and evolution in *Anacyclus (Asteraceae-Anthemideae)*. *Plant Syst. Evol.* 126, 107—148.
- Shidei, T. & S. Moromizato, 1965: Karyotype Analysis of Japanese Red and Black Pines (*Pinus densiflora* S. et Z. and *P. thunbergii* Parl.) I. *J. Jap. For. Soc.* 47: 271—274.
- Shidei, T. & S. Moromizato, 1971: Karyotype analysis of Luchu pine (*Pinus luchuensis* Mayr.). *J. Jap. For. Soc.* 53, 13—18.
- Simak, M., 1962: Karyotype analysis of *Larix decidua* Mill. from different provenances. *Medd Stat. Skogsforskn.* 51:1—22.
- Simak, M., 1966: Karyotype analysis of *Larix griffithiana* Carr, *Hereditas* 56, 137—141.
- Strasburger, E., 1892: Über das Verhalten des Pollens und die Befruchtungsvorgänge bei den Gymnospermen. *Hist. Beitr.* 4: 1—156, Jena.
- Stebins, G. L., 1971: *Chromosomal Evolution in Higher Plants*. E. Arnold Ltd. London, 1—216.
- Tanaka, R. & M. Hizume, 1980: C Banding Treatment for the Chromosomes of Some Gymnosperms. *Bot. Mag. Tokyo* 93: 167—170.
- Tarnavschi, I. T. & I. Ciobanu, 1965: Karyologische Untersuchungen an *Pinus nigra* Arn. ssp. *nigricans* Host. var. *banatica* Georg. et Ionescu in vergleiche mit *Pinus nigra* Arn. var. *austriaca* Moess. *Rev. Roum. Biol., Ser. Bot.* 10, 371—375.
- Vidaković, M., 1955: Značenje anatomske građe iglica kod svojta crnog bora u Jugoslaviji. *Šum. list* 7—8: 244—253.

- Vidaković, M., 1957: Oblici crnog bora u Jugoslaviji na temelju anatomije iglica. Glasnik za šum. pokuse 13: 111—248, Zagreb.
- Vidaković, M., 1958: Investigations on the intermediate type between Austrian and the Scots pine. *Silvae Genetica* 7, 12—18.
- Vidaković, M., 1963: Interspecific hybridization of several pine species from the subgenus *Diploxylon* Koehne. *World Consult. on Forest Genetics and Tree Improvement*, Stockholm, FAO/FORGEN 63-2b/5:5p.
- Vidaković, M., 1966: The occurrence and meaning of heterosis in hybrids within and between species. *Šumarski list* 90, 105—122.
- Vidaković, M., 1977a: Some morphological characteristics of *Pinus x nigrosylvis* (*Pinus nigra x Pinus sylvestris*). *Ann. Forest.* 8/2, 15—27.
- Vidaković, M., 1977b: Savlađivanje inkompatibilnosti pri križanju nekih borova. *Genetika* 9, 51—63.
- Vidaković, M., 1982: Četinjače — morfologija i varijabilnost. *Jugoslavenska akademija znanosti i umjetnosti i Sveučilišna naklada Liber*, Zagreb, 710 pp.
- Vidaković, M. & B. Jurković-Bevilacqua, 1970: Observations on the ovule development following cross pollination between Austrian and Scots pines using irradiated and nonirradiated pollen. *IUFRO Sec. 22., Meeting of the working group on reproduction of forest trees, Varparanta, Finland*, 8 pp.
- Vidaković, M. & B. Jurković-Bevilacqua, 1971: Development of ovules after interspecific hybridization of Austrian and Scots pines with gamma-irradiated pollen. *Genetika* 3, 119—130.
- Vidaković, M. & Z. Borzan, 1973: Contribution to the investigations of incompatibility by crossing Scots pine and European black pine. *Int. Symp. on Gen. of Scots Pine, Kornik*, 1—19.
- Vidaković, M. & associates, 1973: Djelovanje zračnog polena na fiziologiju rasta. Završni izvještaj projekta FG-YU-143 (Influence of irradiated pollen on the physiology of growth. Final report of the project: FG-YU-143). *Šumarski fakultet, Zagreb*.
- Vidaković, M. & associates, 1977: Utjecaj mikro-okoline na inkompatibilnost kod tvrdih borova. Završni izvještaj projekta YO-FS-88-JB-6. (Effect of micro-environment on species incompatibility in hard pines. Final report of the project YO-FS-88-JB-6). *Šumarski fakultet, Zagreb*.
- Vidaković, M. & associates, 1985: Faktori inkompatibilnosti između crnog i običnog bora i mogućnosti masovne proizvodnje njihovih bihrida. Završni izvještaj projekta YO-FS-90-JB-61. (Factors of incompatibility between European black pine and Scots pine and possibilities of mass production of their hybrids. Final report of the project YO-FS-90-JB-61). *Šumarski fakultet, Zagreb*.
- Vosa C. G. & P. Marchi, 1972: Quinacrine fluorescence and Giemsa staining in plants. *Nature New Biology* 237, 191—192.
- Wardlaw, C. W., 1955: *Embriogenesis in plants*. Methuen & Co. Ltd., London, 381 pp.
- Winer, B. J., 1970: *Statistical Principles in Experimental Design*. Int. Student Edition & Mladinska knjiga, Ljubljana, 1—672.
- Yim, K. B., 1963: Karyotype analysis of *Pinus rigida*. *Hereditas* 49, 274—276.

