

Priručnik za vježbe iz biologije 1

Šver, Lidija; Bielen, Ana; Babić, Ivana; Vladušić, Tomislav; Hrašćan, Reno; Durgo, Ksenija; Franekić, Jasna

Authored book / Autorska knjiga

Publication status / Verzija rada: **Published version / Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)**

Publication year / Godina izdavanja: **2017**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:258078>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)





Manualia Universitatis studiorum Zagrabienensis

Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

**PRIRUČNIK za VJEŽBE iz
BIOLOGIJE 1**

Lidija Šver, Ana Bielen, Ivana Babić, Tomislav Vladušić, Reno Hrašćan,
Ksenija Durgo, Jasna Franekić

Naslov:

Priručnik za vježbe iz Biologije 1

Autori:

izv. prof. dr. sc. Lidija Šver, doc. dr. sc. Ana Bielen, dr. sc. Ivana Babić, doc. dr. sc. Tomislav Vladušić, izv. prof. dr. sc. Reno Hrašćan, prof. dr. sc. Ksenija Durgo i prof. dr. sc. Jasna Franekić

Urednica:

izv. prof. dr. sc. Lidija Šver

Recenzenti:

izv. prof. dr. sc. Biljana Balen, PMF

izv. prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček, PBF

doc. dr. sc. Ivana Ivančić Baće, PMF

Jezična recenzija:

Ana Vraneša, prof.

Nakladnik:

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Pierottijeva 6, 10000 Zagreb

ISBN: 978-953-6893-15-7

Senat Sveučilišta u Zagrebu, na prijedlog Povjerenstva za sveučilišnu nastavnu literaturu, donio je na sjednici održanoj 12. prosinca 2017. godine odluku (klasa: 032-01/16-01/47, urbroj: 380-061/117-17-5) kojom se rukopisu pod nazivom „PRIRUČNIK ZA VJEŽBE IZ BIOLOGIJE 1“, urednica: izv. prof. dr. sc. Lidija Šver odobrava korištenje naziva sveučilišni priručnik (*Manualia Universitatis studiorum Zagrabienensis*).

SADRŽAJ

NAPUTCI ZA RAD NA PRAKTIKUMU IZ MODULA „Biologija 1”	vii
Potreban pribor	vii
Rad u praktikumu	vii
Crtanje u bilježnicu (Laboratorijski dnevnik).....	vii
Pisanje znanstvenog nazivlja biljnih i životinjskih rodova i vrsta	viii
MANJE POZNATE RIJEČI	ix
1. MIKROSKOP	1
Svjetlost.....	1
Lom i refleksija svjetlosti	2
Leće.....	4
Zrcala.....	5
Djelovi mikroskopa.....	7
Mehanički dijelovi mikroskopa.....	7
Optički dijelovi mikroskopa	8
Povećanje mikroskopa.....	10
Stvaranje slike i povećanje mikroskopa	10
Moć razdvajanja mikroskopa	11
Kvaliteta slike	12
Postupak pravilnog mikroskopiranja.....	13
a) Namještanje izvora svjetlosti	14
b) Dobivanje slike na malom povećanju	14
c) Dobivanje slike na velikom povećanju.....	14
d) Crtanje promatranog predmeta u bilježnicu.....	14
Priprava prirodnih (nativnih) preparata	15
2. STANIČNA MEMBRANA	20
Građa stanične membrane	20

Propusnost stanične membrane	22
Difuzija.....	24
Osmoza.....	26
Utjecaj otopina različitih toniciteta na biljnu stanicu.....	28
Utjecaj otopina različitih toniciteta na životinjsku stanicu.....	31
3. STANIČNA STIJENKA	34
Glavne funkcije stanične stijenke biljne stanice	35
Građa stanične stijenke biljne stanice.....	35
Komunikacija među biljnim stanicama	37
Sekundarne promjene stanične stijenke	37
4. CITOSKELET	43
Citoskelet eukariotske stanice	43
Mikrotubuli	44
Intermedijarni filamenti	44
Mikrofilamenti ili aktinski filamenti	45
5. PLASTIDI	51
Fotosintetski aktivni plastidi	51
Fotosintetski neaktivni plastidi – kromoplasti	53
Fotosintetski neaktivni i bezbojni plastidi – leukoplasti	53
6. REZERVNE TVARI U STANICI	56
Ulja i masti.....	57
Ugljikohidrati.....	59
Kvalitativni testovi za dokazivanje ugljikohidrata	66
Molischova reakcija	66
Benedictova reakcija.....	67
Tollensova reakcija ili reakcija srebrnog zrcala.....	68
Lugolova reakcija	69
Škrobna zrnca	72

7. DEOKSIRIBONUKLEINSKA KISELINA (DNA).....	76
Otkriće DNA	76
Građa molekule DNA	77
Udvostručavanje molekule DNA (replikacija)	83
Pakiranje molekule DNA u jezgri stanice	85
8. TRANSKRIPCIJA I TRANSLACIJA	95
Ribonukleinska kiselina (RNA)	97
Prepisivanje (transkripcija)	98
Procesiranje prekursorske molekule mRNA	99
Genski kod	101
Prevođenje (translacija).....	103
Razlike u transkripciji i translaciji između prokariota i eukariota	109
9. BJELANČEVINE (PROTEINI)	111
Reakcije za dokazivanje bjelančevina.....	115
10. STANIČNA DIOBA.....	119
Stanična dioba u prokariota	119
Stanična dioba u eukariota	121
Stanični ciklus	122
Faze mitoze.....	125
Citokineza	130
11. RAZMNOŽAVANJE I MEJOZA	138
Nespolno razmnožavanje.....	138
Spolno razmnožavanje.....	139
Tjelesne (somatske) i spolne stanice.....	139
Mejoza – redukcijska dioba.....	140
Interfaza	141
Prva mejotska dioba (mejoza I)	142
Druga mejotska dioba (mejoza II).....	145

Izvori varijabilnosti gameta u mejozi.....	147
Kariotip i idiogram.....	151
Ljudski (humani) kariotip	153
Promjene broja kromosoma – poliploidija i aneuploidija	153
12. MENDELOVI ZAKONI NASLJEĐIVANJA – OSNOVE GENETIČKIH KRIŽANJA.....	157
Monohybridno križanje.....	160
Test-križanje.....	163
Dihybridno križanje	164
13. VINSKA MUŠICA KAO MODELNI ORGANIZAM	167
Genom vinske mušice	168
Životni ciklus vinske mušice.....	169
Uzgoj vinske mušice u laboratoriju.....	170
Spolno dvoličje (seksualni dimorfizam)	171
Mutacije kod vinske mušice	171
Nasljeđivanje svojstava vezanih uz spol.....	175
14. MEĐUDJELOVANJE GENA.....	179
Odnosi između alela.....	179
Multipli aleli.....	180
Krvne grupe sustava AB0	181
Pleiotropni učinak.....	186
Poligensko nasljeđivanje	186
15. VEZANI GENI.....	195
16. POPULACIJSKA GENETIKA.....	201
Hardy-Weinbergov zakon	202
Utvrđivanje učestalosti alela u populaciji	203
A) Utvrđivanje učestalosti kodominantnih alela.....	204
B) Utvrđivanje učestalosti alela koji su u dominantno-recesivnom odnosu: Hardy-	

Weinbergova jednadžba	205
KAZALO POJMOVA	218
IZVORI SLIKA.....	228
LITERATURA	232

NAPUTCI ZA RAD NA PRAKTIKUMU IZ MODULA „Biologija 1”

Potreban pribor

Na praktikumu iz modula „Biologija 1“ potrebno je imati sljedeći pribor:

- priručnik
- bilježnica A4 formata, bez crta
- obična olovka i gumica
- papirnate maramice ili mekana krpica za brisanje
- dobra volja.

Sav navedeni pribor je obavezan i potrebno ga je uvijek imati sa sobom na vježbama. Laboratorijska kuta potrebna je samo za određene vježbe, i to će biti na vrijeme najavljeno. Ostali pribor koji nije obavezan, ali je poželjan, su drvene bojice, britvice i histološke iglice.

Sav ostali pribor koji je potreban za rad na vježbama naći ćete na svome radnom mjestu. Svaki student je dužan ostaviti pospremljeno i uredno radno mjesto. Ukoliko nepažnjom studenta dođe do kvara/štete (primjerice razbijeni trajni preparat), student pojedinac snosi troškove popravka ili nabavke nove opreme.

Rad u praktikumu

Tijekom praktikuma iz modula „Biologija 1“ naučit ćete se služiti svjetlosnim mikroskopom, upoznat ćete se s građom, funkcijama i staničnim ciklusom eukariotske stanice, obraditi ćete prijenos genske upute u stanici, osnovne pojmove klasične i populacijske genetike, te evolucije. Gradivo praktikuma će pratiti predavanja i dodatno obrađivati pojedine dijelove tematskih cjelina.

Rad u praktikumu zasniva se većim dijelom na tehnici mikroskopiranja, a uz to će se izvoditi i praktične vježbe i zadaci. Mikroskopirati ćete naučiti (ako se do sada tijekom školovanja niste upoznali s tom tehnikom) na prvom praktikumu.

Svaka vježba se, uz pomoć asistentice/asistenta, izvodi u praktikumu, te se u bilježnicu crta viđeno i/ili odgovara na pitanja i zadatke iz priručnika.

Crtanje u bilježnicu (Laboratorijski dnevnik)

Iako se u današnje vrijeme crtanje možda čini pomalo zastarjela metoda, ono i dalje ima važnu ulogu u mikroskopiji te se ne može u potpunosti nadomjestiti fotografijom. Smisao crtanja

prilikom mikroskopiranja u praktikumu Biologije (a i šire) je u tome da se vježbate zapažati i razlikovati strukture na promatranom preparatu. Osim toga, na crtežu se treba istaknuti ono bitno, manje bitno samo naznačiti, a suvišno posve zanemariti (npr. ukoliko na preparatu uočite mjehurić zraka, nećete ga nacrtati u bilježnicu). Nadalje, pri označavanju crteža se razmišlja o naučenom i na taj način još jednom utvrđuje znanje (prepisivanje bez razmišljanja je, dugoročno, samo gubljenje vremena).

U bilježnicu je potrebno nacrtati sve crteže koji su tijekom određene vježbe zadani. Svaki crtež/zadatak mora imati svoj naslov. Crteži moraju biti u potpunosti obilježeni (svaki crtež treba sadržavati i na njemu trebaju biti označene **sve** strukture navedene u priručniku!). Također, u bilježnici je potrebno ispunjavati tablice i odgovarati na pitanja iz pojedinih vježbi.

Pisanje znanstvenog nazivlja biljnih i životinjskih rodova i vrsta

Znanstveni nazivi rodova i vrsta (najčešće izvedeni iz latinskog jezika ili latinizirani ako su iz drugih jezika primjerice, (staro)grčkog ili su imena znanstvenika, nazivi mjesta pronalaska vrste i dr.) pišu se pisanim (ne štampanim!) slovima i to naziv roda velikim slovom (*Allium*), a svojstveni naziv vrste malim slovom (*cepa*). Također, znanstveni nazivi vrsta, prema konvenciji, pišu se kosim pismom, kurzivom (*italic*). Budući da Vi niste u mogućnosti pisati kosim pismom, kako biste naglasili da se radi o znanstvenim nazivima biljnih ili životinjskih rodova i vrsta, Vi te nazive podcrtavate i to posebno naziv roda i naziv vrste (ne i razmak između njih):

Luk, *Allium cepa* → Luk, *Allium cepa*

Kratica „sp.“ (ili „spec.“) se koristi kada nije poznat točan znanstveni naziv; npr. *Allium* sp. znači „vrsta roda *Allium*“. Kratica „spp.“ (množina) zamjenjuje „više nepoznatih vrsta“. Navedene kratice se ne pišu u kurzivu, odnosno ne podcrtavaju se u bilježnici.

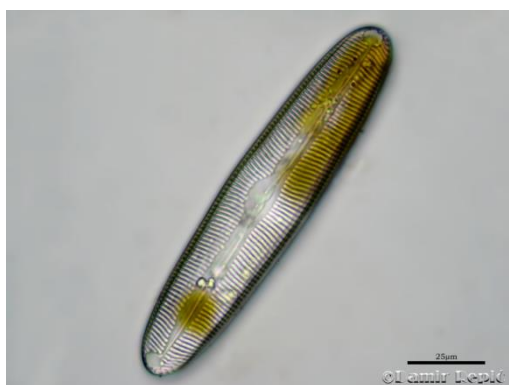
MANJE POZNATE RIJEČI

a-	ne-
aboralan	sa suprotne strane od usta
amfi-	okolo, na obje strane
anterioran	prednji
apikalan	vršni
baza	osnova
bi-; di-	dva
bilateralan	dvostran, obostran
cefalan	glaveni
cirkularan	kružni
distalan	dalje od medijalne ravnine
dorzalan	leđni
egzo- (od exo)	vani, izvan
ekstra-	izvan
endo-	unutar
epi-	na, gore
fibrilarni	vlaknasti
globularni	kuglasti
hemi-	polu-
hetero-	različito
heteronoman	raznovrsan
homo-	isto-
homonoman	istovrsan
inkrustacija	umetanje, oblaganje
integralni	sastavni
inter-	među
intra-	unutar, unutra
kaudalan	repni
kinesis (grč.)	kretanje
lamela	sloj
lateralan	bočni, sa strane

letalan	smrtonosan
linearan	poput crte, linije
longitudinalan	uzdužni
lumen	šupljina
medijalan (medijani)	srednji
mera	jedinica, dio nečega
mezo-	sredina
mono-	jedan
oligo-	malo, neznatno, nekoliko
oralan	usni
peri- (grč.)	okolni, oko, prema, koji okružuje
-plast (grč. plastos)	oblikovan, formiran
poli-	mного, puno
posterioran	stražnji
proksimalan	bliži medijalnoj ravnini
pseudo-	lažan
radijalan	zrakast
sagitalan	streličast
semi-	polu-
sesilan	sjedilački
sferičan	kuglast
sinapsis (grč.)	spoj, veza
soma	tijelo, tjelešce
trans	preko, s onu stranu
transverzalan	poprečni
ventralan	trbušan

1. MIKROSKOP

Mikroskop (grč. *micrós* – mali, *skopân* – gledati) uređaj je za promatranje objekata premalih da bi se vidjeli golim okom. Tehnika koja proučava mikroskop kao uređaj za promatranje sitnih predmeta te njegovu uporabu naziva se **mikroskopija**. Ovisno o načinu dobivanja slike promatrana objekta, postoje različiti tipovi mikroskopa, primjerice elektronski, rentgenski ili infracrveni mikroskop. U ovoj vježbi pobliže ćete se upoznati sa svjetlosnim mikroskopom, budući da ćete se njime služiti na vježbama iz kolegija Biologija 1 i Biologija 2. **Svjetlosni mikroskop** je optički instrument u kojem slika nastaje skupljanjem vidljive svjetlosti s promatrana objekta uz pomoć optičkih leća (Slika 1. 1). Najmanja veličina promatranih objekata mjeri se u desetinkama mikrometara za standardni svjetlosni mikroskop (oko 0,2 mikrometra = $0,2 \mu\text{m} = 0,2 \times 10^{-6} \text{ m}$), a kod posebnih izvedbi svjetlosnih mikroskopa u desetcima nanometara (npr. SIM – engl. *Structured Illumination Microscope*).



Slika 1. 1. Slika dobivena svjetlosnim mikroskopom. Alga kremenjašica *Pinnularia* sp. Izvor: Damir Repić, Mikrosvijet.

Kako se radi o optičkom instrumentu, nužno je poznavati osnovna svojstva svjetlosti.

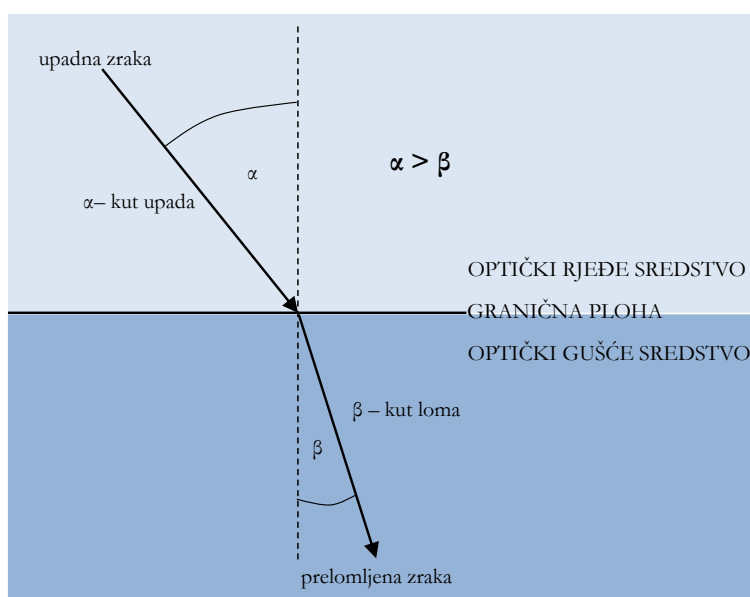
Svjetlost

Vidljiva svjetlost predstavlja dio elektromagnetskog zračenja valnih duljina od 400 do 700 nanometara ($\text{nm} = 10^{-9} \text{ m}$), vidljiv ljudskom oku. Svjetlost se u homogenoj sredini širi pravocrtno, u obliku transverzalnog sinusoidalnog vala, s najvećom brzinom u vakuumu od otprilike 300 000 km/s. U bilo kojem drugom sredstvu svjetlost će se širiti sporije pa je tako brzina svjetlosti u zraku za 0,8 % manja od brzine svjetlosti u vakuumu, dok je u vodi brzina svjetlosti za 25 % manja od one u vakuumu. Sredstvo u kojem se svjetlost širi sporije nazivamo

optički gušćim, dok je ono u kojem se svjetlost širi brže **optički rjeđe**. To su relativni pojmovi jer je primjerice voda optički gušće sredstvo od zraka, ali je optički rjeđe u odnosu na staklo.

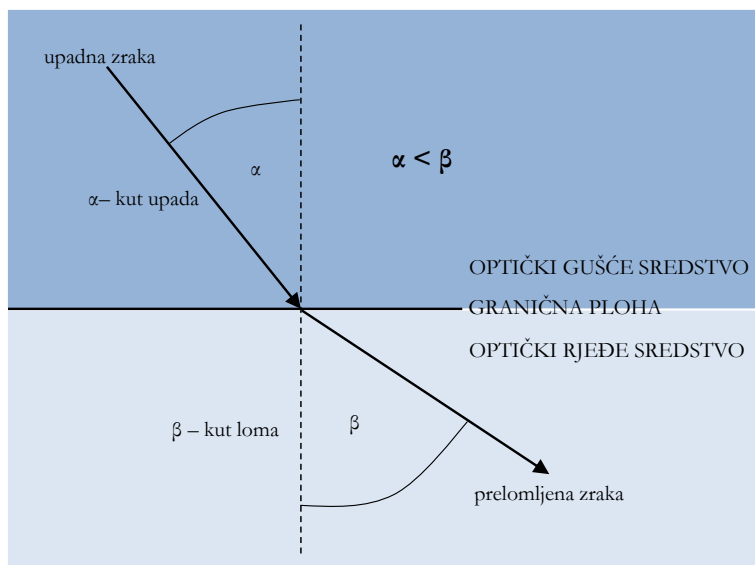
Lom i refleksija svjetlosti

Na granici između optički rjeđeg i optički gušćeg sredstva dolazi do promjene smjera i brzine svjetlosnih zraka. Tu pojavu zovemo **lom svjetlosti**. Ako zrake svjetlosti prelaze iz optički rjeđeg u optički gušće sredstvo, lomit će se prema zamišljenoj okomici na graničnu površinu pa će kut loma zrake svjetlosti (β) biti manji od kuta upada zrake (α) (Slika 1. 2):



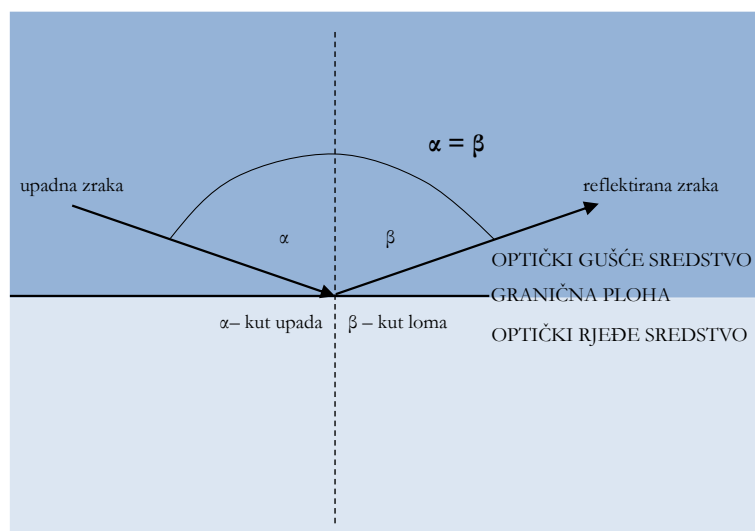
Slika 1. 2. Lom zrake svjetlosti na prijelazu iz optički rjeđeg u optički gušće sredstvo. Izvor: autori.

Prelaskom zrake svjetlosti iz optički gušćeg u optički rjeđe sredstvo dolazi do loma zrake od zamišljene okomice na graničnu površinu. Kut loma zrake (β) veći je od kuta upada zrake (α) na graničnu površinu (Slika 1. 3):



Slika 1. 3. Lom zrake svjetlosti na prijelazu iz optički gušćeg u optički rjeđe sredstvo. Izvor: autori.

Povećava li se kut upada prilikom prolaska zrake svjetlosti iz optički gušćeg u optički rjeđe sredstvo, lom će svjetlosti biti sve veći (kut loma ovisi o kutu upada). Pri određenom kutu upada kut loma iznositi će 90° od zamišljene okomice te će prelomljena zraka svjetlosti praktički prolaziti uza samu graničnu površinu dvaju sredstava. Kut upada zrake pri kojem se to događa naziva se **graničnim** ili **kritičnim kutom totalne refleksije**. Daljnjim povećanjem kuta upada zraka svjetlosti više se neće lomiti, već će se u potpunosti odbiti od granične površine natrag u optički gušće sredstvo i to pod istim kutom pod kojim je i došla do granične površine. Ova pojava naziva se **totalnom refleksijom** (Slika 1. 4).



Slika 1. 4. Totalna refleksija zrake svjetlosti nailaskom iz optički gušćeg na optički rjeđe sredstvo. Izvor: autori.

Ako su dva sredstva kroz koja prolazi zraka svjetlosti različite optičke gustoće, brzina

zrake koja upada na graničnu površinu između dva sredstva (c_1) razlikovat će se od brzine prelomljene zrake (c_2) (svjetlost se brže kreće u optički rjeđem sredstvu). Odnos između brzina svjetlosnih zraka koje prolaze kroz dva optički različito gusta sredstva jednak je omjeru sinusa kuta upada i sinusa kuta loma zrake te je ta vrijednost konstantna:

$$\frac{c_1}{c_2} = \frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = K$$

Upada li zraka svjetlosti iz vakuuma u neko drugo prozirno sredstvo, odnos brzina upadajuće i prelomljene zrake predstavlja **indeks loma** (n) za to sredstvo:

$$\frac{c}{c_1} = \frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = n$$

gdje c označuje brzinu upadajuće zrake u vakuumu, a c_1 brzinu prelomljene zrake u drugom prozirnem sredstvu.

Kako se svjetlost najbrže širi upravo kroz vakuum, indeks loma za vakuum iznosi 1, dok je za svako drugo optičko sredstvo to veći što je veći lom svjetlosti u sredstvu, odnosno što je ono optički gušće. Indeks loma uvijek je veći od 1 (Tablica 1. 1).

Tablica 1. 1. Indeks loma nekih sredstava važnih za mikroskopiranje

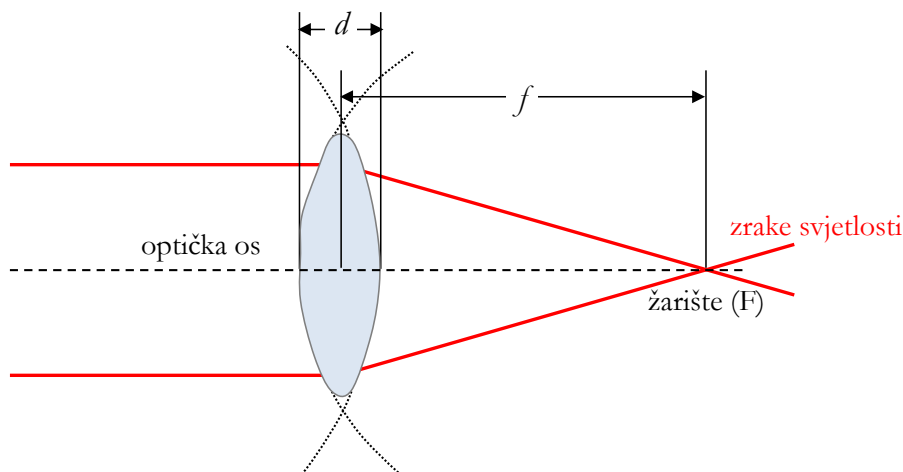
sredstvo	indeks loma
vakuum	1,00000
zrak	1,00029
destilirana voda	1,333
pokrovno stakalce	1,516
kanadski balzam (smola za uklapanje)	1,516
anisol (imerzijska tekućina)	1,516
cedrovo ulje (imerzijska tekućina)	1,516

Optički elementi koji koriste lom i refleksiju svjetlosti zovu se leće (lome svjetlost) i zrcala (reflektiraju svjetlost).

Leće

Leća je optički element od prozirnog materijala omeđen dvjema plohamo koje lome svjetlost. Svaka od ploha može biti ispupčena (konveksna), udubljena (konkavna) ili ravna (planarna) pa njihovim kombinacijama nastaju različiti tipovi leća. Ispupčena leća djeluje kao **konvergentna** (**skupljajuća**, **sabirna**) leća koja zrake svjetlosti skuplja u jednu točku na zamišljenom pravcu koji prolazi sredinom leće, okomito na njezine plohe, zvanom optička os.

Točka u kojoj se zrake svjetlosti skupljaju naziva se **žarište** ili **fokus** (F) (Slika 1. 5). Osim konvergentnih, u mikroskopu se koriste i udubljene **divergentne** (**rasapne**) leće koje rasipaju zrake svjetlosti oko optičke osi.



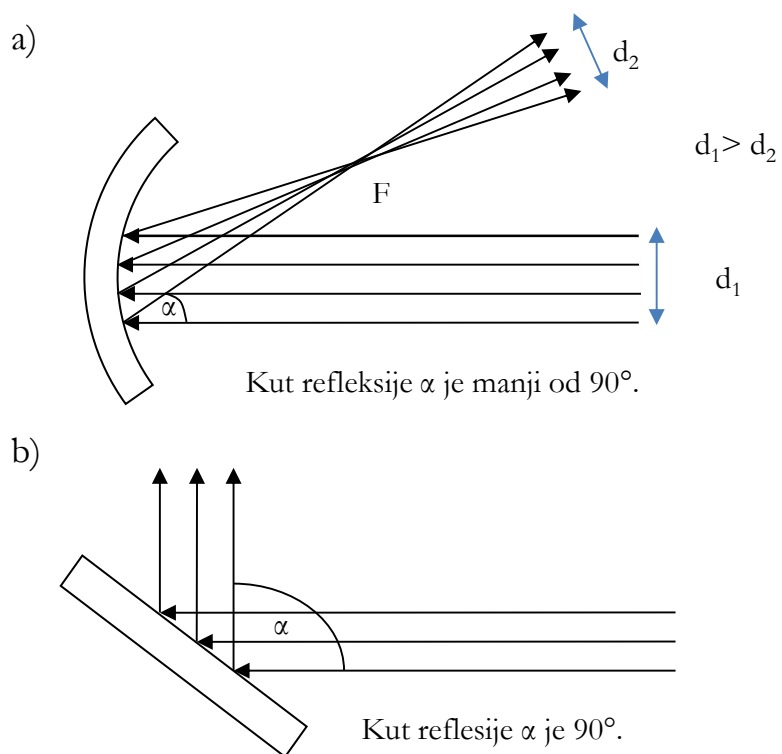
Slika 1. 5. Prolaz zrake svjetlosti kroz konvergentnu (sabirnu) leću; d – debljina leće, f – fokalna (žarišna) duljina leće. Izvor: autori.

Zrcala

Zrcalo je optički element glatke površine koja reflektira svjetlost. Kod nekih tipova mikroskopa koristi se kako bi se svjetlost koja dolazi iz vanjskog izvora (primjerice stolne svjetiljke) usmjerila prema objektu mikroskopiranja. Koriste se **ravna** i **udubljena** (zakrivljena) zrcala.

Na Slici 1. 6 prikazana je refleksija zraka svjetlosti na udubljenom (konkavnom) i ravnom zrcalu. Vidi se da se refleksija korisnih zraka svjetlosti kod udubljenog zrcala odvija pod kutem manjim od 90° (Slika 1. 6a) pa se zrake nakon refleksije skupljaju u jednoj točki, žarištu ili fokusu (F), te se nakon toga šire dalje uz međusobno manju udaljenost nego što je bila udaljenost zraka prije refleksije. To znači da se korištenjem udubljene strane zrcala u mikroskopiji zrake svjetlosti mogu skupiti i time bolje osvijetliti promatran predmet. Nakon refleksije svjetlosti na udubljenom zrcalu puno više korisnih svjetlosnih zraka doći će do promatranog objekta pa će stoga kontrast i detalji slike promatranog objekta biti oštrije i uočljiviji.

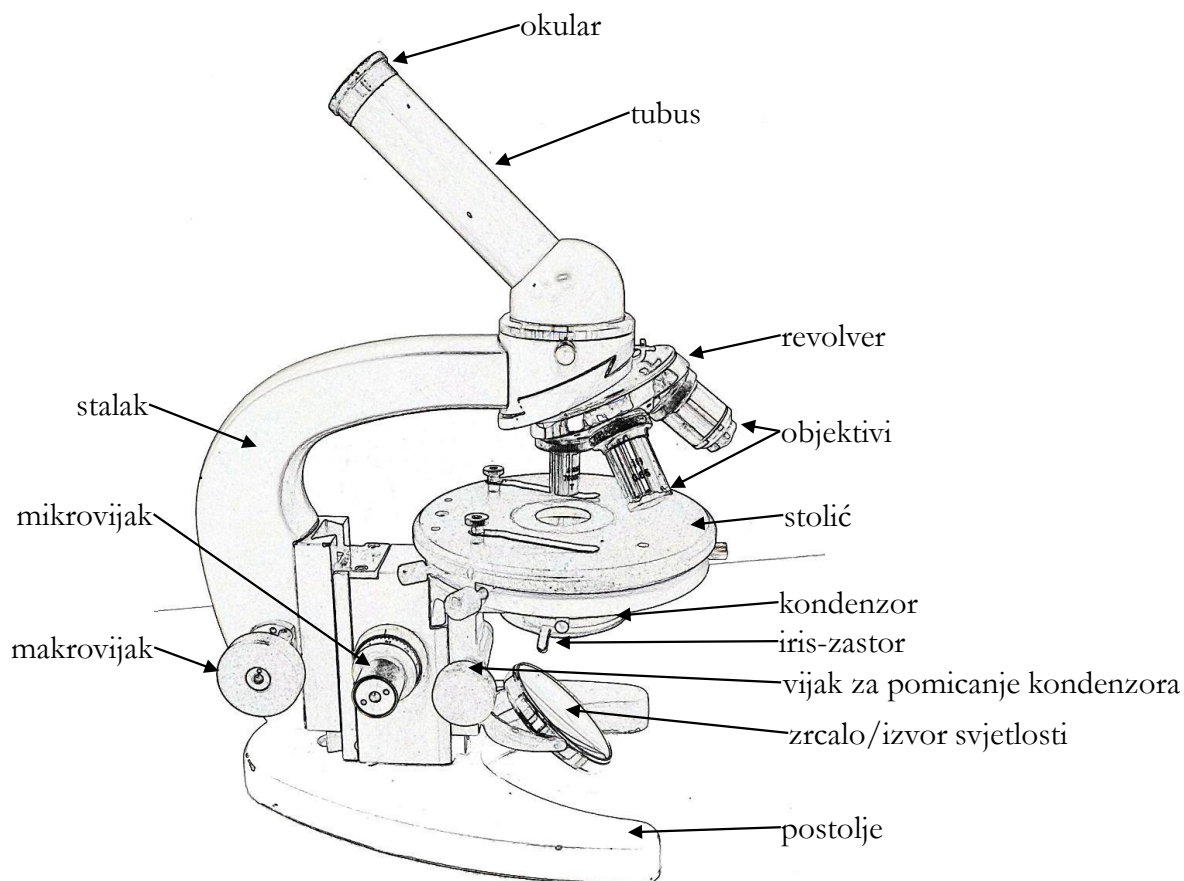
Refleksija svjetlosnih zraka s površine ravnog zrcala odvija se pod kutem od 90° (Slika 1. 6b) te je udaljenost svjetlosnih zraka nakon refleksije ista kao i prije refleksije. Zrake svjetlosti se nakon refleksije ne skupljaju i ne zgušnjavaju pa stoga i broj korisnih svjetlosnih zraka koje padaju na promatran objekt nije bitno izmijenjen, što također može biti korisno pri mikroskopiranju (primjerice, ako je izvor svjetlosti jak).



Slika 1. 6. Refleksija zraka svjetlosti na (a) udubljenom i (b) ravnom zrcalu. F – fokus ili žarište, d – udaljenost zraka. Izvor: autori.

Dijelovi mikroskopa

Dijelove mikroskopa (Slika 1. 7) možemo podijeliti u **mehaničke** i **optičke**.



Slika 1. 7. Dijelovi mikroskopa. Izvor: autori.

Mehanički dijelovi mikroskopa

Mehanički dijelovi nose optičke dijelove mikroskopa, služe za njihovo usklađivanje i za namještanje preparata s objektom koji želimo promatrati.

Mehanički su dijelovi:

1. **postolje**
2. **stalak** – povezuje sustav okulara i objektivna s postoljem
3. **stolić** – na njega se stavlja preparat koji se želi promatrati
4. **tubus** – metalna cijev koja na gornjem kraju nosi okular, a na donjem pokretan revolver u kojem se nalaze ležišta za objektivne različitih povećanja
5. **revolver** – rotirajući nosač objektivna za 2, 3, 4 ili 5 objektivna
6. **makrovijak** i **mikrovijak** – vijci koji pokreću sustav zupčanika koji omogućuje

pomicanje ili tubusa ili stolića (ovisno o modelu mikroskopa) te traženje i izoštravanje slike promatrana objekta. Dakle, makrovijak i mikrovijak rade u principu isto – pomiču sustave mikroskopa kako bi se izoštrila slika. Međutim makrovijak omogućuje velike, prostim okom vidljive pomake (pa se stoga koristi pri traženju slike na malom povećanju), a mikrovijak daje vrlo fine pomake tubusa ili stolića koji se ne vide prostim okom i služe za izoštravanje slike na velikom povećanju. Ovdje treba naglasiti da su makro- i mikrovijak mehanički različito izvedeni kod različitih tipova mikroskopa. Primjerice, kod nekih se mikroskopa oba vijka nalaze zajedno, a kod drugih su odvojeni (kao na Slici 1. 7). Prilikom upoznavanja s građom mikroskopa na vježbama uočit ćete ove razlike od jednog do drugog tipa mikroskopa.

Optički dijelovi mikroskopa

Optički dijelovi mikroskopa predstavljaju skup leća i zrcala neophodan za stvaranje slike promatrana objekta. Promatrani je objekt uklopljen u privremeni ili trajni preparat (vidi objašnjenje kasnije u tekstu). Vidljiva svjetlost prolazi kroz preparat i optičke dijelove mikroskopa stvarajući sliku koja se može izravno gledati, uhvatiti na fotografski film ili snimiti digitalno. U optičke dijelove mikroskopa ubrajamo:

1) izvor svjetlosti i zrcalo

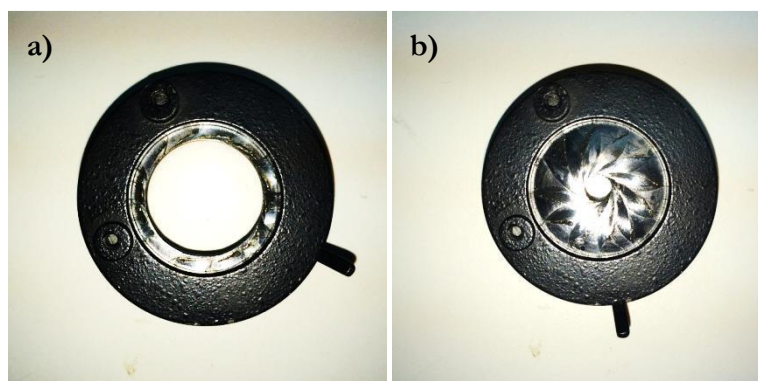
Izvor svjetlosti daje zrake svjetlosti koje prolaze kroz preparat. Najčešće se kao izvor svjetlosti koristi već ugrađena žarulja u mikroskopu koja daje bijelu svjetlost (valne duljine od 400 do 700 nm). Ako je izvor zraka svjetlosti sunčeva svjetlost ili umjetni izvor svjetlosti odvojen od mikroskopa, koristi se zrcalo koje usmjeruje zrake svjetlosti preko kondenzora na objekt koji se promatra.

Treba naglasiti da postoje uvjeti mikroskopiranja kad treba voditi računa o tome je li prema preparatu okrenuta udubljena ili ravna strana zrcala. Ravno se zrcalo upotrebljava pri jakom izvoru bijele svjetlosti ili jakom danjem, difuznom svjetlu i ako se koriste objektivi velikog povećanja. Uz slabiji izvor svjetlosti ili ako mikroskop nema kondenzor, koristi se udubljeno zrcalo koje skuplja zrake svjetlosti.

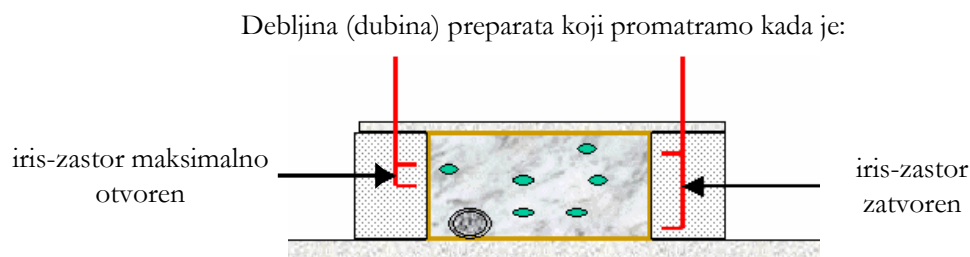
2) kondenzor

Sastavljen od 2-3 leće, ovaj optički dio djeluje kao konvergentna (sabirna) leća. Skuplja i usmjeruje veći broj korisnih zraka svjetlosti na objekt koji promatramo. U sklopu kondenzora nalazi se i metalni **iris-zastor** (Slika 1. 8) koji omogućuje regulaciju količine svjetlosti koja dolazi na kondenzor. Smanjivanjem otvora iris-zastora na kondenzor dolazi manje svjetlosti, što povećava dubinu pogleda na promatran objekt (Slika 1. 9). Budući da sužava i usmjeruje svjetlost

na promatran objekt, kondenzor je posebno važan prilikom promatranja objekata pri velikom povećanju.



Slika 1. 8. Iris-zastor: otvoren (a), zatvoren (b). Izvor: autori.



Slika 1. 9. Promjer iris-zastora i debljina preparata koji se promatra. Izvor: autori.

3) objektiv

Objektivi su leće na „revolveru“ iznad stolića na kojem se nalazi promatran objekt. Oni su najvažnije leće mikroskopa jer prikupljaju informacije o promatranu objektu i daju njegovu uvećanu, realnu i obrnutu sliku. Na svakom je objektivu navedeno njegovo povećanje (primjerice, $40\times$ na Slici 1. 11; pojam numeričke aperture bit će objašnjen kasnije u tekstu).

Prema mogućnosti povećanja slike razlikujemo:

1. objektiv malog povećanja – do $10\times$ (najčešća su povećanja $3,2\times$, $4\times$, $8\times$, $10\times$)
2. objektiv velikog povećanja – $40\times$
3. imerzijski objektiv – povećanja $90\times$ ili $100\times$, označen crnim prstenom.

Objektivi malog i velikog povećanja nazivaju se još i **suhim objektivima** jer se između preparata i objektiva nalazi zrak (suhi medij). Prilikom njihova korištenja zrake svjetlosti s objekta koji se promatra prelaze iz optički gušćeg sredstva (mikroskopskog stakalca) u optički rjeđe sredstvo – zrak. Zbog toga se prilikom promatranja uslijed loma i totalne refleksije svjetlosti (vidi

objašnjenje ranije u tekstu) gubi dosta korisnih svjetlosnih zraka, što smanjuje mogućnost uočavanja detalja promatrana objekta. Zato se pri promatranju vrlo sitnih detalja uz vrlo veliko povećanje koriste tzv. **imerzijski objektiv**, koji su označeni crnom prugom. Prilikom upotrebe imerzijskih objektivna na pokrovnicu se stavlja kap imerzijske tekućine (anisol, cedrovo ulje) koja ima isti indeks loma kao i staklo (Tablica 1. 1). Imerzijski objektiv uroni se u tu kapljicu i mikrovijkom se izoštri slika. Budući da sad zrake svjetlosti prolaze od preparata do objektivna kroz sredstva istog indeksa loma, one se ne lome pa je na taj način smanjen gubitak korisnih svjetlosnih zraka i slika preparata sadrži mnogo više detalja. Za iskorištavanje što većeg broja svjetlosnih zraka ponekad se koriste i imerzijski kondenzori.

4) okular

Okular je leća smještena na gornjem kraju tubusa kao posljednji dio optičkog sklopa uz pomoć kojeg korisne zrake svjetlosti skupljene prilikom prolaska svjetla kroz kondenzor, promatran objekt i objektiv dolaze do oka. Okular povećava realnu sliku nastalu u objektivu i pretvara je u „virtualnu“, oku vidljivu sliku.

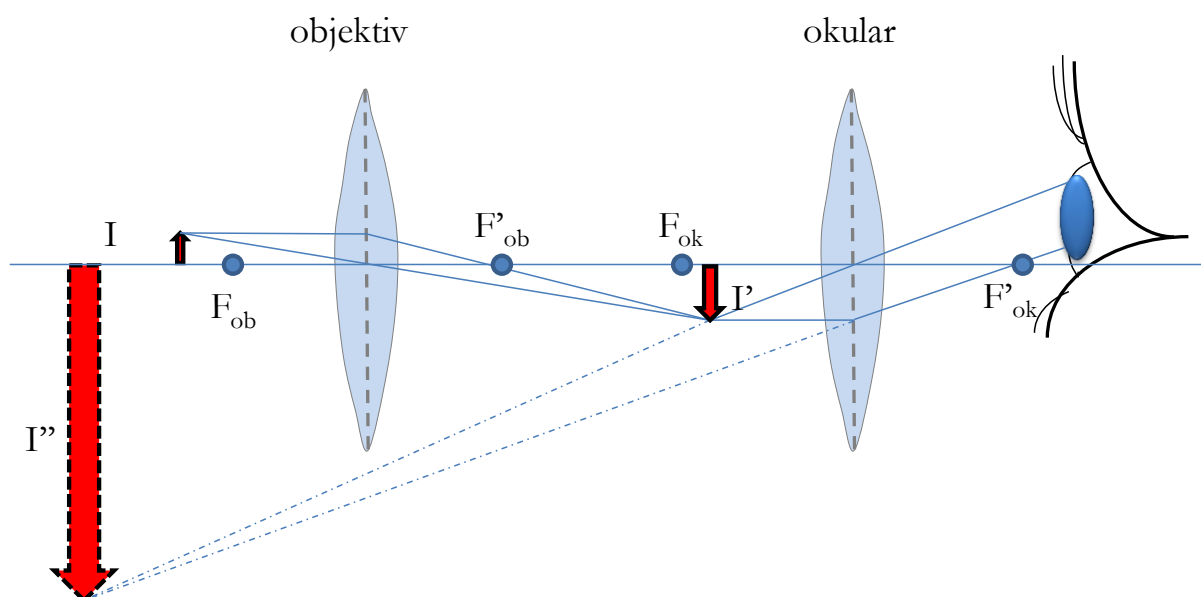
Dakle, smjer je prolaska svjetlosti kroz mikroskop: izvor svjetlosti → zrcalo → kondenzor → predmetno stakalce → preparat → pokrovno stakalce → objektiv → okular → oko.

Povećanje mikroskopa

Stvaranje slike i povećanje mikroskopa

Slika određenog predmeta nastala mikroskopom **uvećana** je, **virtualna** i **obrnuta**. Objektiv uvećava objekt ili predmet (I) i nastaje realna, ali obrnuta slika (I') ispred žarišne točke druge leće (okulara). Okular tada stvara uvećanu virtualnu sliku (I'') koja se može vidjeti kao obrnuta slika na udaljenosti od 25 cm (normalna vidna duljina) (Slika 1. 10). **Povećanje mikroskopa** umnožak je povećanja okulara i objektivna:

$$\text{ukupno povećanje (U. P.)} = P_{\text{objektiva}} \times P_{\text{okulara}}$$



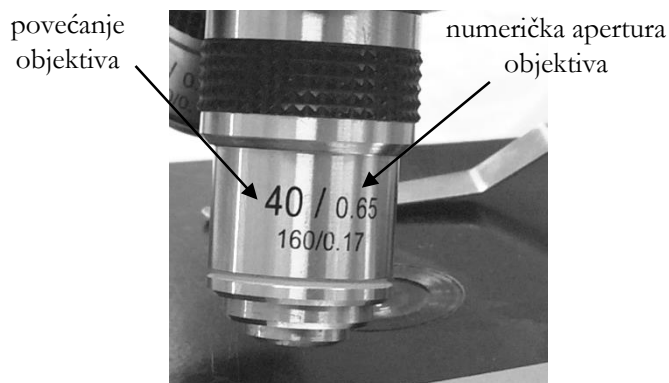
Slika 1. 10. Pojednostavnjen princip dobivanja slike u mikroskopu. F_{ob} – žarište objektiv, F_{ok} – žarište okulara, I – predmet (objekt), I' – slika nastala u objektivu, I'' – uvećana slika nastala u okularu. Izvor: autori.

Moć razdvajanja mikroskopa

Povećanje mikroskopa ne može ići u beskonačnost. Minimalna udaljenost bliskih detalja na predmetu koji će se kroz mikroskop vidjeti kao dvije odvojene točke naziva se **razlučivošću** ili **moći razdvajanja mikroskopa** (d). Ona ovisi o numeričkoj aperturi objektiv, numeričkoj aperturi kondenzora te o valnoj duljini svjetlosti koja pada na preparat. Izračunava se prema jednadžbi:

$$d = \frac{\lambda}{N.A._{obj} + N.A._{kond}}$$

gdje je d udaljenost dviju točaka na preparatu koje vidimo razdvojene, λ (*lambda*) je valna duljina svjetlosti, dok je $N. A.$ numerička apertura objektiv/kondenzora. Prostim okom na normalnoj

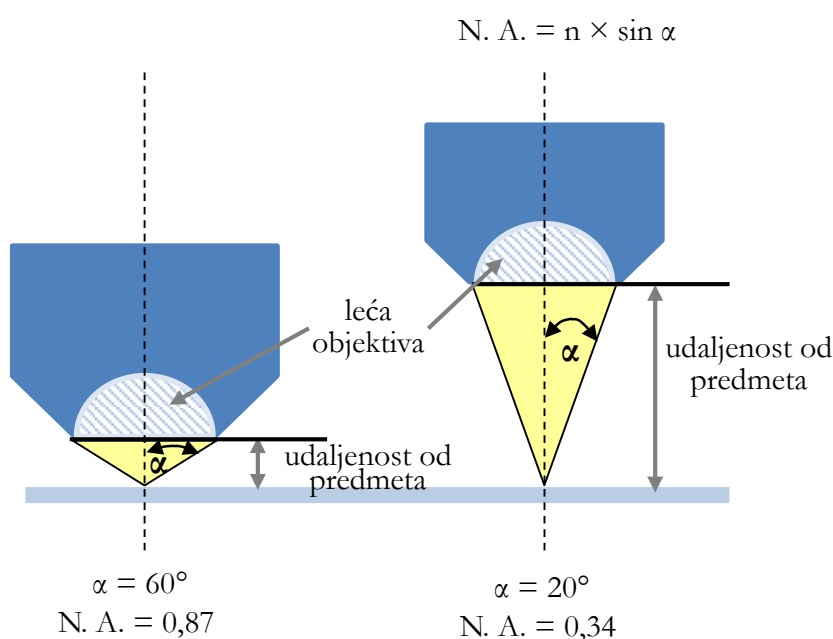


vidnoj duljini (25 cm) možemo uočiti dvije strukture kao međusobno razdvojene ako su međusobno udaljene najmanje oko 0,1 mm. Granica moći razlučivanja običnog svjetlosnog mikroskopa jest od 0,2 do 0,5 μm . Moć razdvajanja mikroskopa *veća* je što je njezina vrijednost (d) *manja*, odnosno

Slika 1. 11. Objektiv. Izvor: autori.

mikroskopom s većom moći razlučivanja možemo odvojeno vidjeti dvije vrlo bliske točke (one su na vrlo maloj međusobnoj udaljenosti). Imajući u vidu gore navedenu formulu, jasno je da se moć razdvajanja mikroskopa može povećati koristimo li svjetlost kraće valne duljine, što se i koristi u nekim tipovima mikroskopa, primjerice fluorescencijskom mikroskopu.

Numerička apertura leće, N. A. (objektiva ili kondenzora), mjera je sposobnosti leće da prikuplja svjetlost i razlučuje fine detalje na promatranu objektu (najvažnija je numerička apertura objektiva). Predstavlja umnožak sinusa polovice kuta stošca svjetlosti koji ulazi u otvor objektiva – α (alfa), i indeksa loma medija koji se nalazi između pokrovnog stakalca i objektiva – n (Slika 1. 12).



Slika 1. 12. Odnos polovice kuta otvora objektiva α i numeričke aperture N. A. Izvor: autori.

Kod objektiva malih i velikih povećanja taj je medij zrak ($n = 1,00029$ – suhi objektivi), a kod imerzijskih objektiva imerzijsko ulje ($n = 1,516$).

Vrijednost N. A. navedena je na svakom objektivu uz vrijednost koja označuje povećanje objektiva (Slika 1. 11).

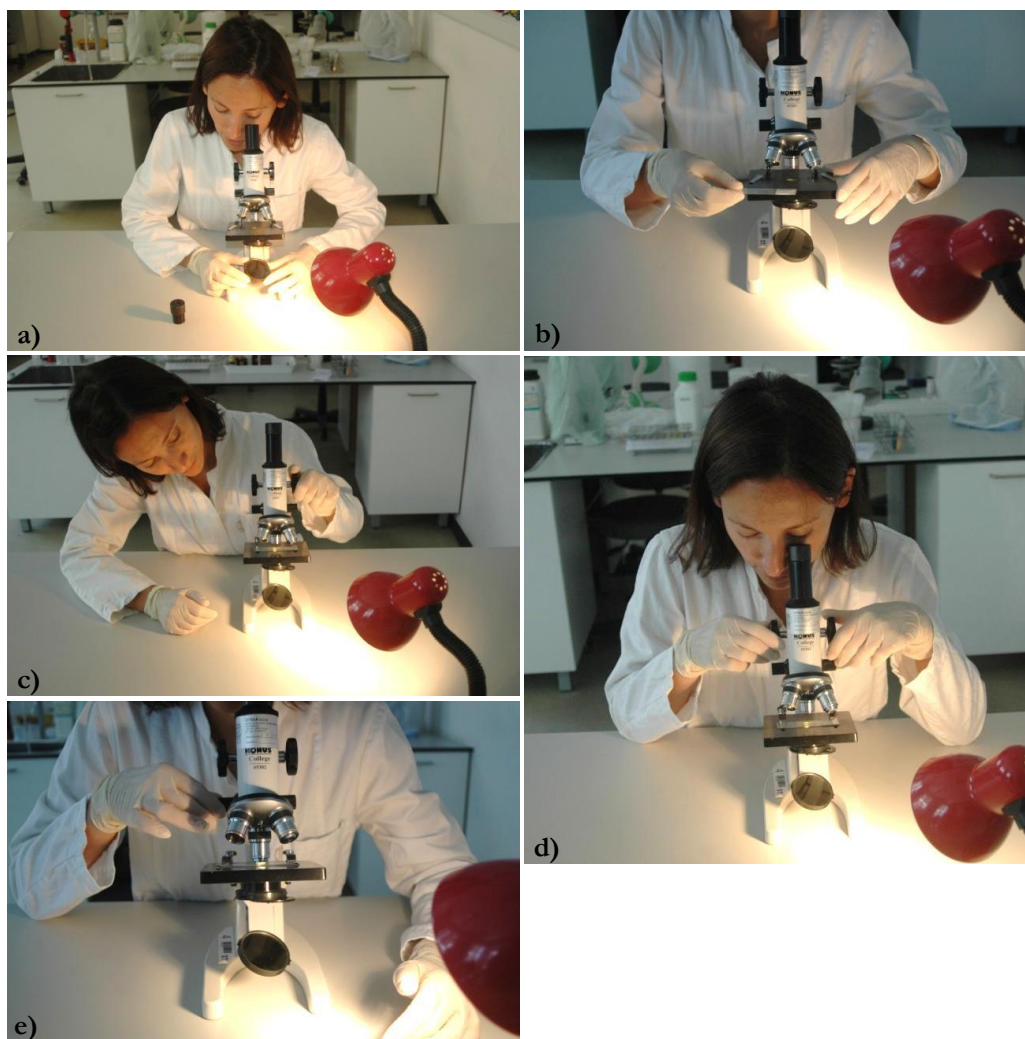
Kvaliteta slike

Kvaliteta slike dobivena mikroskopom ovisi o nizu čimbenika. Prije svega o kvalitetnom izvoru svjetlosti te pravilno namještenom zrcalu, iris-zastoru i kondenzoru; što je veća količina korisnih zraka svjetlosti koje dolaze na preparat, bolja je kvaliteta slike (zbog previše svjetlosti slika biva presjajna pa se količina svjetlosti na preparatu i regulira iris-zastorom). Također, što je tanji preparat i što je veći kut otvora objektiva (veća numerička apertura), više svjetlosti dolazi s

preparata pa je time i razlučivost detalja na njemu bolja. Razlučivost detalja može se povećati i **diferencijalnim bojenjem**: bojom se karakteristično ističu određeni detalji na preparatu. Promatraju li se vrlo mali detalji na vrlo velikom povećanju, koristi se **imerzijski objektiv** uronjen u imerzijsko sredstvo kako bi se smanjili gubitci svjetlosti uslijed loma svjetlosti.

Postupak pravilnog mikroskopiranja

Pravilnim mikroskopiranjem dobit ćete jasnu, oštru sliku predmeta. Postupak se odvija u nekoliko osnovnih koraka (Slika 1. 13):



Slika 1. 13. Postupak pravilnog mikroskopiranja: (a) namještanje izvora svjetlosti, (b) postavljanje mikroskopskog preparata na stolić, (c) približavanje sustava objektiv preparatu uz gledanje sa strane pri traženju slike na malom povećanju, (d) izoštravanje slike makrovijkom na malom povećanju, (e) izoštravanje slike mikrovijkom na velikom povećanju. Izvor: autori.

a) Namještanje izvora svjetlosti

Kod **mikroskopa koji nemaju vlastitu rasvjetu** potrebno je na početku mikroskopiranja usmjeriti vanjski izvor svjetlosti preko zrcala na preparat (Slika 1. 13a). To je najlakše učiniti tako da se izvadi okular (odložiti ga okomito uz mikroskop, u suprotnom se može otkotrljati i pasti) i, gledajući kroz tubus, pomiče zrcalo dok se u sredini vidnog polja ne pojavi žarna nit žarulje svjetiljke. Kad se koriste suhi objektivi, bolje je koristiti udubljeno zrcalo jer je izvor svjetlosti relativno slab. Nakon toga vrati se okular i pogleda kroz njega. Vidno bi polje trebalo biti jarko i ravnomjerno osvijetljeno.

Kod **mikroskopa s vlastitom rasvjetom** potrebno je samo upaliti prekidač koji se obično nalazi na dnu stalka.

b) Dobivanje slike na malom povećanju

Namjestiti **objektiv malog povećanja**, staviti predmetnicu s preparatom na stolić (Slika 1. 13b) i **gledajući sa strane** makrovijkom približiti sustav objektiva na visinu od otprilike pola centimetra od predmetnog stakalca (Slika 1. 13c). Kod nekih modela mikroskopa maksimalno donji položaj objektiva udaljen je više od pola centimetra od stolića pa kod takvih mikroskopa objektiv spustite u najdonji položaj. Kod nekih mikroskopa, uz okretanje makrovijka, objektiv se približava predmetnici pomicanjem tubusa (objektiv se spušta prema predmetnici), a kod drugih pomicanjem stolića (stolić se podiže prema objektivu). **VAŽNO: Sustav objektiva nikada se ne smije približavati predmetnici gledajući u okular (opasnost od razbijanja preparata i/ili leće objektiva)!**

Prisoniti oko na okular i polako makrovijkom podizati objektiv (u suprotnom smjeru od smjera kojim se tubus spuštao do predmetnog stakalca) dok se ne pojavi slika (Slika 1. 13d). Iris-zastorom zasjenjivati vidno polje do postizanja najboljeg kontrasta svih detalja koji se pri danom povećanju mogu vidjeti.

c) Dobivanje slike na velikom povećanju

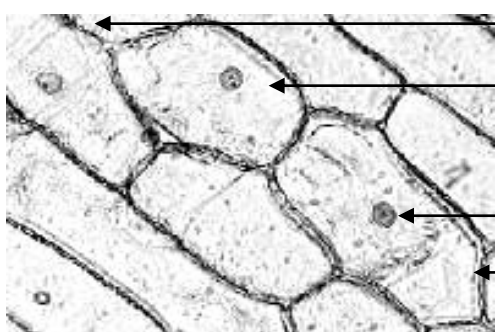
Nakon što je slika pronađena na malom povećanju, okrenuti objektiv velikog povećanja bez pomicanja makrovijka (Slika 1. 13e). **Mikrovijkom izoštriti sliku. NE DIRATI MAKROVIJAK!**

d) Crtanje promatranog predmeta u bilježnicu

Promatrani se predmet u bilježnicu crta tijekom samog mikroskopiranja!

Crtanje mikroskopskih preparata treba ići ovim slijedom i pridržavajući se ovih pravila:

1. Na slici potražite i prepoznajte sve dijelove/strukture navedene u tekstu. Ako se sve pojedinosti ne vide unutar istog vidnog polja, treba pomicati preparat dok ne pronađete sve tražene strukture. Ako neke strukture ni tad ne uspijete pronaći, napravite novi preparat i ponovite postupak.
2. Gledajući mikroskopsku sliku, nacrtajte viđeno u bilježnicu. Pritom vodite računa o sljedećem:
 - Ne zahtijevamo da se radi o umjetničkim slikama (za to ionako nemate vremena), već o jasno i zorno predloženim shematskim skicama koje su i u cilju samog zadatka.
 - Drvene su boje dobrodošle za naglašavanje pojedinih detalja. Pritom pazite na prirodnu boju preparata. Primjerice, u biljnim stanicama zeleno ćete obojiti samo kloroplaste. Također, pozadinu ostavite neobojenu, tj. bijelu.
 - Ne crtajte krug vidnog polja, odnosno ne zaokružujte crtež.
 - Ako se radi o tkivu, nacrtajte više čitavih stanica te *početke susjednih stanica* (Slika 1. 14).



početak susjedne stanice

čitava stanica u tkivu

jezgra

stanična stijenka

Slika 1. 14. Tkivo pokožice lukovice luka (*Allium cepa*) – primjer ispravnog crtanja stanica u tkivu.
Izvor: autori.

- Ne crtajte presitne crteže: poželjna su 2-3 crteža po stranici A4.
- a) Označite na crtežu sve tražene pojmove.
 - b) Zapišite ukupno povećanje pod kojim je promatran nacrtani preparat!

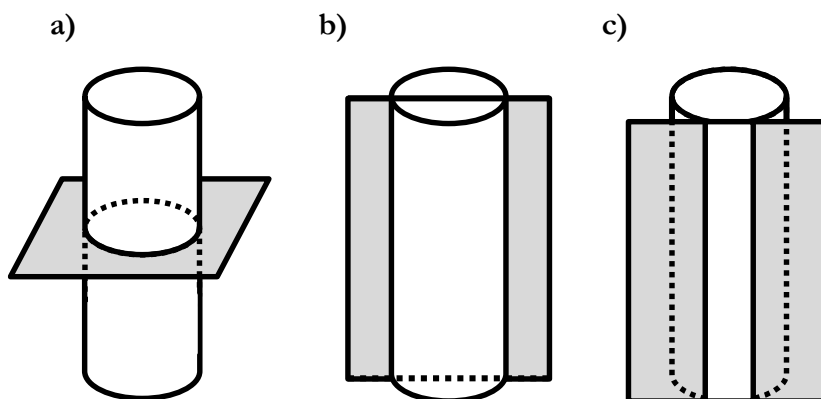
Pri promjeni preparata obvezno vratite objektiv malog povećanja, odnosno ponovite korake od (2) do (4).

Nakon mikroskopiranja okrenite objektiv malog povećanja, isključite izvor svjetla i mikroskop prekrijte navlakom.

Priprava prirodnih (nativnih) preparata

Mikroskopske preparate dijelimo na nativne (prirodne) i trajne.

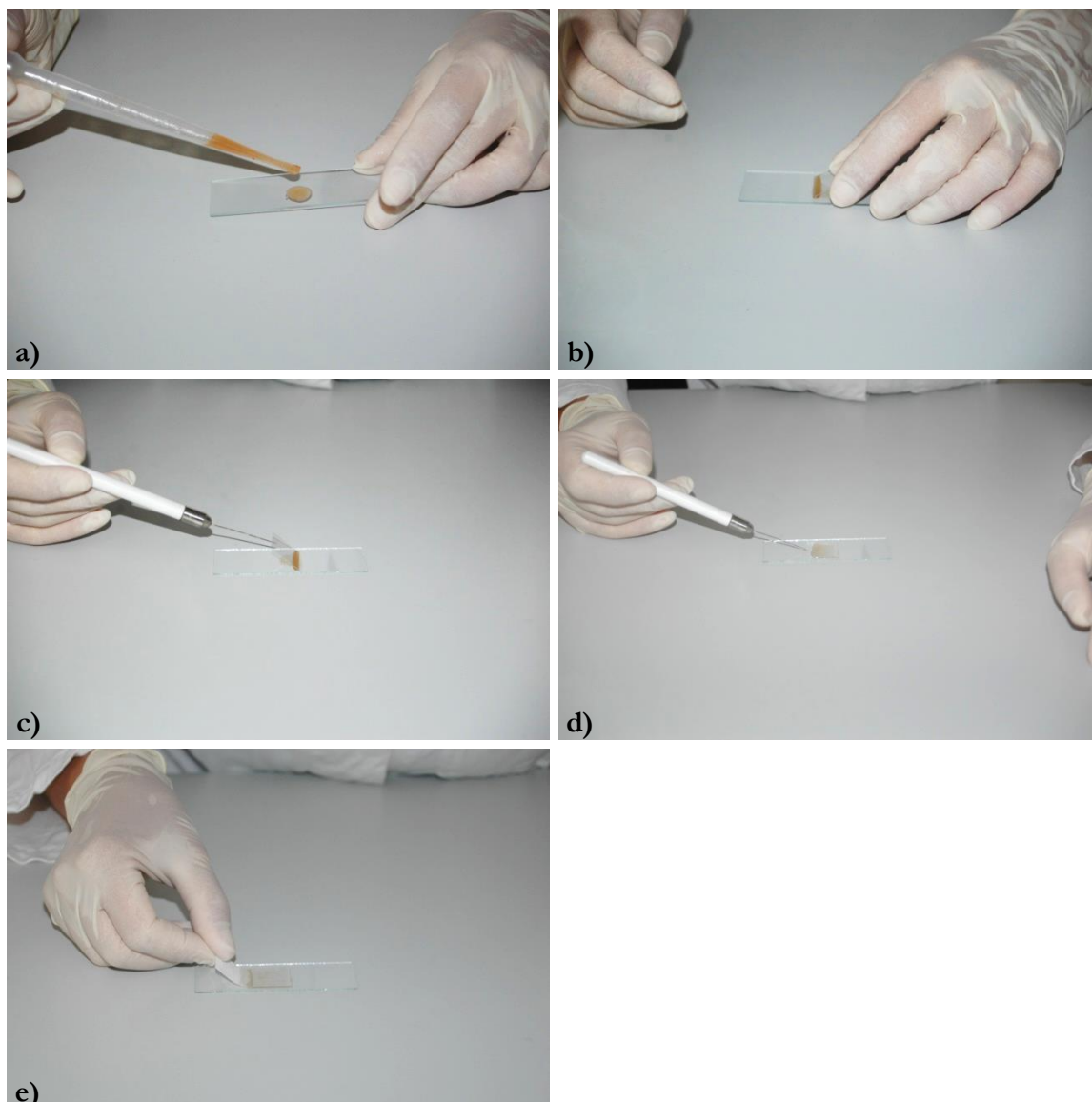
Nativni preparati obično se pripremaju od živih organizama, suspenzije stanica ili presjeka tkiva. Preprati biljnog tkiva rade se tako da se skalpelom ili britvicom napravi nekoliko što tanjih presjeka biljnog tkiva/organa. Presjek može biti poprečni (transverzalni), uzdužni (longitudinalni) ili plošni (tangencijalni) (Slika 1. 15). Uzorak se potom uklopi u vodu između mikroskopskog stakalca (predmetnice) i pokrovnice (Slika 1. 16).



Slika 1. 15. Orijentacije presjeka: (a) poprečni, (b) uzdužni, (c) plošni. Izvor: autori.

Postupak pripreme nativnog preparata:

- a) Na čistu predmetnicu kapnuti kapaljkom kap vode s organizmima/stanicama (Slika 1. 16a) ili čiste vode u koju se mikroskopskom iglicom ili pincetom uroni što tanji prerez tkiva.



Slika 1. 16. Postupak pripreme nativnog preparata. Izvor: autori.

- b) Pridržavajući pokrovnici sa strane, prisloniti njezin donji rub u kapljicu vode na predmetnom stakalcu (Slika 1. 16b).
- c) Histološkom iglicom pridržavati pokrovnici pod kutom od otprilike 45° (Slika 1. 16c) i polako je spuštati do predmetnice (Slika 1. 16d). Ako se stvore mjehurići zraka, nježno pritisnuti pokrovnici da bi se pomaknuli prema rubovima. Ako postoje suha područja pod pokrovnicom, kapnuti kapljicu vode uz rub pokrovnice. Suvišak vode može se odstraniti prislanjanjem filtarskog papira ili staničevine uz rub pokrovnice (Slika 1. 16e).

Žive organizme koji se kreću može se usporiti stavljanjem malo niti vate na predmetnicu na koju se kapne uzorak i poklopi pokrovnicom.

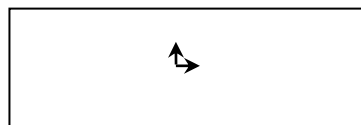
Kod **trajnih preparata** uzorak se umjesto u vodu uklapa u kanadski balzam ili neko drugo sredstvo koje omogućuje očuvanje takvog preparata tijekom dužeg razdoblja.

Obje vrste preparata, i nativni i trajni, mogu se i diferencijalno obojiti. Radi se o bojanju preparata različitim pigmentima, što omogućuje lakše uočavanje pojedinih detalja na istom preparatu.

Zadatak 1: Promatranje orijentacije slike koju daje mikroskop.

Pribor:

- predmetno stakalce
- vodootporni flomaster



Postupak:

Na predmetnicu vodootpornim flomasterom nacrtajte dvije *što manje* strelice, kao što je prikazano na gornjoj shemi.

Prema gore navedenim uputama o pravilnom mikroskopiranju promatrajte crtež na malom povećanju. Obratite pozornost na orijentaciju strelica. Kakva je orijentacija slike koju daje mikroskop u odnosu na stvarnu sliku predmeta?

Zadatak 2: Promatranje mjehurića zraka u vodi na malom i velikom povećanju.

Pribor:

- kapaljka
- histološka iglica
- predmetnica i pokrovnica
- čaša s vodom

Postupak:

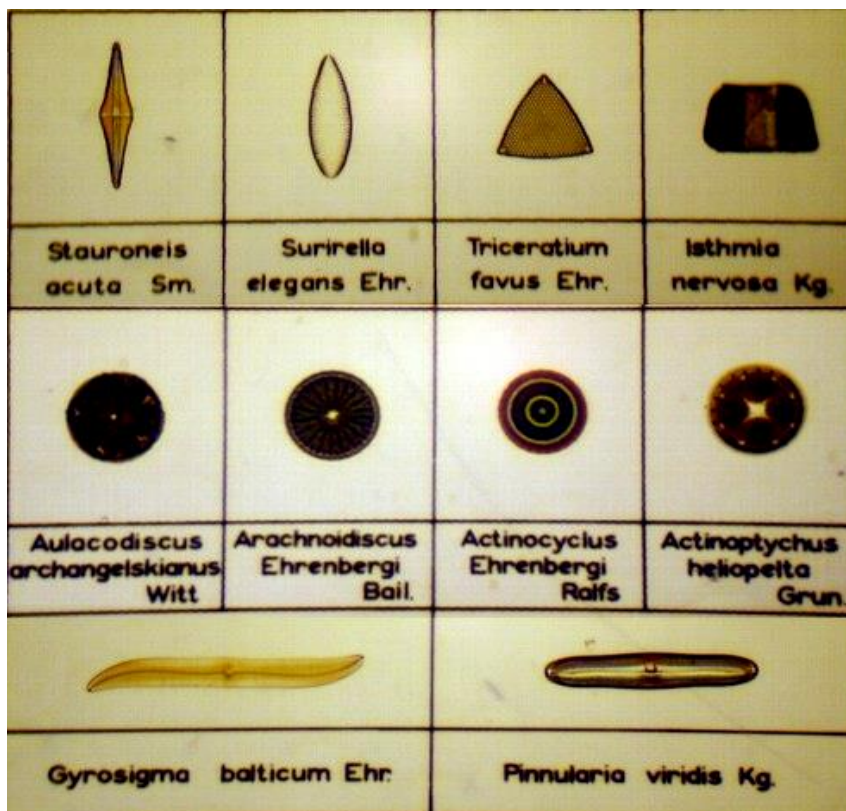
Pripremite preparat mjehurića u vodi tako da naglo spustite pokrovnicu na kapljicu vode na predmenici, odnosno postupite suprotno gore navedenim uputama za pripremu nativnih preparata. Promatrajte i nacrtajte mjehuriće zraka pri malom i velikom povećanju kako biste ih u daljnjem radu prepoznali i ignorirali.

Uočite da pri velikom povećanju ne vidite cijeli mjehurić zraka. To je zato što je objektiv velikog povećanja jako blizu predmetu i njime dobivamo izrazito detaljnu sliku jako malog dijela promatrana predmeta!

Zadatak 3: Promatranje algi kremenjašica (silikatne alge, Diatomeae).

Materijal:

- trajni preparati algi kremenjašica



Slika 1. 17. Alge kremenjašice (400×). Izvor: autori.

Alge kremenjašice (ili silikatne alge, Diatomeae; Slika 1. 17) jednostanični su eukarioti, tj. prave mikroalge. Rasprostranjene su i u slatkim i morskim vodama svih klimatskih područja Zemlje. Razlikujemo alge kremenjašice koje žive u slobodnoj vodi (plankton) i one koje žive na dnu (bentos). U morskoj vodi predstavljaju dominantnu skupinu fitoplanktonskih zajednica obalnog područja. Glavna karakteristika ovih organizama jest njihova modificirana stanična stijenka izgrađena od silicija koja čini kremenu ljušturicu. Sudjeluju u biogeokemijskom kruženju silicija (Si), ali i drugih elemenata kao što su ugljik (C), dušik (N) i fosfor (P). Podnose temperature između 0 i 50 °C (optimalno 10 – 20 °C), a najbolje uspijevaju u slabo alkalnim vodama (pH≥7).

Postupak:

Promatrajte trajni preparat s aranžiranim diatomejama. Nacrtajte nekoliko (3-4) različitih algi. Prema priloženoj Slici 1. 17 pokušajte prepoznati kojem rodu pripadaju neke od algi kremenjašica koje ste nacrtali.

2. STANIČNA MEMBRANA

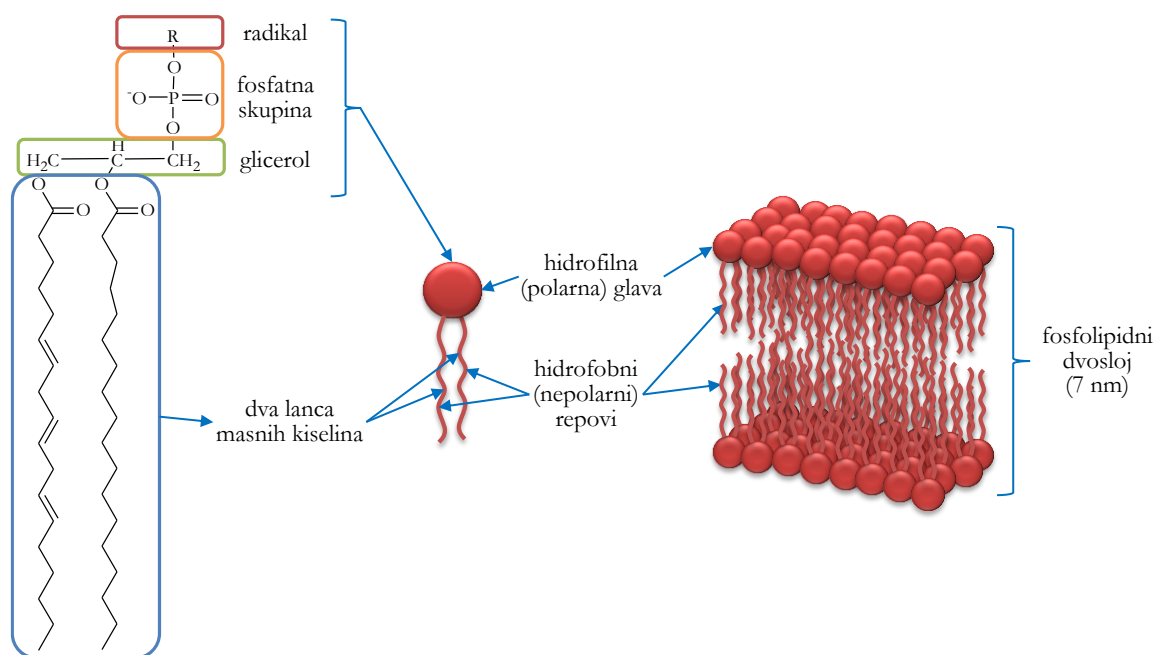
Stanična membrana (plazmatska membrana ili plazmalema) tanka je, lipidna, dvoslojna, polupropusna opna koja čini sastavni dio svih živućih stanica.

Glavne su značajke stanične membrane da okružuje stanicu, daje joj oblik i istovremeno predstavlja jasnu granicu, barijeru, između vanjske (izvanstanične) tekućine i unutarnje (unutarstanične) tekućine ili citosola. U eukariotskim stanicama membrana definira i stanične organele (jezgra, mitohondriji i kloroplasti – omeđeni su dvostrukom membranom, odnosno ovojnicom; lizosomi, Golgijev aparat, endoplazmatski retikulum, peroksisomi, vakuole – jednostrukom membranom). Stanična membrana ujedno predstavlja veznu točku za stanični citoskelet (Slika 2. 2; vidi Poglavlje 4) kao i staničnu stijenkku (kod stanica bakterija, arheja, algi, gljiva i biljaka; vidi Poglavlje 3).

Građa stanične membrane

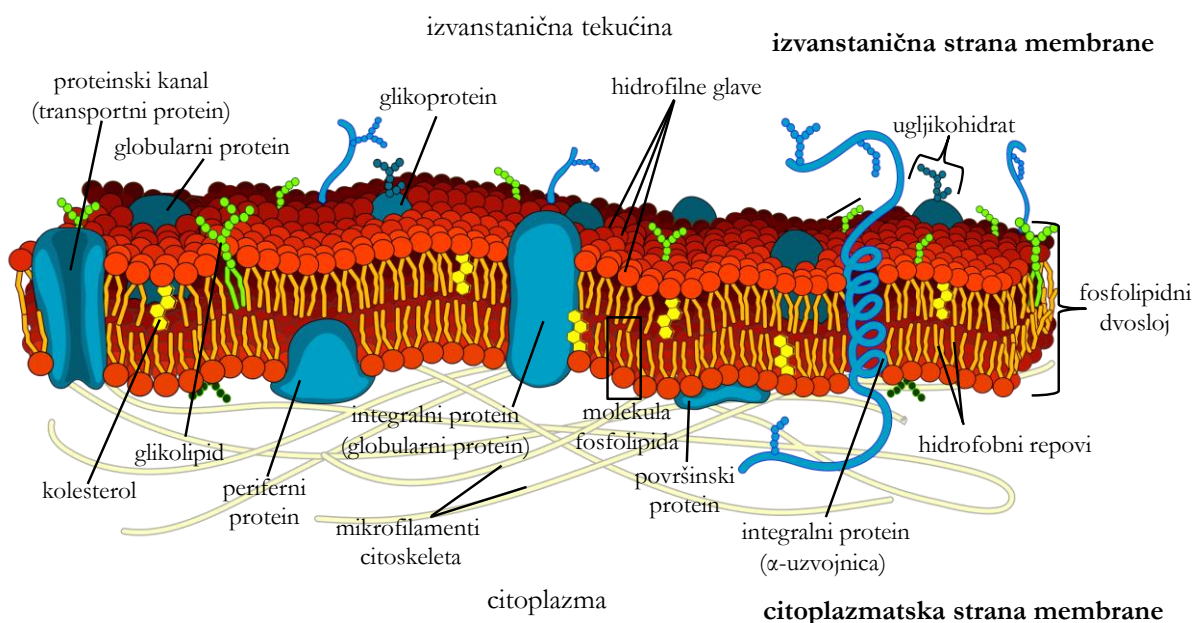
Stanična je membrana građena od velikog broja različitih biomolekula, a najzastupljenije su proteini, lipidi i ugljikohidrati.

Fosfolipidi predstavljaju osnovnu građevnu jedinicu stanične membrane (čine oko 30 % ukupne mase većine staničnih membrana). To su molekule građene od dva lanca masnih kiselina (dva „repa“, hidrofobni, nepolarni dio molekule) povezana s glicerolom na kojeg je vezana i fosfatna skupina („glava“, hidrofilni, polarni dio molekule) (Slika 2. 1).



Slika 2. 1. Molekula fosfolipida i fosfolipidni dvosloj. Izvor: autori.

Upravo zbog amfipatskog svojstva (molekule na jednom kraju privlače vodu, a na drugom odbijaju) fosfolipidne biomolekule spontano se orijentiraju tako da formiraju tzv. fosfolipidni dvosloj: hidrofobni (lipidni) dijelovi orijentirani su unutar dvosloja, a hidrofilni (fosfatni) dio prema izvanstaničnoj tekućini i citoplazmi (Slika 2. 1 i Slika 2. 2). Debljina fosfolipidnog dvosloja iznosi oko 7 nm. Tako formirani fosfolipidni dvosloj čini stabilnu barijeru između dva vodena medija (citoplazme i izvanstanične tekućine) i predstavlja osnovnu strukturu svih bioloških membrana. Same fosfolipidne molekule unutar dvosloja povezuju se nekovalentnim interakcijama hidrofobnih repova, ali usprkos tomu nisu statične, već se mogu slobodno pokretati unutar sloja (svojstvo fluidnosti stanične membrane), odnosno između slojeva. Ipak, budući da kretanje fosfolipida između slojeva nije energetski povoljno (hidrofilna glava mora proći kroz hidrofobni sloj), takva kretanja nisu česta.



Slika 2. 2. Shema građe plazmatske membrane; model „tekućeg mozaika“. Izvor: <http://bit.ly/2uxOKiZ>

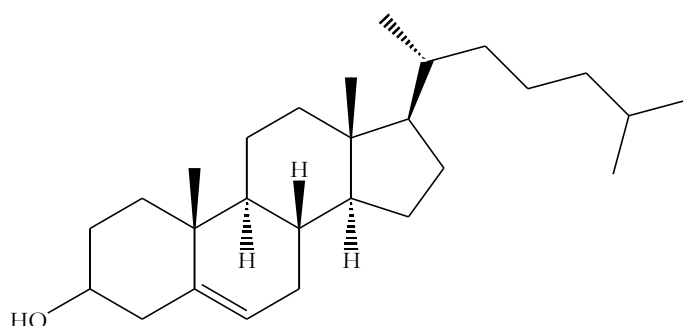
Zbog opisane fluidnosti stanične membrane pojedine se komponente unutar nje mogu gibati ovisno o potrebama (npr. fosfolipidne molekule). Danas prihvaćen model koji najbolje objašnjava složenu građu i funkciju stanične membrane jest tzv. „model tekućeg mozaika“ (Singer i Nicolson, 1972.) (Slika 2. 2).

Osim fosfolipida u membrani se nalaze i različiti **membranski proteini** (čine oko 50 % ukupne mase većine staničnih membrana). S obzirom na njihov položaj u fosfolipidnom dvosloju, razlikujemo dvije skupine membranskih proteina: integralne (ili transmembranske) proteine (u potpunosti uloženi u fosfolipidni dvosloj) i periferne proteine (nalaze se na površini

fosfolipidnog dvosloja) (Slika 2. 2). Glavna je uloga integralnih proteina prijenos raznih molekula i iona preko stanične membrane – oni grade proteinske nosače, ionske kanale i proteinske crpke. Periferni su proteini reverzibilno (privremeno) pričvršćeni za integralne membranske proteine ili za molekule fosfolipida. Periferni su proteini primjerice enzimi i hormoni koji su uključeni u mnogobrojne bitne funkcije stanične membrane.

Uz fosfolipide i proteine u sastav stanične membrane ulaze i **ugljikohidrati** i to ili kovalentno vezani na lipide membrane (glikolipidi) ili vezani na proteine (glikoproteini) (Slika 2. 2).

Jedna je od osnovnih struktura staničnih membrana životinjskih stanica i **kolesterol** (Slika 2. 3). To je lipidna molekula koja se prema svojoj strukturi svrstava u sterole. Steroli su podgrupa steroida, lipida čije su molekule izgrađene od četiri međusobno povezana ugljikovodična prstena i koje imaju dodatnu hidroksilnu (-OH) skupinu. Kolesterol se nalazi nepravilno razasut unutar samog membranskog lipidnog dvosloja – steroidni nepolarni dio molekule (ugljikovodični prstenovi, „rep“) uklopljen je u dvosloj, a alkoholni polarni dio molekule (-OH skupina, „glava“) na površini je dvosloja (Slika 2. 2). Uloga je kolesterola regulacija fluidnosti same membrane u ovisnosti o temperaturi: pri nižoj temperaturi onemogućuje prečvrsto povezivanje molekula



fosfolipida, a pri višoj temperaturi onemogućuje njihovo međusobno odmicanje. Stanične membrane biljnih stanica ne sadrže kolesterol, ali sadrže druge sterole koji imaju sličnu ulogu kao kolesterol kod životinjskih stanica.

Slika 2. 3. Struktura molekule kolesterola. Izvor: autori.

Propusnost stanične membrane

Kao granična barijera, a i zbog određenih fizioloških i kemijskih karakteristika, stanična membrana ima svojstvo **selektivne propusnosti** (semipermeabilnosti): omogućuje određenim tvarima ulazak u stanicu, dok istovremeno sprječava prolazak drugih tvari. Svojstvo selektivne propusnosti membrana uvjetovano je samom njihovom građom. Membrane reguliraju izmjenu tvari između stanica i njihove okoline te između organela i citosola. Također osiguravaju zadržavanje određenih staničnih metabolita u odvojenim dijelovima stanice (odjeljcima).

Između živih organizama i njihove okoline prisutna je neprekidna izmjena tvari, a na razini stanice prijenos tvari kroz staničnu membranu može biti:

- I. **pasivni prijenos tvari** (pasivni transport) ili difuzija proces je prijenosa tvari pri kojem se ne troši energija. Tvari se, kroz lipidni dvosloj, kreću s područja svoje više koncentracije u područje svoje niže koncentracije (*niz* koncentracijski gradijent). Treba napomenuti da proces difuzije podrazumijeva bilo koje kretanje molekula niz koncentracijski gradijent, bez utroška energije. Difuzija se može, ali i ne mora, odvijati kroz membranu (detaljnije objašnjenje vidi dalje u tekstu). Difuzija tvari kroz membranu:
 - a. **jednostavna difuzija**: prijenos malih ili nepolarnih molekula za koje nije potreban nikakav proteinski nosač ili kanal (O_2 , CO_2 , alkoholi, steroidni hormoni, tvari topive u lipidima itd.)
 - b. **olakšana difuzija**: prijenos velikih ili polarnih molekula i iona koji ne mogu samostalno proći kroz membranu, već postoje specifični proteini koji omogućuju njihov prijenos. Ti proteini pripadaju **proteinskim nosačima** (prenose molekule ili ione kroz membranu putem svoje konformacijske promjene) i **proteinskim kanalima** (protein gradi tunel kroz membranu kojim prolaze molekule ili ioni). Olakšanom se difuzijom prenose molekule koje su ili prevelike da nesmetano prođu kroz lipidni dvosloj (glukoza), ili su polarne (voda, aminokiseline) pa im to onemogućuje prolazak kroz središnji nepolarni dio dvosloja, ili se radi o nabijenim ionima (npr. Na^+ i K^+).
- II. **aktivni prijenos tvari** (aktivni transport): prijenos tvari pri kojem se troši energija. Tvari se kreću s područja svoje niže koncentracije kroz lipidni dvosloj u područje svoje više koncentracije (*uz* koncentracijski gradijent) i to kroz specijalizirane proteinske kanale. Iz tog razloga prijenos tih tvari ne može se odvijati spontano difuzijom, već stanica mora uložiti energiju. Ako se za prijenos određene tvari troši energija u obliku ATP-a, radi se o tzv. **primarnom** aktivnom transportu. Primjerice, ABC-transportni proteini imaju ugrađenu jedinicu za hidrolizu ATP-molekule i transportiraju niz različitih molekula kroz staničnu membranu primarnim aktivnim transportom. U slučaju **sekundarnog** aktivnog transporta tvari prolaze kroz združene proteinske nosače i to tako da jedna tvar prolazi niz svoj koncentracijski gradijent te time oslobađa energiju za prijenos druge tvari uz njezin koncentracijski gradijent. Primjerice, Na^+ -glukoze crpke, koje se nalaze u epitelnim stanicama tankog crijeva i proksimalnim kanalčićima bubrega, transportiraju glukozu uz njezin koncentracijski gradijent iz lumena crijeva, odnosno iz lumena bubrežnih kanalčića, u stanice, zahvaljujući energiji koja se oslobodila difuzijom natrijevih iona niz njihov

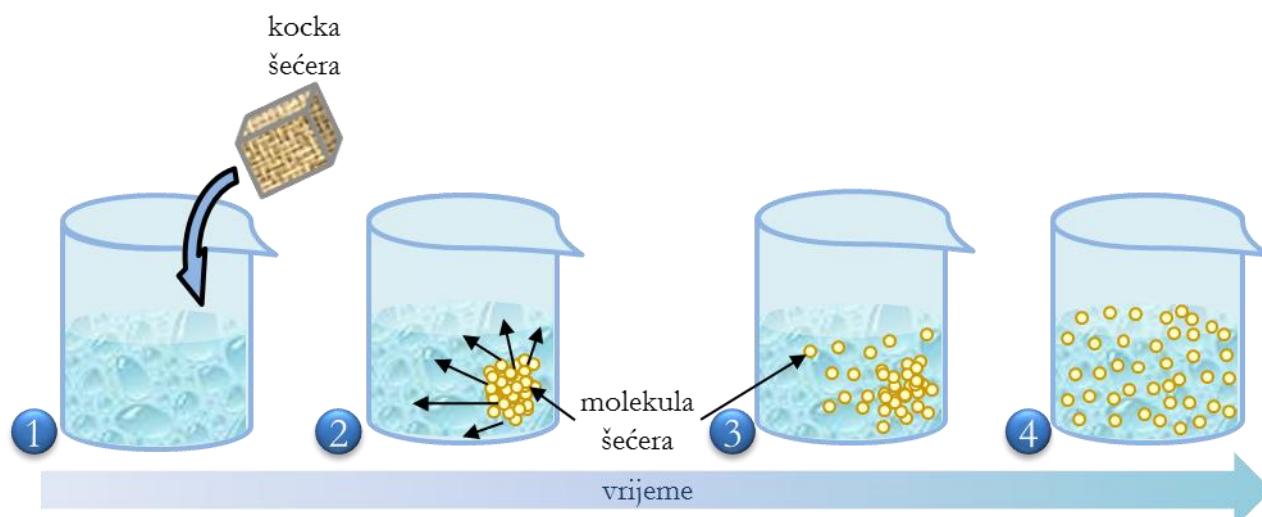
elektrokemijski gradijent.

Propusnost stanične membrane određene stanice ovisi o (i) njezinom sastavu, odnosno prisutnosti/odsutnosti specifičnih nosača i transportnih proteina, te sastavu lipidnog dvosloja u koji su ti nosači uklopljeni, (ii) veličini i kemijskom sastavu te o naboju tvari koja prolazi kroz membranu (kao što je pokazano u više primjera gore u tekstu). Transport određene molekule može u nekom slučaju biti aktivan, a u drugom pasivan, ovisno o fiziološkim potrebama. Tako se glukoza kroz membranu eritrocita prenosi olakšanom difuzijom, a kroz membranu epitelnih stanica crijeva aktivnim transportom. Naime, uloga je crijevnog epitela prijenos glukoze (iz hrane) iz probavila u ostatak tijela, kao i sprječavanje prolaza glukoze u suprotnom smjeru (iz tijela u probavilo). Zato se u tom slučaju glukoza prenosi aktivnim transportom pa ona uvijek ulazi u stanicu crijevnog epitela, a nikad ne izlazi iz njih, čak i kada je koncentracija glukoze u lumenu crijeva niža nego u stanicama crijevnog epitela. U suprotnosti s ovim, glukoza kroz membranu eritrocita (i većine drugih stanica u crijevu) prolazi olakšanom difuzijom, uz pomoć proteinskih nosača. Za razliku od crijeva, gdje se koncentracija glukoze neprestano mijenja i može biti i viša i niža od njezine koncentracije u stanicama crijeva, koncentracija glukoze u krvi strogo je regulirana i obično viša nego u stanicama. Čim glukoza olakšanom difuzijom uđe u eritrocit, kemijskim se reakcijama pretvara u druge spojeve potrebne za proizvodnju energije ili biosintezu. Dakle, u ovom slučaju nema potrebe za aktivnim transportom glukoze jer bi to značilo bespotreban gubitak energije.

Difuzija

Na svim temperaturama višim od apsolutne nule pojedini atomi određene tvari uvijek su u pokretu. Što je temperatura viša, atomi se kreću brže. Kada to kretanje postane dovoljno brzo, kruta tvar prelazi u tekuću, odnosno u plinovitu fazu u kojima se atomi mogu slobodnije kretati. Kada bismo mogli pratiti kretanje pojedinih atoma ili molekula u tekućini ili plinu, vidjeli bismo da se kreću nasumično, sudarajući se pritom s drugim atomima i molekulama. Takvo nasumično gibanje naziva se Brownovim gibanjem.

Kad u nekoj otopini postoji koncentracijski gradijent (u jednom dijelu otopine nalazi se puno veći broj čestica nego u drugom), doći će do procesa difuzije, odnosno ukupni učinak kretanja čestica bit će s mjesta njihove veće koncentracije na mjesto njihove manje koncentracije do izjednačenja koncentracije u čitavoj otopini. Najjednostavniji su primjeri difuzije širenje kapi tinte ili otapanje kocke šećera u čaši vode (Slika 2. 4).



Slika 2. 4. Proces difuzije – otapanje kocke šećera u čaši vode (1 – 4). Tijekom vremena molekule šećera kreću se s mjesta njihove veće koncentracije (kut čaše, 2) niz svoj koncentracijski gradijent do konačnog izjednačenja koncentracije u čitavoj otopini (4). Izvor: autori.

Zadatak 1: Promatranje difuzije.

Reagensi:

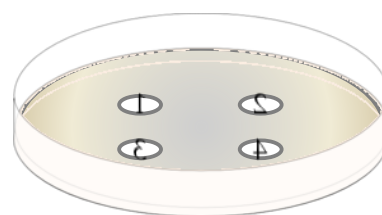
- 1,5 %-tni agar-gel u Petrijevoj zdjelici
- otopina 1: 0,1 M kongo crvenilo ($C_{32}H_{22}N_6O_6S_2Na_2$)
- otopina 2: 0,1 M metilno crvenilo, natrijeva sol ($C_{15}H_{14}N_3O_2Na$)
- otopina 3: 0,1 M kalijev permanganat ($KMnO_4$)
- otopina 4: 0,1 M malahitno zelenilo ($C_{23}H_{25}N_2Cl$)

Pribor:

- Petrijeva zdjelica ispunjena 1,5 %-tnim agarom u kojem su izbušena četiri bazenčića
- kapaljka
- ravnalo
- vodootporni flomasteri
- stalci za kivete od 1,5 mL
- posuda za otpad

Postupak:

U Petrijevoj zdjelici s 1,5 %-tnim agar-gelom izbušena su četiri bazenčića. Na poleđini zdjelice vodootpornim flomasterom označite bazenčiče brojevima od 1 do 4, za četiri različite otopine boja (Slika 2. 5). U svaki bazenčić dodajte jednu kapljicu (oko 50 μ L) gore navedenih otopina. Nemojte prepuniti bazenčiče! Ovaj



Slika 2. 5. Petrijeva zdjelica s bazenčićima. Izvor: autori.

zadatak treba izvesti na početku vježbi kako bi se rezultati mogli promatrati na kraju njihova izvođenja. Nakon 90 minuta preokrenite Petrijevu zdjelicu i izmjerite promjer obojenog kruga oko svakog bazenčića u milimetrima. Precrtajte donju tablicu u bilježnicu i ispunite dobivenim rezultatima!

otopine	kongo crvenilo	metilno crvenilo	kalijev permanganat	malahitno zelenilo
promjer kruga (mm)				

Odgovorite na sljedeća pitanja:

- Što opažate i što možete zaključiti na temelju dobivenih rezultata? Kako relativna molekulska masa molekula utječe na brzinu njihove difuzije?
- Zašto je korišten agar u ovom eksperimentu?

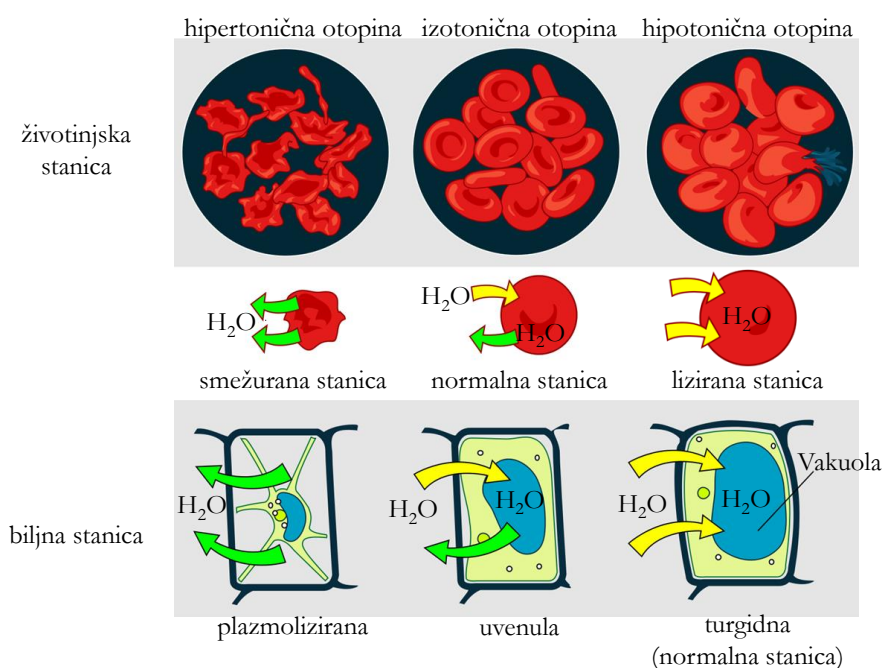
Osmoza

Najzastupljenija je tvar u većini stanica voda, otapalo u kojem je otopljena većina drugih molekula u stanici. Kao što je ranije spomenuto, voda može pasivnim transportom (olakšanom difuzijom) proći kroz staničnu membranu. **Osmoza** je proces prolaska vode kroz selektivno propusnu membranu. To je zapravo poseban slučaj difuzije: difuzija otapala (vode), a ne difuzija otopljene tvari. Osim toga, za razliku od obične difuzije, osmoza uključuje prolazak otapala *kroz membranu*. Kad se osmoza odvija u živim stanicama, voda difundira kroz selektivno propusnu membranu niz *svoj* koncentracijski gradijent: iz razrijeđene otopine (u kojoj je koncentracija vode veća) u koncentriraniju otopinu (u kojoj je koncentracija vode manja).

Osmotski tlak je tlak koji je potrebno primijeniti na koncentriraniju otopinu kako bi se spriječila osmoza, odnosno difuzija vode iz razrijeđene otopine. Stoga se može reći da osmotski tlak održava stanje različitih koncentracija otopljenih molekula (čestica) u otopinama razdvojenim polupropusnom membranom. Proporcionalan je molarnoj koncentraciji otopljenih tvari u otopini: otopina s velikim brojem molekula otopljenih tvari u odnosu na broj molekula otapala (visoka molarna koncentracija otopljenih tvari) ima visok osmotski tlak. Isto tako, otopina s malo otopljenih tvari u odnosu na broj molekula otapala (niska molarna koncentracija otopljenih tvari) ima niski osmotski tlak. Tijekom osmoze molekule otapala difundiraju kroz polupropusnu membranu niz svoj koncentracijski gradijent dok se ne uspostavi osmotska ravnoteža s obje strane polupropusne membrane, odnosno dok se ne izjednače osmotski tlakovi dviju otopina. Osmotski je tlak bitan čimbenik koji utječe na žive stanice. Stanica (živi organizam) posjeduje

mehanizme kojima regulira osmotski tlak (osmoregulacija). Naime, stanice su mali osmotski sustavi: obavijene su selektivno propusnom plazmatskom membranom koja obavija citoplazmu – vodenu otopinu različitih tvari. Da bi preživjela, stanicu mora i izvana okruživati određena količina vode, u kojoj su također otopljene neke tvari. Kao što je prikazano na Slici 2. 6, ovisno o koncentraciji otopljenih tvari u izvanstaničnoj otopini, ta otopina može biti:

1. **izotonična** s citoplazmom – tada je ukupno kretanje molekula vode u stanicu i iz nje jednako nuli. Izvanstanična otopina ima jednaki osmotski tlak kao stanična tekućina. Stanica uronjena u izotoničnu otopinu ne mijenja svoj oblik jer u istom vremenskom intervalu u stanicu (npr. eritrocit) kroz semipermeabilnu membranu uđe i iz nje iziđe ista količina vode.
2. **hipotonična** u odnosu na citoplazmu – ako je tekućina izvan stanice razrjeđenija od citoplazme, tj. ima niži osmotski tlak. Tada voda osmozom ulazi u stanicu.
3. **hipertonična** u odnosu na citoplazmu – ako je tekućina izvan stanice koncentriranija od citoplazme, tj. ima viši osmotski tlak. Tada voda osmozom izlazi iz stanice.



Slika 2. 6. Djelovanje hipertonične, izotonične i hipotonične otopine na životinjsku i biljnu stanicu.
Izvor: <http://bit.ly/2toBIFL> i <http://bit.ly/2f1Nad7>

Zbog razlike u građi biljne i životinjske stanice (ponajprije zbog toga što biljne stanice imaju staničnu stijenk, a životinjske ne) na njih različito djeluju otopine različitog toniciteta, što ćete promatrati u sljedećim zadacima (Zadaci 2 i 3). Tonicitet je mjera sposobnosti otopine da izvrši osmotski tlak na membranu. Drugim riječima, tonicitet izravno ovisi o koncentraciji otopine.

Utjecaj otopina različitih toniciteta na biljnu stanicu

U biljnim stanicama nalazimo **vakuole** – stanične organele obavijene jednostrukom lipoproteinskom membranom koja se zove **tonoplast**. Kod diferenciranih stanica vakuole mogu zauzimati gotovo čitav lumen stanice dok ih kod embrijskih stanica uopće nema. Unutar vakuola biljna stanica pohranjuje ione, šećere, organske kiseline i aminokiseline, različita bojila te mnoge druge tvari. Sadržaj vakuole naziva se **staničnim sokom**. Otopljene tvari u staničnom se soku nalaze u znatnim koncentracijama, zbog čega je povećan osmotski (hidrostatski) tlak, a time i ulazak (influks) vode.

Nadalje, za razliku od životinjske stanice, stanice biljaka s vanjske strane plazmatske membrane imaju i **staničnu stijenk**u koja im daje oblik i čvrstoću (vidi Poglavlje 3).

Turgorski tlak (**turgor**) biljne stanice pritisak je staničnog sadržaja na staničnu stijenk i on je većim dijelom određen sadržajem vode u vakuoli. Turgor vakuole pritišće citosol i plazmatsku membranu (plazmalemu) uz čvrstu staničnu stijenk. Iz tog su razloga i citosol i plazmatska membrana tijesno priljubljeni uz staničnu stijenk, dok velika vakuola zauzima gotovo cijeli lumen biljne stanice. Turgor ima odlučujući utjecaj na održavanje čvrstoće i stabilnosti biljnog tkiva. Svaka stanica vrši pritisak na okolne stanice, a ti se tlakovi zbrajaju i u konačnici doprinose visokoj napetosti biljnog tkiva. Turgorskim tlakom omogućen je stoga uspravan položaj biljnih organa – lista i stabljike. Biljke koje gube vodu venu jer se smanjuje turgorski tlak u stanicama (jer se više ne nalaze u hipotoničnom okruženju) te se stabilnost i napetost tkiva ne može održati. Sve dok su stanice žive, turgorski se tlak može obnoviti, odnosno zalijevanjem uvenula će se biljka oporaviti.

Zbog stanične stijenke osmotski ulazak vode koji se javlja kad su stanice u hipotoničnoj otopini dovodi do povećanja turgorskog tlaka, ali ne i do povećanja staničnog volumena. Dakle, u hipotoničnoj otopini biljna stanica poprima normalan oblik (turgidna stanica, Slika 2. 6). Korijen biljke neprestano crpi vodu iz zemlje, što upravo i omogućuje hipotoničan medij biljnih stanica.

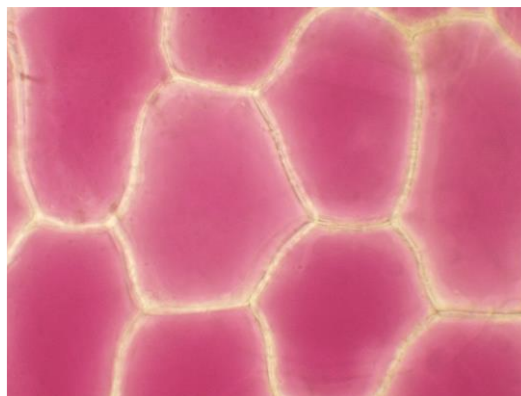
Ako se biljna stanica stavi u hipertoničnu otopinu, voda izlazi iz stanice preko stanične membrane (plazmaleme). Voda se ponajprije



Slika 2. 7. Plazmoliza u stanicama pokožice luka (*Allium cepa*); crnim strelicama označene Hechtove niti (400×).
Izvor: autori.

gubi iz vakuole koja se smanjuje, povećava se koncentracija staničnog soka, smanjuje se obujam stanice, a istovremeno se smanjuje i pritisak na staničnu stijenku. Smanjivanje pritiska na staničnu stijenku uzrokuje odvajanje plazmaleme i nastupa plazmoliza, tj. odvajanje stanične membrane od stanične stijenke (Slika 2. 7). Daljnjim napredovanjem ovog procesa tonoplast, citoplazma i plazmalema prate smanjivanje vakuole, dok se citoplazma i plazmalema konačno ne skupe u oblik lopte (kugle) oko vakuole. Plazmalema se na mjestima još uvijek drži za staničnu stijenku pa su u tom trenutku vidljive tanke citoplazmatske ili Hechtove niti (Slika 2. 7; označeno strelicama) koje se protežu od stanične stijenke prema plazmoliziranom protoplastu. Plazmoliza se nastavlja sve dok se zbog izlaska vode iz stanice osmotski tlakovi citoplazme i izvanstanične tekućine ne izjednače.

Stavljanjem stanice iz hipertonične u hipotoničnu otopinu dolazi do deplazmolize (Slika 2. 8). Voda iz izvanstanične tekućine ulazi u vakuolu i postupno se povećava njezin volumen. Kako vakuola raste, tako ona potiskuje tonoplast, citoplazmu i plazmalemu prema staničnoj stijenci (Hechtove niti više nisu vidljive). Pritisak na staničnu stijenku sve više raste, plazmalema i citoplazma su opet tijesno priljubljene uz staničnu stijenku, a gotovo cijeli volumen stanice zauzima velika vakuola. Deplazmoliza traje, tj. voda ulazi u stanicu dok se ne izjednače osmotski tlakovi citoplazme i izvanstanične tekućine.



Slika 2. 8. Deplazmoliza u stanicama pokožice luka (*Allium cepa*) (400×). Izvor: autori.

Zadatak 2: Plazmoliza i deplazmoliza u stanicama epiderme luka.

Biljni materijal:

- crveni luk (*Allium cepa*), porodica Alliaceae

Reagensi:

- konc. otopina natrijevog klorida (NaCl)
- voda (H₂O)

Pribor:

- predmetna i pokrovna stakla
- mikroskop
- filtarski papir
- britvica ili pinceta
- posuda za otpad
- histološka iglica

U ovom zadatku promatrat ćete stanice epiderme sočnih listova lukovice crvenog luka, *Allium cepa*, te proučiti promjene koje se događaju u stanicama kada su uronjene u otopine različitog toniciteta (hipertonična otopina – konc. otopina natrijevog klorida; hipotonična otopina – obična voda).

Lukovica je podzemna vertikalna (uspravna) stabljika na kojoj se nalaze posebno zadebljali modificirani listovi (ili baze listova; nemaju peteljku) čija je uloga pohranjivanje rezervne hrane. Promatrat ćete stanice **epiderme** (pokožice, tanke kožice) koje u vakuoli, odnosno u staničnom soku, sadrže ljubičasto-crveni pigment **antocijan**. Epidermu čini jedan sloj duguljastih stanica (Slika 2. 8) na površini zadebljanih listova lukovice. Obratite pozornost na to da list ima gornju i donju epidermu, a da se pigment nalazi samo u donjoj epidermi te ćete stoga pod mikroskopom promatrati duguljaste stanice donje epiderme obojene ljubičasto-crveno. Kod ovih je stanica vakuola vrlo velika pa je citoplazma sa svim organelama koji se nalaze u njoj svedena na tanak sloj između tonoplasta (membrane vakuole) i plazmaleme. Sloj citoplazme toliko je tanak da se gotovo i ne vidi pa izgleda kao da je cijela stanica obojena ljubičasto-crveno (Slika 2. 8). U nekim stanicama moći ćete uočiti jezgru ako se ona nalazi iznad vakuole. Nemojte je zamijeniti s mjehurićima zraka, koji imaju, za razliku od jezgre, vrlo pravilan tamni rub (Poglavlje 1, Zadatak 2). Obratite pozornost na to da se jezgra ne nalazi *u* vakuoli (iako tako izgleda), nego *iznad* nje.

Postupak:

1. Britvicom, pincetom ili noktom pažljivo odljuštite mali komadić *donje* epiderme sočnog lista lukovice crvenog luka, stavite ga u kapljicu vode na predmetnici i poklopite pokrovnicom. Pazite da se pokožica ne savije ili ne smota (ako se to ipak dogodi, poravnajte je uz pomoć histološke iglice) i izbjegnite stvaranje mjehurića zraka! Promatrajte stanice pokožice luka pod mikroskopom (malo i veliko povećanje). Nacrtajte nekoliko promatranih stanica!
2. Nakon toga uz rub pokrovnice kapnite kapljicu konc. otopine natrijevog klorida (NaCl). Ne skidajte pokrovnicu kako bi tkivni prerez ostao ravan. Filtarski papir prislonite uz rub pokrovnice nasuprot mjestu kapnute otopine NaCl i na taj način uvucite otopinu pod pokrovnicu. Opet promatrajte stanice pod mikroskopom. Što opažate? Nacrtajte opažene promjene!
3. Na kraju uz rub pokrovnice (ne skidati pokrovnicu!) kapnite nekoliko kapi vode (H₂O). Ponovno filtarskim papirom uvucite vodu pod pokrovnicu i promatrajte pod mikroskopom. Što opažate? Nacrtajte opažene promjene!

Crteže 1, 2 i 3 međusobno povežite strelicama i na njima označite sljedeće:

- stanična stijenka
- plazmalema (stanična membrana)
- vakuola koja sadrži pigment antocijan
- tonoplast (membrana vakuole)
- plazmatske niti (Hechtove niti)
- jezgra
- *konc. NaCl (plazmoliza)
- *H₂O (deplazmoliza).

*Označiti iznad strelica!

Koji je ključni faktor omogućio promatranje plazmolize i deplazmolize u stanicama pokožice crvenog luka (*Allium cepa*)?

Utjecaj otopina različitih toniciteta na životinjsku stanicu

Kao što je objašnjeno u gore navedenom tekstu, biljna stanica osmozom prima vodu i u njoj se stvara turgor – hidrostatski tlak koji doprinosi napetosti biljnog tkiva. Zahvaljujući postojanju stanične stijenke, biljna stanica ne može prsnuti u hipotoničnoj otopini. Štoviše, za biljnu je stanicu to normalno stanje (Slika 2. 6). Nasuprot tomu, životinjska je stanica puno osjetljivija na promjene toniciteta izvanstanične tekućine. Ona ne posjeduje stijenkicu pa mora neprestano biti u izotoničnoj otopini kako bi preživjela. U hipotoničnoj otopini smjer kretanja vode veći je iz otopine u stanicu nego obrnuto, stoga se stanici povećava volumen dok ne dođe do oštećenja membrane i prsnuća stanice zbog povećanja staničnog tlaka. U hipertoničnoj otopini smjer kretanja vode veći je iz stanice u otopinu nego obrnuto, zato stanice gube vodu, smežuraju se te im se volumen znatno smanji (Slika 2. 6).