Andresa autora:  
Šumarski fakultet  
Katedra za šumarsku  
genetiku i dendrologiju  
41001 Zagreb, pp. 178.



ŽELIMIR BORZAN

## KARYOTYPES OF SOME PINES OF THE SUBSECTION SYLVESTRES

### *Summary*

Karyotype analysis was performed using two main procedures:

1. The Feulgen squash method, and
2. The Giemsa C-banding method.

All the slides have been made from endosperm tissue in development (female gametophyte) taken from three European black pine trees (*Pinus nigra* Arn.) ni 47, ni 221 and ni 366; two Scots pine trees (*P. sylvestris* L.) sy 77 and sy 367; a ramete of the Japanese red pine (*P. densiflora* S. & Z.) de V 116; and a hybrid tree between the European black pine and Scots pine (*P. x nigrosylvis* Vid.) nisy 410, as the result of a cross between trees ni 221 and sy 77.

Collection of material for cytological slides, the technique of preparing the endosperm, applied staining methods, analysis of the slides and photographs of the cells, as well as measurement and analysis of the chromosomes are described in earlier papers (Borzan 1977, 1979, 1981; Borzan & Papeš 1978).

It is necessary to point out that 18 suitable cells with well ordered chromosomes were taken from each tree for definition of the karyotype, and that *each slide was always made only from the endosperm of a single ovule*. In some cases only one cell was analysed from one slide (ovule), while in other cases several cells were analysed, and for tree nisy 410 all 18 analysed cells come from a single ovule.

Table 1 shows the serial number of the cell, serial number of the slide, serial number of the cone, fixation dates and dates when the slide was made for each tree.

Cytotaxonomic research of pines using endosperm in development has certain advantages over using cells from the root tip meristem. Endospermal tissue is haploid, chromosomes are longer and it is easier to determine the exact arm ratio of individual chromosomes, especially important for pines which have symmetrical karyotypes i. e. chromosomes with equally long arms. Although the trees were selected primarily because of their crossing ability, the defined karyotypes had to have characteristics of the respective species, which karyotypes have already been defined by some researchers, especially Natarajan & al. (1961), Saylor (1964), Pederick (1970) and Borzan (1981). In the course of definition of karyotypes for each of the seven trees

investigated (ni 47, ni 221, ni 366, sy 77, sy 367, de V 116 and nisy 410) noticeable were chromosome reversals in order and arm reversals (mis-identification of adjacent chromosomes, or arms of the same chromosome), that can be as high as 50% in pines, especially for metacentric chromosomes II to X (Chetty et al. 1970).

Numeric karyotypes of the each tree investigated are presented in Tables 5, 9, 10, 11, 12, 13 and 14. Each table contains computer processed data on measurements. The data shows relative total length of chromosomes, relative length of short arms (S), relative length of long arms (L), arm ratio (S/L) and centromere indices  $(S / S + L) \times 100$ . Each of the morphological characteristics of individual chromosome is accompanied by statistic parameters: standard deviations (s), standard error ( $s_{\bar{x}}$ ) and coefficients of variability (C. V.). In the upper part of the Table between mean values of two neighbouring chromosomes their differences (d) are recorded.