Tijekom ove vježbe promatrat ćete eritrocite, crvene krvne stanice, u otopinama različitog toniciteta (Slika 2. 6). Krv je poseban oblik vezivnog tkiva koje se sastoji od **krvnih stanica** (eritrociti, leukociti, trombociti) i tekuće **krvne plazme**. Krvna plazma sadrži bjelancevine, šećere, soli (NaCl) i vodu i izotonična je sa svim krvnim stanicama uključujući eritrocite (stanice stoga u njoj ne mijenjaju svoj oblik). S obzirom na osjetljivost krvnih (i svih ostalih) životinjskih stanica na neizotonične otopine, pri davanju intravenske infuzije u medicini koriste se razne infuzijske otopine, koje sve imaju isti osmotski tlak kao krvna plazma, tj. *izotonične* su s njom. Primjerice, fiziološka otopina sadrži 0,9 %-tnu koncentraciju soli natrijeva klorida (9 g NaCl u 1000 mL vode).

Eritrociti sisavaca okrugle su stanice slične disku (tj. imaju bikonkavni oblik, Slika 2. 6 životinjske stanice u izotoničnoj otopini). Prosječni je promjer ljudskih eritrocita 7,5 μm, a na presjeku im najveća debljina iznosi oko 2 μm. To su najbrojnije krvne stanice u organizmu, a glavna im je zadaća prijenos kisika u sve dijelove organizma. Eritrociti u zrelom obliku nemaju jezgru ni mitohondrije, već svaka stanica sadrži otprilike 280 milijuna molekula hemoglobina, koje

daju stanici crvenu boju. Molekule hemoglobina imaju hem-skupinu (sadrži atom željeza) koja veže molekule kisika (O_2). S obzirom na bikonkavan oblik, površina kroz koju se odvija izmjena plinova razmjerno im je velika ($140 \mu m^2$) u odnosu na volumen. Budući da nemaju jezgru ni mitohondrije, životni vijek stanice eritrocita ograničen je na 120 dana. Površinu eritrocita omeđuje membrana građena od bjelančevina (40 – 60 %), lipida (40 %) i ugljikohidrata (oko 8 %). Bjelančevine tvore savitljivu mrežastu strukturu koja omogućuje promjenu oblika eritrocita prilikom prolaska kroz organe i tkiva. Membrana je polupropusna, tj. omogućuje pasivan prolaz vode, O_2 i CO_2 te nekih aniona (klorida i bikarbonata), dok je izmjena kationa (natrija i kalija) aktivan proces koji se vrši uz pomoć kationskih crpki. Natrij pasivno ulazi u eritrocit, a aktivno se (uz utrošak ATP-a) izbacuje, dok se kalij aktivno ubacuje u stanicu, a pasivno difundira iz nje. Membrana eritrocita nepropusna je za hemoglobin, međutim pod utjecajem različitih čimbenika (npr. zbog ulaska vode u eritrocit u hipotoničnoj otopini) može doći do njezina oštećenja ili promjene propusnosti. Posljedica je toga izlazak hemoglobina iz eritrocita i njegovo otapanje u okolnom mediju. Ta se pojava zove **hemoliza** (prsnuće eritrocita). Hemolizirana je krv svjetlocrvena i prozirna.

Zadatak 3: Promatranje eritrocita u otopinama različitog toniciteta.

Životinjski materijal:

- trajni preparat razmaza ljudske krvi
- krv sisavca (koagulacija spriječena heparinom)

Reagensi:

- 3,6 %-tna otopina NaCl
- 0,9 %-tna otopina NaCl
- 0,3 %-tna otopina NaCl

Pribor:

- predmetna stakla i pokrovnice
- posuda za otpad
- čačkalice

Postupak:

Na stolić mikroskopa postavite trajni preparat razmaza ljudske krvi i nađite sliku eritrocita najprije na malom, a zatim i na velikom povećanju. Uočite karakterističan i pravilan bikonkavan oblik stanica eritrocita (Slika 2. 6) u krvnoj plazmi (izotoničnoj otopini).

Zatim pripremite tri čista predmetna stakalca. Po jednu kap 3,6 %-tne, 0,9 %-tne i 0,3 %-tne otopine natrijeva klorida stavite na zasebno predmetno staklo. U svaku od kapi uronite čačkalicu kojoj ste prethodno vrh uronili u krv (za svaku kap natrijeva klorida koristite novu

čačkalicu!). Čačkalicu vrtite između prstiju kako bi se stanice eritrocita ravnomjerno raspršile u kapi natrijevog klorida. Pazite da ne stavite previše krvi jer u tom slučaju nećete moći vidjeti pojedinačne eritrocite (bit će ih previše na preparatu). Kap poklopite pokrovnicom i promatrajte eritrocite pod *velikim* povećanjem. Osobito pripazite da ne dođe do miješanja otopina natrijevog klorida različitih koncentracija, stoga obvezno koristite tri različite predmetnice!

Nacrtajte po nekoliko stanica eritrocita promatranih u sve tri navedene otopine natrijevog klorida i naznačite na crtežu opažene promjene!

Ispod svake slike ukratko objasnite riječima zašto je došlo do promjena koje ste zapazili! Koja je otopina za eritrocite izotonična, koja hipotonična, a koja hipertonična?

Zadatak 4:

Fiziološka otopina, izotonična s krvnom plazmom i krvnim stanicama, jest 0,9 %-tni natrijev klorid (NaCl). Izračunajte postotnu koncentraciju otopine glukoze ($C_6H_{12}O_6$) koja je izotonična s krvnom plazmom i stanicama, odnosno može se davati u obliku infuzije.

3. STANIČNA STIJENKA

Stanična stijenka relativno je čvrst omotač koji obavija stanicu i nalazi se s vanjske strane stanične membrane. Ona pruža mehaničku zaštitu i strukturnu potporu stanici. Stanična stijenka nije organela, već mrtva struktura koju izlučuje citoplazma. Obavija stanice bakterija, arheja, nekih protista (alge), gljiva i biljaka. Životinjske stanice i protozoa (životinjama slični protisti; vidi Poglavlje 4) nemaju staničnu stijenku.

Osnovna građevna komponenta (molekula) koja izgrađuje staničnu stijenku razlikuje se između različitih vrsta organizama, što je prikazano u Tablici 3. 1.

Tablica 3. 1. Osnovna građevna komponenta stanične stijenke različitih vrsta stanica.

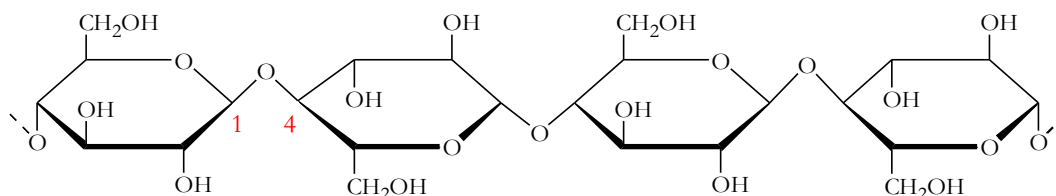
stanica	glavna građevna komponenta (molekula) stanične stijenke
bakterije	<p>peptidoglikan murein – polisaharidni lanci unakriž povezani peptidima koji sadrže D-aminokiseline (gotovo svi ostali organizmi imaju proteine izgrađene samo od L-aminokiselina)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gram-pozitivne bakterije = mnogobrojni slojevi mureina (50 – 90 % stanične stijenke) oko stanične membrane; zadržavaju boju kristal-violet u debelom sloju peptidoglikana • Gram-negativne bakterije = tanak sloj mureina (10 % stanične stijenke) okružen dodatnim lipidnim omotačem (sloj lipopolisaharida i lipoproteina); sloj mureina je pretanak i ne zadržava boju kristal-violet
arheje	<p>pseudopeptidoglikan pseudomurein – metanogene arheje (vrste rodova <i>Methanobacterium</i> i <i>Methanothermus</i>)</p> <p>debeo sloj polisaharida – vrste roda <i>Halococcus</i></p> <p>glikoprotein – hipertermofili (vrste roda <i>Halobacterium</i>)</p>
alge	<p>polisaharidi (celuloza, agaroza, agaropektin i drugi) i/ili različiti glikoproteini</p> <p>Uklopljeni dodatni polisaharidi omogućuju taksonomsko prepoznavanje vrsta.</p> <p><i>Iznimka:</i> alge kremenjašice (dijatomeje) – stanična stijenka izgrađena od silicijevog dioksida (SiO₂) u obliku kremene ljuštare nazvane frustula.</p>
gljive	<p>Tri sloja polisaharida:</p> <ul style="list-style-type: none"> • hitin • β-1,3-glukan • manoproteini
biljke	<p>Ugljikohidrati:</p> <ul style="list-style-type: none"> • celuloza • hemiceluloza • pektin

Glavne funkcije stanične stijenke biljne stanice

- **zaštita** stanice od mehaničkih oštećenja i patogena;
- **održavanje oblika** stanice (posljedica je turgorskog tlaka, tj. pritiska staničnog sadržaja na staničnu stijenku; vidi Poglavlje 2);
- stanične stijenke nekih stanica (osobito onih koje se nalaze na vanjskoj površini biljke) mogu imati funkciju u **zaštiti od isušivanja** (u takve se stijenke ulažu dodatne lipofilne tvari kao što su suberin i kutin);
- promatrajući biljku u cjelini, čvrste stanične stijenke specijaliziranih stanica (ksilemske stanice, sklerenhim, kolenhim) omogućuju uspravan položaj biljke, protivno gravitacijskoj sili, tj. **mehaničku potporu**.

Građa stanične stijenke biljne stanice

Glavna je komponenta stanične stijenke biljne stanice **celuloza** (Tablica 3. 1, Slika 3. 1). Po kemijskoj strukturi celuloza je homopolimer β -glukoze (Slika 3. 1). (Svaki ugljikohidrat dolazi u dva različita anomerna oblika nazvana α - i β -anomerni oblik, što je detaljno objašnjeno u Poglavlju 6). Pojam **polimer** označuje svaku molekulu koja je građena od ponavljajućih jedinica – monomera.

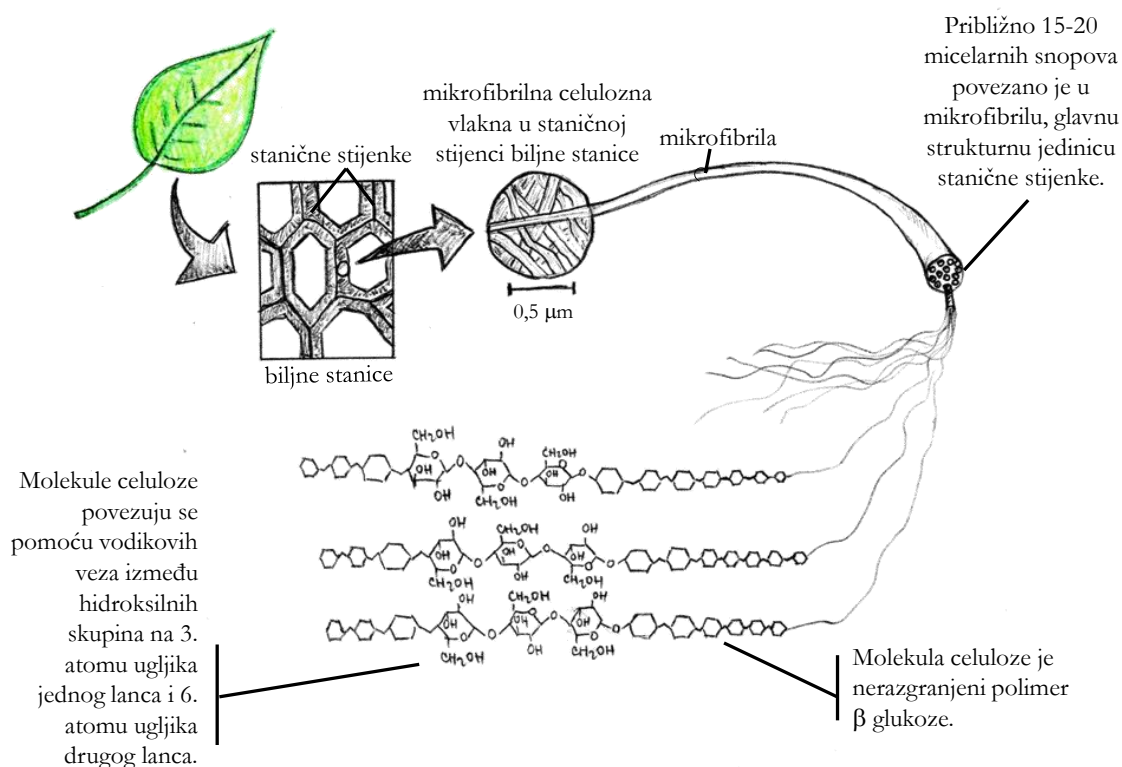


Slika 3. 1. Molekula celuloze izgrađena je od monomera glukoze spojenih β -1,4-glikozidnim vezama.
Izvor: autori.

Ako su monomeri međusobno jednaki, radi se o homopolimeru. Za razliku od celuloze, molekula DNA je heteropolimer jer je građena od četiri različita monomera – nukleotida (detaljno objašnjenje vidi u Poglavlju 7). Glukozni ostatci u celulozi međusobno su povezani β -1,4-**glikozidnom vezom** tvoreći nerazgranjenu, nitastu celuloznu molekulu – celulozni lanac.

Celulozni lanci dugi su od 1000 do 10000 glukoznih ostataka. Približno 100 nerazgranjenih, nitastih celuloznih lanaca izgrađuje **micelarni snop** (Slika 3. 2). Jednu **mikrofibrilu** čini od 15 do 20 micelarnih snopova. Između pojedinih micelarnih snopova u mikrofibrili tzv. je intermicelarni prostor ispunjen vodom i mnogim drugim tvarima. Na kraju

više mikrofibrila čini deblje **mikrofibrilno vlakno**. Ta su vlakna unutar stanične stijenke pravilno raspoređena u slojevima. Takav pravilan raspored mikrofibrila pruža staničnoj stijenci elastičnost i čvrstoću. Između mikrofibrilnih vlakana nalaze se međuprostori koji su ispunjeni vodom i drugim tvarima (hemicelulozom, glikoproteinima itd.).

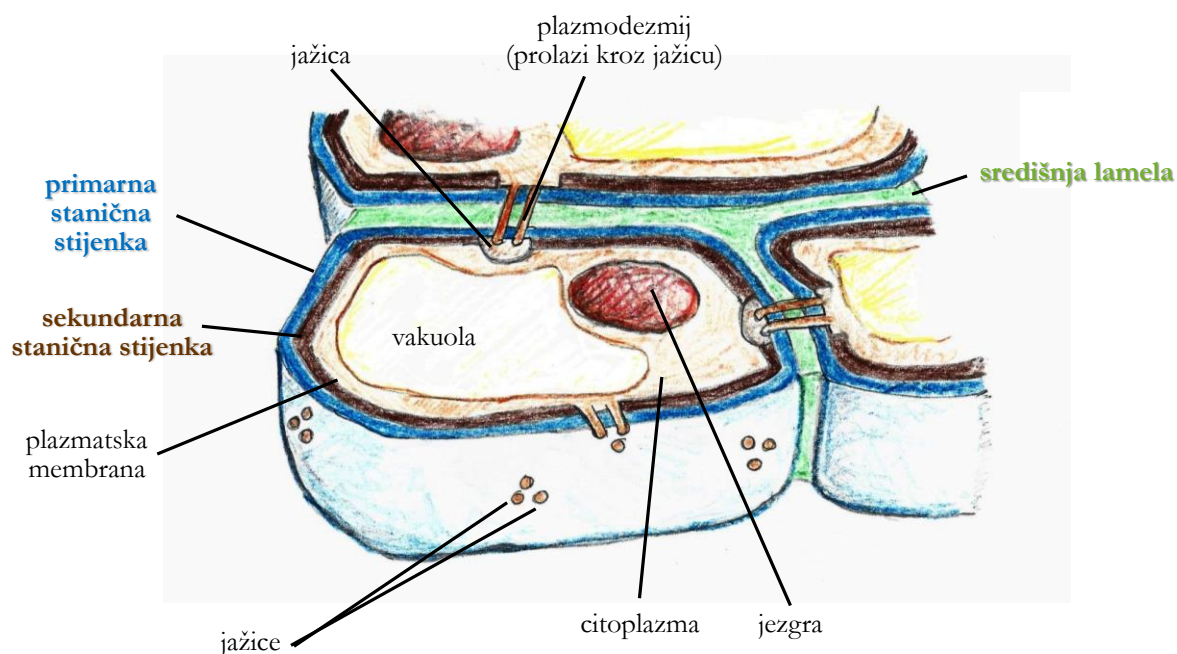


Slika 3. 2. Građa stanične stijenke biljne stanice. Izvor: autori.

Višestruki slojevi mikrofibrila izgrađuju staničnu stijenku biljne stanice, koja kod pojedinih tipova stanica može biti vrlo debela. Na poprečnom presjeku stanične stijenke odrasle biljne stanice razlikujemo dva ili tri različita sloja (Slika 3. 3):

1. primordijalna stijenka ili **središnja lamela**: sloj koji je najudaljeniji od stanične membrane, povezuje (stvara kontakt) dvije susjedne stanice i zajednička je tvorevina obaju protoplasta. Izgrađuje ga ljepljivi polisaharid **pektin**. Ovaj sloj nastaje tijekom citokineze (dioba citoplazme, završna faza mitoze – stanične diobe) i izlučuju ga istovremeno obje novonastale stanice.
2. **primarna stanična stijenka**: naslanja se na središnju lamelu; tanji i fleksibilni sloj građen od celuloze, hemiceluloze, pektina i glikoproteina. Izlučuje ju mlada stanica. Mikrofibrilna vlakna u ovom sloju nemaju još posve pravilan raspored.
3. **sekundarna stanična stijenka**: najdeblji sloj stanične stijenke koji nastaje kad je biljna stanica u potpunosti razvijena; naslanja se na primarnu stijenku s jedne strane i samu

staničnu membranu (plazmalemu) biljne stanice s druge strane. Čini je više laminarnih celuloznih slojeva, često s uklopljenim drugim tvarima (npr. lignin, suberin, polisaharidi, proteini). Pruža glavnu čvrstoću, krutost i zaštitu biljnoj stanici. Ovaj sloj stanične stijenke nemaju sve biljne stanice.



Slika 3.3. Tri sloja stanične stijenke i jažice. Izvor: autori.

Komunikacija među biljnim stanicama

Iako su obavijene čvrstom i neživom staničnom stijenkom, biljne stanice nisu izolirane jedna od druge, već međusobno komuniciraju putem tankih citoplazmatskih niti – **plazmodezmija**. One prolaze kroz šupljine u slojevima stanične stijenke koje nazivamo jažicama (Slika 3.3 i 3.4). **Jažice** nastaju tako da prilikom rasta stanične stijenke pojedini dijelovi njezina primarnog sloja ostaju nezadebljali, dok sekundarnog sloja u području jažice nema. Ako su sekundarni slojevi uokolo jažice umjereno zadebljali, one imaju oblik pukotina, dok kod vrlo zadebljanih staničnih stijenki imaju oblik **jažičnog kanalića**. Položaj jažica između dvije susjedne stanice se podudara. Dakle, ova nezadebljala mjesta omogućuju komunikaciju i prolaz hranjivih tvari (pasivan i aktivan) iz jedne stanice u drugu.

Sekundarne promjene stanične stijenke

Tijekom života biljke u stijenci pojedinih stanica mogu nastati određene sekundarne promjene. Te su promjene povezane s posebnim zadacima koje biljna stanica preuzima ovisno o

tome gdje se nalazi unutar biljnog organizma. Stanične stijenke izgrađene samo od celuloze imaju hidrofilna svojstva. Sekundarne promjene omogućuju staničnoj stijenci da poprimi nova kemijska i fizička svojstva, a samim time stanica poprima i novu funkciju. U tekstu koji slijedi opisane su različite modifikacije stanične stijenke.

1. **Odrvenjavanje** ili **ligniziranje**: proces ulaganja (inkrustiranja) drvenastih tvari u celulozni skelet stanične stijenke, između molekula celuloze. Time stanične stijenke dobiju novo svojstvo – povećanu **čvrstoću**. Glavna molekula koja se inkrustrira jest **lignin**, koji je poslije celuloze najzastupljenija organska tvar u prirodi. Naziv riječi lignin potječe od latinske riječi *lignum*, što znači drvo. To je velika molekula, biopolimer, nepravilne strukture koja se ugrađuje u staničnu stijenku između slojeva celuloze, hemiceluloze i pektina. Na taj se način u staničnoj stijenci kombiniraju slojevi celuloze čvrsti na poteg i slojevi lignina čvrsti na pritisak (stoga građu lignizirane stanične stijenke možemo prema strukturi i čvrstoći usporediti s armiranim betonom). Drvo je materijal koji čovjek svakodnevno koristi u različite svrhe, a čine ga upravo vrlo zadebljale lignizirane stijenke biljnih stanica.
2. Ulaganje tvari lipofilnog karaktera u stanične stijenke naziva se **oplutnjavanjem** (**suberinizacijom**) ili **kutinizacijom**, ovisno o tvari koja se ulaže – **suberin** ili **kutin**. U oba slučaja svrha je zaštita biljke od prevelikog gubitka vode (isušivanja).
 - a. **Suberin** je lipofilna molekula koja se ugrađuje u sekundarnu stijenku u obliku zasebnih suberinskih lamela na već postojeće celulozne slojeve. Oplutnjavanjem nastaje specijalizirano kožno tkivo – **pluto**. Kao što je već rečeno, svrha je oplutnjavanja zaštita biljke od prevelikog gubitka vode. Kako je suberin nepropustan za vodu, stanice sa suberinskim lamelama brzo umiru (nemaju živi protoplast) – tj. to su u svojoj funkcionalnoj zrelosti mrtve stanice.
 - b. **Kutin** se ugrađuje ili kao uklopina (inkrusta) u stanične stijenke epiderme (stanične stijenke koje graniče s atmosferom) ili u obliku tanke prevlake na površini biljne stanice (**kutikula** na epidermi), a proces ugradnje naziva se **kutinizacijom**.
3. **Mineralizacija**: ulaganje mineralnih (anorganskih) tvari u staničnu stijenku. Najčešće se ulažu kalcijev karbonat (CaCO_3) i silicijev dioksid (SiO_2). Ulaganjem mineralnih tvari stanična stijenka postaje tvrda, a istovremeno mineralne tvari iritiraju sluznicu biljojeda i na taj se način biljka brani od predatora (biljojeda).

Kod starijih biljnih stanica veći dio stanične stijenke obično zadeblja, ovisno o sekundarnoj promjeni, tj. o funkciji koju određena stanica obavlja. Ta zadebljanja stijenke mogu

biti lokalna ili cjelovita.

Tzv. **lokalna zadebljanja** služe za povećanje čvrstoće stijenke, a kao što i samo ime govori, ta se zadebljanja nalaze samo na pojedinim dijelovima stijenke biljne stanice (uglovni kolenhim, begonija, Slika 3. 5). Stanice s lokalnim zadebljanjima stanične stijenke imaju funkcionalne jažične kanale u tanjim dijelovima stijenke, što im omogućuje komunikaciju s ostalim stanicama (žive su).

Kod određenih biljnih stanica cijela stijenka jednoliko je zadebljala. Tada govorimo o **cjelovito zadebljaloj staničnoj stijenci** (sklereide, kruška, Slika 3. 6). Stanice čija je stanična stijenka u potpunosti zadebljala u početku imaju funkcionalne jažične kanale, ali se oni jako brzo začepi. Zbog toga te stanice odumiru, a jedino što ostaje jest mrtav „skelet“ stanične stijenke koji i dalje pruža mehaničku potporu biljnom tkivu.

Zadatak 1: Građa stanične stijenke i jažični kanali, pavitina (*Clematis vitalba*).

Biljni materijal:

- stabljika pavitine (*Clematis vitalba*), porodica Ranunculaceae

Reagensi:

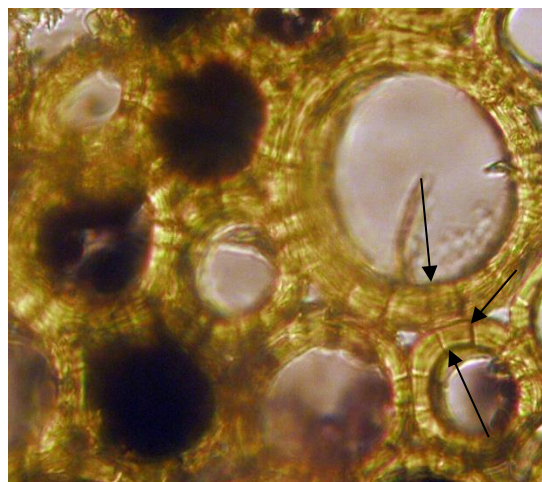
- otopina klor-cink-joda (Cl-Zn-I)

Pribor:

- britvica
- iglica
- predmetna i pokrovnostakalca

Postupak:

Uz pomoć britvice napravite više uzastopnih poprečnih presjeka stabljike pavitine. Vrlo je važno da presjeci budu što tanji! To ćete uspjeti tako da prereze radite više kao strugotine nego kao „šnite“ i tako da odjednom napravite veći broj strugotina (5-6). Kako želimo napraviti prerez kroz tkivo srčike koje se nalazi u centralnom dijelu stabljike, poželjno je stabljiku prije žiletom zašiljiti (kao drvenu olovku – pratite upute asistenta/-ice). **Srčika** je spremišno parenhimsko tkivo koje se nalazi u središnjem dijelu stabljike i središnjem dijelu centralnog cilindra korijena jednosupnica. To tkivo izgrađuju parenhimske ili osnovne stanice koje imaju okruglast oblik, izrazito slojevit i debelu staničnu stijenku i pune su škrobnih zrnaca (vidi Poglavlje 6).

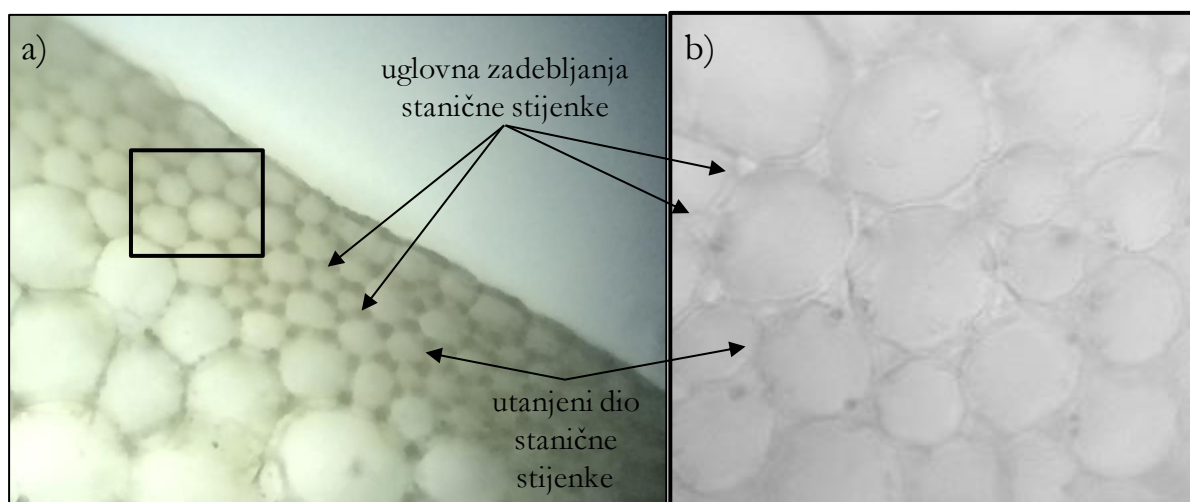


Slika 3. 4. Jažični kanali (označeni strelicom) u staničnoj stijenci stanica stabljike pavitine (*Clematis vitalba*). Obojeno otopinom Cl-Zn-I. U stanicama su vidljiva tamnoplavo obojena škrobna zrnca (400×). Izvor: autori.

Dobivene prereze stavite, uz pomoć iglice, na predmetno stakalce u kapljicu otopine klor-cink-joda i pokrijte pokrovnicom (pazite da ne bude mjehurića zraka!). Otopina klor-cink-joda obojit će staničnu stijenku žućkasto-smeđe te ćete moći lakše uočiti slojevitú građu i jažične kanale. Pogledajte preparate i pod malim i velikim povećanjem i nacrtajte nekoliko opaženih stanica. Strukture koje trebate označiti na crtežu jesu:

- višeslojno zadebljala stanična stijenka
- jažični kanali gledani sa strane
- središnja lamela
- međustanični prostor
- jažični kanali gledani odozgo
- škrobna zrnca

Zadatak 2: Uglovni kolenhim, sobna kopriiva (*Coleus* sp.) ili begonija (*Begonia* sp.).



Slika 3. 5. Uglovni kolenhim u peteljci begonije (*Begonia* sp.): (a) 100 \times , (b) 400 \times . Izvor: autori.

Biljni materijal:

- peteljka lista ili stabljika sobne kopriive (*Coleus* sp.), porodica Lamiaceae
- peteljka lista begonije (*Begonia* sp.), porodica Begoniaceae

Pribor:

- britvica
- predmetna i pokrovna stakalca
- iglica

Postupak:

Žiletom napravite više uzastopnih poprečnih prereza peteljke lista ili stabljike sobne kopriive ili begonije. Presjeci moraju biti što tanji! **Uglovni kolenhim** (Slika 3. 5) mehaničko je tkivo (pruža potporu) biljke koje se nalazi uz vanjski rub peteljke ili stabljike pa nije potrebno raditi cijeli poprečni prerez, već samo prereze vanjskog dijela peteljke ili stabljike. Posebno je

važno obratiti pozornost na to da presjeci budu poprečni, tj. pod pravim kutom na središnju os peteljke ili stabljike. Ako presjeci budu načinjeni ukoso, nećete moći vidjeti uglovni kolenhim. Dobivene prereze iglicom stavite na predmetno stakalce u kapljicu vode i pokrijte pokrovnicom (pazite da ne bude mjehurića zraka!). Pogledajte preparate i pod malim i velikim povećanjem i nacrtajte nekoliko opaženih stanica. Strukture koje trebate označiti na crtežu jesu:

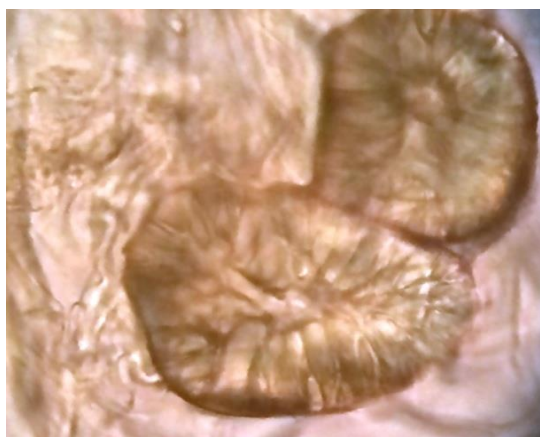
- uglovno zadebljanje stanične stijenke
- utanjeni dio stanične stijenke

Zadatak 3: Sklereide (kamene stanice), kruška (*Pyrus communis*).

Biljni materijal:

- usplođe kruške (*Pyrus communis*), porodica Rosaceae

Sklereide (kamene stanice, Slika 3. 6) stanice su sklerenhimskog mehaničkog tkiva i nalaze se u usplođu kruške (sočni, jestivi dio ploda). To su mrtve stanice s jako zadebljalim i krutim stijenkama i brojnim nerazgranjenim ili razgranjenim jažičnim kanalima. U usplođu kruške nalaze se u nakupinama – „gnijezdima“ (ne dolaze pojedinačno).



Slika 3. 6. Sklereide u usplođu kruške (*Pyrus communis*) (400×). Izvor: autori.

Pribor:

- Petrijeva zdjelica
- pipeta
- kapaljka
- filtarski papir
- predmetna i pokrovna stakalca

Postupak:

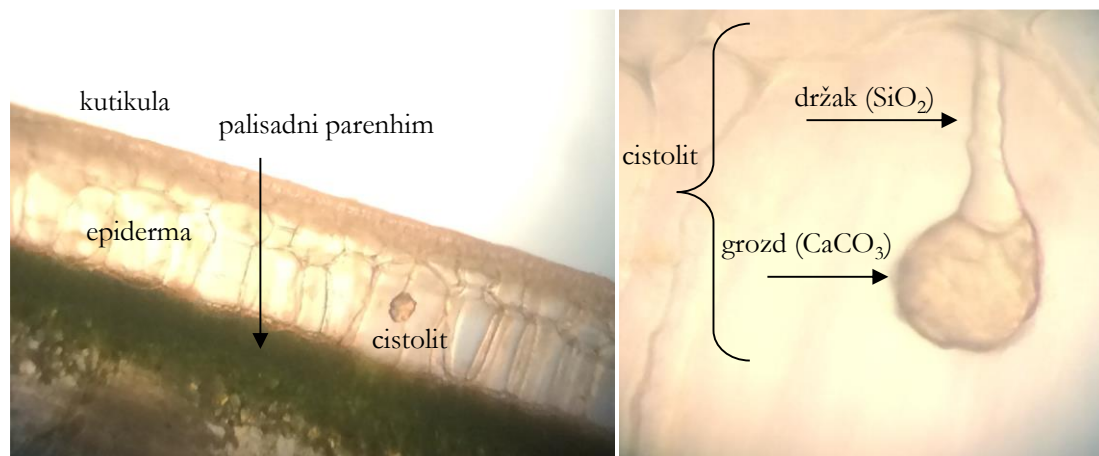
Iglicom (ili britvicom) malo sočnog usplođa zrele kruške stavite u malo vode u Petrijevu zdjelicu. Kap-dvije ove otopine stavite na predmetno stakalce. Pokrijte pokrovnicom, na nju položite filtarski papir i čvrsto (a opet ne tako jako da potrgate stakalce!) pritisnite palcem preparat (tehnika *squash*) kako biste razbili nakupine sklereida. Pogledajte preparat i pod malim i velikim povećanjem i nacrtajte nekoliko opaženih stanica. Strukture koje trebate označiti na crtežu jesu:

- lumen stanice
- višeslojno zadebljala stanična stijenka
- razgranjeni jažični kanali

Zadatak 4: Cistoliti, fikus (*Ficus elastica*).

Biljni materijal:

- list fikusa (*Ficus elastica*), porodica Moraceae



Slika 3. 7. Cistolit u stanici epiderme lista fikusa (*Ficus* sp.): (a) 100×, (b) 400×. Izvor: autori.

Cistoliti (Slika 3. 7) lokalna su, specifična zadebljanja stanične stijenke koja se nalaze u epidermalnom sloju lista fikusa. Cistoliti služe biljci kao zaštita od predatora. Građeni su od okamenjenog drška (SiO_2) na kojem visi „grozdu“ slično tijelo (CaCO_3).

Pribor:

- britvica
- predmetna i pokrovna stakalca
- iglica

Postupak:

Britvicom napravite veći broj što tanjih poprečnih prereza lista fikusa. Dobivene prereze stavite, uz pomoć iglice, na predmetno stakalce u kapljicu vode i pokrijte pokrovnicom (pazite da ne bude mjehurića zraka!). Preparate pogledajte pod malim povećanjem. Promatrajte vanjske bezbojne slojeve stanica – troslojnu epidermu (zaštitno pokrovno tkivo lista koje ne sadrži kloroplaste). Pronađite stanicu epiderme koja sadrži cistolit i nacrtajte opaženo. Strukture koje trebate označiti na crtežu jesu:

- epiderma
 - kutikula
 - grozd (CaCO_3)
 - držak (SiO_2)
- } cistolit

4. CITOSKELET

Citoskelet je unutarstanični „kostur“ i čini ga mreža vlakana koja se pruža kroz cijelu citoplazmu stanice. Nalazimo ga i u prokariotskim i eukariotskim stanicama. Citoskelet je vrlo dinamična struktura čije su glavne **funkcije**:

- određivanje oblika stanice
- omogućivanje kretanja čitave eukariotske stanice (bičevi, trepetljike, pseudopodiji)
- reguliranje kretanja unutarstaničnih struktura (npr. promet organela u eukariotskoj stanici odvija se elementima citoskeleta)
- pružanje mehaničke potpore stanici
- određivanje rasporeda određenih struktura (polarnost) unutar stanice prokariota i eukariota
- sudjelovanje u diobi stanice.

Citoskelet eukariotske stanice

Citoskelet eukariotskih stanica izgrađuju tri vrste vlaknaca (filamenata): mikrotubuli, intermedijarni filamenti i mikrofilamenti. Osnovne su razlike između njih u smještaju unutar stanice, proteinskom sastavu i promjeru samih vlaknaca (Tablica 4. 1). Mikrofilamenti i intermedijarni filamenti čine mrežu niti koja se pruža kroz stanicu, dok mikrotubuli predstavljaju potporne nosače unutar citoplazme.

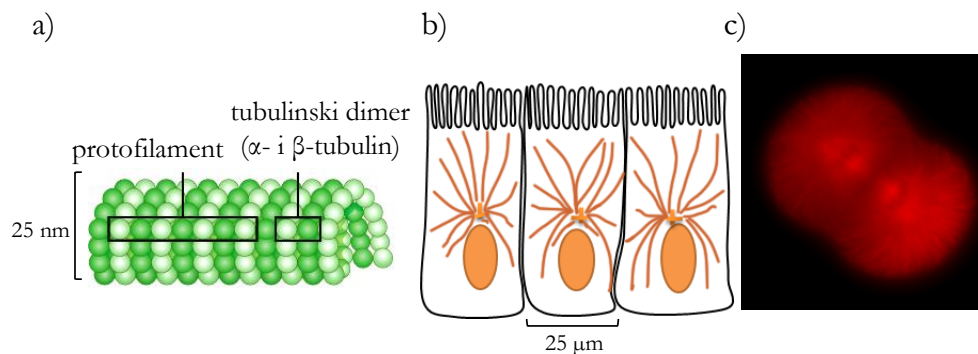
Citoskelet je jako dinamičan. Brza disocijacija (razdvajanje) i asocijacija (ponovno povezivanje) podjedinica citoskeleta (ponajprije tubulina) omogućuje brzu promjenu oblika same stanice kao i razmještaj organela unutar citoplazme.

Tablica 4. 1. Osnovne značajke elemenata citoskeleta eukariotskih stanica

	mikrotubuli	intermedijarni filamenti	mikrofilamenti (aktinski filamenti)
proteinska jedinica	α - i β -tubulin	keratin, vimentin, lamin, neurofilamenti	aktin
promjer	25 nm	8 – 10 nm	7 nm

Mikrotubuli

Mikrotubuli (Tablica 4. 1 i Slika 4. 1) šuplje su cijevi promjera oko 25 nm (promjer je šupljine cijevi – lumena – oko 15 nm) građene od podjedinica. Podjedinicu mikrotubula izgrađuju dvije različite molekule tubulina (α -tubulin i β -tubulin) pa je zovemo **tubulinski dimer (heterodimer)**. Mikrotubul nastaje tako da se heterodimerne podjedinice spajaju u linearne protofilamente (Slika 4. 1a). U sljedećem koraku 13 protofilamenata spaja se u mikrotubul.



Slika 4. 1. Mikrotubuli: (a) shematski prikaz građe te (b) položaj mikrotubula unutar stanice. (c) Struktura diobenog vretena embrija morskog ježinca promatrana fluorescencijskim mikroskopom; mikrotubuli su crveno obojeni (400 \times). Izvor: (a) <http://bit.ly/2tIJGaz>, (b) i (c) autori.

Glavne su funkcije mikrotubula:

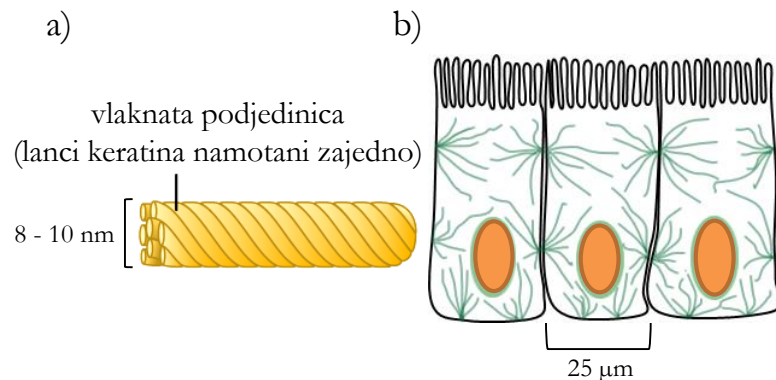
- unutarstanični transport organela kroz citoplazmu (npr. mitohondrija ili vezikula)
- pokretanje stanice (**bič i trepetljika**) (Slike 4. 6, 4. 7 i 4. 8)
- pokretanje kromosoma tijekom diobe stanice – tada mikrotubuli grade **centriole** i **diobeno vreteno** (Poglavlje 9)
- sudjelovanje u sintezi stanične stijenke biljne stanice.

Intermedijarni filamenti

Intermedijarni filamenti (Tablica 4. 1 i Slika 4. 2) vlaknati su proteini, promjera 8 – 12 nm, izgrađeni od dviju do osam podjedinica supernamotanih u deblje niti. Proteini koji grade ove filamente ovisno o tipu stanice mogu biti: vimentini (najčešća strukturna potpora mnogih stanica), keratini (koža, kosa, nokti), neurofilamenti (proteini prisutni u živčanim stanicama) i lamini (jezgrina lamina). Intermedijarni filamenti sudjeluju u organizaciji trodimenzionalne strukture stanice, a **glavne** su im **funkcije**:

- održavanje **oblika stanice** (otpornost na rastezanje)
- učvršćivanje jezgre i određenih organela (strukturna funkcija)
- formiranje **jezgrine lamine** (ovojnice)

- izgradnja strukturne komponente **sarkomere** (osnovna jedinica mišićnog vlakanca)
- održavanje produžetaka živčanih stanica
- međusobno povezivanje stanica.

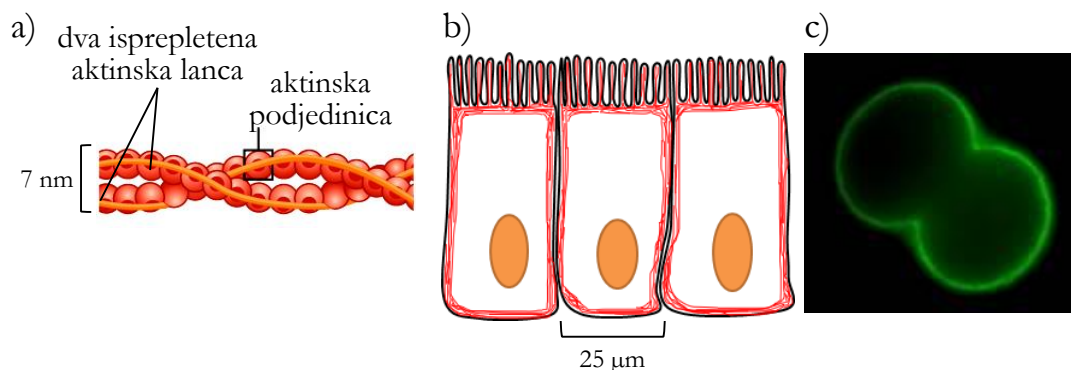


Slika 4. 2. Intermedijarni filamenti: (a) shematski prikaz građe intermedijarnih filamenata te (b) njihov položaj unutar stanice. Izvor: (a) <http://bit.ly/2tTJGaz>, (b) autori.

Mikrofilamenti ili aktinski filamenti

Mikrofilamenti su proteinska vlakanca građena od dva međusobno isprepletana lanca **aktina**, promjera 7 nm (Tablica 4. 1 i Slika 4. 3). Unutar citoplazme stanice aktinski filamenti stvaraju snopove ili mreže. Najviše ih je u prostoru ispod same stanične membrane. **Glavne su funkcije** mikrofilamenata:

- održavanje **oblika stanice** (otpornost na rastezanje)
- promjene oblika stanice (ameboidno kretanje)
- mišićna kontrakcija
- pokretanje (strujanje) citoplazme
- dioba stanice (formiranje **kontraktilnog prstena**).



Slika 4. 3. Mikrofilamenti: (a) shematski prikaz građe mikrofilamenata te (b) položaj vlaknaca unutar stanice. (c) Dvostanični embrij morskog ježinca promatran fluorescencijskim mikroskopom; aktinski filamenti su zeleno obojeni (400 \times). Izvor: (a) <http://bit.ly/2tTJGaz>, (b) i (c) autori.

Zadatak 1: Rotacijsko gibanje citoplazme u stanicama lista vodene kuge (*Elodea canadensis*).

Biljni materijal:

- listići vodene kuge (*Elodea canadensis*), porodica **Hydrocharitaceae**

Pribor:

- iglica
- predmetna i pokrovna stakalca



Slika 4. 4. Vodena kuga (*Elodea canadensis*).
Izvor: autori.

Vodena kuga (*Elodea canadensis*) (Slika 4. 4)

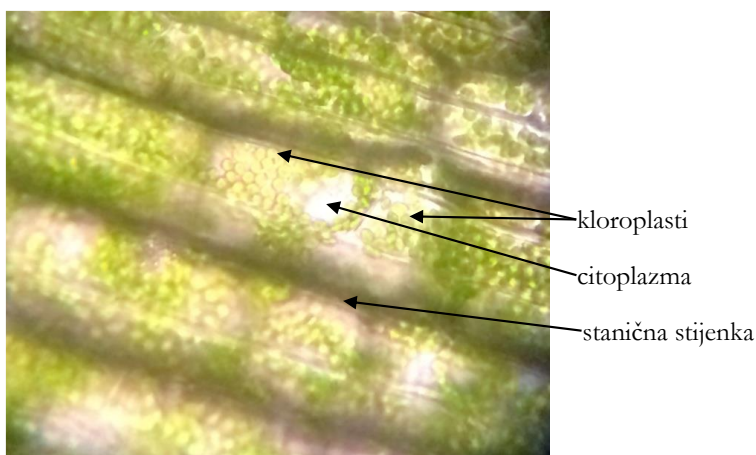
vodena je biljka koja se često koristi u akvaristici.

Podrijetlom je iz Sjeverne Amerike (iz Kanade). U

Europu se proširila u 19. stoljeću preko brodova i nastanila većinu europskih rijeka i jezera. Danas je vodena kuga često prisutna i u mnogim hrvatskim jezerima, rijekama i mirnim vodotocima.

Postupak:

Vodena kuga ima male, tanke, prozirne listiće. Uz pomoć iglice postavite što tanji listić u kapljicu vode na predmetno stakalce i prekrijte ga pokrovnicom. Pritom pazite da listić bude u potpunosti ravno (plošno) položen na predmetno stakalce (ako je potrebno, ispravite ga iglicom). Zatim mikroskopom promatrajte listić, tj. njegove stanice (Slika 4. 5), prvo pri malom, a zatim pri velikom povećanju (rasvjeta treba biti dobro namještena, a iris-zastor potpuno otvoren!). Prilikom promatranja preparata potrebno je dobiti jasnu sliku stanica. Listić vodene kuge građen je od više slojeva stanica koji se nalaze jedan iznad drugog. Uz pomoć mikrovijka treba izoštravati sliku sve dok u vidnom polju ne dobijemo jasnu sliku jednog sloja stanica. Trebate jasno vidjeti kloroplaste (vidi Poglavlje 5) i oblik same stanice.



Slika 4. 5. Stanice lista vodene kuge (400×). Izvor: autori.

Nakon što ste promotrili stanice listića vodene kuge, skinite preparat s postolja i nekoliko minuta zagrijavajte predmetnicu prislonivši je uz stolnu lampu (pazite da ne pregrijete listić). Vratite preparat na postolje mikroskopa i ponovno pronađite jasnu sliku stanica. Sada trebate uočiti rotacijsko gibanje citoplazme. U stanicama

listića vodene kuge središnji položaj zauzima velika vakuola. Nju ne možete vidjeti jer je bezbojna. Citoplazma se stoga nalazi u tankom sloju uokolo velike vakuole uz staničnu stijenku. U njoj se, kao najuočljivije organele, nalaze kloroplasti. Sliku treba izoštriti u onoj ravnini u kojoj se vidi niz kloroplasta oko (bezbojne) središnje vakuole. Kako biste zamijetili samo strujanje, pozornost treba usmjeriti na kloroplaste. Strujanje citoplazme ograničeno je na tanki sloj uz staničnu stijenku, a omogućuju ga **mikrofilamenti**. Citoplazma neprestano lagano struji u istom smjeru i, kružeći oko središnje vakuole, nosi kloroplaste. Kako je citoplazma prozirna, nismo u mogućnosti zamijetiti njezino strujanje, već vidimo pasivno kretanje kloroplasta koji su nošeni strujom citoplazme.

Nacrtajte nekoliko stanica listića vodene kuge. Strukture koje trebate označiti na crtežu jesu:

- stanična stijenka
- vakuola
- kloroplasti
- rotacijsko strujanje citoplazme (smjer strujanja naznačite strelicom!)

Zadatak 2: Promatranje praživotinja.

Životinjski materijal:

- ameba (*Amoeba dubia*) (Slika 4. 9)
- papučica (*Paramecium caudatum*) (Slika 4. 6)

Pribor:

- iglica
- predmetna i pokrovna stakalca
- komadić higijenske vate

Praživotinje su eukarioti (imaju pravu jezgru i organele) građeni samo od jedne jedine stanice. Prema starijoj klasifikaciji praživotinje su svrstavane u carstvo **Protista**. Naziv im dolazi od grčke riječi „*protos*“, što znači „prvi“, a označuje najstarije, ishodišne, eukariotske organizme iz kojih su se razvili svi danas poznati višestanični eukarioti. Međutim, novija taksonomija dijeli ovu skupinu u 30 do 40 različitih odjeljaka unutar četiri carstva i jedne nerazvrstane skupine. Tradicionalno su protisti dijeljeni u tri velike skupine, s obzirom na njihovu sličnost s višim organizmima:

1. životinjama slični protisti = Protozoa ili praživotinje
2. biljkama slični protisti (ili alge)
3. gljivama slični protisti (sluznjake ili sluzave plijesni; vodene plijesni ili algašice).

Praživotinje ili Protozoa nalazimo, kao i većinu drugih protista, i u slatkoj vodi i u moru. Svaka praživotinja, iako jednostanična, potpuni je organizam sposoban obavljati sve životne funkcije.

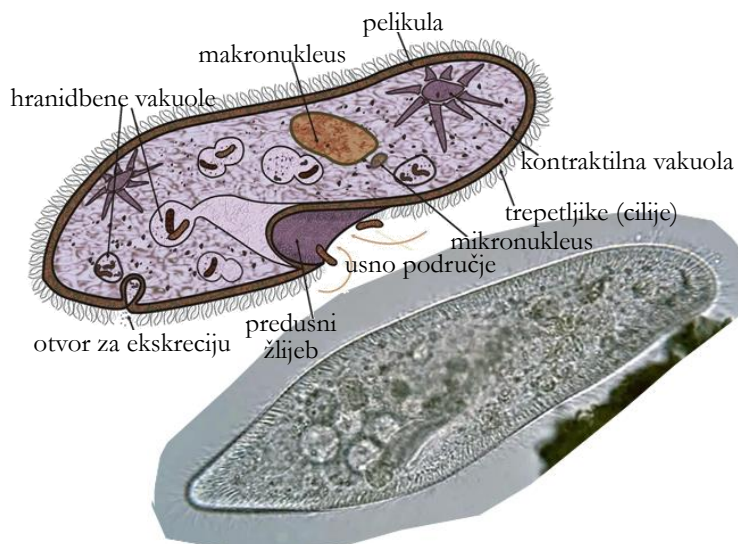
Na vježbama ćemo promatrati predstavnike dvaju različitih odjeljaka praživotinja:

i. odjeljak **Ciliophora** ili trepetljikaši

- predstavnik: papučica (*Paramecium caudatum*) (Slika 4. 6)

Papučica živi u vodama na kopnu (jezerima i rijekama) i pripada vrlo velikim trepetljikašima (od 150 do 300 μm). Lako se uzgaja u kulturi i često se koristi u eksperimentalne svrhe.

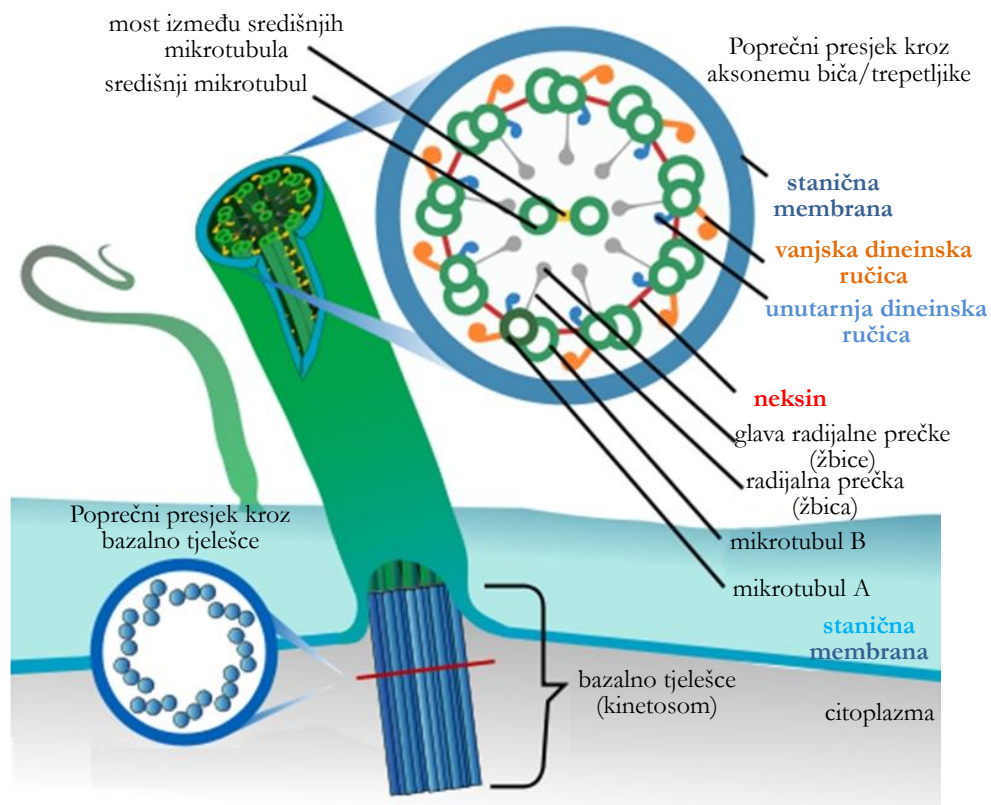
Papučice hranu uzimaju kroz predusni žlijeb uz pomoć oralnih trepetljika. Kada hrana uđe u tijelo, stvori se hranidbeni mjehurić, koji se spoji s lizosomom (organelom koji sadržava enzime za razgradnju hranjivih čestica). Neprobavljene ostatke papučica izbacuje na bilo kojem mjestu na tijelu. Količinu vode u organizmu papučice kontroliraju stežljivim mjehurićima (kontraktilnim vakuolama).