Computer data processing is presented in Table 28. In this way the morphological characteristics of various trees' chromosomes were tested by means of T test and altogether 105 tables were obtained. They provided data on significant differences in certain morphological properties of chromosomes of each pair of investigated trees. Tables 18, 19, 20, 21, 22, 23 and 24 present encompassing data. Table 20, for instance, displays the differences in chromosomes of tree ni 366 and other trees, and it is obvious that trees ni 47 and ni 221 do not differ from ni 366. It does not, however, follow that the karyotypes of ni 47 and ni 221 are also identical, because Table 18 shows that karyotypes of the two trees differ in 4 (5) morphological characteristics: total length of chromosome XII, short arm of chromosome XI, long arm of chromosome X and arm ratio of chromosome I (centromere index of chromosome I and XI). This is due to the fact that morphological properties of karyotype of tree ni 366 are in its numeric value between numeric values of karyotypes of ni 221 and ni 47. There is a larger difference between ni 47 and ni 221 than between ni 47 and ni 366 or between ni 221 and ni 366. This conclusion agrees with performance of these trees in controlled hybridization in relation to tree sy 77. Tree ni 47 was pollinated in 304 bags between 1958 and 1969, with pollen from 7 various Scots pine trees; in 1974 in 24 bags with pollen from sy 367 and in 1977 in 49 bags with pollen from sy 77 and it has never produced a hybrid plant. On the other hand, crossing combination ni 221  $\times$  sy 77 in 265 bags produced altogether 28 hybrid plants in the period from 1966 to 1978. Crossing ni 366  $\times$  sy 77 in 127 pollinated bags produced no hybrids, but crossing ni 366  $\times$  sy 367 in the period from 1972 to 1980 produced 3 hybrid plants from 150 bags (Borzan 1986b).

Table 22 displaying the differences between karyotype of tree sy 77 and other trees shows that karyotype of sy 77 is the least different from tree ni 221, slightly more from karyotype ni 366 and the most from karyotype ni 47.

May we, on the basis of this coincidence and similarities/differences of individual karyotypes, draw conclusions on these trees' crossing ability or inability?

It seems that in this case such conclusion is prevented by the following reasons:

1. The sample of analyzed karyotypes of trees which can be crossed and yield hybrids and those European black pine trees which do not produce hybrids with Scots pine is too small. If the same method were applied to a larger number of European black pine trees and were to show differences in karyotypes in relation to sy 77 on the same chromosomes as in the case of ni 47 or ni 221, that would prove that cytology could be used in solving the problem of incompatibility; especially if these trees in field conditions in the course of controlled hybridization would behave the same way as trees ni 47 and ni 221, that is, that tree ni 47 is fully and tree ni 221 partially incompatible with sy 77. On the other hand, the increase in number of samples would mean higher expenses thus making this cytological investigation impractical for solving the problems in the field of incompatibility.

2. Tree sy 367 was taken for cytological research in 1974 as the control tree for purposes of comparison with karyotype of tree sy 77, at the time when first attempts at crossing with tree sy 367 did not produce hybrids. In 1978, however, crossing of ni 366  $\times$  sy 367 produced 3 plants which were verified as hybrids in 1981. If we want to check the relation of karyotypes of trees ni 47, ni 366 and ni 221 to tree sy 367, a comparison of Tables 21 and 22 will show that the karyotype of tree sy 367 does differ from karyotypes of trees ni 47, ni 366 and ni 221 in larger number of characteristics than the karyotype of tree sy 77, nevertheless, in terms of incompatibility no correlation has been found between the crossing performance of those trees and the morphology of their chromosomes, since the trees which without pollen treatment (Borzan 1986b) did not produce hybrids (ni 366  $\times$  sy 77) differ in karyotypes to a lesser degree than the trees which produced hybrid plants (ni 366  $\times$  sy 367).

The only conclusion that can be drawn from such an analysis is that the factors of incompatibility between pines are determined on the molecular level and are not contained (visible) in chromosome morphology; therefore, they cannot be exposed by means of investigation of differences in chromosome morphology alone.