Slika 4. 6. Shema i mikrofotografija papučice (*Paramecium caudatum*). Izvor: <http://bit.ly/2uRvxbt> i <http://bit.ly/2sU9L5d>

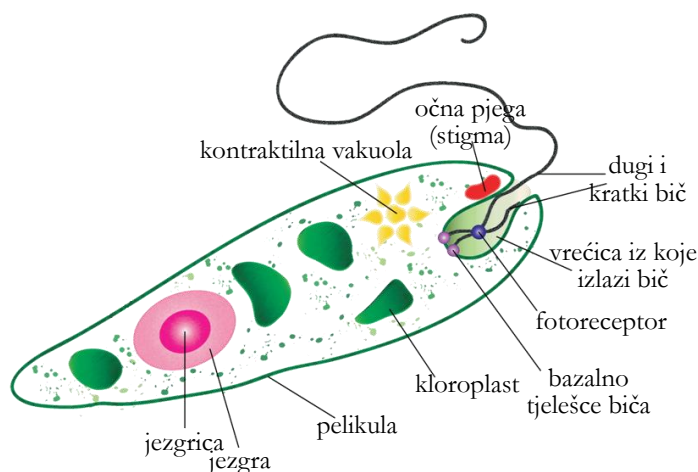
Trepetljikaši koriste **trepetljike** ili **cilije** (Slika 4. 7) za pokretanje ili hranjenje. Trepetljike su raspoređene u više ili manje usporednim nizovima po cijeloj površini tijela praživotinje. To su cjevaste strukture (promjera 250 nm) čiju osnovu čine snopovi **mikrotubula**. Ti snopovi mikrotubula raspoređeni su prema formuli 9+2, što znači devet periferno raspoređenih parova (dvostrukih) mikrotubula i dva središnja (jednostruka) mikrotubula. Mikrotubule izgrađuje protein **tubulin** (α -tubulin i β -tubulin povezani u tubulinske dimere, Slika 4. 1). Svi su snopovi mikrotubula međusobno povezani proteinskim „radijalnim prečkama“ („žbicama“) i „ručicama“ (detaljni položaj i raspored snopova mikrotubula prikazuje poprečni presjek kroz trepetljiku na Slici 4. 7).

U samom dnu trepetljike, u razini površine citoplazme, svi snopovi mikrotubula zajedno tvore **bazalno tjelešće** koje se kod trepetljikaša zove **kinetosom**. On ima jednaku strukturu kao centriol (vidi Poglavlje 9) životinjskih stanica (devet perifernih **tripleta** mikrotubula, bez dvaju središnjih mikrotubula) i iz njega nastaju trepetljike (ili bič). Bazalna tjelešća trepetljika međusobno su povezana, što omogućuje koordinaciju trepetljika. Mogu se razlikovati **tjelesne ili somatske trepetljike** (nalaze se po cijelom tijelu) i **oralne trepetljike** (nalaze se oko usnog područja). Svaka trepetljika obavijena je staničnom membranom.



Slika 4. 7. Građa trepetljike i biča. Izvor: <http://bit.ly/2tYV4Dc>

Bič je cjevasta struktura građena jednako kao i trepetljika (vidi Sliku 4. 7), ali je puno duži i na tijelu životinje dolazi u puno manjem broju (Slika 4. 8). Pokretanje dvama bičevima, jednim kratkim i jednim dugačkim, glavna je karakteristika odjeljka praživotinja **Euglenozoa**. Svaki bič ima svoje bazalno tijelo. Glavni je predstavnik ovog odjeljka euglena (*Euglena* sp.) (Slika 4. 8). Euglena, kao što je rečeno, ima dva biča, a kraći od njih je toliko kratak da se na Slici 4. 8 gotovo ne vidi. Euglena obitava u stajaćim vodama na kopnu, osobito onima koje sadrže veće količine otpadnih organskih tvari.



Slika 4. 8. Građa euglene. Izvor: <http://bit.ly/2tPU1oF>

ii. odjeljak **Amebozoa** ili amebe

- predstavnik: ameba (*Amoeba dubia*) (Slika 4. 9)

Za ovu skupinu karakteristično je kretanje promjenom oblika tijela ili ameboidno kretanje, pri čemu se stvaraju različiti oblici lažnih nožica ili **pseudopodija**. Takvo kretanje zasniva se na

aktivnosti proteina **aktina** (mikrofilamenti) koji je uključen u pružanje pseudopodija. Nagle kontrakcije aktina u stražnjem dijelu tijela uzrokuju guranje citoplazme prema naprijed. Zatim **mikrotubuli** aktivno pomiču organele unutar citoplazme, što omogućuje pokretanje životinje.

Amebe obitavaju u močvarama i rijekama sa slabim strujanjem vode, gdje ima dovoljno kisika i hrane. Često se nalaze s donje strane lišća i vodenog bilja.

Hranu uzimaju cijelom površinom tijela tako da lažnim nožicama obavijaju česticu hrane ili cijeli plijen, npr. nekog trepetljikaša. Kada hrana uđe u tijelo, stvori se hranidbeni mjehurić, koji se spoji s lizosomom. Neprobavljene ostatke ameba izbacuje na bilo kojem mjestu na tijelu.

Ameba za disanje koristi kisik koji u organizam ulazi difuzijom, a nakon razgradnje tvari istim procesom iz tijela izlazi ugljikov dioksid. Količinu vode u organizmu amebe kontroliraju stežljivim mjehurićima (kontraktilnim vakuolama).

Postupak:

Na predmetno stakalce postavite što manji komadić higijenske vate koji ste prethodno razvukli. Niti celulozne vate usporit će kretanje praživotinja jer će biti zarobljene u mreži vlakana, a to će omogućiti promatranje živih životinja. Na vatu kapnite kap vode u kojoj se nalaze praživotinje, prekrijte je pokrovnicom i promatrajte pod mikroskopom.

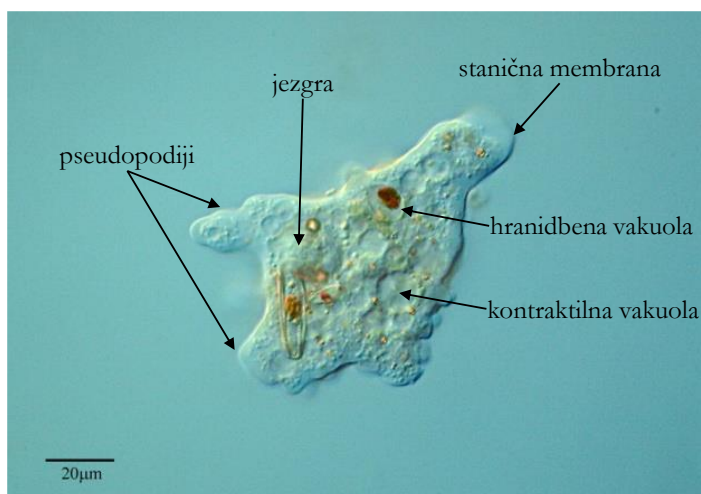
Nacrtajte barem jednu papučicu i jednu amebu. Kako se žive praživotinje vrlo brzo pokreću, kao pomoć koristite i trajne preparate! Strukture koje trebate označiti na crtežu jesu:

1) papučica (*Paramecium caudatum*)

- makronukleus
- trepetljike (cilije)
- hranidbena vakuola
- kontraktilna vakuola
- predusni žlijeb

2) ameba (*Amoeba dubia*)

- jezgra
- pseudopodiji
- stanična membrana
- kontraktilna vakuola
- hranidbena vakuola



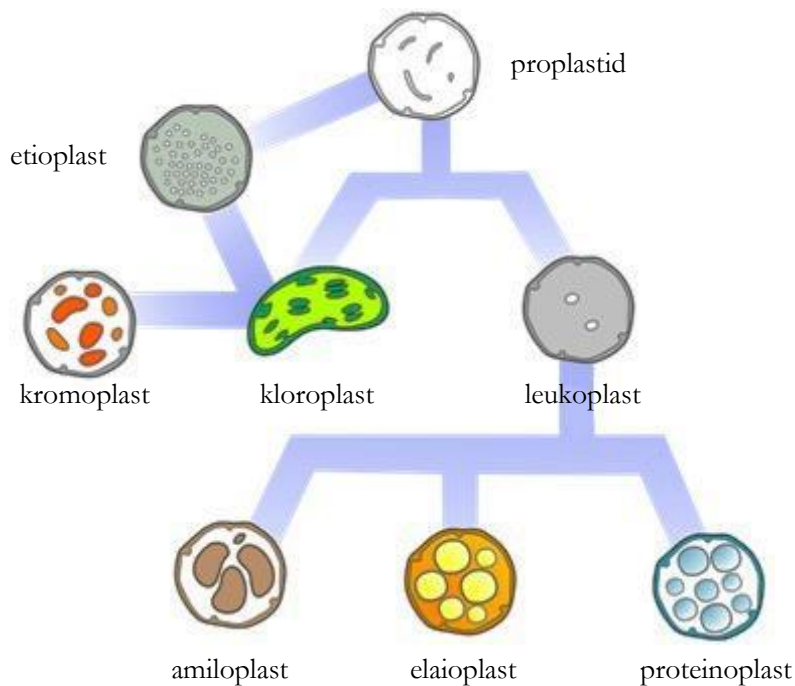
Slika 4. 9. Građa amebe. Izvor: Proyecto Agua, Logroño, Španjolska.

5. PLASTIDI

Plastidi su stanični organeli karakteristični za biljnu stanicu i stanice alga. Od citoplazme su odijeljeni dvostrukom membranom. Svi plastidi sadrže vlastite mnogobrojne (100 – 1000) kružne dvolančane molekule DNA (DNA plastida = **plastom** = genom plastida; 75 – 250 kilobaza) i ribosome 70S (ribosomi u citoplazmi su 80S, vidi Poglavlje 8). U jednoj biljci postoji više vrsta plastida i svi imaju isti plastom, a međusobno se razlikuju u građi i funkciji. Međutim, važno je naglasiti da jedna biljna stanica može sadržavati samo jedan tip plastida.

Ishodišni je oblik svih plastida mali **proplastid** koji je prisutan u meristemskim (ili tvornim) tkivima biljnog organizma. Iz njega se formiraju svi ostali tipovi plastida (Slika 5. 1). Diferencirani plastidi trajnih stanica pojavljuju se u tri tipa:

fotosintetski aktivni plastidi te fotosintetski neaktivni plastidi i to obojeni i neobojeni.



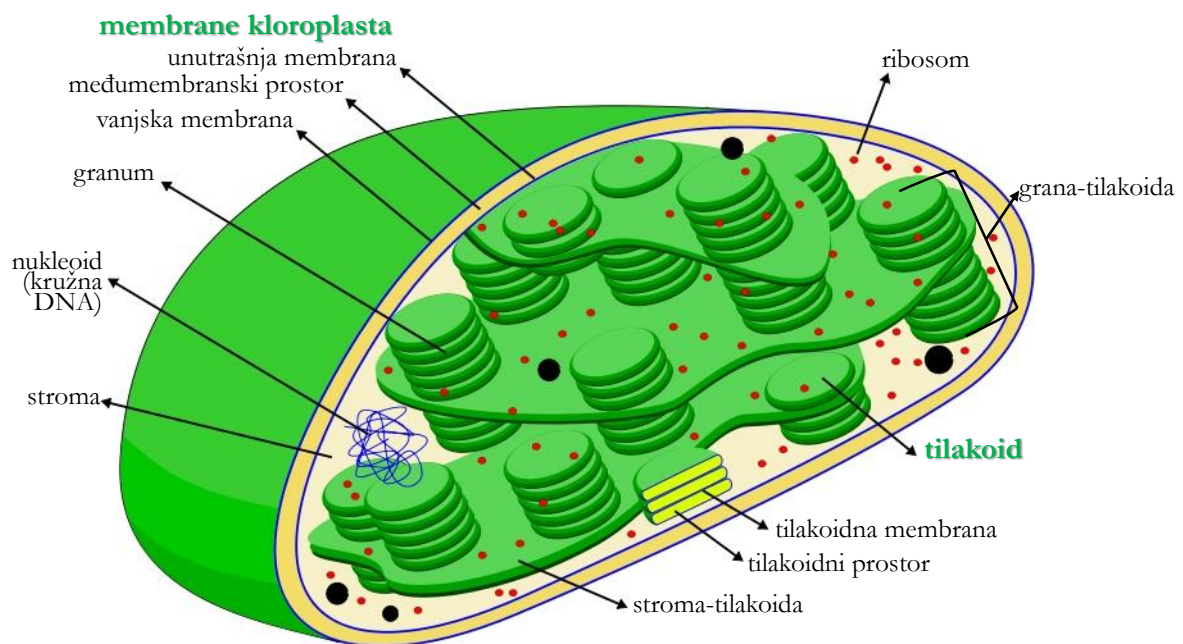
Slika 5. 1. Iz ishodišnog proplastida mogu se razviti svi oblici plastida. Izvor: <http://bit.ly/2sNLFhB>

Fotosintetski aktivni plastidi

Fotosintetski aktivni plastidi sadrže razne pigmente, najčešće **klorofile**, koji sudjeluju u procesu fotosinteze. Najčešći su oblici klorofila u biljkama **klorofil a** i **klorofil b**. Fotosintetski aktivni plastidi su **kloroplasti** (zelene boje), smeđi **feoplasti** i crveni **rodoplasti**.

***Kratice S** je oznaka za **svedberg** – jedinicu koja opisuje ponašanje čestice pri ultracentrifugiranju, odnosno oznaka za razvrstavanje čestica prilikom centrifugiranja u gradijentu gustoće. Općenito govoreći, veće se čestice lakše obore centrifugiranjem i imaju veće S-vrijednosti. Ipak, važno je napomenuti da se S-vrijednosti ne mogu zbrajati jer na brzinu sedimentacije u centrifugi ne utječe samo masa, već i oblik čestice.

- i. **Kloroplasti** su veliki plastidi (od 5 do 10 μm) i prisutni su u svim biljkama. Nalaze se u biljnim organima koji su izloženi svjetlosti, odnosno nadzemnim dijelovima biljaka. Uz vanjsku dvostruku membranu imaju i treći unutrašnji membranski sustav nazvan tilakoidnim membranama. **Tilakoidne membrane** nalaze se u **stromi** – viskoznoj tekućini koja ispunjava unutrašnjost kloroplasta, a na njima se nalazi zeleni pigment klorofil. Razlikujemo grana- i stroma-tilakoide (Slika 5. 2). Kloroplasti se nalaze u svim fotosintetski aktivnim dijelovima biljaka (listovima, stabljici), a zbog zelene boje klorofila zaslužni su i za zelenu boju biljaka. Uz zeleni klorofil u kloroplastima se uvijek nalaze u manjoj količini i crveni, narančasti i žuti karotenoidi.



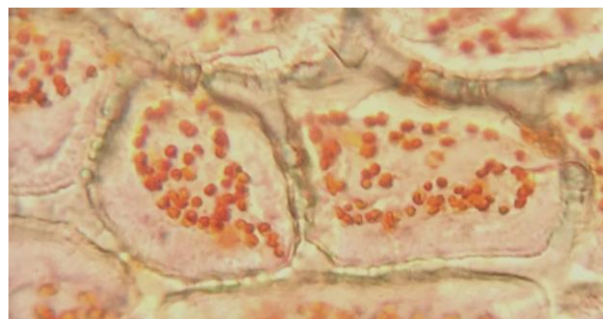
Slika 5. 2. Model građe membrana kloroplasta. Izvor: <http://bit.ly/2tTRLfl>

Ako biljku držimo u mraku tijekom dužeg razdoblja, kloroplasti će degenerirati (pigment klorofil će se razgraditi) i nastat će **etioplasti** – zakržljali oblik kloroplasta. Etioplasti mogu zatim preuzeti ulogu leukoplasta (vidi dalje u tekstu!).

- ii. Kod smeđih algi (*Phaeophyceae*) klorofil je prekriven smeđim karotenoidom (**fukoksantin**). Zbog toga je boja njihovih fotosintetski aktivnih plastida smeđa i te plastide nazivamo **feoplastima**.
- iii. **Rodoplaste** nalazimo kod crvenih alga (*Rhodophyceae*). U ovim fotosintetski aktivnim plastidima klorofil je prekriven crvenkastim karotenoidom (**fikoeritrin**). Svi zajedno daju crvenu boju plastidima kao i cijelim algama.

Fotosintetski neaktivni plastidi – kromoplasti

Kromoplasti ne sadrže klorofil, već **karotenoide** (crveni karoteni i žučkasti ksantofili). Glavna je uloga ovih plastida upravo sinteza i skladištenje pigmentata karotenoida. Razvijaju se ili neposredno iz bezbojnih proplastida ili nastaju gubitkom klorofila iz zelenih kloroplasta. Primjeri su: mijenjanje boje zelenih rajčica u crvene pri sazrijevanju; jesenja žuta boja lišća mnogih drvenastih biljaka nastaje na način da se razgradi sav klorofil i da u listovima preostanu samo karotenoidi (svi kloroplasti postanu kromoplasti); žuta, odnosno narančasta, boja limuna i naranče temelji se na nagomilavanju karotenoida uz istovremeno nestajanje klorofila tijekom dozrijevanja plodova. Kromoplasti daju boju mnogim cvjetovima – od žute do narančaste (npr. forzicija, narcisa), kao i živo crvenu boju mnogim plodovima (npr. šipak, paprika, rajčica) (Slika 5. 3). Mogu se pojaviti i u podzemnom organu biljke – korijenu (npr. odebljali korijen mrkve, *Daucus carota*). Ljubičasta ili plava boja cvjetova i plodova potječe od antocijanina, u vodi topivih pigmentata iz skupine flavonoida, koji se pohranjuju u vakuolama, a ne u kromoplastu.



Slika 5. 3. Kromoplasti u stanici crvene paprike (*Capsicum annuum*) (400×). Izvor: autori.

Fotosintetski neaktivni i bezbojni plastidi – leukoplasti

Leukoplasti (Slika 5. 4) su nepigmentirani plastidi. Nastaju iz proplastida ili iz kloroplasta koji izgube svojstvo proizvodnje klorofila. Neki leukoplasti mogu se diferencirati u kromoplaste ili kloroplaste ako su izloženi svjetlosti, dok se neki, bez obzira na neprestanu izloženost svjetlosti, ne diferenciraju u kloroplaste (primjerice, leukoplasti u stanicama susjedicama puči na listu).

Kod zelenih biljaka leukoplaste nalazimo u pravilu u bezbojnim organima, osobito u podzemnom korijenu i rizomima, ali često i u bezbojnim dijelovima listova i stabljike.

Specijalizirani su za skladištenje rezervnih tvari – škroba, masti ili proteina (vidi Poglavlje 6) pa prema tome razlikujemo amiloplaste, elaioplaste i proteinoplaste.

U nefotosintetskim spremišnim organima (korijen, gomolji i podanci), odnosno spremišnim tkivima (tkivo srčike i endosperm, hranjivo tkivo sjemenki), leukoplasti sintetiziraju i skladište škrob. Kao što je već navedeno, takve leukoplaste nazivamo **amiloplastima** (Slika 5. 5). Zapravo, amiloplasti se s vremenom potpuno ispune škrobom i tada ih nazivamo **škrobnim**

zrncima (detaljnije objašnjeno u Poglavlju 6). Škrobna zrnca imaju i ulogu statolita, odnosno daju biljci informaciju o njezinu položaju u prostoru, tj. u percepciji gravitacije (geotropizam).

Zadatak 1: Kromoplasti u usplođu šipka (*Rosa* sp.).

Biljni materijal:

- šipak – zreli plod ruže (*Rosa* sp.), porodica Rosaceae

Pribor:

- predmetna i pokrovna stakalca
- žilet
- iglica
- kapaljka
- Petrijeva zdjelica



Slika 5. 4. Plodovi divlje ruže (*Rosa* sp.).
Izvor: autori.

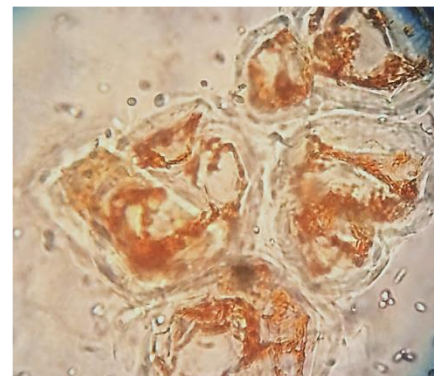
U zreлом plodu ruže (*Rosa* sp.) – **šipku** (Slika 5. 6) – dolazi do prirodne maceracije tkiva. Maceracija je proces u kojem se razgrađuju/kidaju veze između susjednih stanica u tkivu pa se stanice mogu lagano odvojiti. U citoplazmi ovih stanica nalazi se velik broj kromoplasta nepravilnog, izduženog i vretenastog, oblika (Slika 5. 5). Boja kromoplasta varira od žute, preko narančaste do crvene ovisno o odnosu pigmenta ksantofila i karotena koji se nalazi u njima.

Postupak:

Šipak prepolovite žiletom. Zatim uz pomoć iglice izvucite u Petrijevu zdjelicu, koju ste napunili vodom, crvenkasto usplođe ploda (**macerat stanica**). Kapnite kapalicom kap ovog macerata na predmetno stakalce, prekrijte pokrovnicom i promatrajte pod mikroskopom na velikom povećanju.

Nacrtajte nekoliko stanica usplođa šipka. Strukture koje trebate označiti na crtežu jesu:

- stanična stijenka
- kromoplasti



Slika 5. 5. Vretenasti kromoplasti u stanicama ploda divlje ruže (šipurak), *Rosa* sp., porodica Rosaceae (400×).
Izvor: autori.

Zadatak 2: Leukoplasti u listu vrste *Rhoeo discolor* ili *Tradescantia* sp.

Biljni materijal:

- listovi *Rhoeo discolor* i *Tradescantia* sp., porodica Commelinaceae

Pribor:

- žilet
- predmetna i pokrovna stakalca
- kapaljka



Slika 5. 6. *Tradescantia* sp.
Izvor: autori.

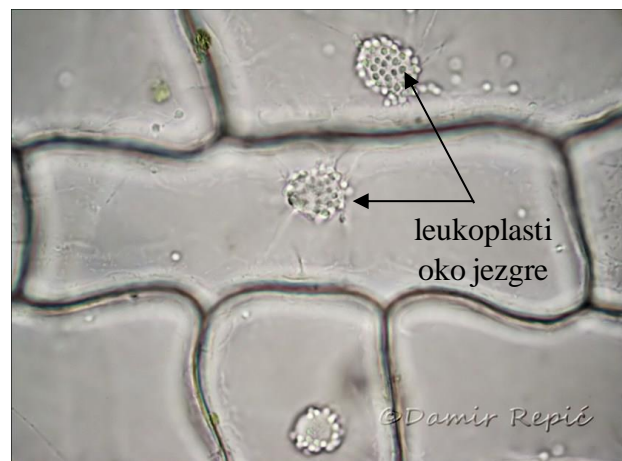
Stanice epiderme listova vrste *Rhoeo discolor* i *Tradescantia* sp. (Slika 5. 8) poligonalnog su oblika i u njima se nalazi velika vakuola koja sadrži crvenkasto-ljubičasti stanični sok, čija je boja uzrokovana prisutnošću pigmenta **antocijana**. U blizini stanične membrane nalazi se okrugla jezgra, a oko nje velik broj sitnih, zrnastih i bezbojnih leukoplasta (Slika 5. 4). Citoplazma se ne vidi jer je bezbojna pa zbog toga izgleda kao da se u stanici nalazi samo jedna vakuola i da se jezgra i leukoplasti nalaze u samoj vakuoli.

Postupak:

List vrste *Rhoeo discolor* ili *Tradescantia* sp. presavinite preko kažiprsta, pridržavaju ga palcem, a pritom pazite da prema gore bude okrenuta donja strana lista. Zatim žiletom pažljivo napravite više *plošnih* prereza lista u blizini glavne provodne žile (na tom se mjestu nalazi najveći broj stanica s antocijanom). Prereze uz pomoć iglice stavite na predmetno stakalce u kap vode i prekrijte pokrovnicom. Promatrajte prereze pod velikim povećanjem.

Nacrtajte nekoliko stanica epiderme lista. Strukture koje trebate označiti na crtežu jesu:

- stanična stijenka
- vakuola s antocijanom
- jezgra
- leukoplasti



Slika 5. 7. Leukoplasti smješteni oko jezgre u stanicama lista tradeskancije (*Tradescantia virginiana*). Izvor: Damir Repić, Mikrosvijet.

6. REZERVNE TVARI U STANICI

Rezervne tvari u stanici tvari su koje stanica (tj. organizam) skladišti i koje služe kao energetska rezerva te stanice (organizma). Stanica ih koristi kad su joj potrebne, najčešće u nepovoljnim uvjetima (npr. glad, suša, nedostatak hranjivih tvari). Rezervne tvari možemo podijeliti u tri skupine:

1. **ulja i masti:** najbogatiji izvor energije za stanicu (organizam). Životinje skladište hranjive tvari uglavnom u obliku masti (specijalizirano masno ili **adipozno tkivo**). Biljke rjeđe skladište masti, a kad to čine, to je uglavnom u organima koji su odgovorni za razmnožavanje (sjemenke ili plodovi, Slika 6. 1b). Prema podrijetlu, dijele se na one životinjskog (mliječna mast/maslac, svinjska mast, goveđi i ovčji loj, mast peradi, riblja ulja) i biljnog podrijetla (primjerice, suncokretovo, maslinovo, bučino, palmino ulje, kokosova mast, kakaov maslac). Organizmi čija tkiva skladište dosta masti, odnosno ulja, i gospodarski su važni, npr. biljke uljarice: suncokret, soja, maslina, uljana repica, kikiriki itd.
2. **ugljikohidrati:** glavni izvor energije u organizmu. Biljke skladište ugljikohidrate u obliku škroba, a životinje u obliku glikogena (Tablica 6. 3 i Slika 6. 6c). **Škrob** se, kao glavna rezervna tvar biljaka, skladišti u specijaliziranim stanicama koje čine **spremišna tkiva** (npr. srčika – spremišno parenhimsko tkivo stabljike, Poglavlje 3) i **spremišne organe** (npr. gomolji krumpira, Slika 6. 1a). Kod životinja **glikogen** se uglavnom pohranjuje u jetrima.
3. **bjelančevine:** skladište se i ponajprije služe kao izvor aminokiselina, za kasniju sintezu novih bjelančevina. Ni u biljnom ni u životinjskom organizmu *ne služe* primarno kao izvor energije (iscrpljuju se posljednje). O bjelančevinama će biti više riječi u Poglavlju 9.

a)



b)

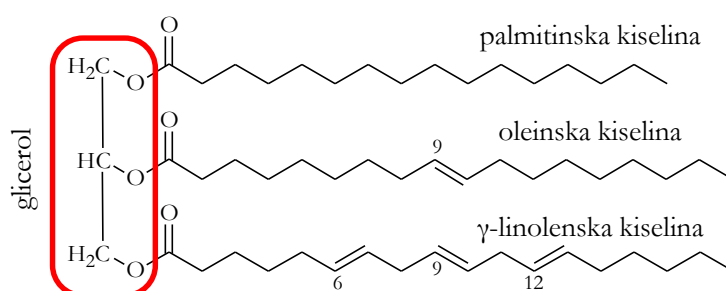


Slika 6. 1. (a) Gomolj krumpira (*Solanum tuberosum*) – podzemni spremišni organ, modificirana stabljika u kojoj se skladišti škrob, (b) plod masline (*Olea europaea*) – koštunica u kojoj se skladište ulja. Izvor: (a) <http://bit.ly/2tTkuB5>, (b) <http://bit.ly/2uRCtFn>

Ulja i masti

Sve spojeve koji se iz živih stanica ili tkiva mogu ekstrahirati uz pomoć nepolarnih organskih otapala nazivamo **lipidima** ili lipidnim spojevima. Lipidi su jedna od četiri osnovne skupine biomolekula (u njih ubrajamo i nukleinske kiseline, bjelančevine i ugljikohidrate). U lipide ubrajamo: ulja, masti, voskove, steroide (npr. kolesterol), fosfolipide itd. Svi ti spojevi, dobiveni iz biljaka ili životinja, netopivi su u vodi (hidrofobni su).

Prema svojoj kemijskoj strukturi **ulja i masti** su triesteri alkohola glicerola i masnih kiselina ili, kraće rečeno, trigliceridi (Slika 6. 2). Ulja su trigliceridi koji se pri sobnoj temperaturi nalaze u tekućem obliku, a masti u čvrstom obliku.



Slika 6. 2. Triglicerid. Lijevo na slici označen je glicerol, a desno se, vezana za glicerol, nalaze tri lanca masnih kiselina. Izvor: autori.

Masne kiseline, koje ulaze u sastav ulja i masti, čine nerazgranati lanci od 14 do 22 atoma ugljika. Veze između ugljikovih atoma mogu biti jednostruke ili višestruke, najčešće dvostruke. Ako se unutar lanca nalaze samo jednostruke veze, tada tu masnu kiselinu nazivamo **zasićenom** (npr. palmitinska kiselina, Slika 6. 2). Za razliku od toga, ako se unutar lanca pojavljuju i, primjerice, dvostruke veze (kao unutar lanca oleinske i linolenske kiseline, Slika 6. 2), tada takvu masnu kiselinu nazivamo **nezasićenom**.

Trigliceridi mogu biti esteri jednakih ili različitih masnih kiselina. Masne kiseline vezane za glicerol određuju hoće li konačan produkt biti ulje ili mast (Tablica 6. 1). Naime, trigliceridi s većom zastupljenošću zasićenih masnih kiselina izgrađuju masti (npr. maslac), a trigliceridi s većom zastupljenošću nezasićenih masnih kiselina izgrađuju ulja (npr. maslinovo ulje).

Tablica 6. 1. Sastav masnih kiselina u pojedinim mastima i uljima.

ulje ili mast	% masne kiseline							
	zasićene				nezasićene			
	laurinska	miristinska	palmitinska	stearinska	oleinska	linolna	linolenska	
biljke	kakaov maslac	-	-	24,4	35,4	38,1	2,1	-
	kokosovo ulje	45,4	18	10,5	2,3	7,5	-	-
	kukuruzno ulje	-	1,4	10,2	3	49,6	34,3	-
	maslinovo ulje	-	-	6,9	2,3	84,4	4,6	-
	ulje kikirikija	-	-	8,3	3,1	56	26	-
	sojino ulje	0,2	0,1	9,8	2,4	28,9	50,7	6,5
životinje	maslac	2,5	11,1	29	9,2	26,7	3,6	-
	loj	-	1,3	28,3	11,9	47,5	6	-
	jetra riba	-	5,8	8,4	0,6	29,1	29,1	-
	kitovo ulje	0,2	9,3	15,6	2,8	35,2	-	-

Važnost masti za životinjski organizam

- Esencijalni vitamini A, D, E i K, i sami lipidi, topivi su u mastima (uljima). To znači da ti vitamini mogu biti apsorbirani i pohranjeni jedino s mastima.
- Masti su glavni oblik rezervne tvari u životinjskim organizmima. Stanice koje su specijalizirane za skladištenje masti čine specijalizirano masno ili adipozno tkivo. Tijekom nepovoljnih uvjeta (glad) u masnim stanicama mast se razgrađuje na glicerol i masne kiseline, koji tada služe kao izvor energije [glicerol se uključuje u proces glikolize kao gliceraldehid-3-fosfat, a masne kiseline razgrađuju se β -oksidacijom (u peroksisomu) i ulaze u ciklus limunske kiseline (u mitohondriju) kao acetil-koenzim A (acetyl-CoA)].
- Masno tkivo služi za privremenu pohranu štetnih tvari (npr. toksičnih tvari iz hrane). Na taj način organizam štiti vitalne organe, a kasnije te štetne tvari mogu biti metabolički obrađene i izlučene iz organizma (ekskrecija putem urina ili fekalija).
- Masno tkivo pomaže u održavanju tjelesne temperature – služi kao toplinski izolator. Osim običnog, bijelog, masnog tkiva postoji i smeđe masno tkivo koje je specijalizirani oblik masnog tkiva u ljudi, nekih glodavaca i nekih životinja koje hiberniraju (stanje mirovanja u nepovoljnim zimskim uvjetima, zimski san). U ljudi ima ga u novorođenčadi, a u odraslih uglavnom je smješteno oko vrata i velikih krvnih žila u prsnom košu. Stanice smeđeg masnog tkiva bogate su mitohondrijima koji sadrže željezo – otud smečkasto obojenje ovog tkiva. Mitohondriji smeđeg masnog tkiva proizvode toplinu „rasparivanjem“ respiracijskog lanca tijekom oksidacijske fosforilacije. U normalnom procesu oksidacijske fosforilacije akceptor elektrona (NADH i FADH₂) predaju elektrone lancu proteina prenositelja elektrona

smještenih na naborima unutarnje membrane mitohondrija (kriste). Preko lanca prenositelja elektroni prelaze tako s više energetske razine na nižu, pri čemu se svakim prijenosom oslobađa energija. Ona se koristi za transport protona (H^+) protivno njihovom koncentracijskom gradijentu iz mitohondrijskog matriksa u međumembranski prostor (unutar krista) jer prenositelji elektrona djeluju i kao protonske crpke. Nastali elektrokemijski gradijent protona između međumembranskog prostora i matriksa mitohondrija omogućuje povratak protona u matriks mitohondrija olakšanom difuzijom (kroz proteinski nosač – proteinski kompleks ATP-sintaza), pri čemu nastaje ATP. U smeđem masnom tkivu mitohondrijima se signalizira da omoguće difuziju protona bez proizvodnje ATP-a. Naime, na unutarnjoj membrani mitohondrija postoje proteini (engl. *uncoupling proteins*) koji preusmjeravaju protone da se olakšanom difuzijom ne vraćaju kroz ATP-sintazu (nema proizvodnje ATP-a), nego se, prolaskom kroz te proteine, energija nastala zbog elektrokemijskog gradijenta protona između međumembranskog prostora i matriksa mitohondrija oslobađa kao toplina.

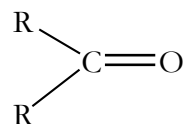
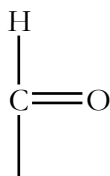
- Masno je tkivo endokrino i metabolički važno tkivo koje sudjeluje u proizvodnji hormona estradiola (estrogena) i adipocitokina (staničnih signalnih proteina od kojih neki sudjeluju u imunskom odgovoru, a neki u održavanju homeostaze glukoze kao i razgradnji masnih kiselina).

Ugljikohidrati

Od četiri osnovne skupine biomolekula, u koje ubrajamo i proteine, lipide i nukleinske kiseline, u živim organizmima najzastupljeniji su **ugljikohidrati**. Od njihovih mnogobrojnih funkcija treba istaknuti onu spremišnu (škrob, glikogen) i strukturnu (celuloza, hitin), kao i bitnu ulogu u mnogobrojnim biološkim procesima u stanici (npr. stvaranje krvnog ugruška, imunski odgovor, oplodnja, razvitak embrija). Ugljikohidrati se nazivaju i **saharidima**.

U stanicama nalazimo različite vrste ugljikohidrata. Prema kemijskoj strukturi oni su organske molekule, točnije to su **polihidroksi** (sadrže velik broj hidroksilnih ili $-OH$ skupina) **aldehidi** ili **ketoni** i njihovi derivati. Polihidroksi aldehidi sadrže aldehydnu (reducirajuću) skupinu, a ketoni sadrže keto-skupinu. Aldehydna i keto-skupina karbonilne su skupine.

- a) aldehydna skupina (reducirajuća) ili b) keto-skupina (nereducirajuća)



Najjednostavnije ugljikohidrate nazivamo **monosaharidima** (npr. glukoza, Slika 6. 3). Kad se dva monosaharida povežu, nazivamo ih **disaharidima**, a ako ih je tri ili više – **polisaharidima** (Slika 6. 6). Mnogi monosaharidi, ovisno o uvjetima, mogu postojati u dva oblika: linearnom i cikličkom. Linearni oblik sadrži slobodnu karbonilnu skupinu (aldehidnu ili keto), a prilikom ciklizacije ta skupina zatvara monosaharidni lanac u prsten. Stoga ciklički monosaharidi (Slika 6. 3) ne sadrže slobodnu karbonilnu skupinu, već samo hidroksilne.

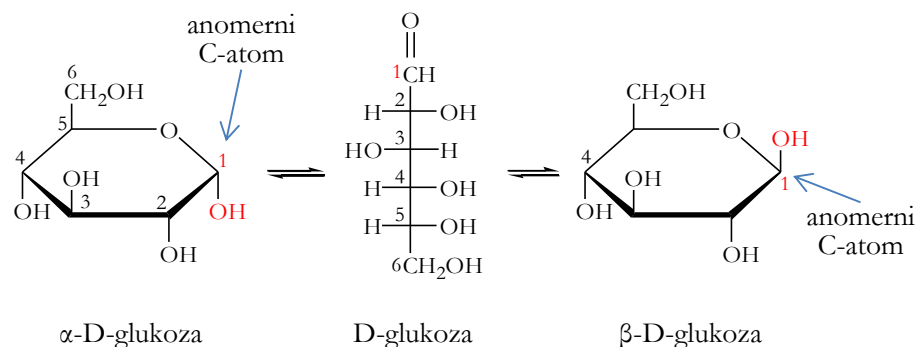
i. **Monosaharidi** su najjednostavniji ugljikohidrati (ne mogu se razgraditi na još jednostavnije). Njihova je osnovna empirijska formula $(\text{C}\cdot\text{H}_2\text{O})_n$, gdje n označava broj ugljikovih atoma. Monosaharidi se dijele s obzirom na sljedeće značajke:

- vrstu karbonilne skupine: monosaharidi koji sadrže aldehidnu skupinu su **aldoze** (npr. gliceraldehid i glukoza), a oni koji sadrže keto-skupinu su **ketoze** (npr. dihidroksiaceton i fruktoza);
- broj ugljikovih atoma: Tablica 6. 2 prikazuje nazive različitih monosaharida s obzirom na broj ugljikovih atoma koji sadrže;

Tablica 6. 2. Nomenklatura monosaharida.

broj ugljikovih atoma u šećeru	naziv šećera
3	trioza
4	tetroza
5	pentoza
6	heksoza

- α - i β -anomerni oblik: monosaharidi s pet ili šest C-atoma vrlo lako cikliziraju u vodenoj otopini. C-atom za koji je u linearnom obliku vezana karbonilna (aldehidna ili keto) skupina nazivamo anomernim C-atomom. U cikličkom obliku na njega je vezana hidroksilna ($-\text{OH}$) skupina koja se može nalaziti ispod ili iznad razine prstena. Kod α -anomernog oblika $-\text{OH}$ skupina nalazi se ispod prstena (Slika 6. 3), a kod β -anomernog oblika iznad prstena (Slika 6. 3). Različiti prirodni polisaharidi građeni su od različitih anomernih oblika monosaharida (npr. celuloza je građena od β -glukoze, a škrob od α -glukoze).

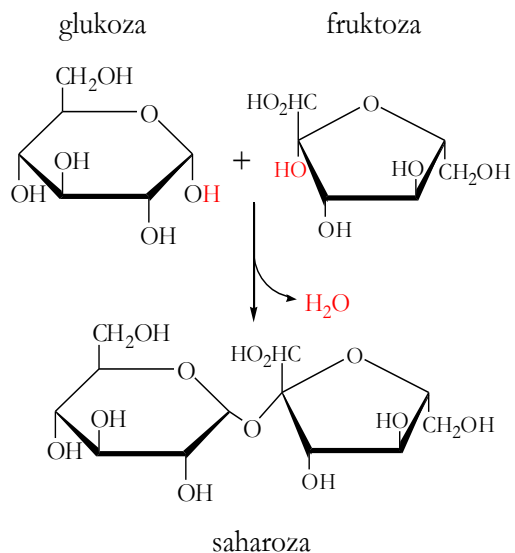


Slika 6. 3. Anomerni oblici D-glukoze nastaju zatvaranjem lanca D-glukoze u prsten. Izvor: autori.

Najvažniji je i najčešći monosaharid **glukoza**, ona je **aldohekszoza** – ugljikohidrat koji ima šest ugljikovih atoma s aldehidnom skupinom u otvorenom lancu (Slika 6. 3). Ostali monosaharidi koji imaju biološku važnost jesu **fruktoza** (ketohekszoza, šest C-atoma s keto-skupinom), **manoza** (aldohekszoza, šest C-atoma s aldehidnom skupinom), **galaktoza** (aldohekszoza, šest C-atoma s aldehidnom skupinom) i **riboza** (aldopentoza, pet C-atoma s aldehidnom skupinom).

Monosaharidi predstavljaju najvažniji izvor energije za stanicu (ponajprije glukoza), a sudjeluju i u biosintezi ostalih važnih biomolekula (primjerice, pentoze riboza i deoksiriboza ulaze u sastav nukleinskih kiselina; vidi Poglavlja 7 i 8).

- ii. **Disaharidi** su najjednostavniji polisaharidi koji nastaju spajanjem dviju molekula monosaharida, pri čemu se stvara **glikozidna veza**, uz eliminaciju molekule vode (Slika 6. 4). I obratno, hidrolizom se raspadaju na dvije molekule monosaharida. Za većinu najčešćih i najvažnijih disaharida zajednička je formula $C_{12}H_{22}O_{11}$. U disaharide se ubrajaju **maltoza** (spoj dviju molekula glukoze), **laktoza** (spoj jedne molekule galaktoze i jedne molekule glukoze), **saharoza** (spoj jedne molekule glukoze i jedne molekule fruktoze; Slika 6. 4) i drugi.



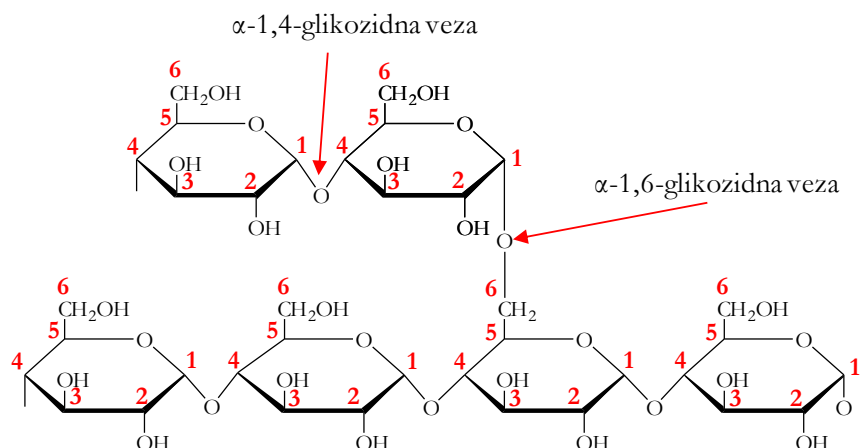
Slika 6. 4. Nastajanje disaharida saharoze. Izvor: autori.

Monosaharidi i disaharidi nazivaju se i **šećerima**. To su jednostavni, jestivi ugljikohidrati

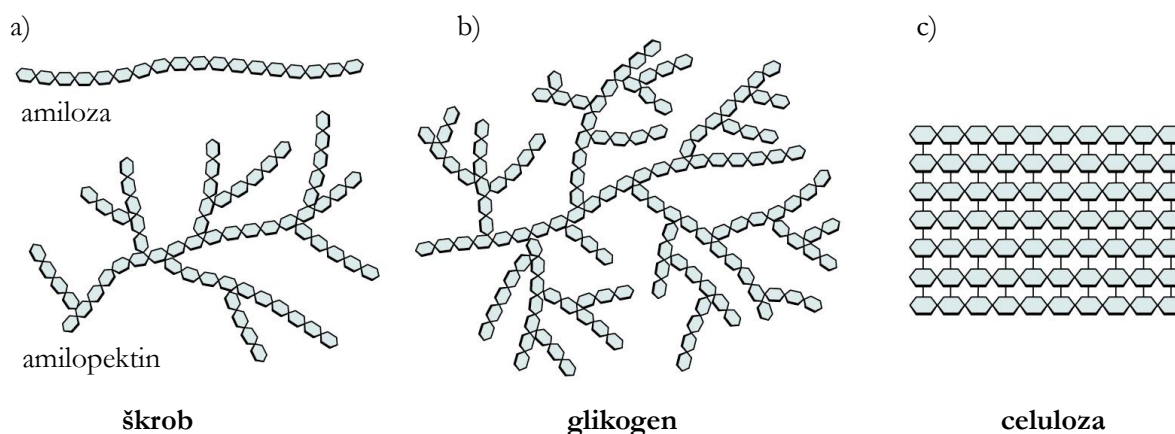
slatkog okusa koji se svakodnevno koriste u prehrambene svrhe. U šećere koje ljudi svakodnevno konzumiraju ubrajamo **fruktozu, laktozu, glukozu** i **saharozu**. Ti osnovni prehrambeni ugljikohidrati dobivaju se iz šećerne trske i šećerne repe, a također ih nalazimo u voću i medu. „Šećer“ koji koristimo u kuhinji u obliku bijelih kristalica jest disaharid saharoza (Slika 6. 4). Karakteristika je svih šećera da se otapaju u vodi i pritom nastaje sirup (npr. javorov sirup). Šećer prisutan u krvnoj plazmi jest glukozu, u kojoj je pohranjena energija i koju stanice biološkim procesima (primjerice, staničnim disanjem) pretvaraju u druge oblike energije (kemijsku, pohranjenu u spoju adenzin trifosfatu — ATP-u, i toplinsku).

iii. **Polisaharidi** su polimeri građeni od tri i više monosaharida. Kao i u disaharidima, pojedini su monosaharidi u polisaharidima vezani glikozidnim vezama. Najvažniji i najčešći polisaharidi (celuloza, škrob, glikogen i hitin) polimeri su glukoze. Međusobno se razlikuju po prirodi glikozidnih veza.

- a) **Celuloza** je najzastupljeniji polisaharid na Zemlji. Građevni je element stanične stijenke biljaka. Celuloza je polimer β -glukoze (Slike 3. 1 i 6. 6c), linearna molekula u kojoj su glukozni ostatci međusobno povezani β -1,4-glikozidnom vezom. (Detaljna građa stanične stijenke obrađena je u Poglavlju 3!)
- b) **Škrob** (Slika 6. 5 i Slika 6. 6a) najvažniji je pričuvni polisaharid u biljkama. Homopolimer je α -glukoze (Slika 6. 3). U većini slučajeva škrob je mješavina dvaju polisaharida — amiloze i amilopektina (Tablica 6. 3). Amiloza je nerazgranjena, linearna molekula u kojoj su pojedini glukozni ostatci povezani α -1,4-glikozidnom vezom (Slika 6. 6a). Za razliku od nje, amilopektin je razgranjen, a ogranci nastaju α -1,6-glikozidnim vezama (Slika 6. 5 i Slika 6. 6.a). Dakle, u amilozi su prisutne α -1,4-glikozidne veze, a u amilopektinu α -1,4- i α -1,6-glikozidne veze (Tablica 6. 3). U sjemenkama nekih sorti ječma, kukuruza i riže škrob se sastoji gotovo isključivo od amilopektina, dok sjemenke graška i nekih drugih sorti kukuruza imaju pričuvni škrob koji sadrži između 50 i 80 % amiloze.
- c) **Glikogen** (Slika 6. 6.b), kao i amilopektin, razgranjen je homopolimer α -glukoze koji sadrži i α -1,4- i α -1,6-glikozidne veze (Tablica 6. 3). Zato se glikogen ponekad naziva i „životinjskim škrobom“. Za razliku od amilopektina, molekule su glikogena razgranjenije, a ogranci kraći. Glikogen je glavni pričuvni polisaharid kod životinja i gljiva.



Slika 6. 5. Molekulska građa škroba (amilopektin). Numeriranje ugljikovih atoma u glukoznim ostacima prikazano je crvenim brojevima. Izvor: autori.

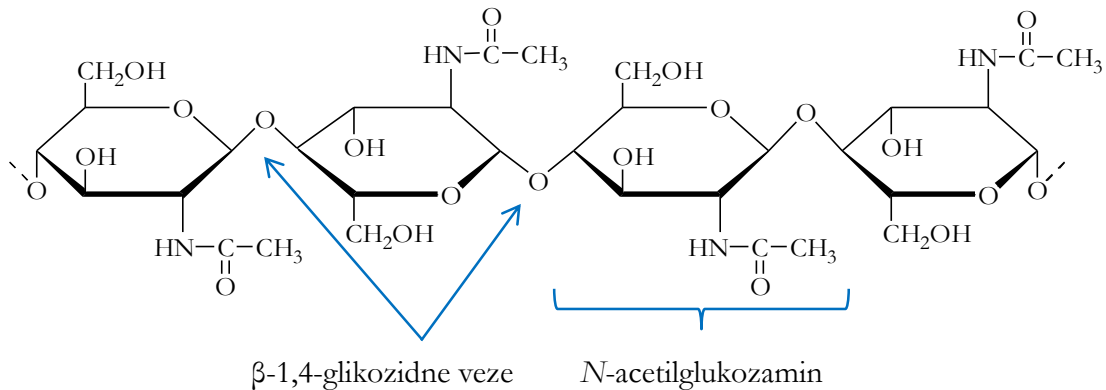


Slika 6. 6. (a) Škrob, (b) glikogen i (c) celuloza. Izvor: <http://bit.ly/2txFtr8>

Tablica 6. 3. Razlike škroba (amiloze i amilopektina) i glikogena.

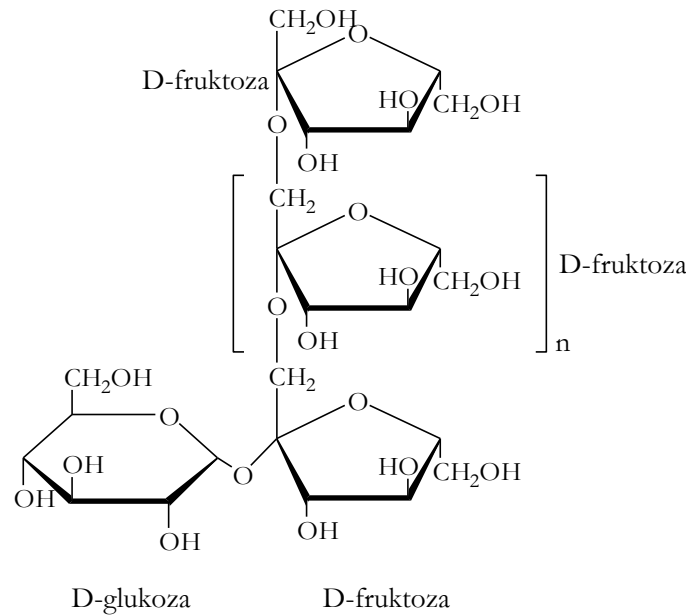
	škrob		glikogen
	amilaza	amilopektin	
razgranjenost lanca	ne	da (α-1,6-glikozidna veza na svakom 25. – 30. glukoznom ostatku)	da (α-1,6-glikozidna veza na svakom 10. – 14. glukoznom ostatku)
dužina lanca	200 – 1000 glukoznih ostataka	2000 – 22.000 glukoznih ostataka	oko 60.000 glukoznih ostataka
veze između glukoznih ostataka	α-1,4-glikozidna veza	α-1,4- i α-1,6-glikozidna veza	α-1,4- i α-1,6-glikozidna veza
relativna molekulska masa	10 ⁴ – 10 ⁵ Da	10 ⁴ – 10 ⁶ Da	10 ⁶ – 10 ⁷ Da
obojenje Lugolovom otopinom (I ₂ -KI)	tamnoplavo do crno	slabo ljubičasto do ružičasto	smeđe-plavo

- d) **Hitin** (Slika 6. 7) drugi je najčešći biopolimer koji se sastoji od molekula derivata glukoze *N*-acetilglukozamina međusobno spojenih β -1,4-glikozidnim vezama. Hitin je glavna strukturna sastavnica stanične stijenke većine gljiva (Poglavlje 3) i lišajeva. Hitin također izgrađuje egzoskelete člankonožaca, Arthropoda (kukaca i rakova), organski dio ljuštore nekih mekušaca (Mollusca) te radulu, dio usnog aparata većine mekušaca (osim školjkaša).



Slika 6. 7. Hitin. Izvor: autori.

- e) Mnoge biljke stvaraju polisaharide koji pripadaju skupini prirodnih vlakana – **fruktanima** (fruktooligosaharidi). Fruktani su polimeri fruktoze (do 200 molekula), a lanac uvijek sadrži jednu molekulu glukoze smještenu na kraju lanca (terminalno). **Inulini** su linearni fruktani kod kojih su molekule β -fruktoze (od 2 do 140) povezane β -2,1-glikozidnom vezom (Slika 6. 8). Sintetiziraju se iz saharoze. Nastaju u mnogim biljnim vrstama (luk, poriluk, češnjak, banana, šparoga), a posebno su karakteristični za vrste iz porodice glavočika (Asteraceae) (maslačak, čičak, vodopija, artičoka, dalija, čičoka). Glavočike skladište inulin kao rezervnu tvar u podzemne organe (korijen i podzemnu stabljiku – rizom). Biljke koje skladište inulin kao rezervnu tvar ne skladište škrob (nemaju škrobna zrnca).



Slika 6. 8. Inulin. Izvor: autori.

Dijabetičari koriste inulin kao zamjenu za škrob (dijabetes je bolest uzrokovana nedostatkom hormona gušterače – inzulina, potrebnog za prijenos glukoze iz krvi u stanice). Ljudski enzimi amilaze razgrađuju škrob do glukoze, ali ne mogu razgraditi inulin. Za razliku od škroba, čija razgradnja do glukoze počinje već u ustima te tako naglo podiže šećer u krvi, inulin prolazi nerazgrađen kroz veći dio probavnog sustava. Osim toga, budući da se radi o polimeru fruktoze, inulin ne uzrokuje povećanje razine glukoze u krvi. Inulin na kraju razgrađuju bakterije u crijevu uz oslobađanje veće količine CO_2 i/ili metana (CH_4) (posljedica je povećana proizvodnja plinova tijekom probave). Nešto fruktoze oslobođene bakterijskom razgradnjom inulina organizam iskorištava neovisno o inzulinu. Inulin je također topivo prirodno vlakno koje pomaže u smanjivanju štetnog kolesterola u krvi. Nadalje, inulin je vrlo učinkovit **prebiotik** (hrana ili tvar koja potiče rast postojećih bakterija u probavnom sustavu). Često se dodaje **probioticima**, tj. hrani poput jogurta, kefira i fermentiranog povrća koja sadrži žive „korisne” mikroorganizme koji, primijenjeni u ljudi, djeluju povoljno na domaćina (smanjuju kolesterol, smanjuju krvni tlak, preveniraju karcinom debelog crijeva, pojačavaju imunost, smanjuju mogućnost infekcija, smanjuju dijareju uzrokovanu antibioticima itd.). Najčešći su rodovi bakterija koje se koriste u probioticima *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*.

U staničnom soku biljaka (stanični sok je sadržaj vakuole!) gotovo se uvijek nalaze različiti ugljikohidrati. To su u prvom redu monosaharidi, zatim neki disaharidi i polisaharidi. Od

monosaharida najčešće su heksoze glukoza i fruktoza, a od disaharida saharoza i maltoza.

Kvalitativni testovi za dokazivanje ugljikohidrata

Svrha **kvalitativnih** testova jest dokazati prisutnost nekog ugljikohidrata u ispitivanom uzorku (otopini, biljnom ili životinjskom materijalu). Oni nam govore ima li ili nema ispitivane tvari u uzorku (pozitivna ili negativna reakcija, da ili ne). Za razliku od toga, **kvantitativnim** se testovima može utvrditi i *koliko* ima te tvari u uzorku. Tijekom ove vježbe radit ćete samo kvalitativne testove za dokazivanje ugljikohidrata.

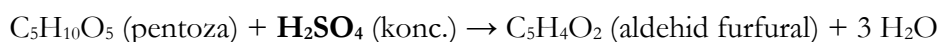
Testovi koje ćete koristiti temelje se na promjeni boje dodatkom određenog reagensa u uzorak (**reakcija bojenja**) i/ili pojavi netopivog taloga ili zamućenja (pojava teško topivih tvari u otopini – **reakcija taloženja**) ako su ugljikohidrati prisutni u uzorku (pozitivna reakcija).