Each chromosome carries such a multitude of genotype characteristics (genes which singly or in interaction control certain genotype properties) that it would be rather fortunate if the crossing ability with a tree of another pine species is correlated to morphological characteristics of a single or more chromosomes.

The conclusion obtained through such analysis confirms the findings of Mc William (1959), Knox et al. (1972), Kriebel (1973), Vidaković (1977), Petričević et al. (1977) and other researchers who have worked on the problem of incompatibility among two-needled pines, i. e. that incompatibility factors are determined on the molecular level and are dependent on the presence or absence of specific enzymes in various phases of the development of the female gametophyte, probably from the moment of pollination to the development of the embryo.

## The Heteromorphism of Chromosome XI

Study of the numerical karyotype of each individual tree served to draw attention to the value of the arm ratio of chromosomes XI and XII, since these chromosomes are the least subject to risk of reversal of order and arm reversal. The mean values of the arm ratios of chromosomes XI and XII for all 7 investigated trees are shown in Table 29.

In view of the high risk of reversal in chromosome order and arm reversals for pine species, Table 15 shows the number of percentage of submetacentric chromosomes for the investigated trees in samples of 18 cells for each tree, and for the total of 126 analysed cells (for all the trees). With regard to results obtained for Tables 29 and 15, Table 30 was made in which arm ratios of chromosome XI for trees ni 221, sy 77, nisy 410 and de V 116 are shown, depending on the ovule from which each of the 18 analysed cells originates.

Ever since Sax & Sax (1933) many authors have studied pines karyologically. A number of these works are quite useful for getting to know the karyological characteristics of individual species of pine. It seems that Saylor's work (1964, 1972, 1983) reached the peak of cytological investigations of pines when he included their karyological characteristics in the taxonomy of pines. But a number of authors differ on the morphology, especially of chromosome XI. According to Saylor (1983), chromosome XI is submetacentric for 19 species of subsection *Sylvestres*, while some authors (with Saylor's definition that the chromosome is submetacentric if the short/long arm ratio is between 0.50 and 0.75, and metacentric if this ratio is between 0.75 and 1.00) state that chromosome XI of some species of this subsection is metacentric. Therefore the result of average values of the arm ratio of chromosome XI obtained on the basis of analysis of 18 investigated cells from each of 7 trees shown in Table 29 is interesting. We see in the Table that chromosome XII of all 7 trees is submetacentric, but that chromosome XI deviates from the characteristics of subsection *Sylvestres* for the ramete of the Japanese red pine de V 116 and hybrid tree nisy 410. For interpretation of this result which does not confirm data from the literature, especially the fact that chromosome XI of tree nisy 410 is metacentric (and this tree is the progeny of cross ni 221 and sy 77 in which trees chromosome XI is submetacentric in its average value) it is necessary to establish that all 18 analysed cells of hybrid tree nisy 410 were found in one slide. Since each slide for this investigation was consistently made from a single ovule, this means that all 18 analysed cells of tree nisy 410 had identical chromosomes following meiotic division of this haploid tissue originating from the functional megaspore.

We see in Table 15 that chromosomes I to X for all 7 trees are metacentric as a rule, and the small number of submetacentric chromosome (0—6%) can be explained by arm reversals or reversal of chromosomes (Matern & Simak, 1968; Chetty et al., 1970). For chromosome XI, however, less subject to risk of reversal and risk of arm reversal than chromosomes II to X (Borzan, 1981), this

conclusion is not valid. The fact, therefore that out of 126 cells in 52.38% of the cases, chromosome XI is submetacentric, points to the possibility that chromosome XI is heteromorphic with regards to centromere position, i. e. in individual ovules it could be submetacentric or metacentric in each of the investigated trees. We find confirmation of such an assumption in Table 30, where for trees ni 221, sy 77, nisy 410 and de V 116, in each of the 18 analysed cells, chromosome XI is classified regarding the centromere position as either submetacentric or metacentric, depending on the ovule (slide) in which the individual cell was. Results show that classification of chromosome XI is the same for the most part in cases when the cells are from the same ovule. In future karyological research attention must therefore be focused on the heteromorphic nature of chromosome XI, i. e. on the likelihood that it is different in individual ovules of the same tree or different as homologues in cells of the root tip meristem. Careful study of photographs of cells from the same ovule in which chromosomes XI are variously classified (slide no. 64 of tree ni 221; nos. 2865, 3086 and 3087 of tree sy 77; no. 635 of tree de V 116) has shown that the value of arm ratio of various chromosomes is always close to the border value of 0.75. Furthermore, the centromere position on each chromosome was defined by pencil mark and movement of centromere position on the chromosome just by the width of a pencil mark to one side changed the status of the centromere position, i. e. from metacentric to submetacentric or vice versa.