Obradit ćemo četiri kvalitativna testa za dokazivanje ugljikohidrata: Molischovu, Benedictovu, Tollensovu i Lugolovu reakciju.

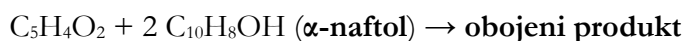
Molischova reakcija

Molischovom reakcijom dokazuje se prisutnost **svih ugljikohidrata**: i monosaharida i disaharida i polisaharida.

U ovom se testu ugljikohidrati (npr. šećer pentoza) dokazuju kemijskom reakcijom uz pomoć konc. **sumporne kiseline** (konc. H_2SO_4) i **Molischova reagensa** (α -naftol ili timol otopljen u etanolu). Sumporna kiselina uzrokuje dehidraciju ugljikohidrata (gubitak H_2O), što rezultira nastankom aldehida (iz pentoze dehidracijom nastaje aldehyd furfural).



Nastali produkt – aldehyd – sad je moguće dokazati uz pomoć Molischova reagensa, pri čemu dolazi do pojave ljubičastog obojenja.

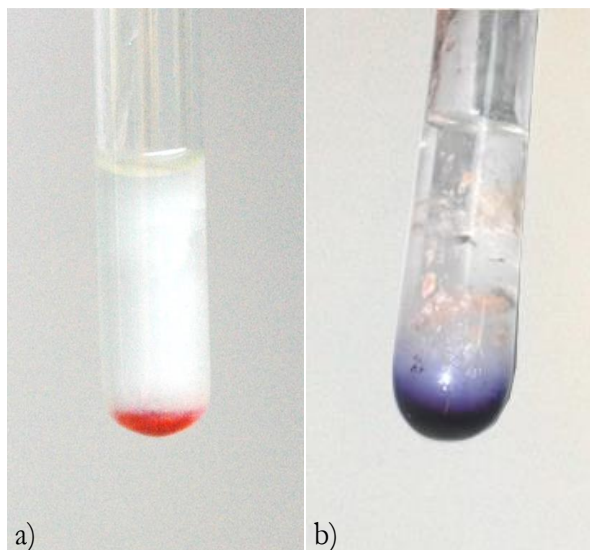


Postupak je sljedeći:

1. U ispitivani uzorak dodaje se Molischov reagens (α -naftol ili timol otopljen u etanolu) i uzorak se promiješa.

- Pažljivo (bez miješanja!) dodaje se konc. sumporna kiselina. Sumporna kiselina dodaje se poslije Molischova reagensa jer se radi o koncentriranoj i vrlo reaktivnoj kiselini!
- Pozitivna reakcija (u slučaju da su u ispitivanom uzorku prisutni ugljikohidrati) vidljiva je pojavom ljubičastog (ako se radilo o α -naftolu) ili crvenog obojenja (ako se radilo o timolu) na mjestu gdje se dodiruju gušći sloj kiseline (dolje) i ostatak otopine (gore) (Slika 6. 9)!

Umjesto α -naftola mogu se koristiti i timol, autron, rezorcinol ili orcinol, s tim da se tada dobije drugačije obojenje.

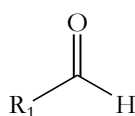


Slika 6. 9. Uzorak daje pozitivnu Molischovu reakciju, što se vidi po pojavi (a) crvenog obojenja s timolom i (b) ljubičastog obojenja s α -naftolom. To je dokaz prisutnosti ugljikohidrata. Izvor: autori.

Benedictova reakcija

Benedictova reakcija služi za dokazivanje prisutnosti **reducirajućih šećera**. Njima pripadaju svi **monosaharidi** i neki disaharidi (ali ne saharoza). Reducirajući su šećeri:

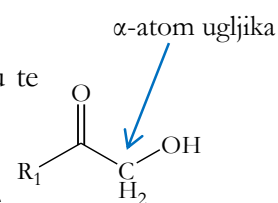
- oni koji imaju slobodnu aldehidnu skupinu



U njih ubrajamo sljedeće ugljikohidrate: monosaharide glukozu, galaktozu, manozu te disaharide laktozu (koju često nalazimo u mokraći žena koje doje) i maltozu.

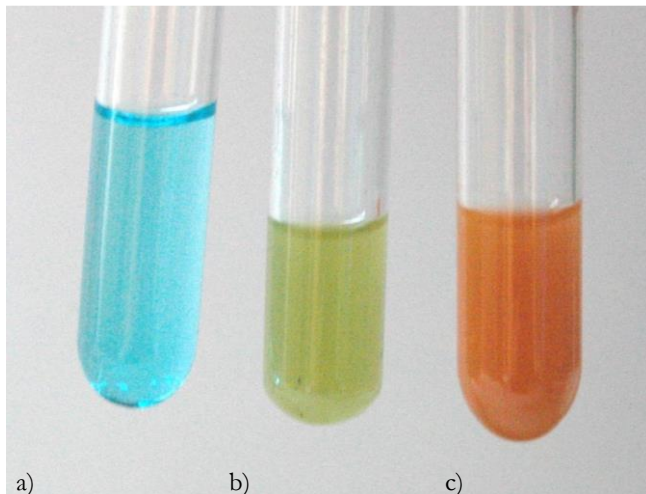
- tzv. **α -hidroksi ketoni**, koji uz hidroksilnu imaju i karbonilnu skupinu te postaju reducirajući u alkalnoj otopini.

Njima pripada ketoza fruktoza (monosaharid), koja se tijekom reakcije pretvara u aldoze manozu i glukozu, koje zatim daju pozitivnu reakciju.



U ovom kvalitativnom testu koristi se **Benedictov reagens** – alkalna otopina koja sadrži bakrove(II) ione (Cu^{2+}) u kompleksu s citratnim ionima ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7^{2-}$). Otopine iona Cu^{2+} tipično su plave boje pa je i otopina samog reagensa plava (Slika 6. 10a).

Test se temelji na reakciji iona Cu^{2+} iz Benedictova reagensa s reducirajućim šećerima, pri čemu dolazi do redukcije bakrovih(II) iona (Cu^{2+}) u bakrove(I) ione (Cu^+) (sami šećeri u toj se reakciji oksidiraju). Ion Cu^+ spaja se s kisikom i nastaje bakrov(I) oksid (Cu_2O), koji se taloži (netopiv je u vodi) i ciglastocrvene je boje.



Slika 6. 10. Sadržaj epruveta slijeva nadesno: (a) Benedictov reagens (BnR), (b) ekstrakt krumpira + BnR, (c) 1 %-tna otopina glukoze + BnR. Izvor: autori.

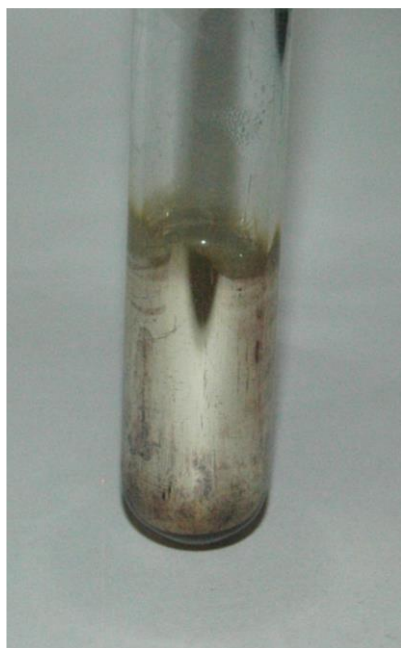
otopini, odnosno o količini taloga bakrova(I) oksida (Slika 6. 10). Stoga ovaj test nije samo kvalitativan (*ima ili nema* reducirajućih šećera u uzorku) već je i donekle kvantitativan (boja taloga pokazuje *koliko* ima reducirajućih šećera u uzorku). Primjerice, kod škroba (polimer α -glukoze) s Benedictovim reagensom reagiraju molekule glukoze koje se nalaze na samim krajevima polisaharidnog lanca i kao rezultat nastaje slaba pozitivna reakcija – zeleno obojenje (Slika 6. 10b). Jaka pozitivna reakcija jest pojava ciglastocrvenog obojenja u 1 %-tnoj otopini glukoze (Slika 6. 10c).

Tollensova reakcija ili reakcija srebrnog zrcala

Tollensova se reakcija, kao i Benedictova, koristi za dokazivanje reducirajućih šećera. Prije svega **aldoza**, odnosno monosaharida s aldehidnom skupinom. Aldehidna skupina je, kao što je već spomenuto, reducirajuća i može reducirati ione Ag^+ iz reagensa do elementarnog srebra. Za razliku od toga, ketoze imaju nereducirajuću keto-skupinu koja ne može reducirati ione Ag^+ (reakcija će biti negativna). Izuzetak su već spomenute α -hidroksi ketoze.

Neke od aldoza koje možemo dokazati ovom reakcijom jesu:

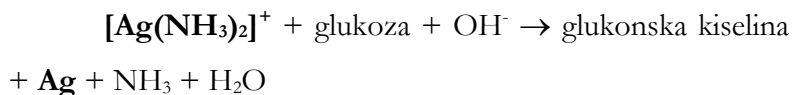
- trioze: gliceraldehid
- pentoze: riboza, arabinoza



Slika 6. 11. Nastanak srebrnog zrcala (Tollensova reakcija). Izvor: autori.

- o heksoze: glukoza, manoz, galaktoza.

Koristimo **Tollensov reagens** – amonijalkaličnu otopinu srebrovog nitrata (otopina AgNO_3 u otopini NH_3) koja sadrži diaminosrebrove ione $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$. Ti ioni djeluju kao slabi oksidansi koji oksidiraju aldozu, primjerice glukozu u glukonsku kiselinu.



Krajnji je rezultat ove redoks-reakcije nastanak elementarnog srebra (Ag) i to u obliku **srebrnog taloga** (srebrno zrcalo) (Slika 6. 11). Ova se kemijska reakcija ponekad koristi pri proizvodnji zrcala.

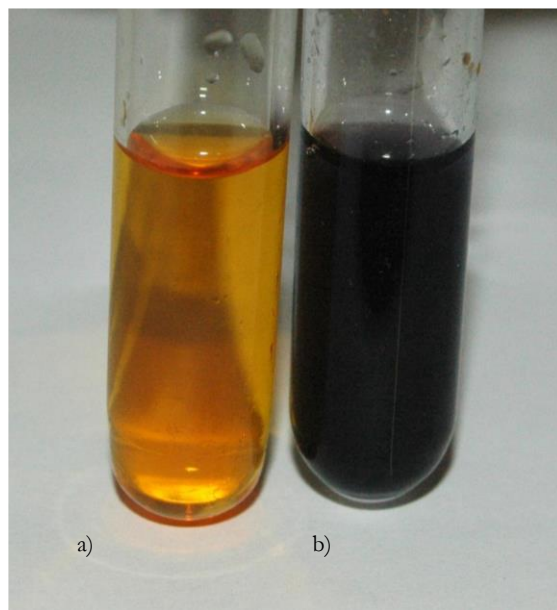
Postupak je sljedeći:

1. U otopinu željenog ispitivanog uzorka dodaje se Tollensov reagens.
2. Kao krajnji produkt na stijenkama epruvete nastaje srebrno zrcalo = istaloženo elementarno srebro (Slika 6. 11).

Lugolova reakcija

Lugolova reakcija koristi se za dokazivanje **škroba** i **glikogena** te za razlikovanje od drugih polisaharida.

U ovoj reakciji koristi se **Lugolova otopina** – žućkasta otopina joda u kalij-jodidu ($\text{I}_2\text{-KI}$). Tijekom reakcije žućkasta se boja Lugolove otopine u prisutnosti škroba mijenja u tamnoplavu do crnu (Slika 6. 12), a u prisutnosti glikogena u smeđe-plavu boju. Ostali polisaharidi i monosaharidi ne daju pozitivnu reakciju (otopina ostaje žućkasto-smeđe boje). Smatra se da škrob i glikogen tvore strukturu uzvojnice u koju se ugradi (inkorporira) kompleks joda i jodidnog iona. Škrob u obliku amiloze i amilopektina manje je razgranjen od glikogena,



Slika 6. 12. (a) Otopina joda u kalij-jodidu (Lugolova otopina), (b) 1 %-tna otopina škroba + Lugolova otopina. Izvor: autori.

odnosno ima duže uzvojnice pa veže više joda. Zato je boja škrob-jod-kompleksa intenzivnija od boje glikogen-jod-kompleksa.

Postupak je sljedeći:

U ispitivani uzorak dodaje se nekoliko kapi Lugolove otopine. Ako je u uzorku prisutan škrob ili glikogen, doći će do promjene boje uzorka iz žućkaste u tamnoplavu, odnosno smeđe-plavu.

Zadatak 1: Izvođenje kvalitativnih reakcija za dokazivanje ugljikohidrata.

Materijal:

- pet epruveta s nepoznatim otopinama (po 1 ml)

Biljni materijal:

- plod jabuke (*Malus domestica*), porodica Rosaceae
- gomolj krumpira (*Solanum tuberosum*), porodica Solanaceae

Reagensi:

- α -naftol (15 %-tna alkoholna otopina)
- timol (15 %-tna alkoholna otopina)
- sumporna kiselina (H_2SO_4 , konc.)
- Benedictov reagens
- Tollensov reagens (amonijalkalična otopina srebrovog nitrata, $AgNO_3$)
- Lugolova otopina

Pribor:

- staklene Petrijeve zdjelice
- žilet
- iglica
- pinceta
- epruvete
- kapaljke
- svjećice
- upaljač

Postupak:

Cilj je ovoga zadatka, izvedeći četiri različita testa za dokazivanje ugljikohidrata, pretpostaviti koje ugljikohidrate sadrže:

- otopine uzoraka koji se nalaze u epruvetama (zadatak A);
- plod jabuke i gomolj krumpira (zadatak B).

Testove izvedite na sljedeći način:

Molischova reakcija

A) U epruvete s uzorcima dodajte po jednu kap alkoholne otopine α -naftola ili timola i

polako dokapavajte nekoliko kapi konc. sumporne kiseline *pažljivo uz stijenku epruvete*. Sumpornu kiselinu obvezno dodajte u digestoru!

Kako su se obojili uzorci? Nacrtajte i objasnite reakciju!

B) Načinite tanke plošne prereze ploda jabuke i gomolja krumpira te u Petrijevoj zdjelici napravite reakciju s α -naftolom ili timolom i koncentriranom sumpornom kiselinom. Sumpornu kiselinu obvezno dodajte u digestoru! Nakon dodatka kemikalija poklopite Petrijevu zdjelicu.

Kakvo se obojenje pojavilo? Nacrtajte i objasnite obje reakcije!

Benedictova reakcija

A) U svaku epruvetu dodajte pet kapi Benedictova reagensa (jednak broj u svaku epruvetu!) i promiješajte protresanjem. Lagano promućkajte epruvete, postavite ih natrag na stalak i pričekajte 5-10 minuta. Reakcija se može ubrzati zagrijavanjem uz lagano protresanje. Pritom pripazite da otvor epruvete ne okrenete prema sebi ili drugima jer može doći do vrenja i prskanja sadržaja epruvete!

Što primjećujete? Nacrtajte i objasnite!

B) Načinite tanke prereze ploda jabuke i gomolja krumpira, stavite ih u Petrijevu zdjelicu i nakapajte ih Benedictovim reagensom. Pričekajte 5-10 minuta da se razvije pozitivna reakcija. Reakcija se može ubrzati zagrijavanjem.

Što primjećujete? Nacrtajte i objasnite! Od kojih ugljikohidrata potječe nastalo obojenje?

Tollensova reakcija

A) Dodajte pet kapi (jednak broj u svaku epruvetu!) amonijalkalične otopine srebrovog nitrata u epruvete s uzorcima. Pazite da otopina ne kapa po stolu jer se mrlje ne mogu očistiti. Lagano promućkajte epruvete, postavite ih natrag na stalak i pričekajte 5-10 minuta. Reakcija se može ubrzati zagrijavanjem. Pripazite da otvor epruvete nije okrenut prema Vama ili drugima jer može doći do vrenja i prskanja sadržaja epruvete!

Što primjećujete? Nacrtajte i objasnite!

Lugolova reakcija

A) Dodajte jednu do dvije kapi Lugolove otopine u epruvete s uzorcima.

Što primjećujete? Nacrtajte i objasnite!

B) Načinite plošne prereze ploda jabuke i gomolja krumpira te u Petrijevoj zdjelici napravite reakciju s Lugolovom otopinom.

Što primjećujete? Nacrtajte i objasnite!

Na osnovi rezultata svih četiriju različitih testova za dokazivanje ugljikohidrata odredite sadržaj nepoznatih otopina koje se nalaze u epruvetama! U bilježnicu precrtajte sljedeću tablicu i ispunite je:

uzorak #:	test za dokazivanje ugljikohidrata					ispitivana otopina:
	Molisch (α -naftol)	Molisch (timol)	Benedict	Tollens	Lugol	
1.						
2.						
3.						
4.						
5.						
jabuka						
krumpir						

Oznakom (+) označite pozitivnu reakciju izvršenog testa, s tim da nastojite naglasiti i intenzitet reakcije: jaku reakciju označite (+++), srednju reakciju (++), a slabu reakciju (+). Negativnu reakciju označite (/). Utvrdite sadržaj epruveta!

Ispod tablice objasnite svoje zaključke!

Škrobna zrnca

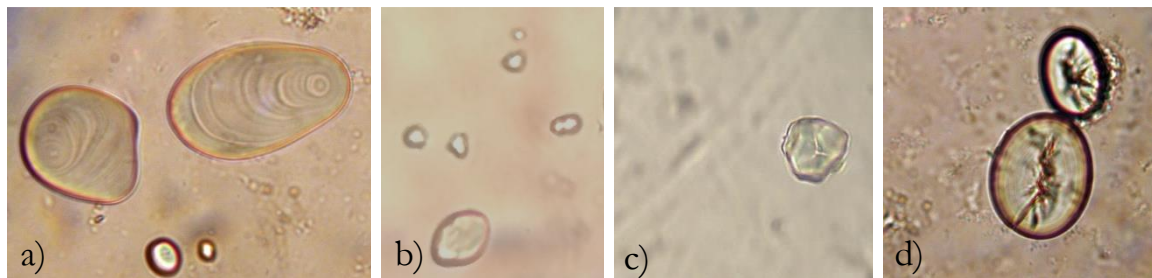
Kao što je već naglašeno, **škrob** (Slika 6. 5 i Slika 6. 6) glavni je pričuvni izvor energije u biljnom organizmu. U biljkama ga u najvećoj količini nalazimo u spremišnim organima (gomoljima, sjemenkama) i spremišnim tkivima (npr. spremišnom parenhimu tkiva srčike u stabljici, Poglavlje 3) i to u obliku škrobnih zrnaca.

Škrob je, kao što je već rečeno, polimer α -glukoze (Slika 6. 3). Kao primarni produkt procesa **fotosinteze** nastaje α -glukoza. Taj se proces odvija tijekom dana u zelenim listovima biljke kad se α -glukoza sintetizira na tilakoidama kloroplasta (fotosintetski aktivni plastidi, vidi Poglavlje 5). Ona se zatim u stromi kloroplasta polimerizira u **primarni** ili **asimilacijski škrob**. Dakle, asimilacijski škrob nastaje danju, za vrijeme fotosinteze, u kloroplastima listova.

Noću, kad nema fotosinteze i provodni putovi za asimilate nisu preopterećeni, asimilacijski se škrob uz pomoć enzima **amilaze** razgrađuje ponovno u α -glukozu. Ona predstavlja transportni oblik ugljikohidrata u biljkama (molekule amiloze i amilopektina koje izgrađuju škrob prevelike su da bi se nesmetano prenosile transportnim sustavom biljke) i prenosi se do spremišnih organa (gomolja ili korijena), gdje se ponovno polimerizira u **sekundarni** ili **pričuvni škrob**.

Pričuvni se škrob skladišti u leukoplastima (fotosintetski neaktivni i bezbojni plastidi, Poglavlje 5). Kada se leukoplast u potpunosti ispuni škrobom, nazivamo ga **škrobnim zrcem**.

Oblik, veličina i građa škrobnih zrnaca mogu biti vrlo različiti i karakteristični su za svaku biljnu vrstu pa se zbog toga uzimaju kao jedna od značajki za determinaciju biljnih rodova i vrsta (Slika 6. 13).



Slika 6. 13. Škrobna zrnca (a) krumpira (*Solanum tuberosum*), (b) pšenice (*Triticum aestivum*), (c) kukuruza (*Zea mays*), (d) graha (*Phaseolus vulgaris*) (400×). Izvor: autori.

Škrobno zrnce nastaje u leukoplastu tako da se prvo stvara tzv. **centar formiranja**, a oko njega se zatim naizmjenično talože slojevi škroba s nejednakim sadržajem vode. Naime, pričuvni (sekundarni) škrob postupno se, u slojevima, skladišti u leukoplastima, ovisno o intenzitetu dotoka α -glukoze. U početku nastajanja svakog novog sloja škroba u leukoplastu prvo se taloži gušći dio tog sloja koji sadrži puno novonastalog škroba i jako malo vode (velik dotok α -glukoze). Kako taj određeni sloj raste, sve se više troši α -glukoza, iz koje nastaje polimer škrob pa sloj postaje sve rjeđi, odnosno sadrži više vode, a manje škroba. Zbog naizmjeničnog taloženja prvo gušćeg (puno škroba, malo vode), a zatim sve rjeđeg (malo škroba, puno vode) dijela sloja škrobne mase dolazi do različitog loma svjetlosti. Pritom su slojevi sa slabijim lomom svjetla bogatiji vodom. Taloženjem škroba škrobno zrnce raste pa se slojevi nazivaju još i zonama rasta. Kod škrobnih zrnaca nekih vrsta biljaka slojanje je jače izraženo, kod nekih slabije, a kod nekih u potpunosti izostane (npr. kod kukuruza, Slika 6. 13c). Ako je centar formiranja škrobnog zrnca u središtu leukoplasta te se oko njega ravnomjerno stvaraju slojevi škroba, takvo slojanje nazivamo **koncentričnim**. Ako je centar formiranja škrobnog zrnca bliže jednom kraju leukoplasta, slojanje je **ekscentrično**. Kod nekih se škrobnih zrnaca na mjestu gdje se nalazio centar formiranja javljaju pukotine (npr. kod pšenice, kukuruza i graha, Slika 6. 13). Škrobna se zrnca boje Lugolovom otopinom i na taj način dokazujemo prisutnost škroba. Nakon dodavanja Lugolove otopine škrobna zrnca postaju prvo plava, zatim plavoljubičasta i konačno gotovo crna.

Zadatak 2: Škrobna zrnca.

Biljni materijal:

- gomolj krumpira (*Solanum tuberosum*, porodica Solanaceae)
- kukuruzno brašno (*Zea mays*, porodica Poaceae)
- pšenično brašno (*Triticum aestivum*, porodica Poaceae)
- grah (*Phaseolus vulgaris*, porodica Fabaceae)

Reagensi:

- Lugolova otopina (otopina joda u kalij-jodidu, I₂-KI)

Pribor:

- predmetna i pokrovna stakalca
- iglica
- filtarski papir
- britvica

Postupak:

A) Sa svježe narezane površine gomolja krumpira britvicom ostružite malo biljnog soka i prenesite ga na predmetnicu u kap vode. Prekrijte pokrovnicom i promatrajte škrobna zrnca pod velikim povećanjem.

B) Iglicom stavite malo brašna kukuruza, pšenice i graha u kap vode na predmetno stakalce. Brašno graha možete dobiti i tako da prepolovite sjemenku graha i sa svježe površine supke britvicom ostružete malo tkiva (hranjivo tkivo endosperma).

Prekrijte pokrovnicom i promatrajte škrobna zrnca pod velikim povećanjem.

Škrobna zrnca krumpira karakteristično su ovalnog oblika i na njima se dobro uočavaju centar formiranja i slojevi (Slika 6. 13a). Škrobna zrnca kukuruza nepravilnog su oblika i na njima se dobro uočava centar formiranja (centralna pukotina), ali ne i sama slojevitost (Slika 6. 13c). Škrobna zrnca pšenice ovalnog su oblika i na njima se ponegdje vidi centralna pukotina, a ponegdje ne. Slojevitost se ne uočava (Slika 6. 13b). Škrobna zrnca graha ovalnog su oblika i na njima se dobro vidi duguljasta centralna pukotina, ali ne i sama slojevitost (Slika 6. 13d).

C) Zatim oprezno uz rub pokrovnice kapnite kap-dvije Lugolove otopine. Uz pomoć komadića filtarskog papira, koji ćete prisloniti uz suprotni rub pokrovnice, uvucite Lugolovu otopinu pod pokrovnicu i uočite što se dogodilo sa škrobnim zrnima.

Nacrtajte nekoliko škrobnih zrnaca krumpira, kukuruza, pšenice i graha, prije i nakon dodavanja Lugolove otopine. Strukture koje trebate označiti na crtežima jesu:

- centar formiranja (označiti na crtežu škrobnog zrnca krumpira!)
- slojevi (označiti na crtežu škrobnog zrnca krumpira!)

- centralna pukotina (označiti na crtežu škrobnog zrnca kukuruza i graha!)
- obojenje nastalo djelovanjem Lugolove otopine

Napomene

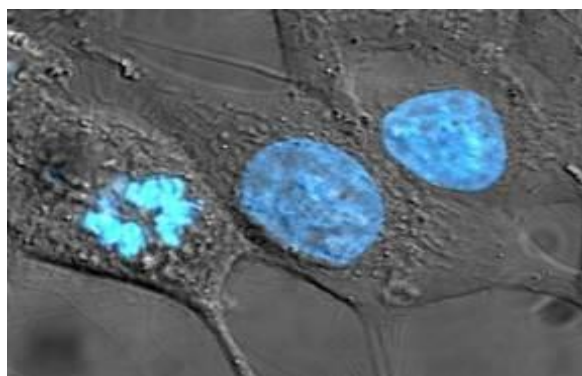
1. Kad žiletom ostružete biljni sok krumpira ili sjemenku graha, time ste mehanički rastrgali biljne stanice (pokidali ste staničnu stijenku i membranu). Zbog toga su iz pokidanih stanica ispala mnogobrojna i relativno velika škrobna zrnca (jer se radilo o stanicama koje čine spremišno parenhimsko tkivo gomolja, odnosno sjemenke). Stoga pod mikroskopom ne možete vidjeti stanice, već samo škrobna zrnca. Ostale stanične organele ne vidite jer je moć razlučivanja svjetlosnog mikroskopa preslaba!
2. U slučaju kukuruznog brašna: brašno je dobiveno mljevenjem zrna kukuruza. Znači, stanice koje su gradile tkivo zrna kukuruza pokidane su mehanički. Ono što se nalazilo u tim stanicama upravo je velik broj škrobnih zrnaca koja sada i čine samo brašno.

7. DEOKSIRIBONUKLEINSKA KISELINA (DNA)

Deoksiribonukleinska kiselina (kraće DNA, od engl. *DeoxyriboNucleic Acid*) složena je molekula koja sadrži nasljednu informaciju potrebnu za razvoj i funkcioniranje svih živućih organizama, uključujući neke viruse. Glavna je uloga molekule DNA **dugotrajna pohrana informacije**. Možemo je usporediti s važnim programskim sustavom jer sadrži instrukcije i upute za izgradnju drugih komponenata stanice, kao što su proteini i ribonukleinske kiseline (molekule RNA, vidi Poglavlje 8). Dijelovi molekule DNA koji nose nasljednu uputu (informaciju) nazivaju se **genima** (Poglavlje 11), dok drugi segmenti molekule DNA imaju strukturnu ulogu ili su uključeni u regulaciju genske informacije.

Otkriće DNA

Ljudi su odavno uočili kako neke fizičke osobine organizama bivaju očuvane iz generacije u generaciju (npr. djeca nasljeđuju mnoga svojstva od svojih roditelja). Međutim, dugo se nije znala biološka osnova procesa nasljeđivanja, odnosno koje su stanične strukture i koje molekule nositelji nasljednih svojstava. Početkom 20. stoljeća smatralo se da su bjelančevine, a ne DNA, najvjerojatnije nositelji nasljednih svojstava. Kao glavni argument za to navodilo se da su bjelančevine građene od dvadeset različitih aminokiselina (Poglavlje 8), a DNA od samo četiri različita nukleotida (što se činilo premalo za sadržavanje informacije za svu raznolikost živog svijeta). Osim toga, tada još nisu bila poznata fizikalna i kemijska svojstva DNA.



Slika 7. 1. DNA u jezgri stanica epitela. Stanica slijeva ušla je u diobu. DNA fluorescentno obojena (800×). Izvor: <http://bit.ly/1DHeMm6>

Pionir znanstveno utemeljenih istraživanja procesa nasljeđivanja bio je Gregor Johann Mendel (Poglavlje 12), koji je djelovao u drugoj polovici 19. stoljeća. Proučavajući različite osobine kod graška, uočio je kako se te osobine prenose iz generacije u generaciju prema određenim zakonitostima te je zaključio da moraju postojati tzv. osnovne jedinice nasljeđivanja,

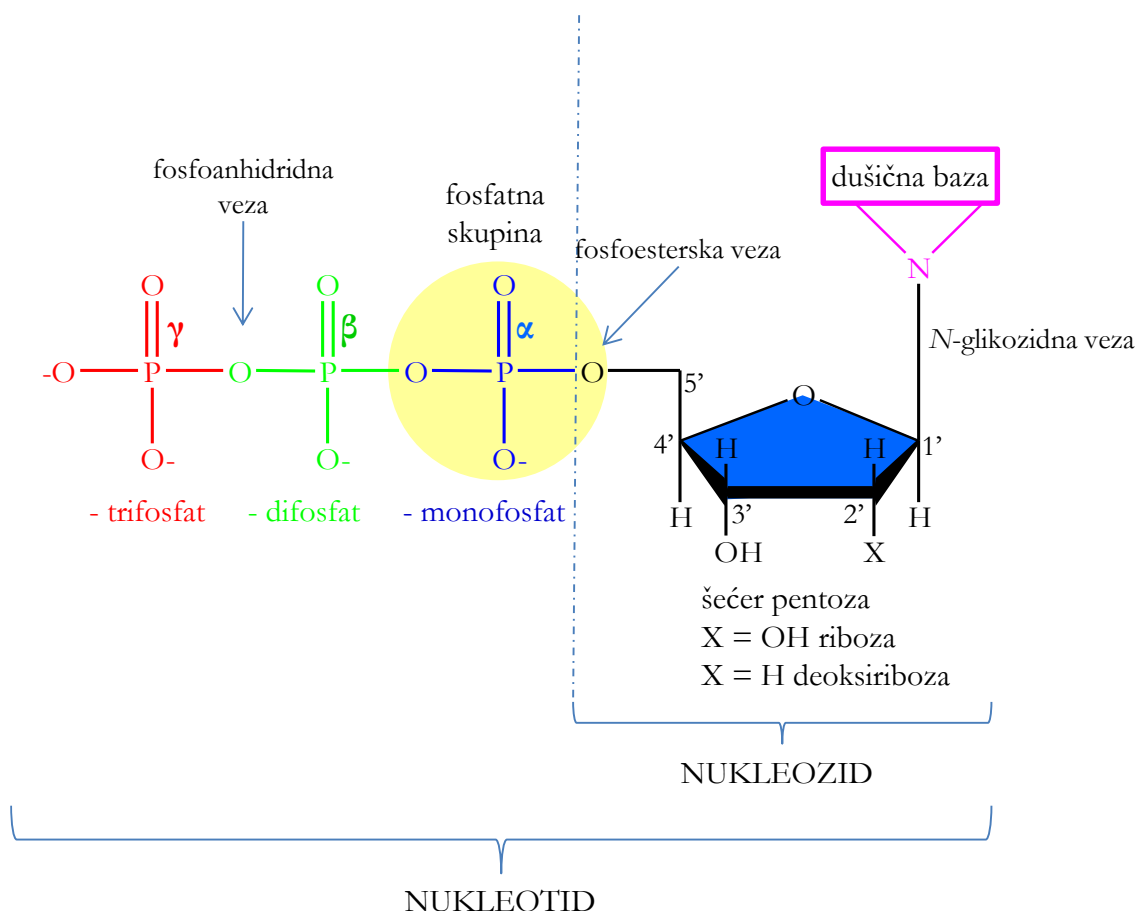
koje je T. H. Morgan kasnije nazvao **genima**. Morgan je utvrdio da se geni nalaze na posebnim strukturama u stanici nazvanim **kromosomima**. Naime, promatramo li diobu stanice pod mikroskopom, vidjet ćemo kako jezgra nestaje, a pojavljuju se kromosomi. Oni se tijekom diobe pravilno raspodijele u dvije novonastale stanice kćeri i onda „nestanu“, tj. na njihovom se mjestu ponovno pojave stanične jezgre (Slika 7. 1). Promatrajući pojavljivanje i nestajanje kromosoma tijekom trajanja staničnog ciklusa (Poglavlje 10), znanstvenici su došli do zaključka kako se nasljedni materijal nalazi upravo u njima. Međutim, kromosomi se sastoje i od DNA i proteina pa je još uvijek ostalo pitanje koja je od tih dviju makromolekula nositelj nasljednih svojstava.

Tijekom prve polovice 20. stoljeća polako su prikupljeni dokazi o tome da je upravo molekula DNA nosilac nasljednih svojstava. Među glavne istraživače na tom području svrstavaju se F. Griffith i O. Avery (dokazali su da DNA iz jednog soja bakterija može prijeći u drugi soj i promijeniti njegova svojstva, koja se dalje nasljeđuju, tj. da upravo DNA određuje nasljedna svojstva), A. Hershey i M. Chase (koristeći viruse dokazali su da je DNA, a ne proteini, genski materijal) te, naravno, Rosalind Franklin, James D. Watson i Francis Crick. Godine 1953. prema rendgenskim slikama koje je napravila Rosalind Franklin James D. Watson i Francis Crick predložili su prvi pravilni model strukture molekule DNA – „model dvostruke uzvojnice“, čime su objašnjena mnoga njezina fizikalno-kemijska svojstva.

Uz DNA su u staničnoj jezgri otkrivene i molekule ribonukleinske kiseline ili RNA (Poglavlje 8) pa se cijela klasa tih molekula naziva nukleinskim kiselinama (lat. *nucleus*, zrno, jezgra). Danas se zna da sva živa bića na Zemlji imaju DNA kao nositelj nasljednih svojstava, s izuzetkom nekih virusa kojima tomu služi RNA.

Građa molekule DNA

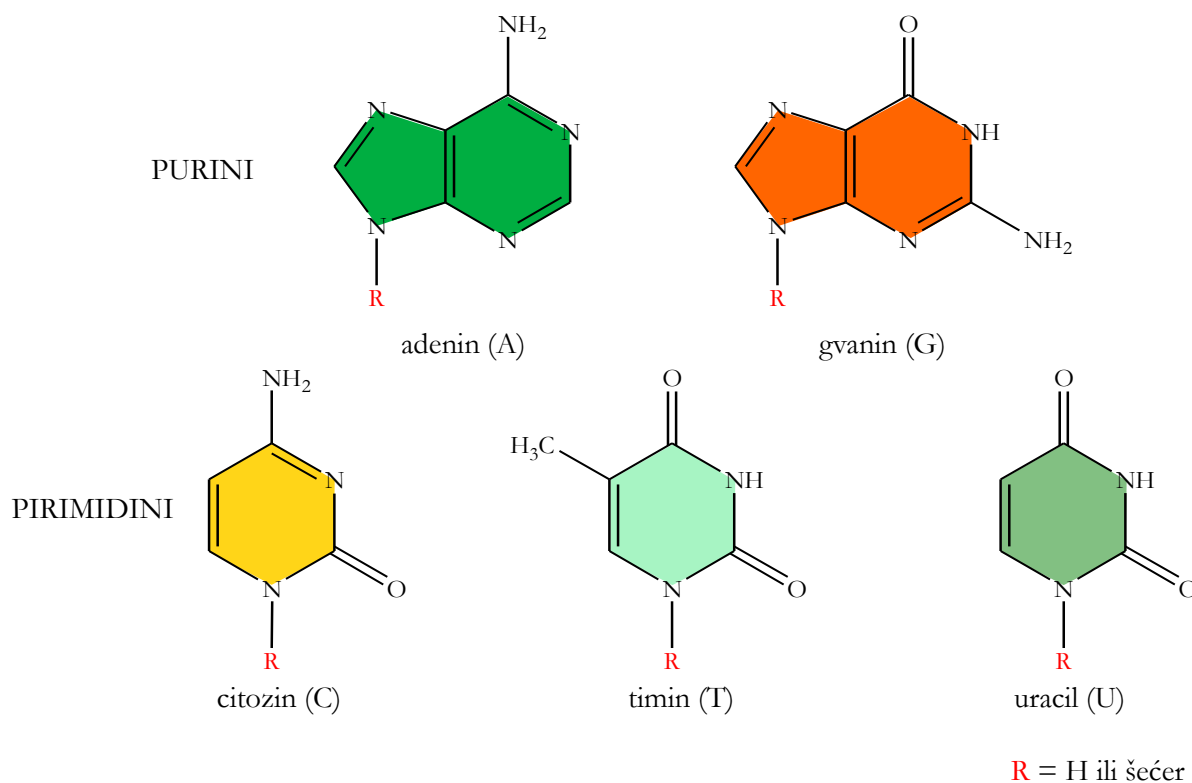
Osnovna gradivna jedinica nukleinskih kiselina, pa tako i molekule DNA, jest **nukleotid** (Slika 7. 2). Nukleotid se sastoji od **šećera pentoze**, **fosfatne skupine** i odgovarajuće **dušične baze**.



Slika 7. 2. Građa nukleotida. Izvor: autori.

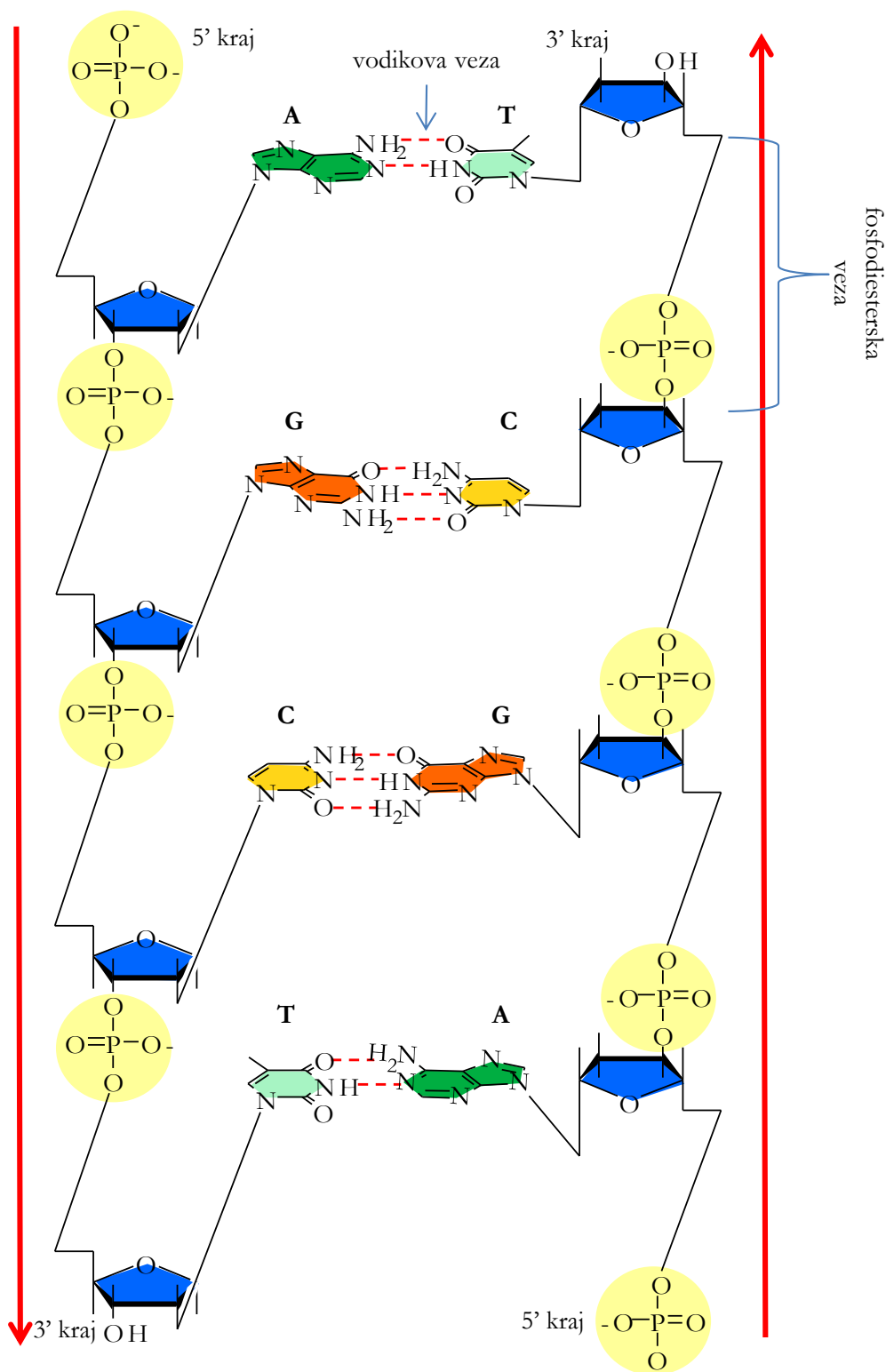
Ovisno o tome radi li se o DNA ili o RNA, razlikuje se šćer u nukleotidu. Ugljikovi atomi u molekuli šćera označavaju se brojevima 1' – 5' (ćita se npr. „jedan crtano“), s tim da je dušićna baza vezana na 1' ugljikov atom, a fosfatna skupina na 5'. Na 2' ugljikovu atomu (Slika 7. 2) šćer može imati hidroksilnu (–OH) skupinu. Taj je šćer *riboza*, a nukleinska kiselina koja ga sadrži naziva se *ribonukleinskom kiselinom* ili RNA (vidi Poglavlje 8). U molekuli DNA na tom se atomu ne nalazi –OH skupina, već umjesto nje samo atom vodika (Slika 7. 2) pa se taj šćer zove *deoksiriboza*, a nukleinska kiselina koja ga sadrži *deoksiribonukleinska kiselina* ili DNA. **Fosfatna skupina**, koja se, kao što je već spomenuto, nalazi na 5' ugljikovu atomu šćera, nosi negativan naboj. Stoga je ukupan naboj molekule DNA negativan. Na 1' ugljikov atom vezana je **dušićna baza** tzv. **N-glikozidnom vezom** (veza sa šćerom preko atoma dušika). Dušićne baze dijele se na **purinske** (dva prstena u strukturi, **adenin** i **gvanin**) i **pirimidinske** (jedan prsten u strukturi, **citozin**, **uracil**, **timin**), kao što je prikazano na Slici 7. 3. Upravo dušićna baza određuje o kojem se nukleotidu radi. Primjerice, dušićna baza adenin u sastavu je nukleotida adenzin-trifosfata (ATP), gvanin gvanozin-trifosfata (GTP), citozin citidin-trifosfata (CTP), uracil uridin-trifosfata

(UTP) i timin timidin-trifosfata (TTP). Osim prema molekuli šećera, DNA i RNA razlikuju se i u bazama. Umjesto timina, u molekuli RNA nalazi se uracil.

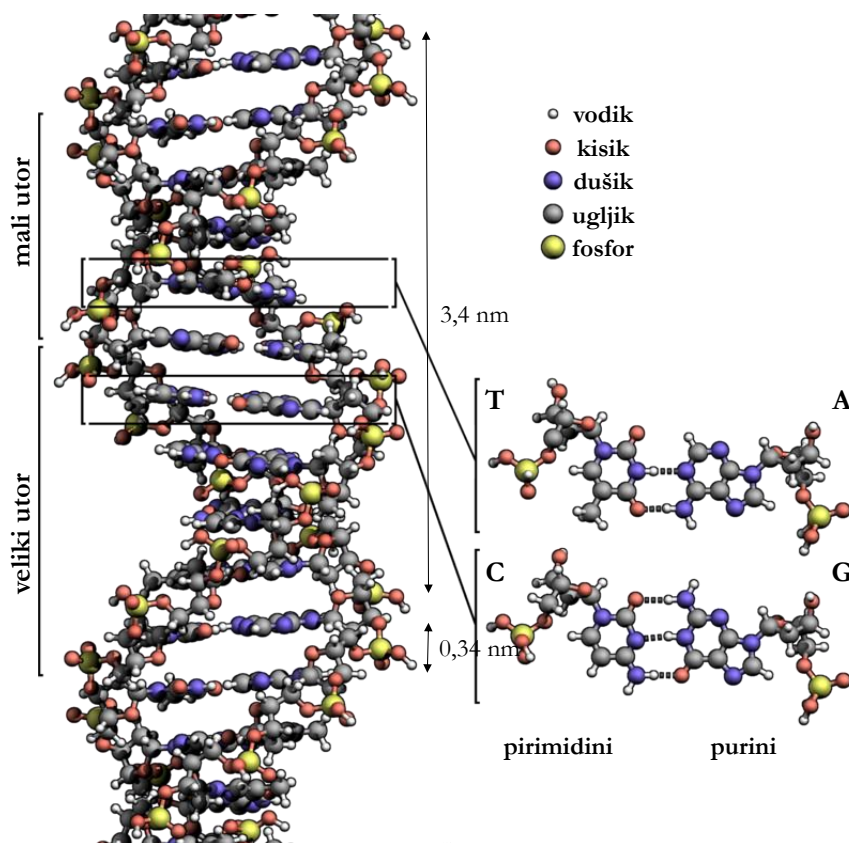


Slika 7. 3. Purinske i pirimidinske dušične baze koje ulaze u sastav nukleinskih kiselina (DNA i RNA). R = vodik (H) ili glikozidna veza sa šećerom. Izvor: autori.

Dva se nukleotida međusobno povezuju tako da se kovalentnom vezom veže hidroksilna skupina koja se nalazi na 3' ugljikovom atomu šećera s fosfatnom skupinom drugog nukleotida koja se nalazi na 5' ugljikovom atomu šećera, čime nastaje 3'-5' **fosfodieterska veza** (između 3' ugljikova atoma prvog šećera i 5' ugljikova atoma drugog šećera, preko fosfatne skupine). Tako dolazi do rasta nukleotidnog lanca u smjeru 5'-3' i na taj način nastaje polinukleotidni lanac (Slika 7. 4).



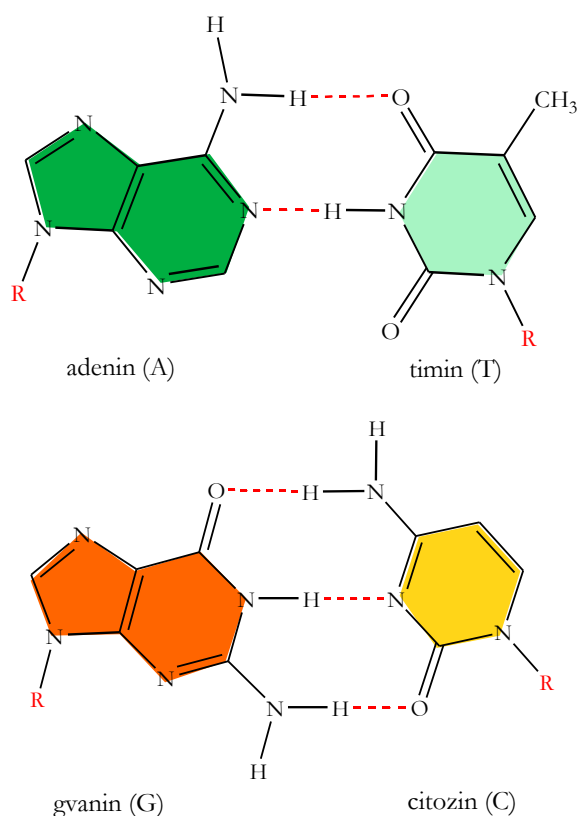
Slika 7. 4. Građa dvolančane molekule DNA. Dva komplementarna lanca povezana su preko dušičnih baza vodikovim vezama, a nukleotidi unutar pojedinog lanca povezani su kovalentnim fosfodieterskim vezama (fosfodieterska okosnica lanca). Dva su lanca uvijek antiparalelna (idu u suprotnim smjerovima, kao što je naznačeno crvenim strelicama) i komplementarna (slijed dušičnih baza jednog lanca određuje smjer dušičnih baza drugog lanca). Izvor: autori.



Slika 7. 5. Građa molekule DNA. Izgled dvostruke uzvojnice DNA; puni okret uzvojnice iznosi 3,4 nm, a baze su međusobno udaljene 0,34 nm. Izvor: <http://bit.ly/2uRzht9>

Kristalografskom je analizom utvrđeno da molekula DNA ima strukturu **dvostruke uzvojnice**, odnosno da se sastoji od dva polinukleotidna lanca koji su omotani jedan oko drugog (Slika 7. 5). Nukleotidi unutar *istog* polinukleotidnog lanca povezani su kovalentnim fosfodieterskim vezama koje čine vanjski dio uzvojnice – **fosfodietersku okosnicu** polinukleotidnog lanca (sastoji se od naizmjeničnih šećera i fosfata). Dušične baze obaju lanaca nalaze se u središtu dvostruke uzvojnice (Slike 7. 4 – 7. 6) i povezane su **vodikovim vezama** po principu komplementarnosti (vidi detaljnije objašnjenje dalje u tekstu). Drugim riječima, dva su lanca međusobno povezana vodikovim vezama. Dva lanca koja tvore jednu molekulu DNA moraju biti suprotno orijentirana, što znači da jedan lanac dvostruke uzvojnice mora završavati 5' krajem, a drugi lanac 3' krajem. Zato se kaže da su dva lanca jedne molekule DNA **antiparalelno** orijentirana (Slika 7. 4).

Naime, uvijek se povezuje jedan purin s jednim pirimidinom i to: adenin s timinom, a citozin s gvaninom. Kaže se da su dušične baze dvaju lanaca **komplementarne** – pa su i dva lanca molekule DNA uvijek komplementarna! Zahvaljujući ovom svojstvu, slijed nukleotida jednog lanca DNA određuje slijed nukleotida drugog lanca. Stoga je omjer purina i pirimidina,



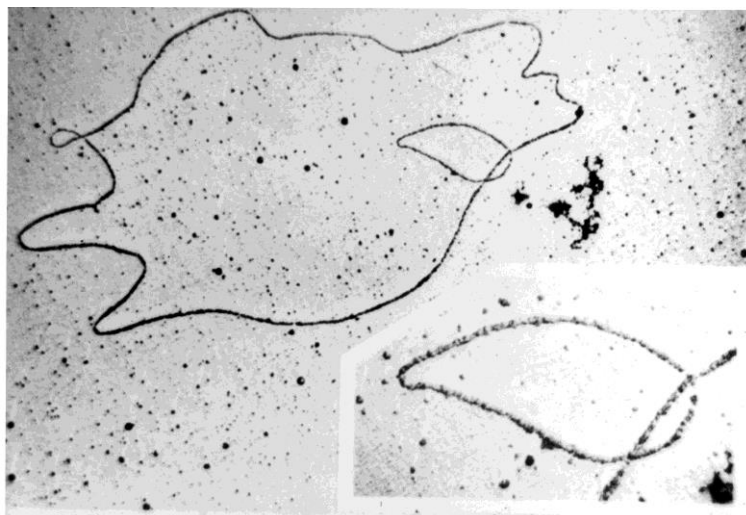
Slika 7. 6. Komplementarnost dušičnih baza, njihove strukturne formule i mjesta nastanka vodikovih veza. R = glikozidna veza sa šećerom. Izvor: autori.

odnosno adenina i gvanina, prema timinu i citozinu oko jedan. Između adenina i timina stvaraju se dvije vodikove veze, a između gvanina i citozina tri vodikove veze (Slike 7. 5 i 7. 6).

Većina molekula DNA koje se nalaze u stanici sastoje se od lanaca dugih po nekoliko milijuna nukleotida, odnosno dušičnih baza. Kad se navodi duljina određene molekule DNA, uobičajeno je da se ona izražava u broju dušičnih baza. Primjerice, ukupna je duljina ljudske DNA oko 6×10^9 parova baza. Naravno, pritom se podrazumijeva da se radi o cijelim nukleotidima.

Informacija o nasljednim svojstvima svakog organizma određena je redoslijedom dušičnih baza u dvolančanoj molekuli DNA. Slijed dušičnih baza koji u molekuli DNA nosi informaciju za jedno nasljedno svojstvo zovemo **gen** (detaljnije vidi u Poglavlju 8).

Kod eukariota najveći dio informacije o nasljednim svojstvima stanice smješten je u više linearnih molekula DNA. One pak tijekom većeg dijela životnog ciklusa stanice bivaju dvostrukom membranom (jezgrina ovojnica) odvojene od ostatka stanice, u organeli zvanoj stanična jezgra. Tijekom stanične diobe te se linearne molekule DNA organiziraju u zasebne strukture zvane kromosomi (Slika 7. 1). Prokarioti nemaju organele, pa tako ni jezgru. Stoga se njihova DNA nalazi slobodno u citoplazmi, najčešće u obliku jedne kružne molekule DNA nazvane **nukleoid** (Slika 7. 7).



Slika 7. 7. Elektronska mikrografija kružnih molekula DNA prokariota. Izvor: <http://bit.ly/2sNAS6S>

Udvostručavanje molekule DNA (replikacija)

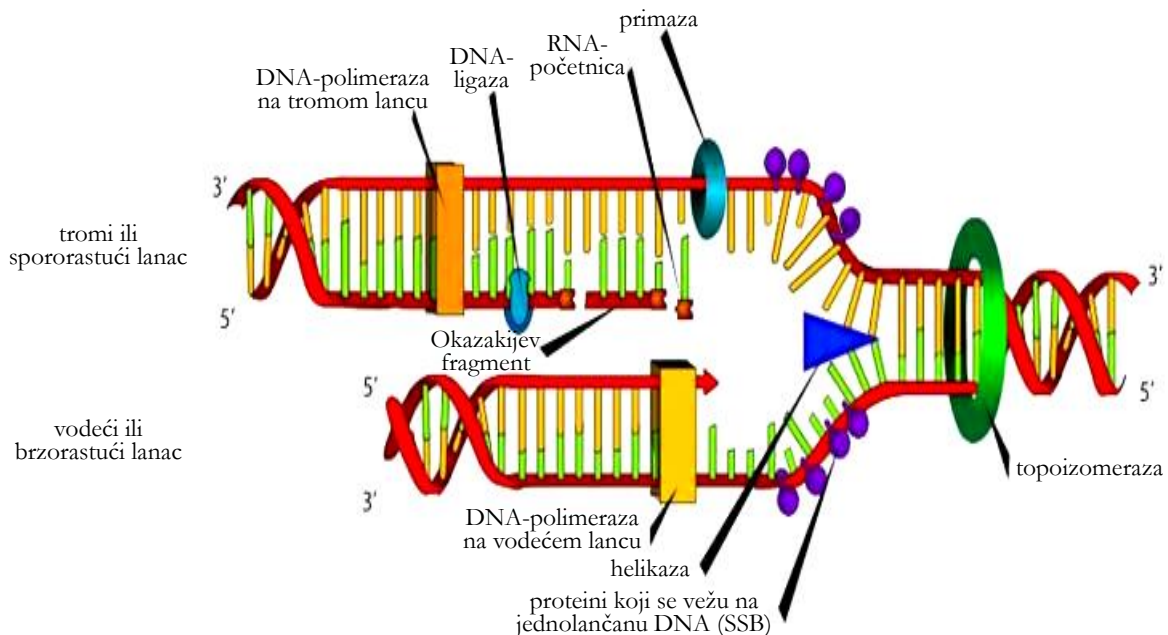
Tijekom diobe stanice svaka od stanica kćeri treba dobiti identične molekule DNA kao stanica majka, tj. važno je sačuvati informaciju o nasljednim svojstvima, odnosno identičan slijed dušičnih baza u molekuli DNA novonastalih stanica. Naime, taj slijed izravno uvjetuje redoslijed aminokiselina u proteinima stanice, a time i obilježja organizma. Zbog toga se dvolančana molekula DNA prije procesa diobe stanice mora **udvostručiti** (**replikirati**, iz jedne molekule DNA nastat će dvije) i taj proces treba biti vrlo precizan.