### Polykaryograms

Russian authors (Ilchenko, 1975; Muratova, 1978a, 1978b, 1979a, 1979b) use in their works graphic presentation of the centromere index of each chromosome, with the values of the centromere index along the abscissa and the chromosome length along the ordinate. This is called polykaryogram. Graphic presentation is suitable because all the chromosomes with their centromere indexes from all the investigated cells are represented by dots which, grouped, clearly convey the characteristics of each karyotype. Fig. 20, 21, 22, 23, 24, 25 and 26 show polykaryograms of investigated trees presented in a way similar to that in Muratova (1978b, 1979a, 1979b); the only difference is that the position of mean chromosome is marked by a circle.

From these polykaryograms the following conclusions may be drawn:

1. In all three European black pine trees chromosomes XI and XII are represented by a group of dots spread to the left towards the origin (direction of submetacentricity for all dots smaller than 42.8571) in relation to a larger and more compact group of dots which represent other metacentric chromosomes I to X (direction of metacentricity for all the dots bigger than 42.8571). Polykaryograms for three European black pine trees are shown in Fig. 20, 21 and 22.

2. Two Scots pine trees are shown in Fig. 23 and 24. It is interesting to note that on the polykaryogram of the tree sy 367 the mean value

of chromosome XI is placed to the left in relation to chromosome XII, which indicates that chromosome XI is submetacentric to a greater extent than chromosome XII (in this single instance out of all 7 trees investigated). Less clearly visible on the idiogram (Fig. 15), this characteristic is brought to light on the polykaryogram. In the case of the tree sy 77, chromosomes XI and XII are represented by dots similarly dispersed in the system of coordinates as in the case of the ni 221.

3. Polykaryogram of the Japanese red pine ramete de V 116 (Fig. 25) differs from the others, because dots are more densely arranged than in case of other trees, and it may be stated that the differences between individual chromosomes of this tree are less conspicuous than in other trees. Only chromosome XII is submetacentric and the dots representing this chromosome are clustered around the circle (the mean value of chromosome XII). In the same area 9 dots are located which represent 9 submetacentric chromosomes XI from 9 cells, which has been discussed on pages 39 and 42.

4. Polykaryogram of the hybrid nisi 410 (Fig. 26) shows slight variation in the length of chromosome XII (all the dots are located in a plane and spread along the abscissa), while the position of the mean value as well as the distribution of dots for this chromosome are almost identical to these in the tree sy 77, the male parent of the hybrid. The remaining chromosomes, including chromosome XI, are metacentric.

#### Giemsa C-banding Method

With pines, the stage of free nuclei in division of the endosperm in development is easier to subject to banding chemicals because there are no membranes to obstruct them. In spite of a relatively small number of slides made by means of Giemsa C-banding method to date (10 for European black pine, 109 for Scots pine and 61 for Japanese red pine) and the small number of slides and cells obtained with visible heterochromatin bands (2 slides for European black pine, 1 for Scots pine and 2 for Japanese red pine) we have proved that the method applied is efficient for differential staining of pine chromosomes.

The slide analysis showed a relatively small quantity of heterochromatin appearing in centromeric position in all and in secondary constriction area in some chromosomes. At least one of metacentric chromosomes of European black pine and Japanese red pine has a heterochromatin band in terminal position (Figures 35, 37). Such a band in terminal position is obviously a recognition mark of this chromosome and if this method were used in karyotype analysis it would be possible to accurately determine the variability of morphological characteristics for this chromosome. On the other arm of the same chromosome there is a heterochromatin band in the secondary constriction area. The preparation of a larger number of good slides will certainly enable discovery and analysis of nuclei with well arranged chromosomes that do not overlap and then a more accurate analysis will be possible.

Although in Japanese red pine the chromosomes are well arranged, one cell only is not sufficient for preparing idiogram of the tree with marked band positions on individual chromosomes. C heterochromatin around centromere is less marked, it is found in the secondary constriction area and, apparently, telomerically in at least one chromosome (probably chromosome X).

In Scots pine heterochromatin was not found in terminal position of any chromosome. In the slides the centromere which has been differentially stained by Giemsa C-banding method is often visible in the shape of two distinct dark spots located perpendicularly to the chromosome axis.

Submetacentric chromosomes are easily identified (chromosomes XI and XII) in slides of European black pine, Scots pine and Japanese red pine. They are characterised by a clearly defined centromeric band and the absence of bands on the arms. This is in accordance with the results of previous karyotype analysis (Borzan 1977a), when it was established that chromosomes XI and XII of European black pine do not have secondary constriction.

Besides works of Borzan & Papeš (1978), Borzan (1979, 1981) and Muratova (1978a) who applied Giemsa C-banding on pine chromosomes, Mac Pherson & Filion (1981) successfully applied this method on chromosomes of five pine species: *Pinus koraiensis*, *P. strobus*, *P. resinosa*, *P. nigra* and *P. banksiana*. A comparison of results of these investigations will reveal some discrepancy in details: Mac Pherson & Filion (1981) claim that European black pine chromosomes II, IV, V, VI, VIII and XII do not have bands in centromeric position and that intercalary bands are linked exclusively with occurrence of secondary constrictions. Our investigation refutes this because our slides have shown at least one intercalary band in telomeric position.

Our investigations agree with the investigations by other authors that pine chromosomes have relatively small amount of constitutive heterochromatin in relation to the total chromosome length. In our opinion, at this point any generalization would be premature; it is not possible to bring conclusions on heterochromatin distribution on the level of species, let alone on the level of population or systematic group of pines. Present investigations were based on insufficient number of slides and trees to allow broader conclusion on the level of species; however, they are significant as the first to use this method in research and a guideline for further work in the field. We are of opinion that this method is still not fully perfected, because due to aggressive chemicals and the method being complicated and long in duration only a small number of successful slides can be obtained. This probably accounts for the fact that in some cells the band on a chromosome cannot be accurately recognized; frequently there are cells with certain chromosomes more heavily stained than the others, and it is possible that a pericentromeric, centromeric or intercalary band, lightly stained, will not be registered as C heterochromatin, but will be visible in some

other cell or slide of the same tree (sample). Due to a small number of successful slides with banded chromosomes no idiogram with C heterochromatin distribution on chromosomes was made for any of the trees.

### Conclusion

1. Using statistical methods in explaining the results obtained by measurement of morphological characteristics of chromosomes on sufficiently large number of samples, it is possible to discern differences between karyotypes of various trees.

2. Cytotaxonomic investigation of pines requires systematization of work and agreement between investigators concerning definition of methods and standardization of work: investigation goals, tissues for slide preparation, methods of preparation, data processing, definition of phenotype characteristics of chromosomes investigated etc. If this is not achieved, it will remain very difficult to compare results of investigations by different authors, since evaluation and interpretation will be limited to their own results.

3. In the trees investigated a high risk of reversal in chromosome order and arm reversals for chromosomes II to IX has been noted, since the coefficients of variability are lowest for these chromosomes in all 7 trees, due to slight differences in length of adjacent chromosomes and similar arm lengths. Chromosomes I, XI and XII are least subject to risk of reversal, since they differ considerably from each other or from adjacent chromosomes in terms of length (or arm ratio), are readily identifiable and, consequently, have higher coefficients of variability than chromosomes II to IX. The conclusions drawn from investigation results concerning these chromosomes are therefore more valid and more significant for cytotaxonomy of pines.

4. Difficulties in identification of chromosomes and differences principally in absolute lengths, and then in relative lengths and secondary constriction positions, are caused by: various types of nuclei (of chromosomes), depending on the part of the tissue of female gametophyte from which the analyzed cell originates; differential activity of individual chromosomes; various stages of cell division; appearance of sticky chromosomes which may cause changes in chromosome morphology; different techniques of slide preparation; fixation of material; poor spreading of chromosomes, etc.