Već je rečeno da se adenin iz jednog lanca može vezati vodikovim vezama samo s timinom iz drugog lanca, kao i citozin s gvaninom. Time slijed baza jednog lanca uvjetuje slijed baza drugog lanca (dva su lanca jedne molekule DNA međusobno **komplementarna** i **antiparalelna** su orijentacije, Slika 7. 4). Zbog toga je moguće da jedan lanac molekule DNA bude kalup za sintezu novog, komplementarnog lanca. Nova molekula DNA imat će, dakle, jedan stari lanac (kalup) i jedan novostvoreni lanac pa se proces udvostručavanja DNA naziva **semikonzervativnom replikacijom**.

Kako bi pojedini lanac DNA mogao služiti kao kalup u replikaciji, lanci se prvo moraju odmotati iz strukture dvostruke uzvojnice. To odmatanje započinje na mjestima zvanim **izvorišta replikacije** (**ori**, od engl. *origin of replication*), a odvija se uz pomoć enzima zvanog **DNA-helikaza**. Kako bi se spriječilo da se lanci ponovno spare, na jednolančanu DNA vežu se posebni proteini (proteini SSB, od engl. *single strand binding*). Razmatanjem uzvojnice DNA stvara se napetost u molekuli DNA (pokušajte od sredine odmotati dvije isprepletene uzice dok ih držite za krajeve) pa, da ne dođe do zapetljavanja strukture, enzimi **topoizomeraze** rade lomove duž molekule

DNA i ponovno ih spajaju nakon razrješavanja napetosti.

Koristeći stare lance kao kalupe, enzim **DNA-polimeraza** sintetizira nove lance u **smjeru 5' → 3'** rastućeg lanca koristeći nukleotide iz okolne karioplazme (tekućeg sadržaja jezgre). Također, kako bi započela sintezu novog lanca, DNA-polimeraza koristi **početnicu** (engl. *primer*) – malu molekulu RNA dugu između 3 i 10 nukleotida koja se komplementarno veže u mjestu *ori* na odmotani lanac DNA i služi kao početak lanca DNA koji se replicira. Početnicu sintetizira enzim **primaza**. Kako je već rečeno, replikacija DNA počinje na mjestu koje se naziva izvorištem replikacije te se oba lanca repliciraju u isto vrijeme. Razdvojeni stari lanci na kojima se sintetiziraju novi, komplementarni lanci DNA imaju oblik slova Y pa se cijela ta struktura naziva **replikacijskom vilicom** (Slika 7. 8). Replikacijska vilica stalno se pomiče duž molekule DNA, kako napreduje sama replikacija.



Slika 7. 8. Replikacijska vilica. Izvor: <http://bit.ly/2ton29C>

U jednoj replikacijskoj vilici rade dvije DNA-polimeraze. Jedna DNA-polimeraza koristi 3' → 5' usmjereni kalup kako bi kontinuirano povezivala nukleotide u smjeru 5' → 3'. Taj se lanac naziva **kontinuiranim, vodećim ili brzorastućim lancem**. Drugi stari lanac (kalup) suprotne je orijentacije, 5' → 3', pa se dugo nije znalo kako DNA-polimeraza može koristiti taj lanac kao kalup da bi napravila novi, komplementarni lanac u 3' → 5' smjeru, budući da se novi lanac može sintetizirati samo u 5' → 3' smjeru. Daljnjim istraživanjima dobiven je odgovor na to pitanje. Naime, DNA-polimeraza koja koristi 5' → 3' lanac kao kalup također povezuje

nukleotide u smjeru 5' → 3', ali se stari lanac uvija u petlju pa polimeraza stari lanac DNA (5' → 3') koristi kao kalup sa suprotne strane. Na taj se način sintetizira novi 3' → 5' lanac (ali podrazumijeva se da je njegova sinteza u 5' → 3' smjeru; Slika 7. 8). Taj lanac raste sporije i sastoji se od manjih polinukleotidnih fragmenata (100 – 1000 nukleotida) koji se nazivaju **Okazakijevim fragmentima**. Za sintezu svakog Okazakijeva fragmenta potrebna je nova početnica. Okazakijevi fragmenti međusobno se spajaju djelovanjem enzima **DNA-ligaze**. DNA-ligaza povezuje 3' kraj jednog fragmenta s 5' krajem drugog fragmenta. Nastali se lanac naziva **nekontinuiranim, spororastućim ili tromim lancem**.

Rezultat replikacije dvije su identične molekule DNA (jer sadrže po jedan komplementarni lanac ishodišne molekule DNA koji je služio kao kalup za sintezu novog lanca). Dvije novonastale DNA nakon replikacije drže se zajedno uz pomoć posebnih proteina (kohezin) u regiji koju zovemo **centromera** te tijekom stanične diobe tvore dva kraka kromosoma – dvije **kromatide**.

U Tablici 7. 1 prikazani su najvažniji enzimi potrebni pri replikaciji DNA.

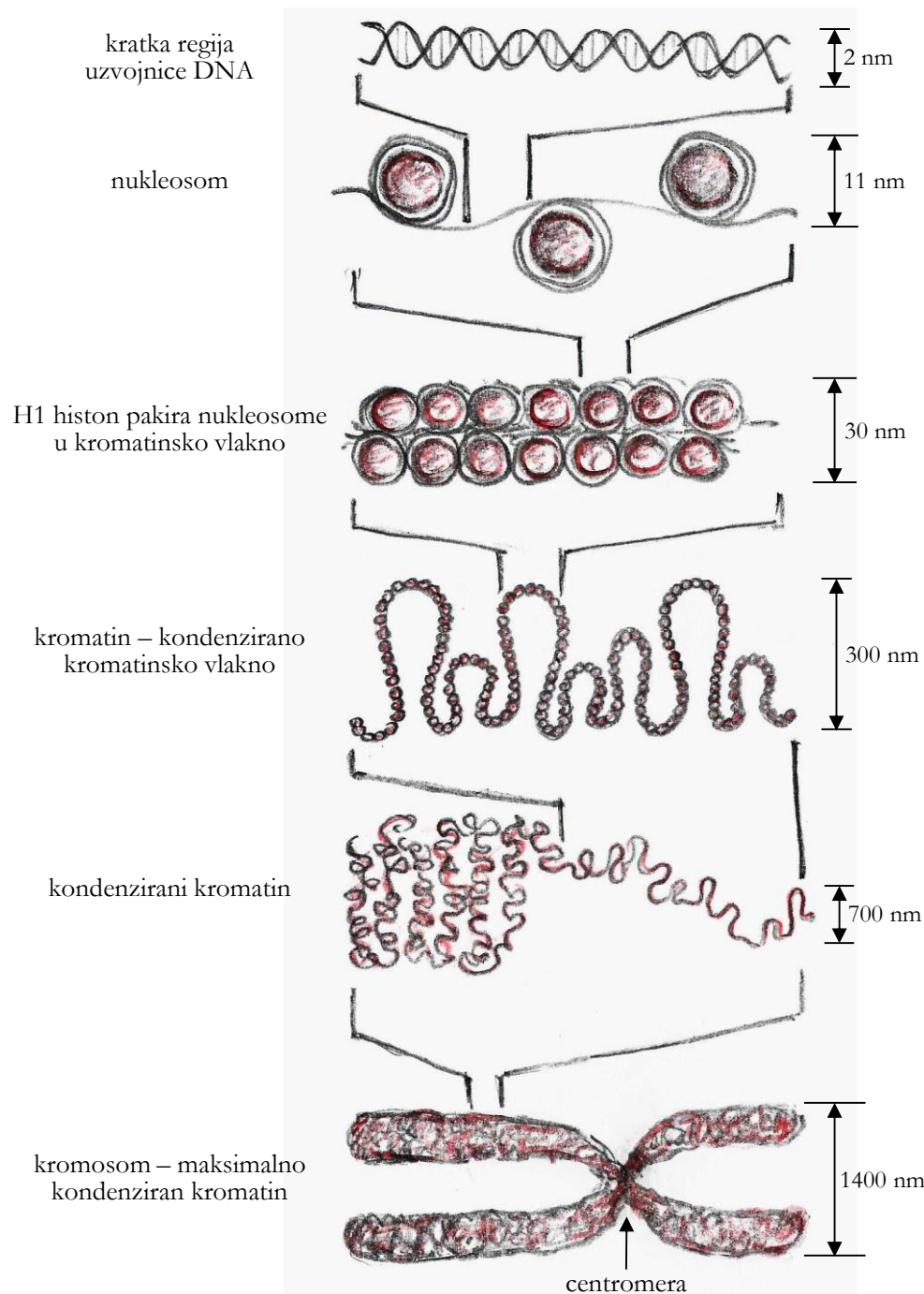
Tablica 7. 1. Enzimi uključeni u replikaciju DNA.

enzim	uloga
DNA-helikaza	odmatanje lanaca DNA iz strukture dvostruke uzvojnice
topoizomeraza	smanjivanje napetosti nastale odmatanjem lanaca DNA
DNA-polimeraza	sinteza novog lanca DNA u 5' → 3' smjeru
primaza	sinteza RNA-početnica
DNA-ligaza	spajanje Okazakijevih fragmenata

Pakiranje molekule DNA u jezgri stanice

Genski materijal prokariota i eukariota jako se razlikuje: prokariotske stanice sadrže najčešće jednu kružnu molekulu DNA, a eukariotske više linearnih molekula. U oba slučaja DNA je puno duža od same stanice (oko 1000 puta za bakterijsku stanicu) i kako bi stala u jezgri (odnosno u stanicu prokariota), DNA se savija te precizno i kompaktno pakira. Proces smatanja DNA u jezgri naziva se **kondenzacijom**. Kondenzacija se u većine prokariota događa smatanjem molekule DNA, dok se u eukariota odvija uz pomoć specifičnih proteina – **histona**. Negativno nabijena molekula DNA veže se za pozitivno nabijene histonske proteine tako da se po 146 nukleotida dvostruke uzvojnice omotava oko kompleksa histonskih proteina. Pojedinačni je histonski kompleks oktamer, tj. sastoji se od osam pojedinačnih proteina (svaki od četiri različite vrste histona: H2A, H2B, H3 i H4, zastupljen je po dva puta, odnosno 2×H2A, 2×H2B, 2×H3 i

$2 \times H4$). Time nastaje struktura **nukleosom** (146 nukleotida duga nit DNA namotana oko histonskog oktamera). Promjer pojedinog nukleosoma iznosi 11 nm. Histon H1 naknadno se veže na nukleosom i stabilizira ga te omogućuje pakiranje više nukleosoma u deblja kromatinska vlakna (30 nm). Ona daljnjom kondenzacijom tvore velike namotane omče koje se drže zajedno uz pomoć nehistonskih proteina (Slika 7. 9). Takav oblik pakiranja genskog materijala (300 nm) zove se **kromatin**.



Slika 7. 9. Shematski prikaz stupnjeva kondenzacije DNA u eukariotskoj stanici. Izvor: autori.

Kao što je gore opisano, kromatin se sastoji od molekula DNA i proteina. To, naravno, ne vidimo kad stanicu promatramo pod mikroskopom – vidimo samo jezgru ispunjenu kromatinom koji je na nekim mjestima tamniji (jače kondenziran), a na drugim svjetliji (slabije kondenziran). Zato jezgra ne izgleda homogeno obojeno, već zrnato. Jače kondenzirani dijelovi kromatina u jezgri nazivaju se zajedničkim imenom **heterokromatin**, a oni slabije kondenzirani tvore **eukromatin**. Heterokromatin je uglavnom inaktivan dio kromatina i obuhvaća inaktivne gene te područja DNA koja ne sadrže gene. Jedno je od najvažnijih područja heterokromatina i centromera.

Prilikom diobe stanice od neizmjerne je važnosti da se genski materijal precizno podijeli u dvije novonastale stanice. Stoga se relativno disperzan kromatin još više kondenzira kako bi se što lakše i preciznije podijelio u stanice kćeri. Tako nastaju pod mikroskopom vidljivi **kromosomi**. Pritom jedan kromosom sadrži dvije molekule DNA nastale replikacijom, vidljive kao krakovi kromosoma ili kromatide. Pojedini kromosom može sadržavati tisuće gena, ali ima i kromosoma s tek stotinjak gena. Budući da je heterokromatin gušće kondenziran, područje na kojem se dvije kromatide u kromosomu drže zajedno izgleda tanje od ostalih dijelova kromatida. Stoga se područje centromere na kromosomu još naziva i **primarnim suženjem** kromosoma (Slika 7. 9). Za razliku od centromere koja predstavlja *primarno* suženje gusto kondenziranog kromosoma, na nekim kromosomima postoji *sekundarno* suženje, a ukazuje na mjesto gdje će se formirati jezgrica (nukleolus) – mjesto sinteze ribosoma, pa se sekundarno suženje još naziva nukleolarnim organizatorom (vidi Poglavlje 11). Sekundarno suženje javlja se kao posljedica postojanja heterokromatinskog područja uz to mjesto. Kromosomi se međusobno razlikuju po veličini, strukturi, obliku, položaju centromere, uzorku pruga vidljivom nakon bojenja određenim bojama i informacijama koje nose (vidi Poglavlje 11).

Zadatak 1: Izolacija DNA iz biljnog i životinjskog materijala.

Postupak izolacije vrlo čiste DNA (dakle, one koja je prikladna za finije eksperimentalne postupke) zahtijeva relativno složenu proceduru koja gotovo uvijek uključuje upotrebu specijalnih deterdženata, lužina, organskih otapala i/ili enzima te skupu laboratorijsku aparaturu. Međutim, DNA se može izolirati (i vidjeti prostim okom!) prilično jednostavnim postupkom koji, u pogledu materijala, ne zahtijeva ništa više od onog što možete naći u vlastitoj kuhinji.

Postupak izolacije DNA sastoji se od nekoliko osnovnih koraka. Prvi je korak mehaničko usitnjavanje tkiva i otvaranje stanica (mi ćemo taj korak napraviti u kuhinjskom mikseru rezaču). Nakon toga se tako dobivenom homogenatu tkiva dodaje tzv. ekstrakcijska otopina koja sadržava deterdžent za pranje posuđa i kuhinjsku sol. Kao što znate, deterdžent otapa masti pa će otopiti i

stanične membrane (po svojoj su građi fosfolipidni dvosloji) te će to ubrzati oslobađanje staničnog sadržaja, a time i molekula DNA u otopinu. Pozitivno nabijeni natrijevi ioni iz kuhinjske soli neutralizirat će negativan naboj fosfata na molekulama DNA. Zbog toga se one više ne odbijaju te je ubrzano njihovo taloženje etanolom.

DNA je negativno nabijena molekula koja se u stanicama nalazi u kompleksu s pozitivno nabijenim proteinima (histonima). Jedna od kritičnih točaka u dobivanju što čistije DNA jest njezino odvajanje od tih proteina, što se može postići dodatkom proteolitičkih enzima (proteaza). To su enzimi koji razgrađuju proteine tako što cijepaju peptidne veze između aminokiselina. U našem slučaju za tu svrhu možemo koristiti svježe iscijeđen sok od ananasa, budući da on sadrži proteolitički enzim **bromelin**.

Na kraju se DNA, koja je dotad bila otopljenom, taloži (precipitira) dodatkom etanola. DNA se, kao polarna molekula, u vodi (koja je također polarna molekula) nalazi u otopljenom obliku. Nasuprot tomu, etanol je relativno manje polaran pa se u njemu DNA taloži. Nakupine DNA nastale dodatkom natrijevih iona u vodi talože se u donjem dijelu alkoholnog sloja, na granici vode i etanola. Nastali talog lakši je od vode te se diže u sloj etanola. Dobiveni talog izgleda poput bijelih niti i može se lako izdvojiti.

Vaš zadatak tijekom ove vježbe bit će izolacija DNA iz biljnog/životinjskog materijala. Svaka od pet grupa imat će različit izvor DNA, tj. različit biljni/životinjski materijal.

Materijal:

- smrznuti ili svježi bob (oko 100 g po izolaciji)
- smrznuti ili konzervirani grašak (oko 100 g po izolaciji)
- banana (1/2 komada po izolaciji)
- smrznuti ili konzervirani kukuruz (oko 100 g po izolaciji)
- smrznuta ili svježa pileća jetra (oko 100 g po izolaciji)

Reagensi:

- kuhinjska sol
- deterdžent za pranje posuđa
- sok od ananasa!
- ledeni 96 %-tni etanol
- TE pufer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA)

Pribor:

- mikser rezač
- menzura od 1 L
- staklena/plastična čaša od 500 mL
- staklena čaša od 250 mL
- stakleni/plastični lijevak
- grijač
- termometar
- filtar za kavu

- stakleni štapić
- drveni štapić
- staklena građuirana epruveta na stalku
- led
- kapalice
- vodootporni flomaster
- plastična kiveta volumena 1,5 mL

Postupak:

1. Pripremite tzv. **ekstrakcijsku otopinu**. Potrebno je oko 100 mL po izolaciji, tj. oko 500 mL za svih 5 grupa. Sastav ekstrakcijske otopine:

- voda : deterdžent za pranje posuđa = 9 : 1
- 2 %-tna kuhinjska sol

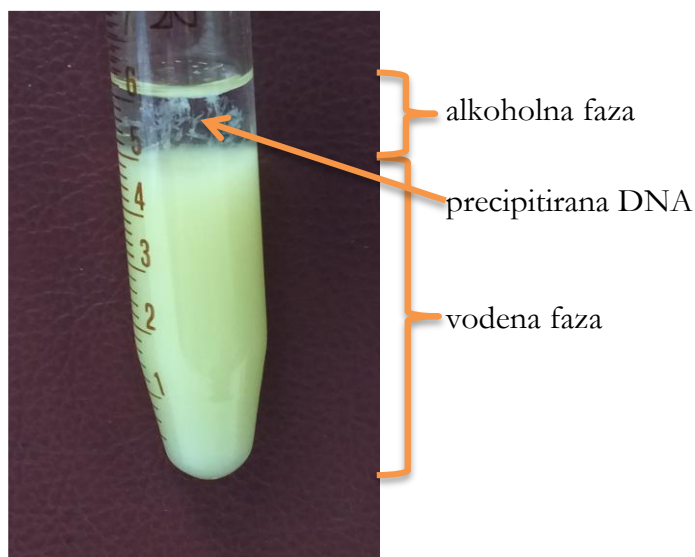
Izračunajte koliko je potrebno deterdženta u mililitrima i kuhinjske soli u gramima dodati u konačni volumen od 100 mL otopine (tj. ukupno 500 mL). Onda pripremite otopinu tako da prvo u čaši otopite potrebnu količinu soli u manjem volumenu vode i nakon toga dodate potrebni volumen deterdženta. Promiješajte otopinu staklenim štapićem i prelijte je u veliku menzuru. Nadopunite vodom do ukupnog volumena od 500 mL.

2. Usitnite svoj biljni/životinjski materijal u mikseru rezaču (bit će potrebno dodati manji volumen vode u mikser rezač za što bolju homogenizaciju/usitnjavanje materijala).
3. Od svakog homogenata (usitnjenog materijala) dodajte oko 50 mL u laboratorijsku čašu od 250 mL i u to dodajte 2 volumena ekstrakcijske otopine. Promiješajte staklenim štapićem. Zagrijavajte suspenziju na otprilike 60 °C na grijaču tijekom 15 minuta uz povremeno miješanje staklenim štapićem. Temperaturu provjeravajte termometrom.

4. Stavite filtar za kavu u lijevak i profiltrirajte suspenziju. Skupite oko 4 mL filtrata u staklenu građuiranu epruvetu. Ostatak homogenata i filtar za kavu bacite.

5. Kapalicom dodajte 1 mL soka od ananasa (bromelin) i inkubirajte 10 minuta na 36 °C (upotrijebite najbliži prirodni termostat).

6. Sad filtratu pažljivo dodajte



Slika 7. 10. Izolirana DNA u alkoholnom sloju. Izvor: autori.

jednak volumen na ledu ohlađenog 96 %-tnog etanola. Jako je važno etanol dodavati polako kapalicom uz stijenku epruvete kako se faze ne bi pomiješale! Na ovaj ćete način u epruveti dobiti dvije faze: gornji alkoholni (jer alkohol ima manju gustoću od vode) i donji vodeni sloj (Slika 7. 10). DNA će se istaložiti u alkoholnom sloju u obliku tankih bijelih niti.

7. Odložite staklenu epruvetu na led kako biste potaknuli precipitaciju (taloženje) DNA.
8. Nacrtajte epruvetu s istaloženom DNA u alkoholnoj fazi i na crtežu označite:
 - alkoholnu fazu (sloj)
 - precipitiranu (istaloženu) DNA
 - vodenu fazu (sloj).
9. Pažljivo drvenim štapićem izvucite DNA i prebacite je u plastičnu kivetu volumena 1,5 mL koju ste prethodno označili voodootpornim flomasterom (npr. DNA iz banane, datum, grupa). Kivetu s istaloženom DNA ostavite nekoliko minuta otvorenu u digestoru kako bi ishlapio višak etanola.
10. Dodajte kapalicom oko 0,5 mL TE pufera u kivetu kako biste otopili DNA. Stavite uzorak na led.

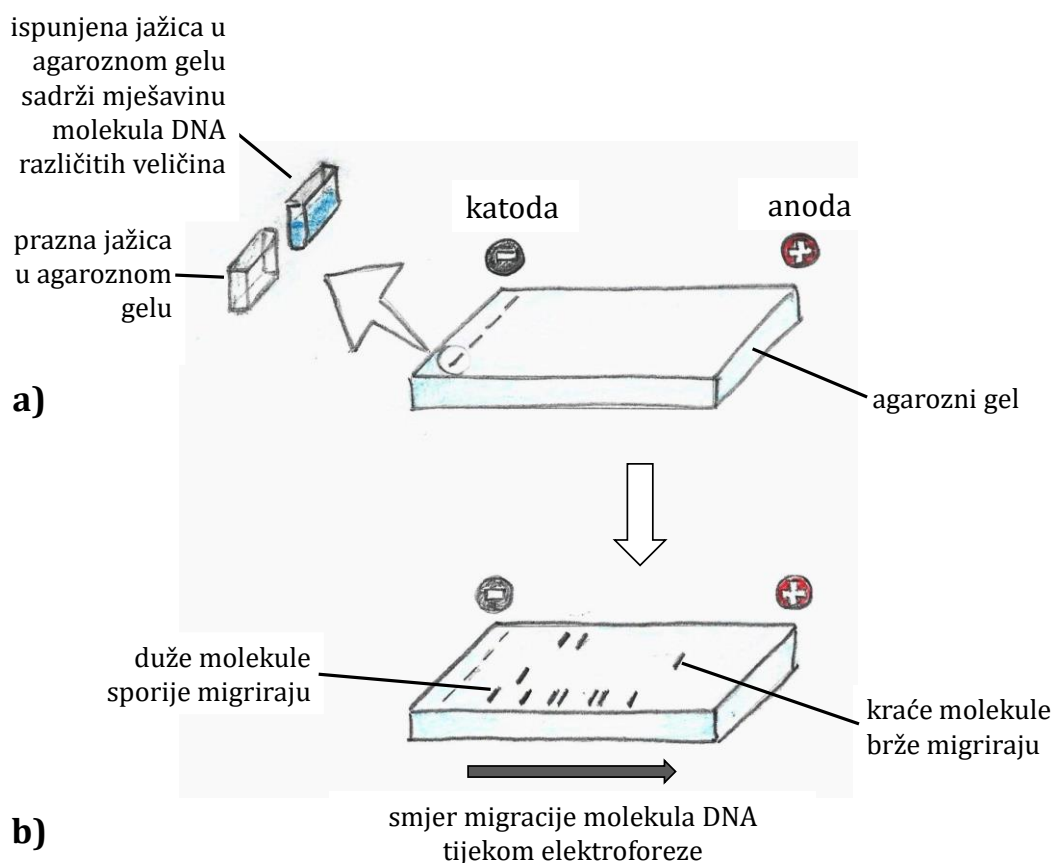
Zadatak 2: Elektroforeza molekula DNA u agaroznom gelu.

Elektroforeza u agaroznom gelu metoda je kojom se mogu razdvojiti molekule DNA i njihovi fragmenti. Po svom kemijskom sastavu agaroz je polisaharid te je sastavni dio agara podrijetlom iz određenih vrsta morskih crvenih algi, a dolazi u obliku bijelog praha. Agarozni gelovi pripremaju se tako da se agaroz rastopi zagrijavanjem u vodenom puferu pri otprilike 90 °C, izlije u pripremljen kalup te se hlađenjem na otprilike 40 °C formira u kruti gel. Tijekom elektroforeze agarozni gel djeluje kao trodimenzionalno molekulsko sito kroz koje putuju molekule DNA, slično kao što su kroz gel agara putovale različite molekule bojila kad smo promatrali proces difuzije (Poglavlje 2, Zadatak 1). Za razliku od spontane difuzije promatrane u sklopu Poglavlja 2, molekule DNA kroz agarozni gel putuju pod utjecajem električnog polja, od katode [(-) elektroda, označena crnom bojom] prema anodi [(+) elektroda, označena crvenom bojom] (Slika 7. 11). To je moguće jer su molekule DNA negativno nabijene zbog fosfatnih skupina unutar fosfodieterske okosnice lanaca DNA. Manje molekule DNA brže putuju kroz pore u gelu, a veće sporije (Slika 7. 11 – 2). Tako se procesom elektroforeze molekule DNA koje su u uzorku bile pomiješane razdvoje prema veličini te na gelu možemo detektirati nakupine molekula DNA iste veličine (tzv. vrpce). Duljina vrpca DNA određuje se uspoređivanjem s

biljegom molekularnih masa (smjesa fragmenata DNA poznatih veličina, komercijalno dostupna, Slika 7. 12).

Na elektroforetsku pokretljivost molekula DNA, osim njihove veličine, utječe i:

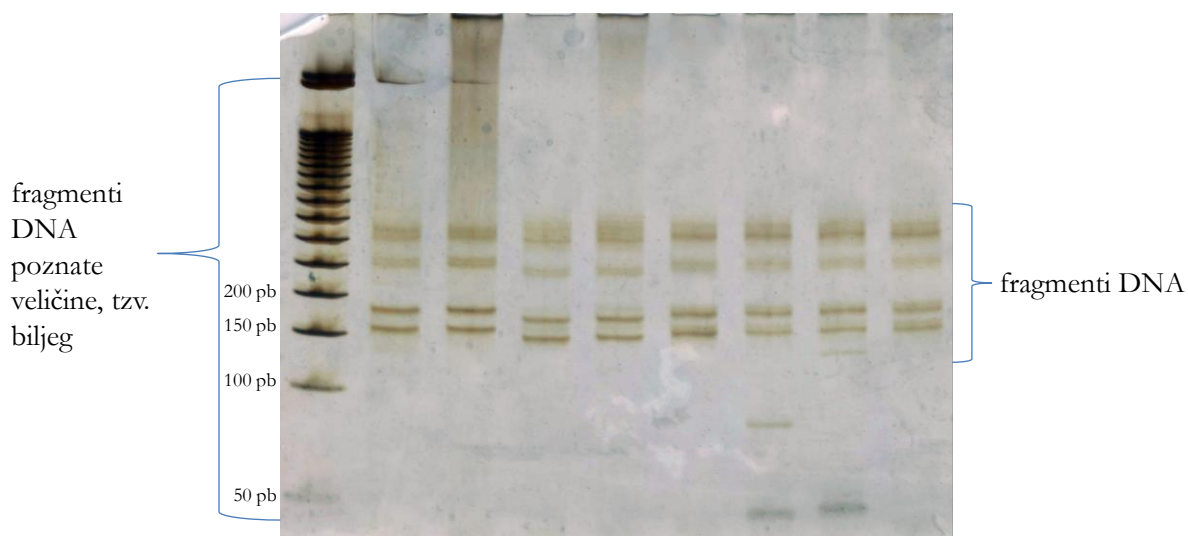
- *koncentracija agaroze u gelu* – fragmenti DNA putuju sporije što je koncentracija agaroze veća. Obično se koriste agarozni gelovi s koncentracijom agaroze između 0,7 i 2 %. Mi ćemo koristiti 1 %-tni agarozni gel (0,5 g agaroze u 50 mL TAE pufera);
- *sastav pufera za elektroforezu* – veća koncentracija soli u puferu uzrokuje bržu migraciju molekula. Mi ćemo koristiti TAE pufer;
- *električni napon* – što je napon veći, molekule DNA putovat će brže. Koristit ćemo napon od 80 V;
- *konformacija molekule* – kružna molekula DNA duljine 200 pb kroz agarozni gel putuje brže od linearne molekule DNA iste duljine. Naš uzorak DNA (genomska DNA iz biljnog ili životinjskog materijala) bit će smjesa linearnih molekula DNA različitih duljina.



Slika 7. 11. Elektroforeza molekula DNA u agaroznom gelu. (a) Prije elektroforeze. Uzorci molekula DNA nanesu se u jažice. (b) Nakon elektroforeze. Molekule DNA različite veličine putovale su različitom brzinom kroz agarozni gel. Izvor: autori.

Prilikom izlivanja otopljene i još tekuće agaroze u kalup se stavi i češljic, kako bi na tom mjestu u gelu nakon hlađenja ostala udubljenja (jažice). U njih se nanose uzorci DNA, prethodno pomiješani s bojom za nanošenje uzoraka (Slika 7. 11 – 1). Boja za nanošenje uzoraka ima dvojaku ulogu. Prvo, služi za povećanje gustoće uzorka kako bi on pao na dno jažice ispunjene puferom za elektroforezu (stoga sadrži glicerol i slične tvari gustoće veće od one pufera), što omogućuje ulazak molekula DNA u gel te sprječava njihovu difuziju u pufer. Osim toga, s obzirom na to da se molekule DNA ne vide tijekom elektroforeze, već se vizualiziraju kasnije, električki negativno nabijeno bojilo služi za jednostavno praćenje elektroforeze (putuje prema anodi ispred molekula DNA). Primjerice, bojilo bromfenol plavo putuje otprilike istom brzinom kao fragmenti DNA veličine 300 pb. Stoga kad je obojena fronta blizu kraja gela, to je znak da se elektroforeza treba prekinuti kako i sami uzorci ne bi izašli iz gela.

Nakon završetka elektroforeze molekule DNA se vizualiziraju (Slika 7. 12). Za ovu svrhu najčešće se koristi etidij-bromid (EtBr). Ova se molekula selektivno veže za DNA umećući se (interkalirajući) između sparenih dušičnih baza u molekulama DNA. Kad se osvijetli UV svjetlom valne duljine 312 nm, fluorescira narančasto. EtBr se može dodati u gel prije elektroforeze ili se gel može naknadno njime obojiti. Ako gel nakon tog osvijetlimo UV svjetlom, svaka vrpca koja sadrži više od ~20 ng DNA postat će vidljiva. Treba naglasiti da je UV svjetlost štetna po zdravlje pa treba biti oprezan prilikom korištenja uređaja s UV svjetiljkom (transiluminatora). Ovakav se gel po potrebi može fotografirati. Nadalje, treba naglasiti da je EtBr, upravo zbog svog svojstva interkaliranja u DNA, mutagen i prilikom njegovog korištenja treba poduzimati potrebne zaštitne mjere (rukavice, kuta, odvojen prostor za rad itd.). Danas su na tržištu dostupna i manje opasna bojila koja se vežu za DNA, poput SYBR Safe.



Slika 7. 12. Elektroforezom razdijeljeni fragmenti DNA. Izvor: autori.

Materijal:

- uzorak molekula DNA otopljenih u TE puferu pripremljen u Zadatku 1

Reagensi:

- 1× TAE pufer (40 mM Tris pH 7,6, 20 mM octena kiselina, 1 mM EDTA) ksilencijanol FF, 30 %-tni glicerol) ili slična bojila
- 6× boja za nanošenje uzoraka na agarozne gelove (0,25 %-tni bromfenol plavo, 0,25 %-tni agaroza
- SYBR Safe ili EtBr stock otopina
- biljeg molekulskih masa (npr. Mass Ruler DNA Ladder Mix, Fermentas)

Pribor:

- automatske pipete
- nastavci za automatske pipete
- parafilm
- vodootporni flomaster
- menzura
- vaga
- Erlenmeyerova tikvica
- rukavice
- kuta
- mikrovalna pećnica
- aparatura za elektroforezu (izvor struje, kadica, kalup za izlijevanje gelova, češljic za jažice)

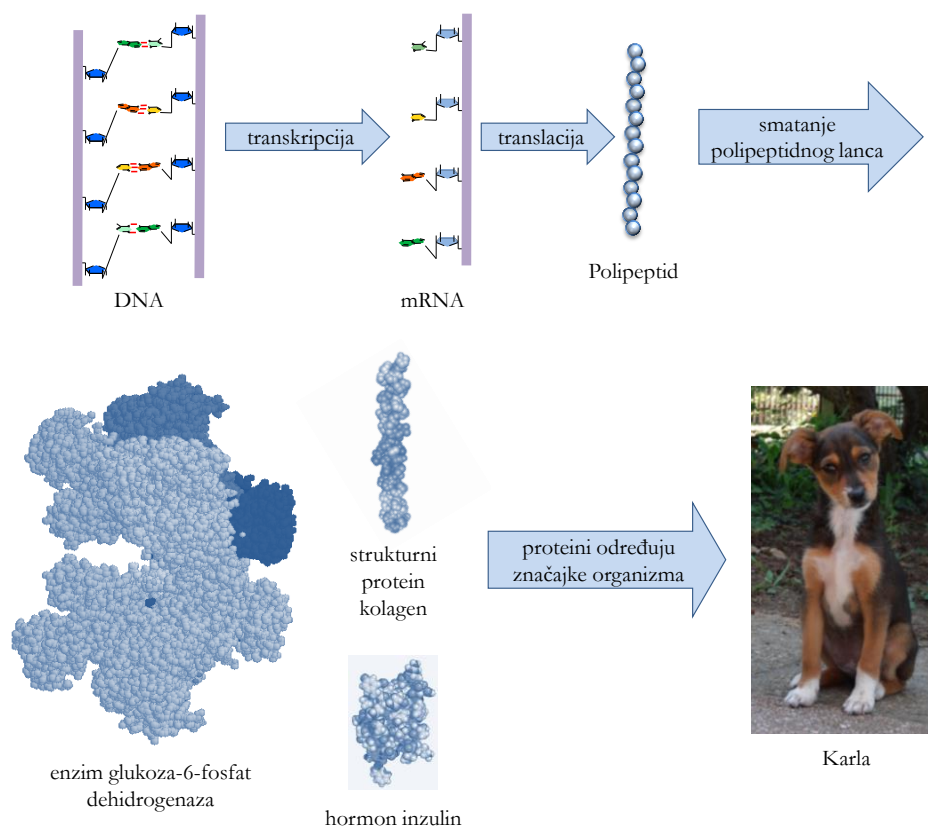
Postupak:

1. Pripremite aparaturu za izlijevanje agaroznog gela: stavite kalup za izlijevanje gelova u ležište za to predviđeno i češljic u njega.
2. Na komadiću papira odvažite 0,5 g agaroze i premjestite u Erlenmeyerovu tikvicu. Dodajte 50 mL TAE pufera, prethodno odmjerenih menzurom. Prekrijte otvor Erlenmeyerove tikvice papirom i zagrijavajte u mikrovalnoj pećnici oko 1 minutu (dok se agaroza ne otopi). Otopljenu agarozu malo ohladite pa je izlijte u kalup i pričekajte 15-20 minuta dok se ne ohladi i polimerizira. Formirani gel pažljivo izvadite i premjestite u kadicu za elektroforezu koja je napunjena TAE puferom. Pažljivo izvadite češljic za jažice. Cijeli gel treba biti potopljen u TAE puferu pa dolijte još pufera ako je potrebno.
3. Na komadiću parafilma pomiješajte 5 μ L otopine DNA i 1 μ L bojila za nanošenje uzoraka. Osim toga, pomiješajte 2 μ L biljega molekulskih masa i 0,5 μ L bojila za nanošenje uzoraka.
4. Automatskom pipetom nanosite uzorke i biljeg molekulskih masa u jažice pripremljenog gela.
5. Poklopite kadicu za elektroforezu i provedite elektroforezu pri naponu od 80 V.

6. Nakon otprilike 30 minuta prekinite elektroforezu.
7. Obojite gel namakanjem u otopini etidij-bromida ili SYBR Safe tijekom 15 minuta. Budite oprezni, EtBr je mutagen!
8. Postavite obojeni gel na UV transiluminator. Također pripazite da se ne izlažete UV zračenju!
9. Fotografirajte gel.

8. TRANSKRIPCIJA I TRANSLACIJA

Opći plan građe svakog organizma zapisan je u njegovim genima, odnosno u molekuli DNA (Poglavlje 7). Geni sadrže upute za izgradnju bjelancevina, molekula koje određuju obilježja organizma. Protok informacija u stanici prikazan je na Slici 8. 1. Dijelovi molekule DNA (geni) prepisuju se (transkribiraju) u molekule RNA, a one se prevode (translatiraju) u proteine, što nazivamo **centralnom dogmom** molekularne biologije: **DNA → RNA → proteini**. Važno je razumjeti da genski zapis u DNA neposredno ne može promijeniti obilježja organizma, već to čini posredno putem proteina koji se sintetiziraju na temelju genske upute te određuju značajke organizma, bilo kao strukturni proteini, enzimi ili hormoni. Primjerice, aktivnost određenih enzima katalizira proizvodnju pigmenta melanina i time utječe na tamnu boju očiju.



Slika 8. 1. Prijenos informacije od gena do proteina. Izvor: autori, <http://bit.ly/2tYXgKN>, <http://bit.ly/2tPYkQv>, <http://bit.ly/2towObL>

DNA, RNA i proteini su molekule koje nazivamo polimerima jer su izgrađene od ponavljajućih jedinica (monomera). Kod nukleinskih kiselina, DNA i RNA, monomeri su nukleotidi (vidi dalje u tekstu i Poglavlje 7), a kod proteina aminokiseline (Slika 9. 1). Slijed

(sekvencija) nukleotida u molekuli DNA određuje slijed aminokiselina u proteinu. Pritom se, naravno, jezik nukleotida mora prevesti (translatirati, lat. *translatio*) u jezik aminokiselina.

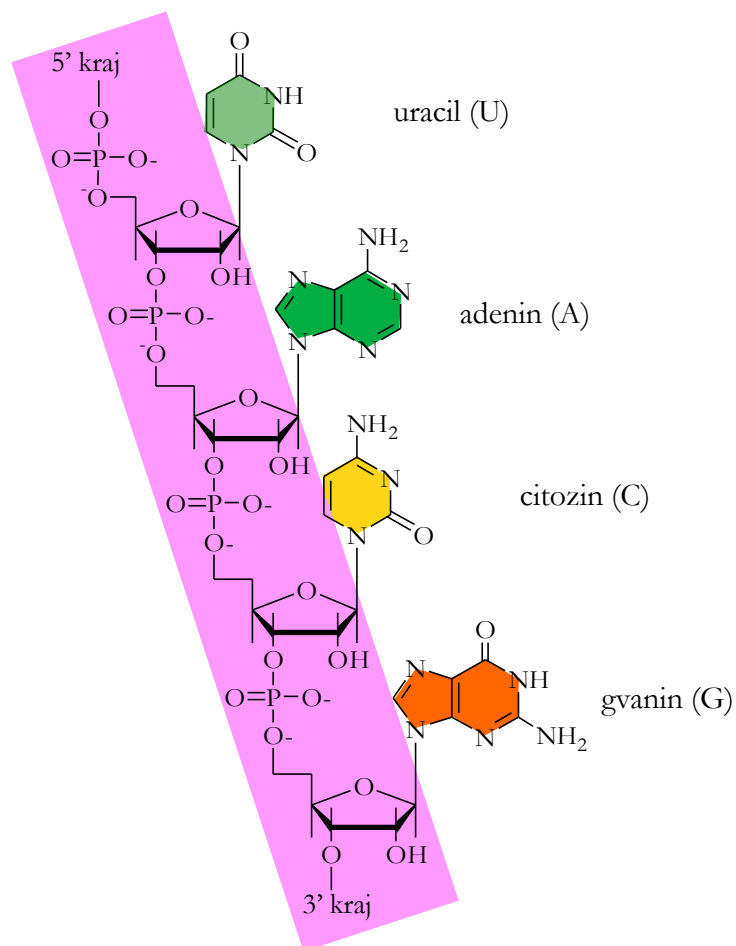
Gen se definira kao osnovna jedinica nasljeđivanja, odsječak molekule DNA koji sadrži, tj. *kodira* uputu za sintezu specifičnog funkcionalnog produkta koji može biti ili protein ili RNA. (Iako će se u ovoj vježbi ponajprije govoriti o tome da geni sadrže uputu za sintezu proteina, to nije uvijek slučaj, već oni mogu kodirati i funkcionalne molekule RNA.) Ovdje vrijedi naglasiti da geni, odnosno kodirajuće regije DNA, čine tek mali udio ukupne DNA eukariotskih organizama (odnosno mali udio **genoma**). Primjerice, tek 2 % ljudske DNA zauzimaju geni, a preostalih 98 % čine tzv. nekodirajuće regije. Što je organizam složeniji, ima veći udio nekodirajuće DNA po genomu (tako bakterije, kao relativno jednostavni organizmi, nemaju mnogo nekodirajuće DNA). Danas je poznata biološka uloga mnogih nekodirajućih regija, poput regulacije aktivnosti gena.

Sve stanice višestaničnog organizma u jezgri sadrže cjelokupni genom, sve gene. Međutim, određeni tip stanice u određenom trenutku razvoja ne treba sve, već točno određene gene. Stoga se geni aktiviraju i deaktiviraju – *aktivni* su oni geni koji se u određenom trenutku prepisuju, odnosno prenose svoju uputu iz jezgre u citoplazmu. Tijekom embrijskog razvitka dolazi do diferencijacije nediferenciranih stanica (tzv. pluripotentnih matičnih stanica) u specijalizirane stanice (primjerice, stanice gušterače). Specijalizirane su stanice, iako imaju sve gene, procesom diferencijacije izgubile mogućnost aktivacije nekih gena. Od onih gena koje takva specijalizirana stanica može aktivirati, dio je gena konstantno aktivan (geni koji su potrebni za obavljanje osnovnih životnih funkcija, tzv. održavateljski (engl. *housekeeping*) geni), a dio gena aktivira po potrebi u određenom trenutku (primjerice, u spomenutoj stanici gušterače, geni za proizvodnju hormona inzulina).

Da bi se sintetizirao potreban protein, prvo se pripadajući gen treba prepisati (transkribirati) u molekulu RNA, nakon čega se ona treba prevesti (translatirati) u protein. Između transkripcije i translacije u eukariotskim se stanicama odvija još jedan proces – procesiranje molekule RNA (modificiranje netom transkribirane RNA, Slika 8. 4). Transkripcija i procesiranje RNA u eukariotskoj se stanici odvijaju u jezgri, a translacija na ribosomima u citoplazmi.

Ribonukleinska kiselina (RNA)

Poput molekule DNA, RNA je linearna molekula građena od nukleotida povezanih fosfodieterskom vezom te ima svoj 5' i 3' kraj (vidi Poglavlje 7 i Sliku 8. 2). Osnovne su razlike u usporedbi s molekulom DNA:



Slika 8. 2. Građa molekule RNA. Izvor: autori.

RNA). **mRNA** je kopija genske informacije iz DNA. Ona prenosi informaciju iz jezgre u citoplazmu, na mjesto sinteze proteina. mRNA su heterogene po veličini i slijedu nukleotida. **rRNA** je građevna jedinica ribosoma, ključnih za sintezu proteina kod svih živih stanica. Molekule **tRNA** (Slika 8. 5) povezuju jezik aminokiselina s informacijom u DNA. O njima će biti više riječi u opisu procesa translacije. U skupini **snRNA** spada niz malih molekula RNA koje se nalaze u jezgri. Imaju ulogu u nizu važnih procesa, kao što su procesiranje mRNA i održavanje krajeva kromosoma (telomera).

1. RNA je najčešće **jednolančana** molekula (iznimka: ponekad stvara vodikove veze između komplementarnih baza iste molekule – unutarmolekulski, odnosno *intramolekulski*, Slika 8. 5b).

2. Umjesto timina, u molekuli RNA nalazi se nukleotid **uracil**, koji se komplementarno sparuje s adeninom.

3. Unutar nukleotida RNA nalazi se šećer **riboza**, umjesto deoksiriboze u molekuli DNA.

Glavne su vrste molekula RNA: mRNA (glasnička ili engl. *messenger* RNA), rRNA (ribosomska RNA), tRNA (transportna ili engl. *transfer* RNA, Slika 8. 3) i snRNA (male jezgrine ili engl. *small nuclear*

DNA i RNA, a zatim i (jake) kovalentne veze između uzastopnih nukleotida novonastajuće RNA. Za te procese potrebna je energija u obliku ATP-a. Kako molekula RNA raste, kidaju se vodikove veze koje ju drže za kalup i ponovno se spajaju dva komplementarna lanca DNA. Nizvodno od gena nalazi se poseban slijed nukleotida – **transkripcijski terminator**. Kad RNA-polimeraza dođe do njega, prestane s radom i RNA se potpuno odvoji od DNA. Osnovne molekule potrebne za transkripciju nabrojene su u Tablici 8. 1.

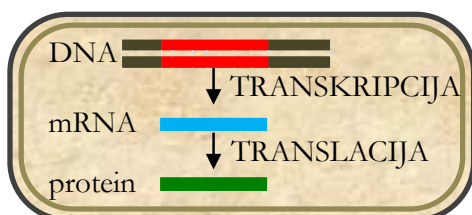
Tablica 8. 1. Neke molekule potrebne za odvijanje transkripcije.

molekula	svrha
lanac DNA (kalup)	sadrži informaciju koja se treba prepisati u mRNA
nukleotidi RNA	gradivne jedinice molekule RNA
RNA-polimeraza	enzim koji katalizira stvaranje mRNA
ATP	daje energiju potrebnu za stvaranje kovalentnih veza između nukleotida RNA

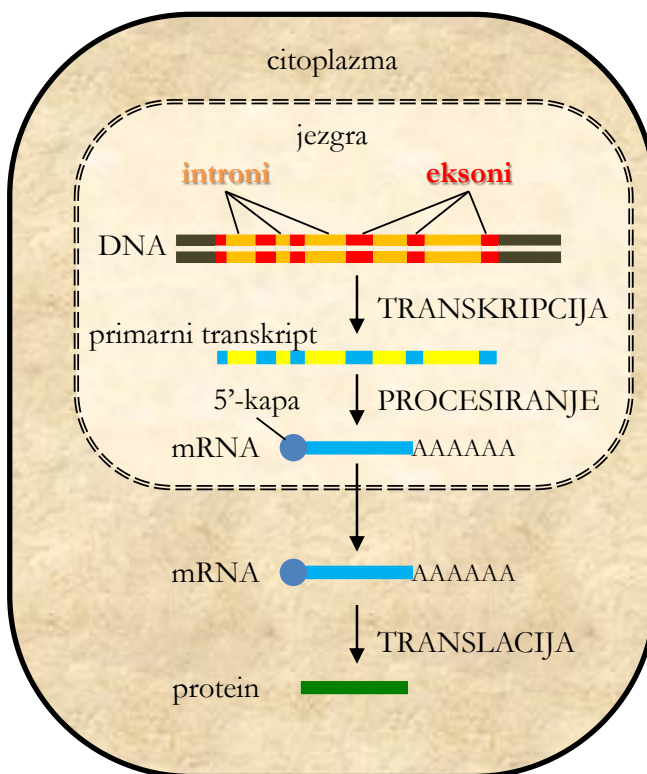
Procesiranje prekursorske molekule mRNA

Eukariotski se geni, za razliku od prokariotskih, sastoje od eksona i introna koji se međusobno izmjenjuju u linearnom slijedu DNA (Slika 8. 4). **Eksoni** (kodirajuće regije) nizovi su nukleotida koji sadrže informaciju koja će kasnije biti prevedena u aminokiselinsku sekvenciju (protein), a **introni** su dijelovi gena koji se ne prevode u protein (nekodirajuće regije). Općenito, količina intronske DNA umnogome nadmašuje količinu eksonske DNA, a njihove su dosad poznate uloge brojne (primjerice, važni su za odvijanje transkripcije i procesiranje molekule RNA). Stoga kod eukariota nakon transkripcije, a prije translacije, dolazi do procesiranja (modificiranja, obrade) mRNA (Slika 8. 4). Početna neprocesirana kopija gena kod eukariota, nastala izravno na kalupu DNA, zove se **prekursorska mRNA** (**pre-mRNA** ili **primarni transkript mRNA**). Iz nje procesiranjem nastaje **zrela mRNA** (Slika 8. 4). I ovaj se proces, poput transkripcije, odvija u jezgri.

a) PROKARIOTI



b) EUKARIOTI



Slika 8. 4. Od gena do proteina kod prokariota i eukariota. (a) Kod prokariota je čitav proces mnogo jednostavniji. Budući da nema jezgre, transkripcija i translacija odvijaju se u istom prostoru – citoplazmi. (b) U eukariotskim stanicama prepisivanjem nastaje primarni transkript koji sadrži i kodirajuće (eksone) i nekodirajuće sekvencije (introne). Prije translacije oba se kraja primarnog transkripta modificiraju te se izrezuju introni. Tako nastala zrela mRNA transportira se iz jezgre u citoplazmu. Izvor: autori.

U sklopu procesiranja molekuli pre-mRNA dodaju se određene molekule na oba kraja, a određeni se dijelovi izrezuju (Slika 8. 4). Na 5' kraj dodaje se tzv. **5'-kapa (7-metil gvanozinska kapa)** koju čine modificirani nukleotidi. Oni štite mRNA od razgradnje i pomažu kod započinjanja translacije na ribosomima. Na 3' kraj dodaje se niz adenina (često i nekoliko stotina – **poli-A-kraj**), koji štite mRNA od razgradnje i pomažu pri izlasku iz jezgre u citoplazmu. Gotova cijela mRNA se obloži proteinima čije je uloga zaštita mRNA od razgradnje enzimima u citoplazmi. Tijekom procesiranja mRNA određene se sekvencije unutar pre-mRNA izrezuju uz pomoć skupine enzima koja se veže na pre-mRNA i zove se **spliceosom** (engl. *splice* – rezati, grč. *soma* – tijelo). Izrezani se segmenti nazivaju intronima, a ostali eksonima. Nakon uklanjanja introna eksoni (dijelovi koji sadrže informaciju za sintezu proteina) spajaju se u zrelu mRNA, koja izlazi iz jezgre kroz nuklearne pore (Slika 8. 4).

Dakle, u zreloj se mRNA između 5'-kapa i poli-A-kraja nalazi tzv. **kodirajuća regija**, sastavljena od uzastopnih kodona koji nose informaciju za sintezu proteina. Kodirajuća regija

počinje start-kodonom (5'-AUG-3'), a završava jednim od stop-kodona (UAA, UAG ili UGA).

Genski kod

Genski kod definira kako se slijed dušičnih baza u DNA prevodi u aminokiseline koje grade proteine svih živih organizama. DNA je izgrađena od četiri različita nukleotida, a proteini od dvadeset različitih aminokiselina. Svaku aminokiselinu kodira slijed od tri nukleotida (**triplet**) u molekuli DNA (genski kod). Genskom kodu komplementaran je triplet nukleotida na mRNA – **kodon**, a njemu je komplementaran triplet na tRNA – **antikodon**. U Tablici 8. 2 dani su kodoni mRNA za svih dvadeset aminokiselina te stop-kodoni.

Postoje $4^3 = 64$ različite kombinacije, svaka s tri nukleotida, a samo 20 različitih aminokiselina. Zato istu aminokiselinu može kodirati nekoliko različitih kodona i ta se pojava naziva **degeneracijom genskog koda**. Obično kodoni koji kodiraju istu aminokiselinu imaju prva dva nukleotida jednaka, a treći varira. Npr. tripleti GCA, GCU, GCG i GCC – svi kodiraju aminokiselinu alanin (Ala). Jedna od aminokiselina, metionin (određena tripletom ATG u DNA, a AUG u mRNA), ne služi samo kao građevna jedinica proteina već i kao startni signal koji označuje početak proteina. Dakle, za sve proteine početni je (**start-**) kodon **AUG** (u mRNA). On kodira aminokiselinu metionin. Od 64 različita tripleta, 61 triplet kodira za različite aminokiseline, a preostala su tri tripleta – kodoni **UAA**, **UAG** i **UGA** – **stop-kodoni**. Oni ne kodiraju nijednu aminokiselinu, već označuju kraj sinteze polipeptidnog lanca.

Tablica 8. 2. mRNA kodoni. Start-kodon zeleno, stop-kodoni crveno. Trivijalne nazive i kratice aminokiselina vidi na Slici 9. 1, Poglavlje 9.

		druga baza				
		U	C	A	G	
prva baza	U	UUU Phe (F)	UCU Ser (S)	UAU Tyr (Y)	UGU Cys (C)	U
		UUC Phe (F)	UCC Ser (S)	UAC Tyr (Y)	UGC Cys (C)	C
		UUA Leu (L)	UCA Ser (S)	UAA -	UGA -	A
		UUG Leu (L)	UCG Ser (S)	UAG -	UGG Trp (W)	G
	C	CUU Leu (L)	CCU Pro (P)	CAU His (H)	CGU Arg (R)	U
		CUC Leu (L)	CCC Pro (P)	CAC His (H)	CGC Arg (R)	C
		CUA Leu (L)	CCA Pro (P)	CAA Gln (Q)	CGA Arg (R)	A
		CUG Leu (L)	CCG Pro (P)	CAG Gln (Q)	CGG Arg (R)	G
	A	AUU Ile (I)	ACU Thr (U)	AAU Asn (N)	AGU Ser (S)	U
		AUC Ile (I)	ACC Thr (U)	AAC Asn (N)	AGC Ser (S)	C
		AUA Ile (I)	ACA Thr (U)	AAA Lys (K)	AGA Arg (R)	A
		AUG Met (M)	ACG Thr (U)	AAG Lys (K)	AGG Arg (R)	G
	G	GUU Val (V)	GCU Ala (A)	GAU Asp (D)	GGU Gly (G)	U
		GUC Val (V)	GCC Ala (A)	GAC Asp (D)	GGC Gly (G)	C
		GUA Val (V)	GCA Ala (A)	GAA Glu (E)	GGA Gly (G)	A
		GUG Val (V)	GCG Ala (A)	GAG Glu (E)	GGG Gly (G)	G

NEKOLIKO VAŽNIH PRAVILA...