5. Chromosome XII is submetacentric in all 7 trees investigated (according to Saylor's (1961) definition that a chromosome is submetacentric if its arm ratio  $S/L$  is lower than 0.75).

6. In its numerical values of arm ratio, chromosome XI is submetacentric in all three European black pine trees and both Scots pine trees, and metacentric in the Japanese red pine ramete de V 116 and the hybrid *Pinus x nigrosylvis* nisy 410. On the basis of detailed analysis of morphology of chromosome XI in single ovule it has been established that some ovules may contain metacentric, and some (on the same tree) submetacentric chromosome XI. Conclusion is that chromosome



XI is heteromorphic for the crucial value of arm ratio below or above 0.75. Furthermore, it appears that homozygotic trees could exist. In the hybrid nisy 410, out of 18 cells analyzed, all from the same ovule, in 16 cells chromosome XI is metacentric, while submetacentricity of chromosome XI in the remaining two cells is due to an »error« while measuring (caused by less or more contracted arms of chromosomes, sticky appearance, overlapping of chromosomes, etc.).

Heteromorphy of chromosome XI might be of importance for cytotaxonomy of pines.

7. Polykaryograms are a suitable graphic presentation of centromere on chromosomes, particularly when there are larger differences in morphology among chromosomes of a certain karyotype. For all 7 trees investigated, chromosome XII, since submetacentric, could be easily seen, chromosome XI only for some trees and other chromosomes (II to X) are for all trees grouped in the region of metacentricity, to the right in the graphic display, which indicates their basically similar morphology.

8. F and T test used for comparison of characteristics of each chromosome of each pair of trees revealed statistically significant differences among trees in respect to chromosome morphology. Analysis of long-term results of controlled hybridization between certain European black pine and Scots pine trees has not shown correlation between interspecific crossing ability and their chromosome morphology. Factors of incompatibility between European black and Scots pine are determined on molecular level and probably cannot be seen in the chromosome morphology.

9. Secondary constrictions could not be used in identification of chromosomes; rather, their frequency distribution was presented schematically and defined on idiogram. The number of prominent secondary constrictions varied within some cells from 0 to 10, depending chiefly on the stage of cell division or on the part of the female gametophyte tissue from which the analyzed cell originated. Some chromosomes may have two prominent constrictions.

10. On the basis of the analysis of anaphase cells of European black and Scots pine the following conclusions may be drawn:

— Anaphase cells are also suitable for karyotype analysis, and besides can provide a number of additional information.

— Chromatides of one pair of chromosomes may after the division differ considerably in their total length.

— Stickiness is possible between homologous chromatids, between non-homologous chromatids moving towards different poles and between non-homologous chromatids which remain in the same daughter cell.

— Consequence of stickiness between homologous chromatids or non-homologous chromatids which move towards opposite poles may be visible as bridges in late anaphases.

11. Sticky chromosome in these pines (discovered and described in the earlier work, Borzan 1977b) appears in almost all slides of

endospermal tissue used in this investigation. It would seem this phenomenon is normal in pine endosperm (and perhaps in other conifers), physiologically very active tissue in development.

12. Method of differential staining of chromosomes (Giemsa C banding method) was successfully applied on chromosomes of endospermal tissue in development of European black pine, Scots pine and Japanese red pine. In respect to their size, pine chromosomes contain relatively small amount of constitutive heterochromatin (C heterochromatin). In metaphases of European black pine tree ni 221, heterochromatin appears in the region of the centromere and secondary constrictions, and at least in one chromosome intercalary on the terminal part. On the other arm of the same chromosome there is a heterochromatin band in the secondary constriction region.

13. Chromosomes XI and XII are readily identifiable on the slides. In all three pine species, they are characterized by distinct centromere bands and absence of bands on chromosome arms.

Ova su istraživanja sufinancirana of RSIZ-a za znanstveni rad SRH, šumarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i projektom broj YO-FS-90-JB-61 od strane Zajedničkog jugoslavensko-američkog odbora za znanstvenu i tehnološku suradnju.

The research reported here was supported by the Republic Selfmanaging Community of Interest for Science of the Socialist Republic of Croatia, Faculty of Forestry, University of Zagreb and financed in part by a grant no. YO-FS-90-JB-61 made by the United States Department of Agriculture, Office of International Cooperation and Development, authorized under Public Law 480.