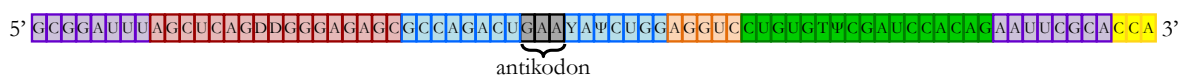
Svaka dva lanca nukleinskih kiselina međusobno su komplementarna i antiparalelna, kao što je detaljnije opisano u Poglavlju 7. Antiparalelnost znači da je jedan lanac usmjeren 5' → 3', a drugi, njemu komplementaran, 3' → 5'. Ovo je uzrokovano molekulskim ustrojstvom nukleinskih kiselina, pa se bilo koja dva lanca nukleinskih kiselina (DNA-DNA, RNA-DNA ili RNA-RNA) ne mogu komplementarno povezati vodikovim vezama ako nisu antiparalelni.

Prema konvenciji, nukleinske se kiseline pišu u 5' → 3' smjeru. Dakle, ako nije drukčije naglašeno, triplet RNA napisan kao „AUG“ zapravo podrazumijeva da se radi o tripletu „5'-AUG-3'“. Taj je triplet, imajući u vidu pravilo antiparalelnosti, komplementaran tripletu CAU (tj. 5'-CAU-3' = 3'-UAC-5') u RNA, odnosno tripletu CAT (tj. 5'-CAT-3' = 3'-TAC-5') u DNA, a nije komplementaran npr. tripletu UAC ili 3'-CAT-5'.

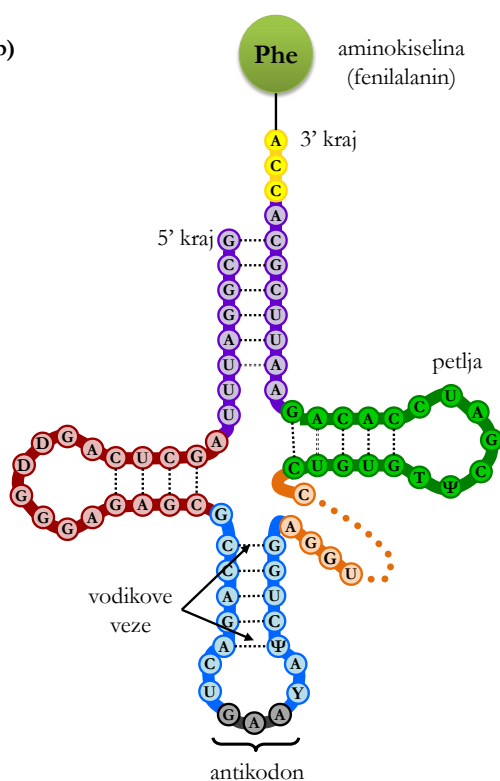
Prevođenje (translacija)

Najkraće rečeno, translacija je proces u kojem se aminokiseline povezuju u polipeptidni lanac na temelju informacije zapisane u mRNA. Proces se naziva i prevođenjem jer se jezik nukleotida „prevodi“ u jezik aminokiselina. Translacija se odvija na ribosomima u citoplazmi. Osnovne molekule i strukture potrebne za translaciju navedene su u Tablici 8. 3. Prije opisa samog procesa translacije treba opisati građu i funkciju ribosoma te molekula tRNA (Slika 8. 5).

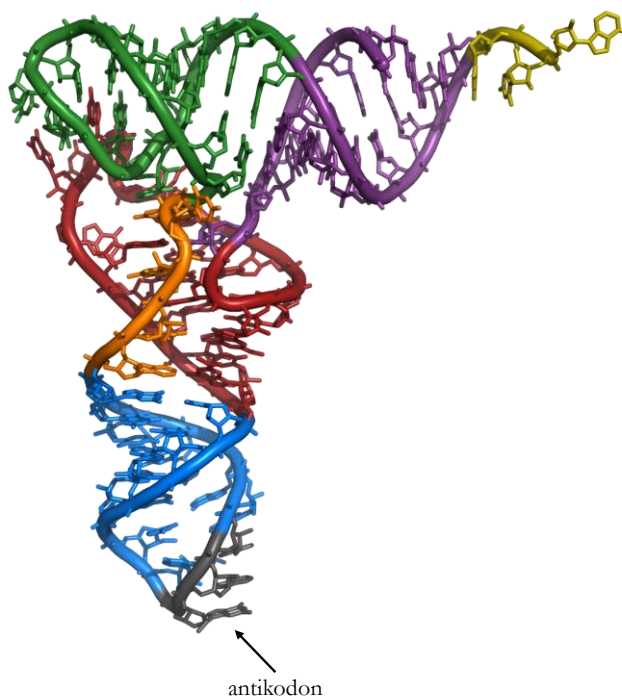
a)



b)



c)



Slika 8. 5. Molekula tRNA (a) Linearni slijed nukleotida tRNA (b) Shematski prikaz tRNA – struktura lista djeteline. Lanac tRNA sadrži komplementarne dvolančane dijelove povezane intramolekulskim vodikovim vezama te jednolančane dijelove ili petlje (prikazane zeleno, plavo i crveno). Antikodon je slijed od tri nukleotida komplementaran kodonu na mRNA (označeno sivom bojom). Aminokiselina koja odgovara paru kodon-antikodon nalazi se na 3' kraju molekule tRNA. tRNA sadrži neobičajene dušične baze poput pseudouridina, Ψ. (c) Trodimenzionalni prikaz molekule tRNA. Izvor: (a) i (b) autori, (c) <http://bit.ly/2tPSxKT>

Tablica 8. 3. Pojedine molekule i strukture potrebne za odvijanje translacije.

molekula ili struktura	svrha
ribosom	Veže mRNA i tRNA; olakšava stvaranje peptidnih veza između aminokiselina.
aminokiseline	građevne jedinice proteina
mRNA	Sadrži informaciju za povezivanje aminokiselina u protein.
tRNA	Donosi aminokiseline na ribosom prema redoslijedu zapisanom na mRNA.
enzimi	Vežu različite molekule na ribosome; vežu pripadajuće aminokiseline na tRNA; kataliziraju sve faze translacije.
ATP, GTP	Daju energiju potrebnu za reakciju.

Transportne molekule RNA (tRNA) molekule su RNA, dugačke između 75 i 95 nukleotida, čija je uloga donošenje aminokiseline na ribosom redoslijedom koji je zapisan u mRNA. Na Slici 8. 5 prikazana je opća građa molekula tRNA i, između ostalog, vidljivo je da su u tRNA prisutne brojne intramolekulske vodikove veze (dvolančani dijelovi tRNA) te nekoliko jednolančanih petlji (engl. *loops*), od kojih jedna nosi **antikodon** – tri nesparena nukleotida komplementarna kodonu u mRNA. U procesu translacije antikodon se sparuje s kodonom po principu komplementarnosti dušičnih baza. Na suprotnom kraju molekule tRNA veže se pripadajuća aminokiselina (prema genskom kodu prikazanom u Tablici 8. 2). Tako tRNA prikazana na Slici 8. 5 nosi antikodon 5'-GAA-3' koji je komplementaran kodonu 5'-UUC-3' i kodira za aminokiselinu fenilalanin (Phe, vidi Tablicu 8. 2). Dakle, molekule tRNA povezuju jezik aminokiselina s informacijom u DNA. Možemo reći da one dekodiraju informaciju sadržanu u DNA.

Ribosom (Slika 8. 6) stanična je struktura (nije organela jer nije obavijen lipoproteinskom membranom!) koja se sastoji od dvije podjedinice – velike i male. Obje su građene od rRNA i proteina. Prokariotski i eukariotski ribosomi razlikuju se po veličini (Slika 8. 6).

Velika i mala podjedinica razdvojene su kad ribosom nije u funkciji, a spajaju se nakon vezanja mRNA, koja „sjeda“ u žlijeb između dvije podjedinice. Uloga je ribosoma da se na njemu ostvari pravilna orijentacija molekula koje se koriste u sintezi proteina i da olakša stvaranje peptidne veze između aminokiselina.

PROKARIOTSKI RIBOSOM		EUKARIOTSKI RIBOSOM	
ribosom		ribosom	
podjedinice		podjedinice	
rRNA	5S 120 nukleotida	rRNA	5S 120 nukleotida
16S 1540 nukleotida	23S 2900 nukleotida	18S 1900 nukleotida	28S 4700 nukleotida
			5,8S 160 nukleotida
proteini	~35	proteini	~50
	~20		~30

Slika 8. 6. Razlike u građi prokariotskog i eukariotskog ribosoma. S je oznaka za svedberg (vidi Poglavlje 5). Izvor: autori.

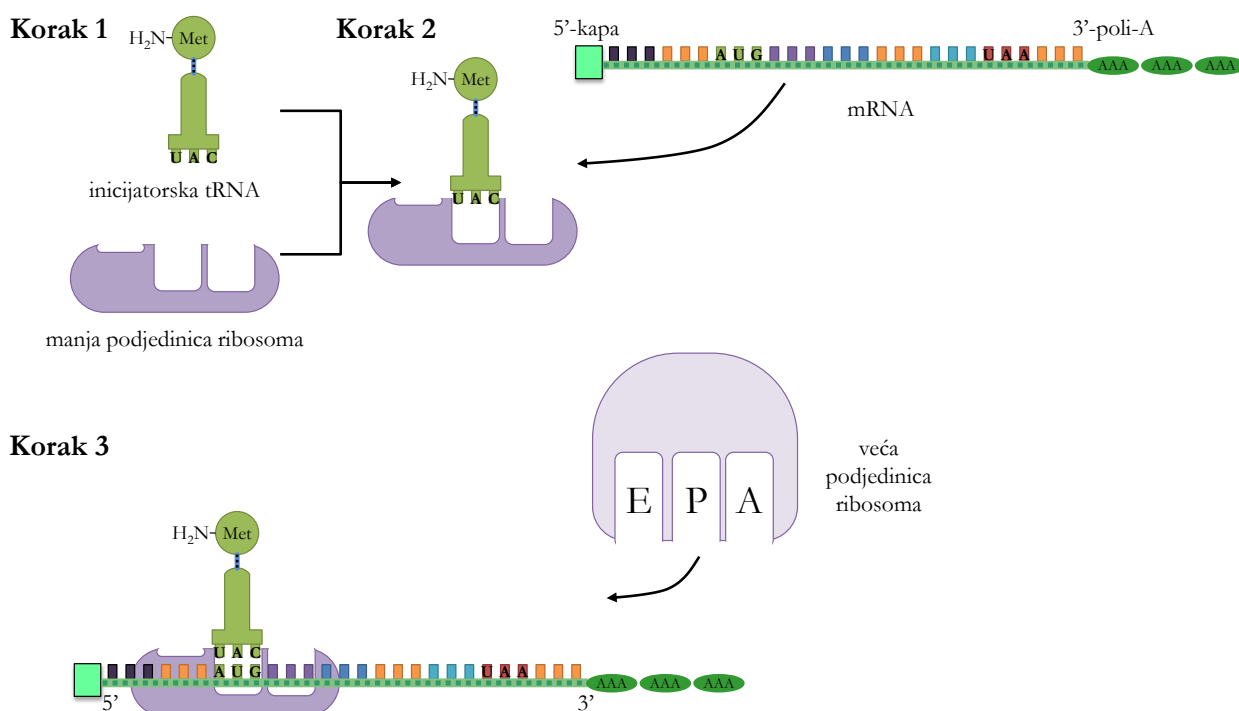
Na ribosomu se nalaze tri vezna mjesta na koja se vežu molekule tRNA.

- Na **A**-mjesto se veže **aminoacil-tRNA** (tRNA na koju je vezana aminokiselina).
- Na **P**-mjestu se nalazi **peptidil-tRNA** (tRNA na koju je vezano nekoliko aminokiselina povezanih peptidnim vezama).
- tRNA koja je u procesu translacije predala aminokiselinu premješta se na **E**-mjesto (prema engl. *exit* – izlaz).

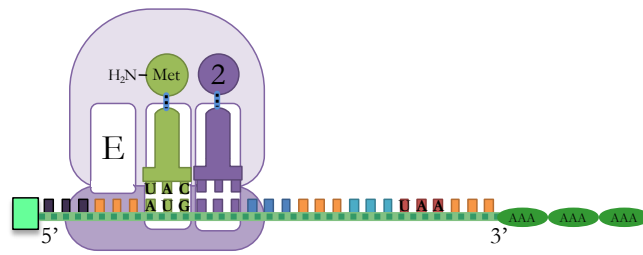
Proces translacije (Slika 8. 7) započinje vezanjem inicijatorske tRNA i manje podjedinice ribosoma (Korak 1). Inicijatorska tRNA ima antikodon 5'-CAU-3', koji je komplementaran start-kodonu 5'-AUG-3' na mRNA te nosi aminokiselinu **metionin** u eukariota, odnosno **N-formil-metionin** u prokariota. Zatim se veže procesirana i zaštićena (5'-kapa i 3'-poli-A) mRNA na manju podjedinicu ribosoma (Korak 2). Inicijatorska tRNA svojim antikodom veže se, vodikovim vezama, na startni kodon na mRNA (Korak 3). Slijedi vezanje veće podjedinice ribosoma za manju podjedinicu (Korak 3). Iako kasnije u procesu translacije na P-mjesto sjedaju peptidil-tRNA, u ovom prvom koraku ovdje se nalazi inicijatorska tRNA (aminoacil-tRNA, Korak 4). Sljedeća aminoacil-tRNA (na slici označena brojem 2) sjeda na A-mjesto (Korak 5). Njezin se antikodon veže s kodonom, a njezina aminokiselina dođe u blizinu metionina. Između te dvije aminokiseline, uz utrošak energije, stvori se peptidna (kovalentna) veza. Ribosom se

pomakne za jedan kodon u 3' smjeru niz mRNA („nizvodno“) i to prvo veća pa zatim manja podjedinica ribosoma. To se pomicanje ribosoma zove **translokacija**. Na taj način prva tRNA ode na E-mjesto i ostane bez svoje aminokiseline, a druga tRNA sad nosi dipeptid i sjedne na P-mjesto. A-mjesto ostane prazno za sljedeću aminoacil-tRNA (Korak 6). Proces se ponavlja, kodon za kodonom, a polipeptid raste (Koraci 7 – 9). Proces translacije završava kad na A-mjesto ribosoma dođe jedan od stop-kodona (UAA, UAG ili UGA). U stanici ne postoji tRNA s antikodonom komplementarnim stop-kodonu i stoga nema vezanja aminoacil-tRNA (Korak 10). Proces translacije završava tako da se na A-mjesto veže čimbenik za završetak sinteze polipeptida (RF, od engl. *releasing factor*) (Korak 11). Dolazi do translokacije ribosoma, čime peptidil-tRNA ode na E-mjesto i dolazi do odvajanja polipeptida (Korak 12), a RF je vezan na P-mjesto (Korak 12). Naposlijetku dolazi do odvajanja čitavog kompleksa (veća i manja podjedinica ribosoma, mRNA i tRNA i RF) (Korak 13). Budući da mRNA više ne služi za translaciju, mora se razgraditi uz pomoć RNAza pa se uklanjaju zaštitni proteini na 5' i 3' kraju.

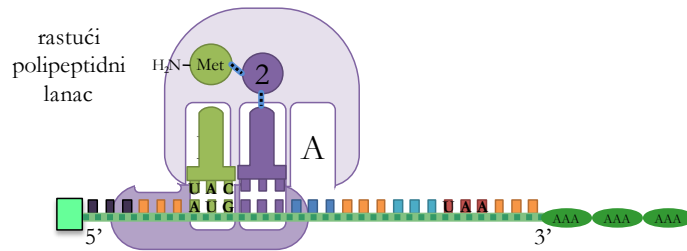
Ukratko, tijekom procesa translacije na ribosomu se sintetizira protein prema uputi u mRNA. Dodaje se jedna po jedna aminokiselina, odnosno ribosom se pomiče po mRNA kodon po kodon i tako raste polipeptid. Kako određeni kodon dođe na ribosom, on se privremeno, vodikovim vezama i po principu komplementarnosti dušičnih baza, veže s antikodonom na tRNA. Aminokiselina te tRNA na taj način dođe u blizinu prethodne aminokiseline i između njih nastaje peptidna veza.



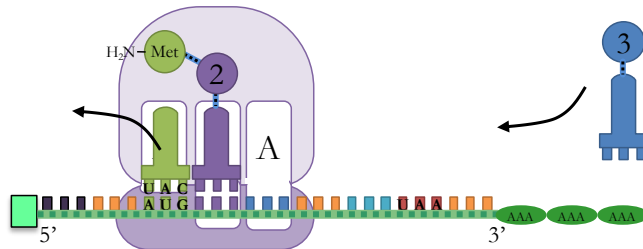
Korak 5



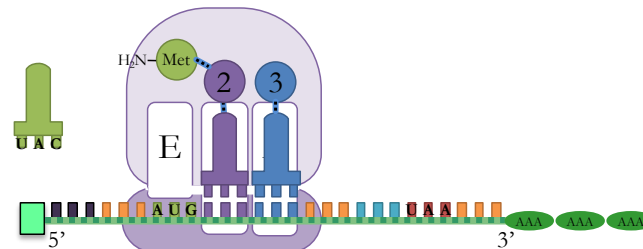
Korak 6



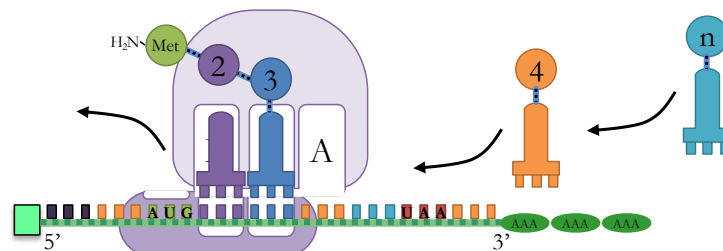
Korak 7



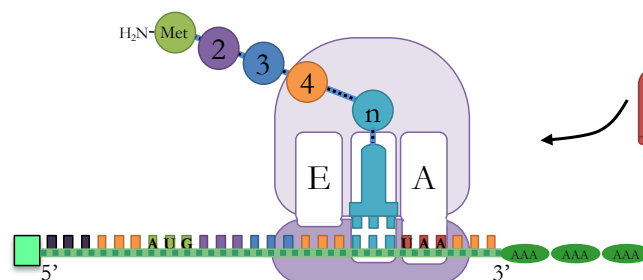
Korak 8



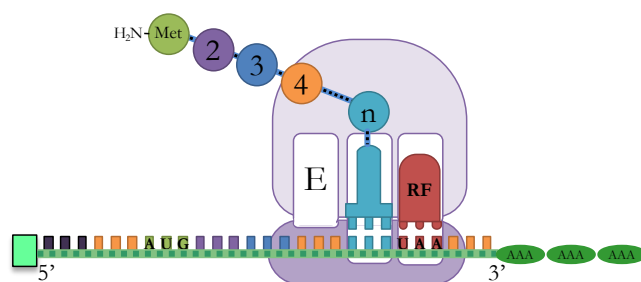
Korak 9



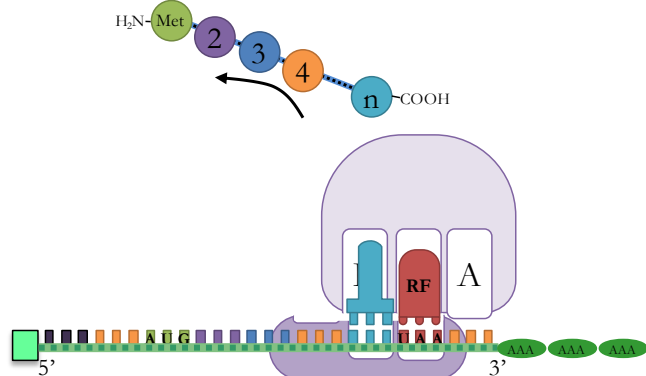
Korak 10



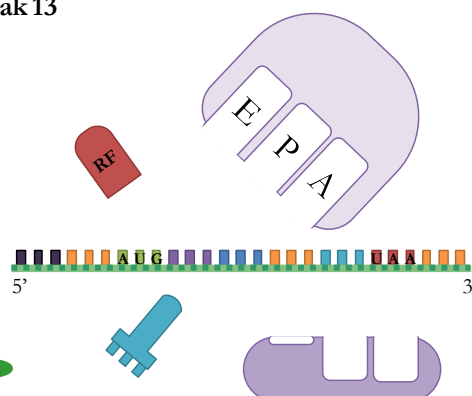
Korak 11



Korak 12

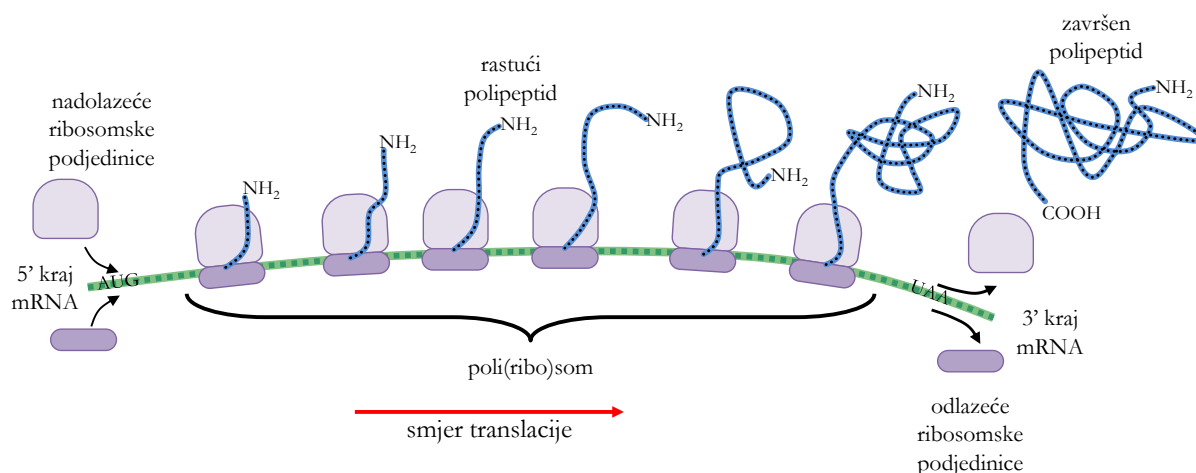


Korak 13



Slika 8. 7. Redoslijed sinteze polipeptidnog lanca. Početak translacije, inicijacija (Koraci 1 - 3). Rast polipeptidnog lanca, elongacija (Koraci 4 - 9). Završetak translacije, terminacija (Koraci 10 - 12). Disocijacija kompleksa (Korak 13). Detaljan opis slijeda događaja objašnjen je u tekstu. RF – *releasing factor*. Izvor: autori.

Jedna mRNA obično se prepisuje na mnogo ribosoma istovremeno pa paralelno nastaje mnogo istovrsnih polipeptidnih lanaca. Takva se nakupina ribosoma zove **poliribosom** ili **polisom** (Slika 8. 8).



Slika 8. 8. Shematski prikaz polisoma. Izvor: autori.

Razlike u transkripciji i translaciji između prokariota i eukariota

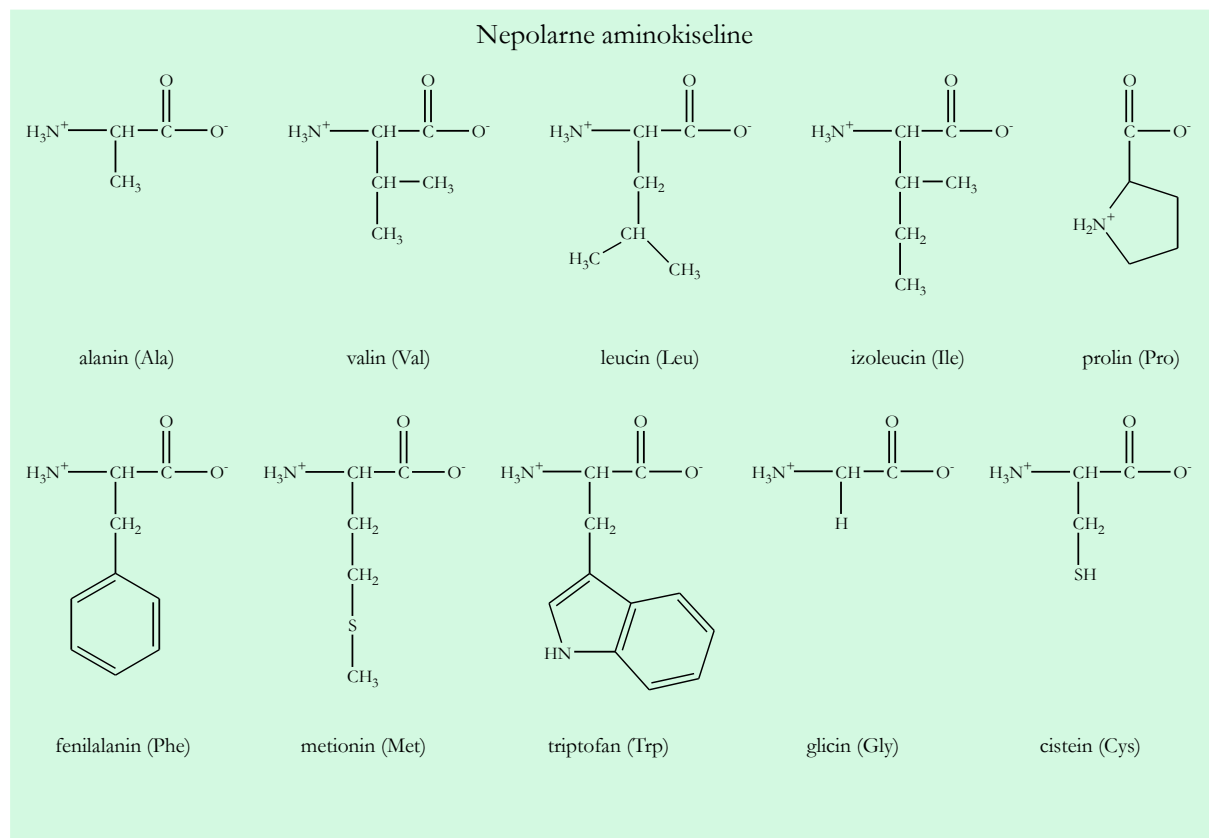
Dosad je u tekstu najvećim dijelom opisivano kako se procesi transkripcije i translacije odvijaju kod eukariota. Naravno, budući da se radi o fundamentalnim životnim procesima, oni se odvijaju i kod prokariota, uz određene razlike koje su navedene u Tablici 8. 4.

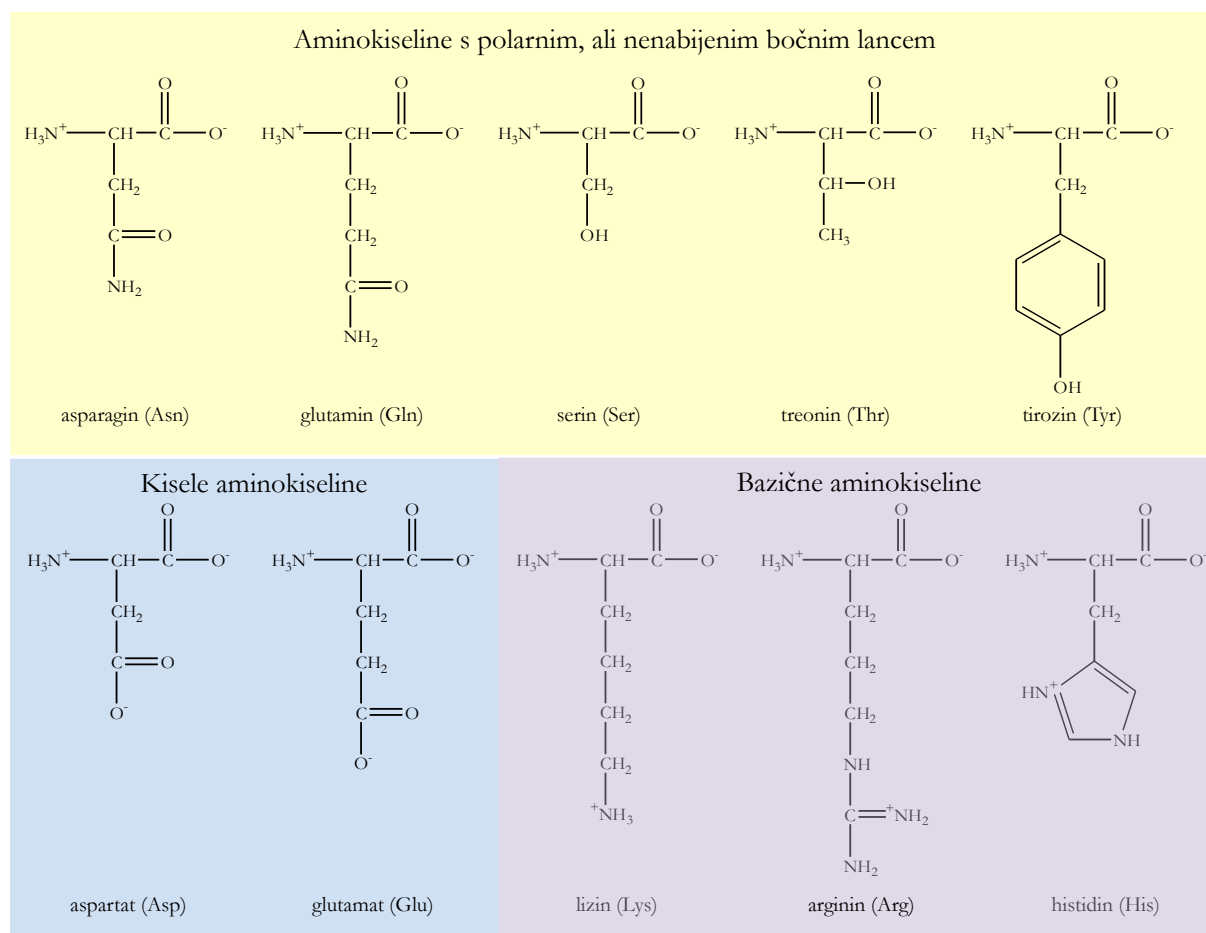
Tablica 8. 4. Glavne razlike u transkripciji i translaciji između prokariota i eukariota.

	prokarioti	eukarioti
mjesto odvijanja procesa	Svi se procesi odvijaju u citoplazmi.	Transkripcija i procesiranje odvijaju se u jezgri, a translacija u citoplazmi.
vrijeme odvijanja procesa	Transkripcija i translacija često se odvijaju istovremeno (dok još traje transkripcija određene mRNA, njezin se početni dio već translatira).	Transkripcija i translacija vremenski su (i prostorno) odvojene.
geni	Ne sadrže introne.	Sadrže eksone i introne.
mRNA	Često je policistronska – sadrži informaciju za translaciju više različitih proteina, odnosno prepisana je s više gena odjednom.	Uvijek je monocistronska – sadrži informaciju za translaciju samo jednog proteina.
procesiranje mRNA	Ne postoji (geni najčešće ne sadrže introne, a njihove mRNA nakon transkripcije ne zahtijevaju dodatne modifikacije).	Postoji (dodavanje 5'-kapa i poli-A-kraja, izrezivanje introna).
veličina ribosoma	70S	80S
prva aminokiselina polipeptida	<i>N</i> -formil-metionin	metionin

9. BJELANČEVINE (PROTEINI)

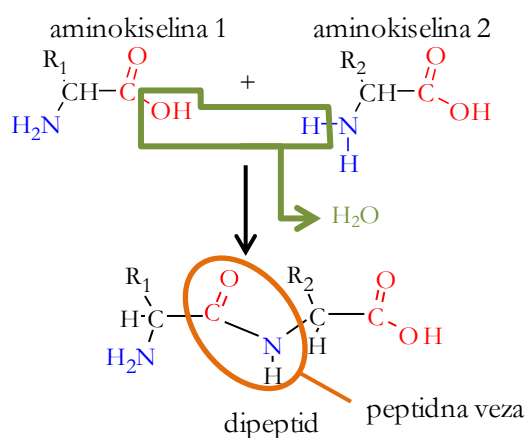
Bjelančevine (proteini) složeni su organski spojevi sastavljeni od L-aminokiselina. Sve bjelančevine živih bića, od bakterije do čovjeka, sastavljene su od istog skupa od dvadeset aminokiselina. Aminokiseline imaju dvije **funkcionalne skupine**: karboksilnu ($-\text{COOH}$) i aminoskupinu ($-\text{NH}_2$). U svim aminokiselinama nađenim u bjelančevinama aminoskupina je vezana na α -ugljik pa stoga aminokiseline koje grade bjelančevine nazivamo α -aminokiselinama (α -ugljik je prvi ugljikov atom u molekuli na koji je vezana funkcionalna skupina). Aminokiseline se međusobno razlikuju po **bočnim ograncima (radikalima ili R-skupinama, Slika 9. 1)**. Bočni ogranci mogu biti vrlo jednostavni (primjerice, bočni ogranak aminokiseline glicin jest atom vodika), ali i složeni (bočni ogranak lizina čini lanac od četiri atoma ugljika koji završava aminoskupinom). Upravo bočni ogranci određuju jedinstvena kemijska svojstva određene aminokiseline: nepolarni bočni ogranci daju hidrofobna svojstva, a polarni hidrofilna. Neke aminokiseline imaju negativan naboj (zbog prisutnosti karboksilne skupine u bočnom ogranku), a druge pozitivan (bazične aminokiseline). Uobičajene kratice koje se koriste za nazive svake aminokiseline navedene su na Slici 9. 1 i u Tablici 8. 2.





Slika 9. 1. Aminokiseline. Izvor: autori.

U bjelančevinama se α -karboksilna skupina jedne aminokiseline veže na α -aminoskupinu druge aminokiseline **peptidnom vezom** uz izdvajanje molekule vode (Slika 9. 2). Peptidne veze povezuju mnoge aminokiseline u nerazgranati polipeptidni lanac koji ima svoj amino- (**N**) i karboksilni- (**C**) kraj (terminus). Pri translaciji proteini se sintetiziraju od N- prema C-kraju:



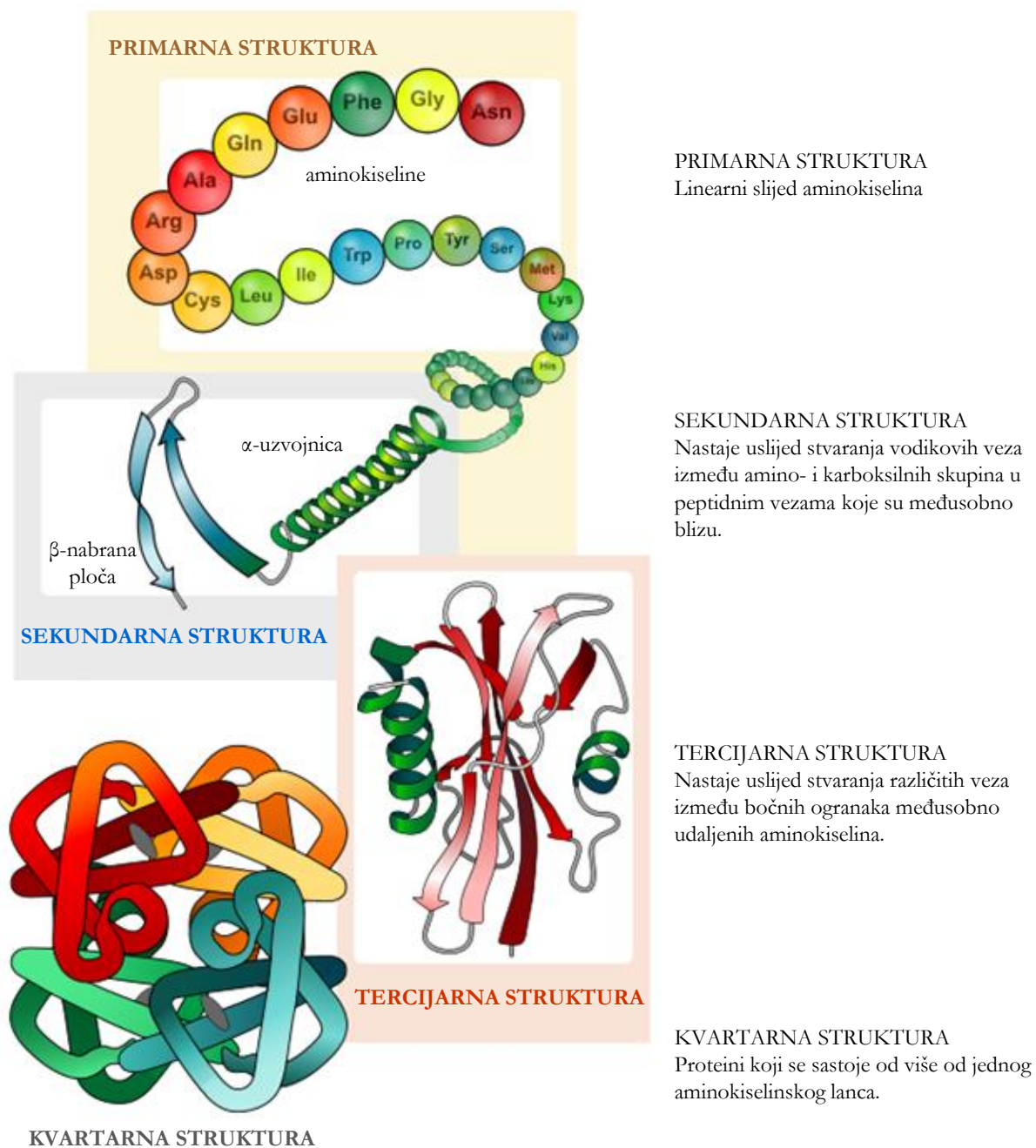
Slika 9. 2. Nastajanje peptidne veze. Izvor: autori.

$-\text{NH}_2$ skupina aminokiseline vezane na aminoacil-tRNA, smještenu na A-mjestu ribosoma, napada $-\text{COOH}$ skupinu na peptidil-tRNA, koja se nalazi na P-mjestu i sadržava zadnju aminokiselinu rastućeg polipeptidnog lanca (Slika 8. 7). Hidrolizom bjelančevina kiselinama, lužinama ili različitim proteolitičkim enzimima peptidna veza puca i kao konačni produkt nastaje smjesa aminokiselina.

Kod bjelančevina postoje četiri strukturne razine (Slika 9. 3).

1. **Primarna struktura** je slijed aminokiselina.
2. **Sekundarna struktura** nastaje kao posljedica stvaranja vodikovih veza između amino- (N-H) i karboksilnih (C=O) skupina u peptidnim vezama koje su u linearnom slijedu međusobno blizu. Primjeri sekundarne strukture jesu α -uzvojnica i β -nabrana ploča. U **α -uzvojnici** vodikove se veze stvaraju između kisika iz karboksilne skupine jedne peptidne veze i vodika iz aminoskupine udaljenog četiri peptidne veze, dok u **β -nabranoj ploči** vodikove veze nastaju između najbližih amino- i karboksilnih skupina susjednih lanaca.
3. **Tercijarna je struktura** prostorni odnos u linearnom slijedu međusobno vrlo udaljenih bočnih ogranaka. Veze između bočnih ogranaka mogu biti kovalentne (disulfidni mostovi koji nastaju između -SH skupina dvaju cisteina) i nekovalentne (ionske i vodikove veze, van der Waalove privlačne sile te hidrofobne interakcije između nepolarnih bočnih ogranaka).
4. Bjelančevine koje sadrže više od jednog polipeptidnog lanca imaju **kvartarnu strukturu** koja opisuje međusobni odnos pojedinih lanaca.

Mnoge se bjelančevine sastoje od jednog polipeptidnog lanca, ali neke sadrže dva ili više lanaca koji po sastavu aminokiselina mogu biti jednaki ili različiti. Primarnu, sekundarnu i tercijarnu strukturu imaju svi proteini, a kvartarnu samo oni koji su građeni od više od jednog polipeptidnog lanca. Primjer je takvog proteina hemoglobin, protein koji se nalazi u eritrocitima i uloga mu je prijenos kisika.



Slika 9. 3. Strukturne razine proteina. Izvor: <http://bit.ly/2sO4y3W>

Bjelančevine imaju velik broj različitih funkcija. Kao strukturni proteini, one su najvažniji polimeri koji sudjeluju u izgradnji stanica. Tako je citoskelet (Poglavlje 4), glavna unutarstanična strukturna komponenta stanice, izgrađen od bjelančevina. Osim toga, dio je bjelančevina koloidno disperziran u stanici. Brojne bjelančevine predstavljaju važne pričuvne tvari (pričuvni ili rezervni proteini) koje u određenim uvjetima mogu formirati kristale (npr. aleuronska zrnca u sjemenkama ricinusa). Enzimi su proteini koji privremeno vežu druge molekule (supstrate) te ubrzavaju njihovu pretvorbu u produkte. Na taj način oni kataliziraju kemijske reakcije, pri čemu

sami ostaju nepromijenjeni. Enzimi tako, ubrzavajući kemijske reakcije koje bi se pri normalnim fiziološkim uvjetima odvijale presporo, omogućuju stanici obavljanje mnoštvo različitih zadataka. Osim toga, proteini imaju ulogu u prijenosu malih molekula (primjerice, prijenos kisika uz pomoć hemoglobina), komunikaciji između stanica (proteinski hormoni i citokini) i obrani organizma od infekcija (npr. protutijela).

Mnogi stanični proteini osim proteinskog dijela sadrže i druge sastojke (**konjugirani proteini** ili **proteidi**): lipoproteini sadrže lipide, glikoproteini šećere, kromoproteini bojila, fosfoproteini fosfatnu skupinu, a nukleoproteini nukleinske kiseline.

Reakcije za dokazivanje bjelančevina

Za dokazivanje bjelančevina koristi se više reakcija koje se mogu podijeliti u dvije velike skupine:

1. Reakcije taloženja. Kao što i samo ime govori, u ovim reakcijama dolazi do stvaranja taloga. U kemijskom smislu, taloženje znači stvaranje čestica krute tvari u tekućini koje se ne moraju nužno (odmah) istaložiti na dnu pa se i zamućenje tekućine naziva taloženjem. Reakcije taloženja izvode se dodavanjem raznih reagensa, između ostalog solima lakih metala, solima teških metala (primjerice, otopinom CuSO_4 , pri čemu bakar s proteinom tvori bakreni proteinat), mineralnim kiselinama, alkoholom, alkaloidnim reagensima i zagrijavanjem. Pod alkaloidnim reagensima podrazumijevaju se organski spojevi s bazičnim atomom dušika. Trikloroocetna kiselina je slaba kiselina koja taloži brojne biomolekule, uključujući proteine.

2. Reakcije bojenja dokazuju prisutnost određenih funkcionalnih skupina u bjelančevinama koje s određenim reagensima daju karakterističnu boju. Najpoznatije su sljedeće:

- **Biuretska reakcija** služi za dokazivanje svih bjelančevina jer ovisi o prisutnosti peptidnih veza ($-\text{CO}-\text{NH}-$). Pozitivnu reakciju daju polipeptidi od tripeptida nadalje (dakle, molekule koje sadrže dvije ili više peptidnih veza). Biuretska reakcija je dobila ime po kondenzacijskom produktu dviju molekula uree, biuretu, koji također daje pozitivnu reakciju. Ova reakcija izvodi se tako da se alkalnoj otopini bjelančevina dodaje minimalna količina razrijeđene otopine bakrovog(II) sulfata, pri čemu se pojavljuje ružičasto-ljubičasto obojenje (Slika 9. 5a).
- **Ksantoproteinska reakcija** je karakteristična za bjelančevine koje sadrže aromatske aminokiseline (fenilalanin, tirozin i triptofan; Slika 9. 1). Djelovanjem konc. nitratne kiseline na bjelančevine dolazi do nitriranja aromatskih jezgara, pri čemu nastaju žuto obojeni aromatski spojevi (Slika 9. 5b).

- **Millonova reakcija** je karakteristična za aminokiselinu tirozin (dakle, daje pozitivnu reakciju na bjelančevine koje sadrže tirozin). Dodatkom Millonove otopine (otopina živinog nitrata i živinog nitrita u nitratnoj kiselini) u uzorak, ako ispitivana bjelančevina sadrži tirozin, pojavit će se ciglastocrven talog koji nastaje djelovanjem žive na bjelančevine (Slika 9. 5c).

Zadatak 1: Dokazivanje bjelančevina u biljnom materijalu.

Biljni materijal:

- sjemenke ricinusa (*Ricinus communis*), Slika 9. 4
- sjemenke kikirikija (*Arachis hypogaea*)

Reagensi:

- kalijev hidroksid (KOH, konc.)
- 0,25 %-tna otopina bakrovog sulfata (CuSO_4)
- nitratna kiselina (HNO_3 , konc.)
- Millonov reagens [otopina $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ i $\text{Hg}(\text{NO}_2)_2$ u HNO_3]

Pribor:

- britvica
- staklene Petrijeve zdjelice
- iglica

Postupak:

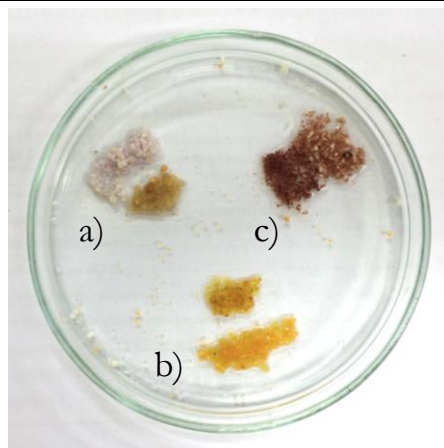
Sjemenke biljaka sadrže spremišne tvari potrebne za razvoj mlade biljke. Te su tvari najčešće ugljikohidrati (npr. škrob u sjemenkama graha, Poglavlje 6) i masti (npr. u sjemenkama bundeve), a ponekad se kao rezervne tvari mogu naći i bjelančevine. Takav su primjer sjemenke ricinusa koje osim ulja sadrže i proteine u tzv. **aleuronskim zrcima**. Ona nastaju dehidracijom vakuola u kojima se nalaze pričuvne bjelančevine, smjesa albumina i globulina. Sjemenke kikirikija također su bogate mastima i uljima, a sadrže i proteine od kojih su najzastupljeniji globulini arahin i konarhin.

Oljuštite jednu sjemenku ricinusa (Slika 9. 4) i očistite jednu sjemenku kikirikija (budite oprezni sa sjemenkama ricinusa – one su otrovne zbog prisutnosti lektina ricina D). Što sitnije nasjeckajte endosperm sjemenki (hranjivo staničje sjemenke, bijele boje kod ricinusa, žuto-smeđe kod kikirikija). Podijelite nasjeckana tkiva u tri skupine na Petrijevoj zdjelici te napravite sljedeće probe:



Slika 9. 4. Sjemenke ricinusa, *Ricinus communis*.
Izvor: autori.

- A. **Biuretska reakcija:** Navlažite komadić endosperma konc. otopinom kalijeve lužine i dodajte nekoliko kapi 0,25 %-tne otopine bakrovog(II) sulfata. Ostavite tkivo da odstoji nekoliko minuta.
- B. **Ksantoproteinska reakcija:** Ovu reakciju izvodite u digestoru. Na endosperm kapnite kap konc. nitratne kiseline. Pustite tkivo da odstoji 2-3 minute i uočite promjenu boje. Nakon dodatka kemikalija poklopite Petrijevu zdjelicu!
- C. **Millonova reakcija:** Ovu reakciju izvodite u digestoru. Kapnite malo Millonova reagensa na usitnjeni endosperm. Ostavite tkivo da odstoji nekoliko minuta. Nakon dodatka kemikalija poklopite Petrijevu zdjelicu!



Slika 9. 5. Reakcije dokazivanja bjelančevina u sjemenkama ricinusa i kikirikija. (a) Ljubičasto obojenje nastalo biuretskom reakcijom; (b) žuto obojenje nastalo ksantoproteinskom reakcijom; (c) ciglastocrveno obojenje nastalo Millonovom

Nacrtajte opažene promjene za sve tri reakcije i oba uzorka biljnog tkiva. Objasnite što smo dokazali kojom reakcijom!

Zadatak 2: Dokazivanje bjelančevina u životinjskom materijalu.

Kao što je detaljno objašnjeno u Poglavlju 2, krv je gusta tekućina koja predstavlja specijalni oblik vezivnog tkiva u kojemu je međustanična tvar tekuća i histološki homogena pa stanice nemaju stalan položaj. Krv se sastoji od otprilike 55 % tekućeg dijela, krvne plazme, i od otprilike 45 % krvnih staničnih elemenata (crvenih krvnih stanica — eritrocita, i bijelih krvnih stanica — leukocita, te staničnih fragmenata nastalih raspadom stanica megakariocita, tzv. krvnih pločica ili trombocita). Krvna plazma sadrži više od 90 % vode, a ostalo su bjelančevine (oko 70 g/L), anorganske soli u obliku otopljenih iona (elektroliti) te tvari koje se transportiraju krvlju (nutrijenti kao što su glukoza, masne kiseline, vitamini, zatim otpadni produkti metabolizma, plinovi (CO₂ i O₂) te hormoni). Bjelančevine plazme dijele se u tri glavne skupine:

- **albumini** (45 g/L) — reguliraju koloidno-osmotski tlak plazme tako što vežu vodu, katione i druge tvari
- **globulini** (25 g/L) — α - i β -globulini transportiraju druge tvari u plazmi, a γ -globulini (imunoglobulini) sudjeluju u obrani organizma

- **fibrinogen** (3 g/L) — sudjeluje u procesu zgrušavanja krvi tako da se u prisutnosti trombina pretvara u netopljiv fibrin iz kojeg se onda stvara krvni ugrušak. Trombin se može inaktivirati heparinom ili hirudinom i tada ne dolazi do grušanja krvi, odnosno krvna plazma ostaje tekuća. Krvna plazma kojoj je odstranjen fibrinogen zove se **krvni serum**.

Životinjski materijal:

- krvna plazma (uzorak po 1 mL)
- krvni serum (uzorak po 1 mL)
- otopina bjelanjka kokošjeg jajeta (protein ovalbumin) u 1 %-tnoj otopini natrij-klorida (NaCl) (uzorak po 1 mL)

Reagensi:

- konc. trikloroctena kiselina
- konc. otopina bakrovog(II) sulfata (CuSO_4)
- 5 %-tna otopina natrijevog hidroksida (NaOH)
- 0,25 %-tna otopina bakrovog(II) sulfata (CuSO_4)

Pribor:

- stalak s epruветama
- kapaljke

Postupak:

- a) U uzorak krvne plazme, seruma i otopine bjelanjka kapaljkom dodajte nekoliko kapi trikloroctene kiseline.
- b) U uzorak krvne plazme, seruma i otopine bjelanjka kapaljkom dodajte nekoliko kapi konc. otopine CuSO_4 .
- c) U uzorak krvne plazme, seruma i otopine bjelanjka dodajte 10 kapi 5 %-tnog NaOH. Zatim dodajte nekoliko kapi 0,25 %-tnog CuSO_4 .

Nacrtajte i objasnite opažene promjene u svim uzorcima. Kojim ste reakcijama dokazali proteine u zadatcima a), b) i c)? Usporedite količinu proteina u različitim uzorcima i komentirajte dobivene rezultate!

10. STANIČNA DIOBA

Sve stanice višestaničnog organizma nastaju tijekom rasta i razvoja mnogobrojnim uzastopnim diobama iz zigote, odnosno zametka (embrija). Kod odraslih organizama stanice većine tkiva dijele se kako bi se tkiva obnavljala. Zarastanje rane primjer je procesa u kojem stanična dioba igra vrlo važnu ulogu. Jednostanični organizmi također ulaze u proces stanične diobe u cilju očuvanja vrste.

Tijekom stanične diobe iz jedne ishodišne stanice („stanice majke“) nastaju dvije nove stanice („stanice kćeri“). Prije početka same diobe u ishodišnoj stanici mora doći do udvostručenja nasljednog materijala, odnosno replikacije DNA (proces replikacije objašnjen je u Poglavlju 7). Nakon tog ishodišna stanica sadržava dvostruku količinu nasljednog materijala pa se on mora proporcionalno podijeliti u dvije novonastale stanice. Sve stanične organele i strukture moraju se također udvostručiti i rasporediti kako bi novonastale stanice sadržavale odgovarajuću količinu staničnih organela i staničnih dijelova, slično ishodišnoj stanici čijom su diobom nastale.

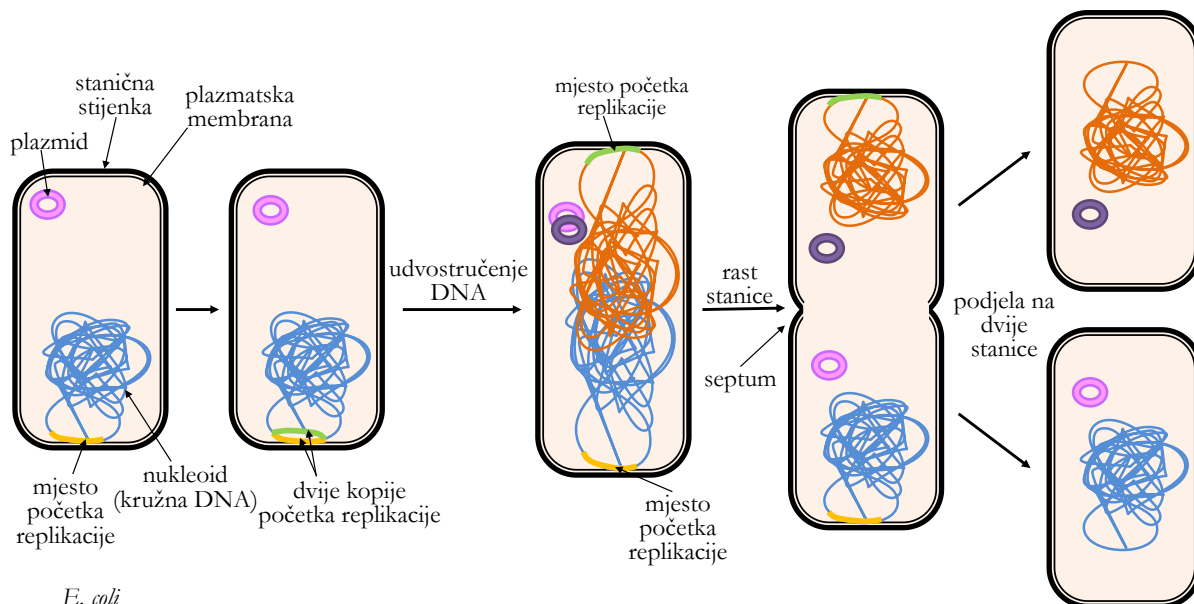
Postoje razlike u procesu stanične diobe kod prokariota i eukariota.

Stanična dioba u prokariota

Proces stanične diobe kod većine prokariota zove se **binarno cijepanje** ili **binarna dioba**. Radi se o procesu nespolnog razmnožavanja (pojam nespolnog razmnožavanja detaljnije je objašnjen u Poglavlju 11) podjelom ishodišne stanice majke u dvije nove stanice kćeri, od kojih svaka sadrži kopiju genskog materijala stanice majke.

Nasljedna informacija prokariota pohranjena je najčešće u obliku kružne molekule DNA (**nukleoid**), koja nije obavijena membranom u zasebnu organelu, kao kod eukariota (u prokariotskoj stanici nisu prisutne organele). Često postoji samo jedna kopija nasljednog materijala kojem je za replikaciju dovoljno jedno izvorište replikacije (*ori*) (za objašnjenje pojma „izvorište replikacije“ vidi Poglavlje 7). Iz tog je razloga proces binarne diobe kod prokariota vrlo brz. Primjerice, stanice bakterije *Escherichia coli* dijele se u odgovarajućim uvjetima svakih dvadeset minuta (tzv. generacijsko vrijeme, t_g). U tih dvadeset minuta dolazi do replikacije nasljednog materijala, udvostručavanja staničnih struktura, pravilne raspodjele nasljednog materijala i staničnih struktura te nastanka dviju novih stanica. Proces binarnog cijepanja prikazan je na Slici 10. 1. Nakon replikacije DNA dvije se molekule DNA vežu na suprotne strane stanične membrane pa rastom bakterijske stanice dolazi do njihova odvajanja. U središtu stanice dolazi do uvlačenja stanične membrane i stanične stijenke te se stvara **septum** (lat. *septum*, pregrada), koji

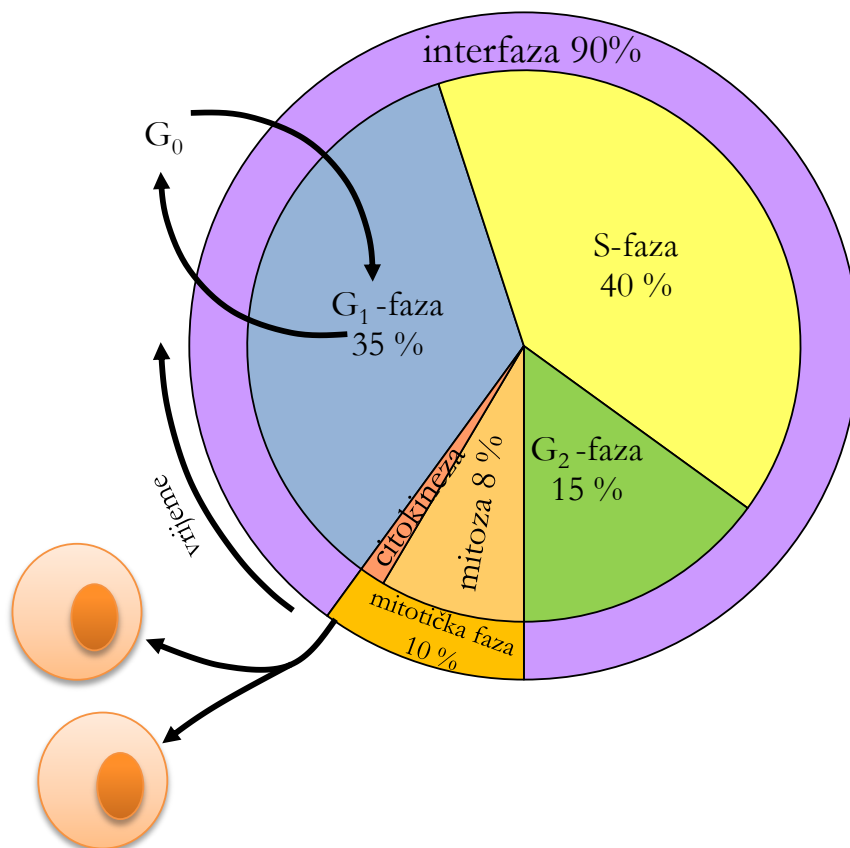
dijeli stanicu u dvije stanice kćeri. Ribosomi i ostali stanični dijelovi udvostručeni tijekom faze rasta bakterijske stanice raspoređuju se u novonastale stanice. Kao rezultat diobe nastaju dvije stanice koje opet mogu ući u proces binarne diobe. Organele eukariota, mitohondriji i plastidi, također se umnožavaju binarnim cijepanjem.



Slika 10. 1. Shematski prikaz binarnog cijepanja u bakterije *Escherichia coli*. Izvor: autori.

Stanična dioba u eukariota

Stanice jednostaničnih i višestaničnih eukariota imaju složeniju građu te stoga i složeniji proces diobe. Dioba, odnosno mitotska faza, dio je procesa ukupnog **staničnog ciklusa**, slijeda staničnih događaja koji rezultiraju diobom stanice, i ne događa se izdvojeno od njega (Slika 10. 2).



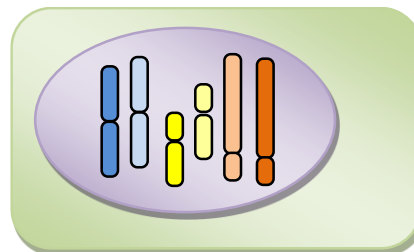
Slika 10. 2. Stanični ciklus ljudske stanice. Navedeno je prosječno trajanje svake pojedine faze u odnosu na ukupno trajanje staničnog ciklusa (%). Izvor: autori.

Eukariotske stanice u jezgri sadrže DNA u obliku više velikih, zasebnih, linearnih molekula koje se tijekom stanične diobe kondenziraju u kromosome (Poglavlje 7). Kromosomi koji su iste veličine, centromera im se nalazi na istom mjestu te nose gene za ista svojstva zovu se **homologni kromosomi** ili **homolozi**.

Pojam **ploidnosti** označuje u koliko se kopija određeni kromosom nalazi u stanici, odnosno koliko setova homolognih kromosoma postoji u stanici. Ploidnost (broj setova kromosoma) neke stanice označuje se slovom ***n***. Ispred slova ***n*** stoji broj koji ukazuje koliko je setova homolognih kromosoma prisutno u stanici. U stanicama većine višestaničnih eukariota svaki homologni kromosom dolazi u dvije kopije, odnosno u jezgri postoje dva seta kromosoma, pa se takve stanice nazivaju **diploidnim**, što označujemo s **2*n***. Triploidne stanice označuju se s

$3n$, tetraploidne s $4n$ itd. Dakle, u diploidnim tjelesnim (vidi Poglavlje 11) stanicama postojat će po dva homologna, odnosno dva istovrsna kromosoma (dvije kopije svakog kromosoma), u triploidnim tri, u tetraploidnim četiri itd.

Za primjer, na Slici 10. 3 prikazana je diploidna stanica s dva seta kromosoma od kojih svaki set sadrži tri različita kromosoma (na slici obojeni plavo, crveno i žuto). Svaki homolog dolazi u dvije kopije i stanica se označuje s $2n = 6$. Drugi su primjer stanice korijena crvenog luka, *Allium cepa*. One sadržavaju šesnaest kromosoma u diploidnom obliku, što označujemo s $2n = 16$. Drugim riječima, u stanici korijena luka nalazi se osam parova homolognih kromosoma, odnosno dva seta po osam kromosoma. Treba napomenuti kako samo broj kromosoma u stanici, iako bitan, nije najvažnija ili isključiva značajka vrste, već je uz broj nužno poznavati i strukturu kromosoma. Tako više različitih vrsta može imati jednak broj kromosoma ($2n = 78$ imaju, primjerice, vuk, *Canis lupus*, ali i kokoš, *Gallus gallus*, te još neke vrste), dok jedinke različitog spola iste vrste mogu imati različit broj kromosoma (primjerice, kod pčela, *Apis mellifera*, ili kod indijskog muntjaka, *Muntiacus muntjak*).



Slika 10. 3. Shematski prikaz stanice sa šest kromosoma, odnosno tri para homolognih kromosoma, $2n = 6$. Izvor: autori.

Stanični ciklus

Stanični ciklus uključuje fazu diobe stanice (mitotska faza) i period interfaze (Slika 10. 2) u kojem stanica provjerava uspješnost prethodne stanične diobe te se priprema za novu, intenzivno obavljajući kataboličke i anaboličke procese: raste, pohranjuje energiju, udvostručuje DNA i organele itd.

Kao što se vidi na Slici 10. 2, sam proces stanične diobe, odnosno mitotska faza, čini svega 10 % vremena staničnog ciklusa, a sve ostalo period je interfaze.

a) Interfaza

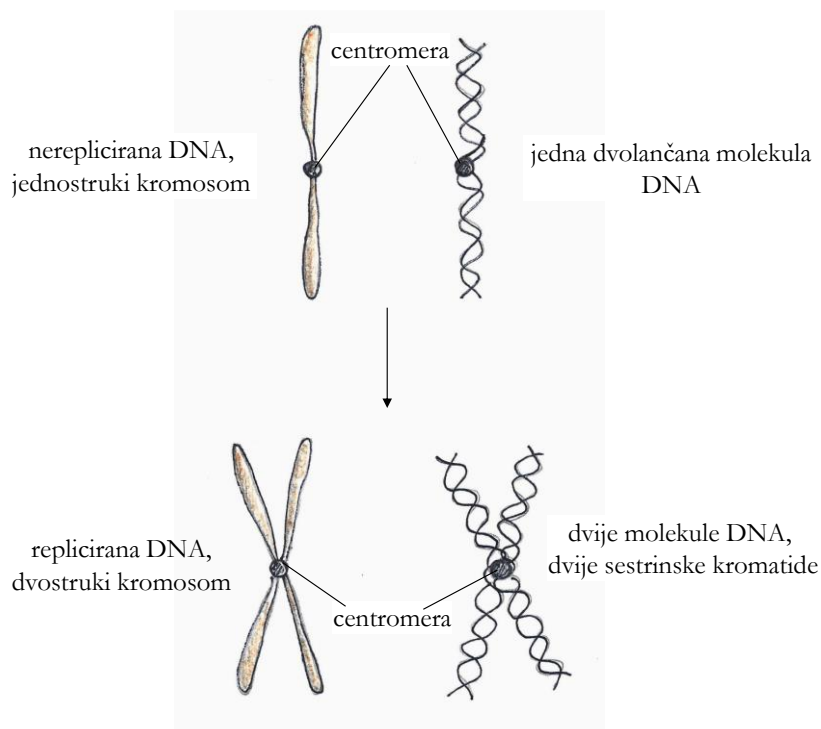
Interfaza se odvija između dvije diobe (mitotske faze) i predstavlja vrijeme staničnog rasta. Sastoji se od tri faze: G_1 -, S- i G_2 -faze.

G_1 -faza slijedi odmah nakon mitotske faze. G potječe od engleske riječi *gap*, što znači praznina (Gap 1), jer mikroskopski nisu primjećivane nikakve promjene u stanici. Međutim, na biokemijskoj razini stanica je izuzetno aktivna i raste pa G označuje rast stanice (prema engl. *growth*). U toj se fazi odvija niz procesa i stanica raste (gotovo udvostruči veličinu) te bi bez tog svaka sljedeća faza staničnog ciklusa bila nemoguća.

Tijekom G_1 -faze dolazi do sinteze novih proteina, ribosoma, mitohondrija, endoplazmatskog retikuluma i drugih dijelova stanice, a isto tako dolazi do sinteze svih enzima potrebnih za sljedeću fazu interfaze, S-fazu, odnosno fazu sinteze DNA. U G_1 -fazi provjerava se jesu li ispunjeni svi uvjeti za prelazak u S-fazu (postignuta određena veličina stanice, sinteza svih potrebnih tvari u stanici, udvostručivanje organela i uspješnost prethodne stanične diobe, ali i postoji li poticaj/inhibicija vanjskim čimbenicima).

Vremensko trajanje G_1 -faze ovisi o mnogim čimbenicima: o vrsti stanica koje se trebaju dijeliti, njihovoj ulozi u organizmu, o uvjetima u okolini itd. Ljudske stanice koje se učestalo dijele (svaka 24 sata) provedu u ovoj fazi u prosjeku devet sati. U slučaju da ne postoji vanjski poticaj ili nisu ispunjeni neki od uvjeta za ulazak u sljedeću fazu, stanica može ući u posebnu fazu mirovanja nazvanu G_0 .

Nakon G_1 -faze slijedi **S-faza**. To je faza u kojoj dolazi do **replikacije** DNA (vidi Poglavlje 7), odnosno udvostručenja nasljednog materijala (Slika 10. 4). Dvije se molekule DNA drže zajedno u području centromere, što će biti vidljivo kad se kromatin kondenzira u **kromosome**. Zbog jednostavnosti prikaza događaja u daljnjem ćemo tekstu govoriti o kromosomima, iako se oni kao strukture pojavljuju tek ulaskom stanice u diobu. Stoga imajte na umu da je i prikaz kromosoma na Slici 10. 4 dan samo radi jednostavnosti. U interfaznoj jezgri linearne molekule DNA zajedno s pripadajućim histonskim i nehistonskim proteinima čine **kromatin**.



Slika 10. 4. Shematski prikaz izgleda kromosoma prije i nakon replikacije. Izvor: autori.

Kao što se vidi na Slici 10. 4, prije replikacije jedan kromosom (lijevo) čini jedna dvolančana molekula DNA (desno). U S-fazu ulazi stanica s jednostrukim kromosomima (jednom dvolančanom molekulom DNA po kromosomu), a nakon S-faze stanica sadržava isti broj kromosoma, ali oni više nisu jednostruki, već dvostruki (dvije dvolančane DNA po kromosomu). Dvostruki kromosomi sadržavaju dvostruko veću količinu nasljednog materijala.

Dvije su molekule DNA unutar dvostrukog kromosoma identične jer su nastale semikonzervativnom replikacijom i stoga se nazivaju **sestrinskim kromatidama**. One se drže zajedno u regiji koju zovemo **centromera** (Poglavlje 7).

U **G₂-fazi** vrši se intenzivna sinteza proteina potrebnih za diobu, tj. mitotsku fazu (ponajprije tubulina za izgradnju mikrotubula). Izostankom te faze ne dolazi ni do mitoze. U sklopu pripreme za mitozu provjerava se uspješnost replikacije DNA. U slučaju neuspjele replikacije (primjerice, zbog oštećenja DNA), problem se pokušava riješiti, a ako to nije moguće, stanica ne ulazi u staničnu diobu.

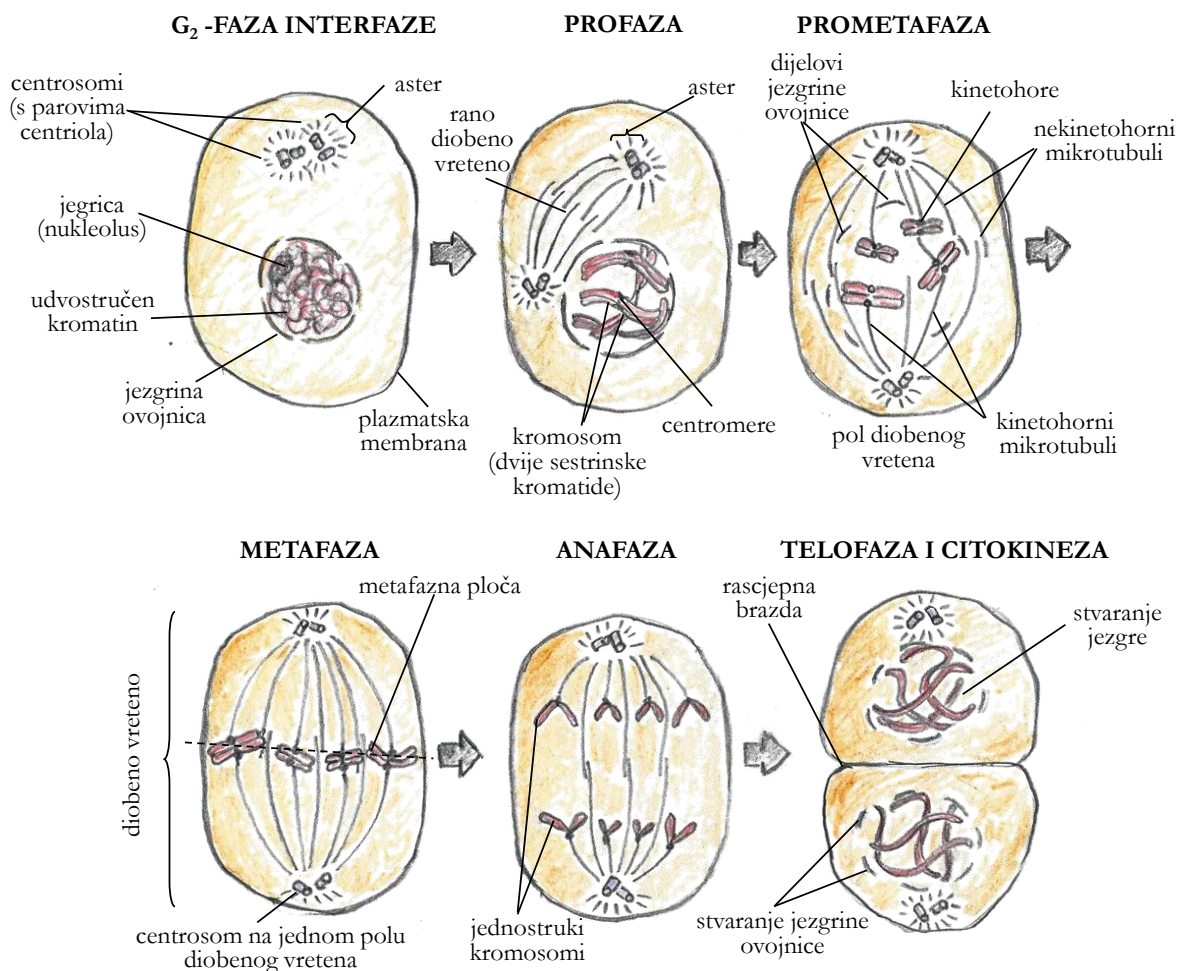
b) Mitotska faza

Smisao **mitotske faze** jest u tome da se nasljedni materijal ishodišne stanice (kao i potrebne organele i ostali sadržaj citoplazme) raspodijeli u novonastale stanice kćeri. Pritom broj kromosoma u stanicama ostaje očuvan. Mitotska faza staničnog ciklusa uključuje dva glavna događaja:

1. mitozu (u užem smislu) – diobu jezgre ili **kariokinezu**
2. diobu citoplazme – **citokinezu**.

Iako se, kao što je gore navedeno, pojam mitoze (u užem smislu) odnosi samo na kariokinezu, uvriježeno je da se pod tim pojmom misli na čitavu mitotsku fazu, dakle i na kariokinezu i na citokinezu.

Glavni je događaj u mitozu (Slika 10. 5) jednakomjerno razdvajanje nasljednog materijala u stanice kćeri. Da bi to bilo moguće, nasljedni se materijal u obliku kromatina dodatno kondenzira u vidljive, gusto pakirane, zasebne kromosome. Tijekom mitotske faze jednostruki kromosomi putuju na suprotne polove stanice, gdje se oko svakog seta kromosoma formira jezgrina ovojnica. Taj proces označuje diobu jezgre (**kariokinezu**). Istovremeno se vrši pravilna distribucija staničnih organela i staničnih dijelova (**citokineza**).

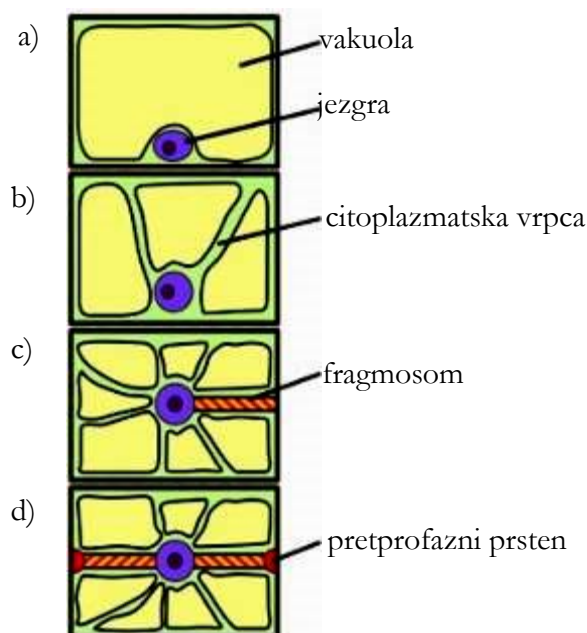


Slika 10. 5. Shematski prikaz životinjskih stanica tijekom mitotske faze staničnog ciklusa. Izvor: autori.

Faze mitoze

Rana profaza (preprofaza)

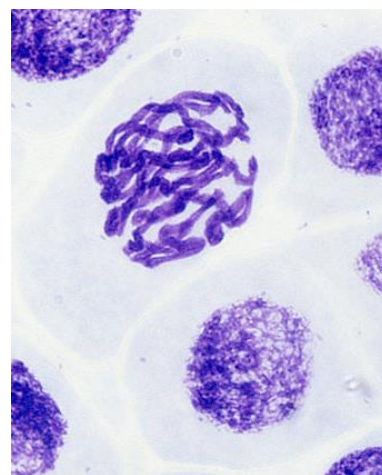
Ovu fazu imaju samo biljne stanice. Kromosomi su dvostruki jer je u S-fazi interfaze došlo do replikacije DNA. Kako velika središnja vakuola biljne stanice najčešće zauzima većinu volumena stanice (i do 90 %, Slika 10. 6a), jezgra se najprije mora premjestiti u sredinu stanice. To se postiže stvaranjem citoplazmatskih vrpca koje prodiru u središnju vakuolu (Slika 10. 6b). Jezgra se povlači prema sredini stanice uz pomoć mikrofilamenata (aktinske niti) koji se nalaze unutar citoplazmatskih vrpca. Više citoplazmatskih vrpca stopi se poprečno na mjestu buduće ekvatorijalne ravnine tvoreći u sredini stanice citoplazmatski prostor, odnosno nastaje struktura **fragmosom** (Slika 10. 6c). Fragmosom podupiru gusti snopovi mikrotubula i mikrofilamenata u obliku **preprofaznog prstena** koji se nalazi neposredno ispod plazmatske membrane (Slika 10. 6d).



Slika 10. 6. Shematski prikaz događaja tijekom rane profaze biljne stanice s vakuolom. Svaka slika predstavlja uzdužni presjek stanice: a) interfaza, b) citoplazmatske vrpce prodiru u vakuolu, c) jezgra se pomiče u sredinu stanice i nastaje fragmosom, d) završetak stvaranja fragmosoma i pretprofaznog prstena. Izvor: <http://bit.ly/2sUGzLy>

Profaza

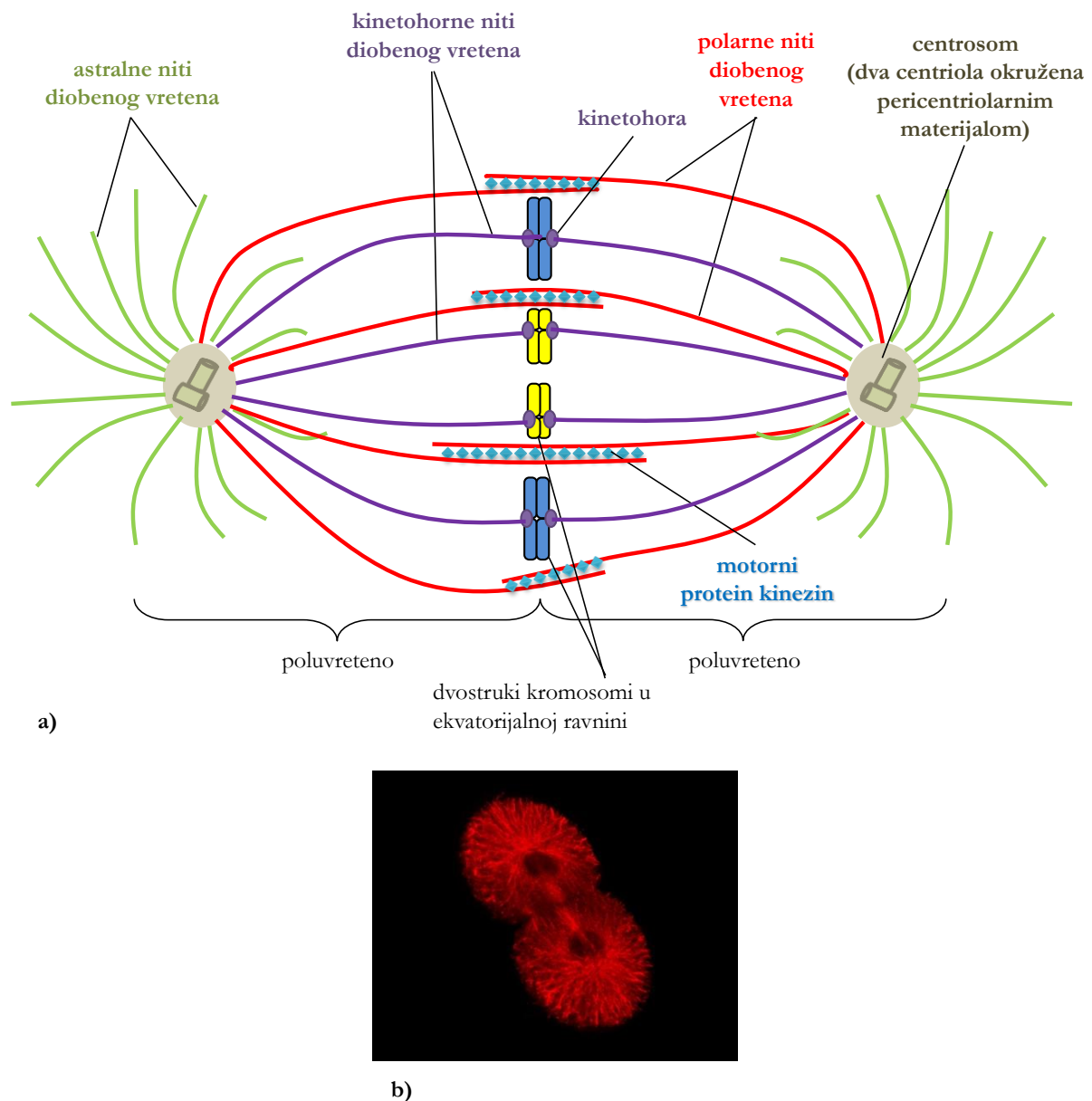
Glavne su značajke **profaze** nestanak jezgrice (nukleolusa) te početak kondenzacije kromatina u zasebne, gusto pakirane kromosome na kojima se vide centromere (Slike 10. 5 i 10. 7). Na polove stanice smještaju se proteinske strukture – **centrosomi** (Slika 10. 8; prisutni u animalnim i nekim biljnim stanicama). Svaki centrosom građen je od dva međusobno okomito postavljena **centriola** (cilindrične strukture sastavljene od mikrotubula; vidi Poglavlje 4). Iz centrosoma se u profazi počinje formirati mitotsko **diobeno vreteno**, sastavljeno od mikrotubula. Važno je uočiti da se diobeno vreteno formira između dva centrosoma, a svaki je centrosom postavljen na jedan pol stanice. Diobeno vreteno nije kontinuirano, već je sastavljeno od dva poluvretena: „lijevo“ poluvreteno pruža se iz „lijevog“ centrosoma do sredine stanice, a „desno“ poluvreteno pruža se s „desnog“ pola stanice do sredine stanice (Slika 10. 8). Na centromerama kromosoma formiraju se kinetohore, proteinske strukture koje će diobeno vreteno povezati s kromosomima.



Slika 10. 7. Rana profaza biljne stanice boba (*Vicia faba*) u sredini slike. Ostale stanice u interfazi (3000×). Izvor: doc. RN dr. Josef Reischig, CSc.

Na Slici 10. 8 isto se tako može uočiti da je diobeno vreteno sastavljeno od tri vrste mikrotubula.

- a) **Astralni mikrotubuli (aster)** (prikazani na Slici 10. 5 i zeleno obojeni na Slici 10. 8) zvjezdasto se pružaju iz centrosoma te su vezani za staničnu membranu. Pridonose odvajanju centrosoma na polove stanice te osiguravaju ispravan položaj centrosoma u njoj.
- b) Druga vrsta mikrotubula koja izgrađuje dva poluvretena jesu **kinetohorni mikrotubuli**. Oni se vežu za **kinetohore** (proteinske strukture koje se nalaze na centromerama kromosoma) te omogućuju razdvajanje jednostrukih kromosoma iz strukture dvostrukih kromosoma tijekom mitoze. Na Slici 10. 8 su kinetohorni mikrotubuli ljubičaste boje.
- c) **Polarni (nekinetohorni) mikrotubuli** treća su vrsta mikrotubula diobenog vretena. Njima je svojstveno da se spuštaju iz centrosoma i prelaze polovicu stanice te se na sredini stanice polarni mikrotubuli iz jednog centrosoma preklapaju s polarnim mikrotubulima iz drugog centrosoma. Na taj je način omogućeno bolje razdvajanje staničnog sadržaja. Na Slici 10. 8 su polarni mikrotubuli obojeni crveno.



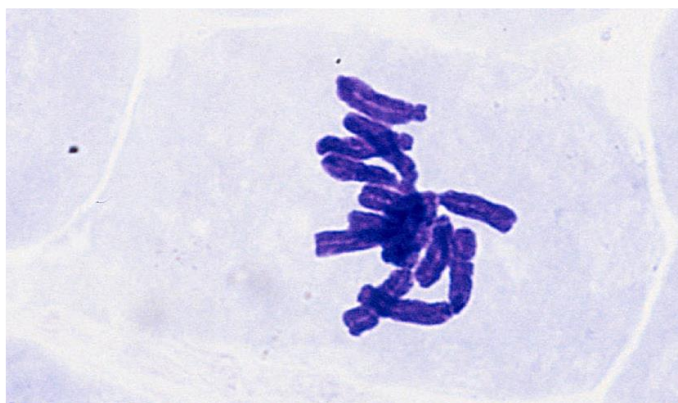
Slika 10. 8. Diobeno vreteno u metafazi: (a) shematski prikaz građe, (b) fotografija animalne stanice u metafazi mitoze dobivena fluorescencijskim mikroskopom, niti diobenog vretena označene crveno (400 \times). Izvor: autori.

Prometafaza

Jezgrina ovojnica se razgrađuje, nasljedni materijal ostaje na mjestu jezgre – u sredini stanice, a iz centrosoma se prema sredini stanice spuštaju niti diobenog vretena (Slika 10. 5). Diobeno vreteno, koje se počelo formirati u profazi, sad je dokraja formirano (onako kako je prikazano na Slici 10. 8). Kinetohorni mikrotubuli vežu se za kinetohore (ljubičasto označeno na Slici 10. 8) na centromerama dvostrukih kromosoma. (Da ponovimo, centromere su dio DNA, a ne proteini. Kinetohorni proteini vezani su za centromere.)

Metafaza

Tijekom metafaze (Slike 10. 5, 10. 9 i 10. 15) dvostruki su kromosomi maksimalno kondenzirani. Smještaju se u **ekvatorijalnu ravninu** stanice, tj. **metafaznu ploču** (središnja ravnina stanice). Leže na pola puta do svakog pola i to tako da se centromere nalaze u ekvatorijalnoj ravnini, a krakovi kromosoma strše prema polovima stanice.



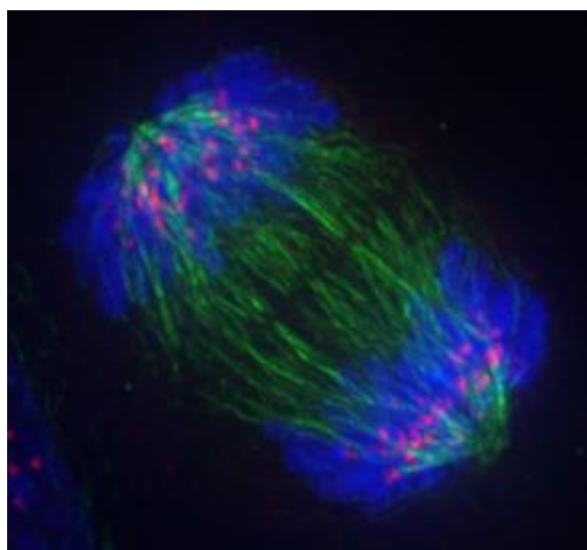
Slika 10. 9. Mikroskopska fotografija biljne stanice boba (*Vicia faba*) u metafazi mitoze (3000×). Izvor: doc. RN dr. Josef Reischig, CSc.

Anafaza

Tijekom anafaze (Slike 10. 5, 10. 10 i 10. 11) nekinetohorni mikrotubuli rastu, produžujući stanicu i povećavajući time udaljenost između centrosoma na suprotnim polovima stanice. Kinetohorni mikrotubuli se skraćuju, što dovodi do razdvajanja sestrinskih kromatida dvostrukih kromosoma. Bivše sestrinske kromatide sad postaju jednostruki kromosomi i putuju na polove stanice pa stoga stanica postaje privremeno tetraploidna ($4n$), kao što ćete uvidjeti u Zadatku 1. Diobeno vreteno daje signal za početak podjele citoplazme – citokinezu. Krajem ove faze postupno se raspada diobeno vreteno.



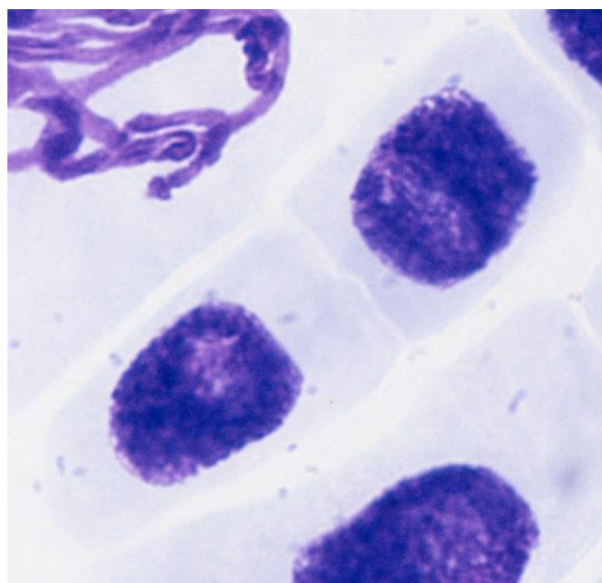
Slika 10. 10. Mikroskopska fotografija biljne stanice boba (*Vicia faba*) u anafazi mitoze (3000×). Izvor: doc. RN dr. Josef Reischig, CSc.



Slika 10. 11. Fotografija životinjske stanice u anafazi mitoze dobivena fluorescencijskim mikroskopom. Plavo – kromosomi (DNA), ružičasto – kinetohore, zeleno – niti diobenog vretena. Izvor: <http://bit.ly/2tTY2YN>

Telofaza

Tijekom telofaze (Slike 10. 5 i 10. 12) bivše sestrinske kromatide, sad samostalni jednostruki kromosomi, došli su do polova stanice. Kromosomi se dekonenziraju u kromatin, a oko svakog seta kromosoma na polovima stanice formira se jezgrina ovojnica. Pojavljuje se jezgrica (nukleolus). Time završava kariokineza, ali ne i ukupan proces stanične diobe. Naime, proces citokineze, koji je započeo u anafazi, završava u telofazi podjelom ishodišne stanice na dvije novonastale identične stanice. Taj proces raspodjele citoplazme razlikuje se u biljnim i životinjskim stanicama.



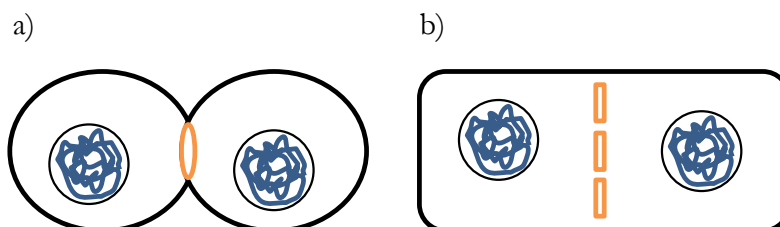
Slika 10. 12. Mikroskopska fotografija biljne stanice boba (*Vicia faba*) u telofazi mitoze (3000×). Izvor: doc. RN dr. Josef Reischig, CSc.

Citokineza

Dok se tijekom telofaze odvija *razdvajanje* kromosoma (kariokineza), citokineza predstavlja zaseban proces podjele citoplazme (citosola, citoskeleta, organela i dr.) u novonastale stanice.

U životinjskim se stanicama razdvajanje dviju stanica kćeri odvija procesom poznatim kao cijepanje (kalanje). Cijepanje započinje pojavom rascjepne brazde koja se javlja kao plitak utor na površini stanice, u blizini nekadašnje metafazne ploče. Rascjepna brazda nastaje kao posljedica kontrakcija elemenata citoskeleta (aktinskih i miozinskih filamenata) koji s citoplazmatske strane utora oblikuju kontraktilni prsten (narančasta struktura na Slici 10. 13a). Kako se prsten kontrahira, tako se smanjuje promjer stanice. Rascjepna brazda se produbljuje sve dok se stanica ne podijeli (Slika 10. 13a).

Kod biljnih stanica razdvajanje stanica kćeri odvija se na bitno drugačiji način zbog postojanja krute polisaharidne (celulozne) stanične stijenke. Ne postoji



Slika 10. 13. Shema citokineze (a) životinjske i (b) biljne stanice. Izvor: autori.

rascjepna brazda, već se umjesto nje tijekom telofaze u sredini roditeljske stanice stvara struktura zvana **fragmoplast** (tvorba nastala od elemenata citoskeleta, endoplazmatskog retikuluma i

Golgijeva aparata), koja sudjeluje kao potpora u izgradnji stanične ploče. Naime, Golgijev aparat otpušta mjehuriće (vezikule), koji se pomiču prema sredini stanice uz pomoć mikrotubula i međusobno se stapaju u staničnu ploču (narančasto označeno na Slici 10. 13b). Mjehurići sadrže gradivne komponente za izgradnju nove plazmatske membrane i stanične stijenke koje rastu od sredine stanice bočno prema rubovima, gdje se naposljetku stope sa staničnom membranom roditeljske stanice. Rezultat je takvog procesa nastanak dviju stanica kćeri, od kojih svaka ima vlastitu staničnu membranu. Nova se stanična stijenka stvara između dvije membrane stanične ploče nakupljanjem polisaharida i dr. (vidi Poglavlje 3).

Glavne razlike u mitozu između animalnih i biljnih stanica dane su ukratko u Tablici 10. 1.

Tablica 10. 1. Razlike u mitozu između biljne i životinjske stanice.

proces/svojstvo	životinjska stanica	biljna stanica
početak diobe	nema fragmosoma	stvaranje fragmosoma
postojanje centrosoma	da	samo neke biljke
podjela citoplazme	rascjepna brazda	fragmoplast, stanična ploča

ZADATCI ZA VJEŽBANJE (od ponuđenih, samo je jedan odgovor točan):

1. Što je karakteristično za diobeno vreteno?
 - a) Centrosomi se nalaze na polovima animalne stanice i građeni su od dva međusobno okomita centromera.
 - b) Formira se u anafazi.
 - c) Sastoji se od dva poluvretena.
 - d) Mikrotubuli diobenog vretena neprekinuto se pružaju između dva centrosoma biljne stanice.
2. Biljna stanica majka ima dvadeset kromosoma. Koja je tvrdnja ispravna?
 - a) Nakon mitoze stanica kćer imat će različit broj kromosoma jer su se u anafazi razdvojile kromatide.
 - b) Kromosome će tijekom mitoze razdvajati centrosomi koji imaju samo jedan centriol jer se radi o biljnoj stanici.
 - c) Citokineza će započeti stvaranjem rascjepne brazde.
 - d) Nakon završene mitoze stanice kćeri imat će dvadeset kromosoma.
3. Mitotska faza u kojoj se odvajaju sestrinske kromatide i putuju prema suprotnim polovima kao samostalni kromosomi zove se _____.
 - a) metafaza
 - b) profaza
 - c) anafaza
 - d) telofaza
4. Zaokružite netočan odgovor. Mitotska faza _____.
 - a) traje oko 10 % vremena staničnog ciklusa
 - b) je dioba u kojoj možemo razlikovati kariokinezu i citokinezu
 - c) je dioba pri kojoj se polarni mikrotubuli vežu na kinetohore
 - d) je dioba u kojoj broj kromosoma u stanici ostaje očuvan
5. Osobina mitotskog metafaznog kromosoma je _____.
 - a) mala kondenziranost
 - b) da su kraci kromosoma okrenuti prema ekvatorijalnoj ravnini
 - c) da se centromere nalaze u metafaznoj ploči
 - d) da svaki kromosom sadrži po jednu molekulu DNA

6. Ako se na kraju posve završene mitoze dobiju dvije stanice, svaka s deset jednostrukih kromosoma, s koliko je i kakvih kromosoma u tu mitozu ušla ishodišna stanica?
- deset jednostrukih kromosoma
 - dvadeset dvostrukih kromosoma
 - dva puta po deset jednostrukih kromosoma
 - deset kromosoma, od kojih je svaki imao po dvije molekule DNA
7. Stanica koja ulazi u mitozu ima osam dvostrukih kromosoma. Zaokružite točnu tvrdnju.
- U profazi će imati šesnaest kromosoma.
 - U anafazi će imati osam jednostrukih kromosoma.
 - U metafazi u ekvatorijalnoj ravnini bit će poredano osam jednostrukih kromosoma.
 - U metafazi će imati osam dvostrukih kromosoma.

Zadatak 1: Shematski prikaz staničnog ciklusa.

Nacrtajte promjene u stanici koje se događaju tijekom jednog staničnog ciklusa s obzirom na broj kromosoma, počevši od G₁-faze interfaze. Nacrtajte svaku pojedinu fazu. Modelna stanica neka bude diploid, $2n = 6$ (Slika 10. 3). Uz svaku stanicu naznačite stupanj ploidnosti, broj kromosoma i molekula DNA.

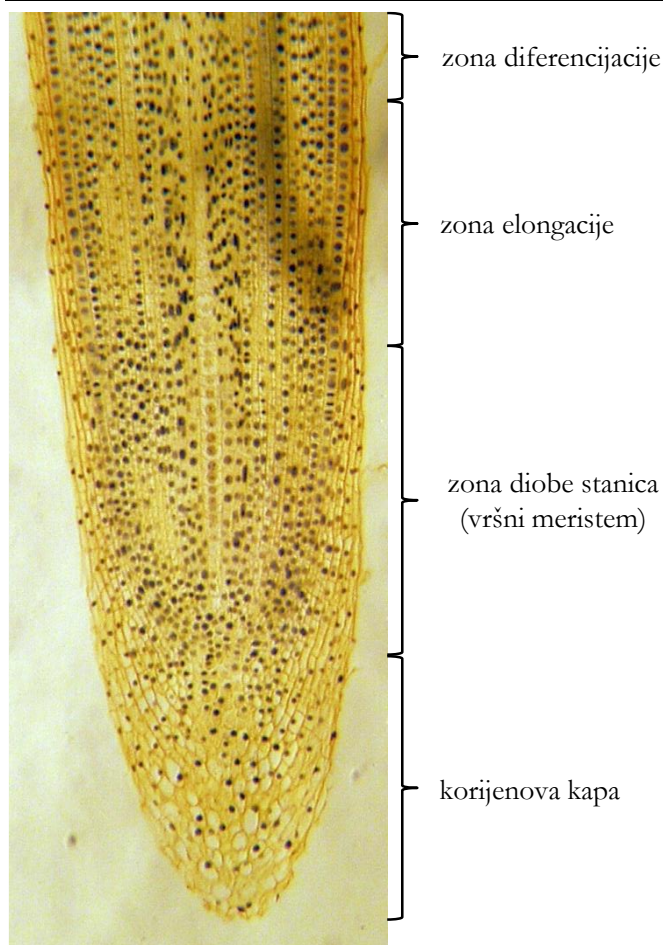
Zadatak 2: Promatranje mitoze u trajnom preparatu vrška korijena crvenog luka (*Allium cepa*).

Materijal:

- trajni preparat vrška korijena crvenog luka (*Allium cepa*)

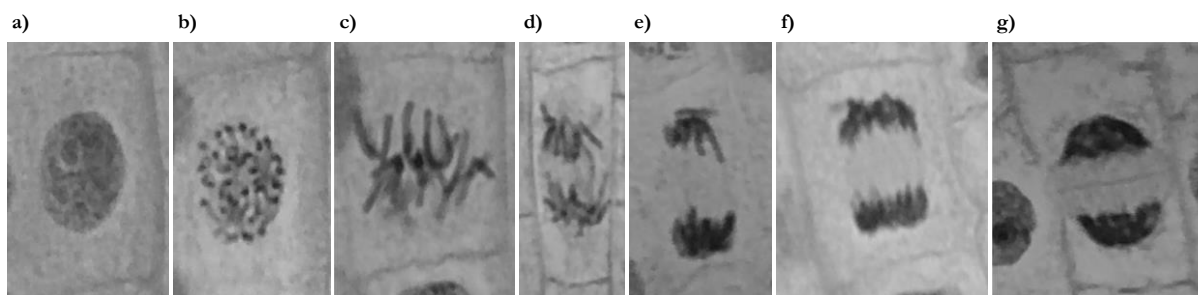
Na preparatu se nalazi uzdužni presjek korijena crvenog luka. Zona vršnog meristema dio je korijena koji se intenzivno dijeli tijekom cijelog života biljke pa je stoga idealno tkivo za praćenje mitoze. Vršak korijena prekriva korijenova kapa (kaliptra), koja štiti osjetljivo tkivo vršnog meristema prilikom prolaska korijena kroz tlo. Stanice korijenove kape se ne dijele, već se nadomještaju stanicama koje nastaju diobama vršnog meristema. Vršni meristem prema van stvara stanice korijenove kape, a prema unutra nove stanice samog korijena.

Dakle, mitotski aktivno tkivo (**meristem**) nalazi se na samom vršku korijena, u **zoni diobe** stanica. Iznad te zone nalazi se zona **produžnog rasta stanica (zona elongacije)**, u kojoj se stanice više ne dijele, već rastu u dužinu. Iznad zone elongacije nalazi se **zona diferencijacije**, u kojoj se stanice diferenciraju u različite stanične tipove (Slika 10. 14).



Uzmite trajni preparat uzdužnog presjeka kroz meristemsko tkivo i na preparatu pronađite područje vršnog meristema u vršku korijena luka (obratite pažnju na Sliku 10. 14). Svaka stanica vršnog meristema nalazi se u nekoj od faza staničnog ciklusa. Pronađite stanice u svim stadijima staničnog ciklusa: interfazi, profazi, metafazi, anafazi i telofazi. Pritom si pomozite gledajući Sliku 10. 15. Nacrtajte po jednu stanicu u svakoj od navedenih faza.

Slika 10. 14. Položaj vršnog meristema na uzdužnom presjeku korijena crvenog luka, *Allium cepa* (32×). Izvor: autori.



Slika 10. 15. Stanice vrška korijena luka, *Allium cepa*, u pojedinim fazama staničnog ciklusa. (a) Interfaza, (b) profaza, (c) metafaza, (d) rana anafaza, (e) kasna anafaza, (f) rana telofaza, (g) kasna telofaza (600×). Izvor: autori.

Zadatak 3: Izrada preparata i promatranje mitoze u vršku korijena crvenog luka, *Allium cepa*.

Biljni materijal:

- lukovica crvenog luka (*Allium cepa*) s prokljalim korjenčićima

Reagensi:

- 6 M kloridna kiselina, HCl
- destilirana voda
- acetokarmin
- 45 %-tna octena kiselina

Pribor:

- predmetna i pokrovna stakalca
- britvica
- Pasteurove pipete
- pincete
- staklene posudice
- filtarski papir

Postupak:

1. Uzmite lukovicu s korjenčićima i britvicom odrežite nekoliko svježih korjenčića. Korjenčiće hvatajte pincetom. Pazite da ih ne uhvatite za vršni meristem (korjenčići su na vrhu zašiljeni), već za suprotni kraj.
2. Korjenčiće stavite u staklenu posudicu s destiliranom vodom. Ostavite tako 1 minutu.
3. Pincetom premjestite korjenčiće u staklenu posudicu sa 6 M kloridnom kiselinom. Ostavite korjenčiće u kiselini 10 minuta. Za vrijeme ove inkubacije kloridna kiselina stvara pore na staničnoj stijenci i membranama stanica vrška korijena. Porozne stijenke biljnih stanica omogućit će u sljedećem koraku ulazak boje acetokarmina u stanice i bojenje molekula DNA.
4. Korjenčiće premjestite ponovno u destiliranu vodu i ispirite uz potresanje 1 minutu.
5. Pincetom premjestite korjenčiće u staklenu posudicu s acetokarminom. Ostavite ih u boji 20 minuta. Acetokarminom ćete obojiti molekule DNA (kromosome) te ih tako učiniti vidljivijima na preparatu.
6. Obojene korjenčiće premjestite u posudu s 45 %-tnom octenom kiselinom koja fiksira acetokarminom obojene strukture (kromosome) u stanicama.
7. Britvicom odrežite sam vršak korjenčića i stavite ga na čisto predmetno stakalce u kapljicu 45 %-tne octene kiseline. Pokrijte pokrovnicom, stavite na nju komadić filtarskog papira i čvrsto pritisnite palcem („squash“). Ovo bi trebalo rezultirati tankim razmazom obojenih stanica.
8. Pogledajte preparat pod velikim povećanjem na mikroskopu. Pokušajte pronaći stanice u svim fazama staničnog ciklusa: interfazi, profazi, metafazi, anafazi i telofazi.

Zadatak 4: Određivanje duljine trajanja različitih faza staničnog ciklusa kod luka, *Allium cepa*.

Prebrojite pedesetak stanica na trajnom (Zadatak 2) ili vašem (Zadatak 3) preparatu vrška korijena luka. Brojite jedan po jedan niz stanica. Brojite sve stanice, osim onih kojima se ne vidi jezgra – njih preskočite. Odredite koliko je stanica u mitozu i koliki je ukupan broj prebrojenih stanica. Zabilježite također koliko je stanica u pojedinim fazama mitoze (profazi, metafazi, anafazi i telofazi). Udružite svoje rezultate s rezultatima ostalih studenata iz grupe. Dolje navedenu tablicu precrtajte u bilježnicu i ispunite.

Broj i udio stanica u određenoj fazi staničnog ciklusa crvenog luka, *Allium cepa*.

faza staničnog ciklusa		broj stanica u određenoj fazi					udio stanica (%)
		grupa 1	grupa 2	grupa 3	grupa 4	grupa 5	
mitoza	interfaza						
	profaza						
	metafaza						
	anafaza						
	telofaza						
ukupno stanica							

Ako je poznato ukupno vrijeme trajanja staničnog ciklusa za određeni tip stanica, moguće je ustanoviti duljinu trajanja pojedinih faza. Kreće se od sljedeće pretpostavke: što je *duže* vrijeme trajanja pojedine faze staničnog ciklusa, to će na mikroskopskom preparatu više stanica biti „uhvaćeno“ u toj fazi. I obratno – ako određena faza staničnog ciklusa traje vrlo kratko, teško ćemo je naći na preparatu. Stoga je postupak određivanja duljine trajanja određene faze staničnog ciklusa sljedeći:

1. Prebroje se stanice u različitim fazama na preparatu.
2. Izračuna se udio stanica za svaku fazu prema formuli:

$$\frac{\text{broj stanica u određenoj fazi}}{\text{ukupan broj stanica}}$$

3. Ako se zna ukupno trajanje staničnog ciklusa (kod luka ono iznosi 16 sati), duljina trajanja pojedine faze odredi se na sljedeći način:

$$\text{duljina trajanja odred. faze} = \text{udio stanica u odred. fazi} \times \text{duljina trajanja stan. ciklusa.}$$

Primjer: ako je 15 od 100 stanica luka u nekoj od faza mitoze, udio je stanica u M fazi 0,15. Drugim riječima, mitoza zauzima oko 15 % ukupnog trajanja staničnog ciklusa. Budući da stanični ciklus kod luka traje 16 sati, možemo zaključiti da M faza traje oko 2,4 sata ($0,15 \times 16$ sati) ili 2 sata i 24 minute (2 puna sata i 0,4 dijela sata \times 60 minuta).

Interfaza je najdulja faza staničnog ciklusa (Slika 10. 2). Profaza je najduža faza mitoze,

dok su metafaza, anafaza i telofaza mnogo kraće.

Mitotski indeks (MI) predstavlja udio stanica u mitozu u odnosu na ukupan broj promatranih stanica:

$$MI = \frac{\text{broj stanica u mitozu}}{\text{ukupan broj stanica}}$$

Na temelju dobivenih podataka (ukupnih brojeva stanica) izračunajte vrijeme trajanja sljedećih faza staničnog ciklusa: interfaze, mitoze, profaze, metafaze, anafaze i telofaze. Rezultate unesite u dolje navedenu tablicu, koju precrtajte u bilježnicu.

Trajanje pojedinih faza staničnog ciklusa u crvenog luka, *Allium cepa*, izraženo u satima i minutama.

trajanje pojedine faze u satima i minutama		
interfaza		
mitoza	profaza	
	metafaza	
	anafaza	
	telofaza	

Na kraju izračunajte mitotski indeks (u postotcima) i trajanje mitoze (u satima i minutama)!

11. RAZMNOŽAVANJE I MEJOZA

Razmnožavanje je biološki proces koji omogućuje nastanak novih jedinki nekog organizma. Taj je proces jedno od osnovnih svojstava živog sustava, odnosno svaka jedinka nekog organizma postoji kao rezultat razmnožavanja. Razlikujemo dva osnovna načina razmnožavanja svih živućih organizama: **nespolno** i **spolno** razmnožavanje.

Nespolno razmnožavanje

Kod nespolnog razmnožavanja pojedina jedinka nekog organizma (nazivamo je „roditeljskom“ jedinkom) može stvoriti nove potomke bez kontakta s drugom jedinkom svoje vrste (odnosno s njezinim genskim materijalom). Na taj način nastaju nove jedinke koje su genski iste kao i sam roditeljski organizam (takve jedinke nazivamo **klonovima**).

Primjer je nespolnog razmnožavanja **binarno cijepanje** kod prokariota (vidi Poglavlje 10). Nespolno razmnožavanje kod višestaničnih eukariota odvija se **mitozom** (Poglavlje 10), staničnom diobom kojom nastaju stanice genski identične stanici majci, odnosno klonovi. Za jednostanične eukariote (papučica, euglena; vidi Poglavlje 4) karakteristično je upravo razmnožavanje mitotskim diobama.



Slika 11. 1. Hidra se nespolno razmnožava pupanjem. Brojnim mitotskim diobama na roditeljskoj se biljci razvija pup (lijevo) koji će se, nakon što dovoljno naraste, odvojiti i nastaviti život kao samostalna jedinka. Izvor: <http://bit.ly/2uRUxiw>

Kod višestaničnih eukariota nespolno razmnožavanje češće je u biljaka nego u životinja. Biljke se često razmnožavaju nespolno uz pomoć nespolnih vegetativnih organa pa se nespolno razmnožavanje u biljaka naziva i **vegetativnim razmnožavanjem**. Primjer je vegetativnog razmnožavanja u biljaka razmnožavanje vriježama (jagode), gomoljem (krumpir), lukovicama (tulipan), pojedinačnim listovima (afrička ljubica), dijelovima stabljike (pelargonija) ili malim biljčicama koje se razvijaju na rubovima listova (kalanhoa).

Nespolno razmnožavanje životinja najčešće se odvija **pupanjem** (primjerice kod žarnjaka poput hidre; Slika 11. 1). Minijaturne hidre nastaju na roditeljskoj jedinki višestrukim mitotskim diobama. Kada se pup dovoljno razvije, odvoji se od roditelja i postaje neovisna

jedinka. Međutim, životinje se mogu nespolno razmnožavati i **fragmentacijom** (plošnjaci, kao i neke niže biljke) i **partenogenezom**, tj. iz jajašca, bez sudjelovanja mužjaka u oplodnji. Partenogeneza je značajka nekih beskralježnjaka (neke vrste slatkovodnih rakova, kukaca, škorpiona), ali i kralježnjaka (neke vrste riba, gmazova, a uočena je rijetko čak i u ptica).

Spolno razmnožavanje

Za spolno razmnožavanje potrebna su dva roditelja suprotna spola od kojih svaki daje polovinu genskog materijala. Na taj način dolazi do kombiniranja nasljednog materijala dvaju roditelja kod potomaka. Zbog novih kombinacija nasljednog materijala potomci su genski jedinstveni. U spolno razmnožavanje uključena je druga vrsta stanične diobe – **mejoza**, kojom nastaju spolne stanice (**gamete**). Spolno razmnožavanje nužno uključuje stvaranje gameta te međusobni kontakt dviju gameta jedinki suprotnog spola nekog organizma.

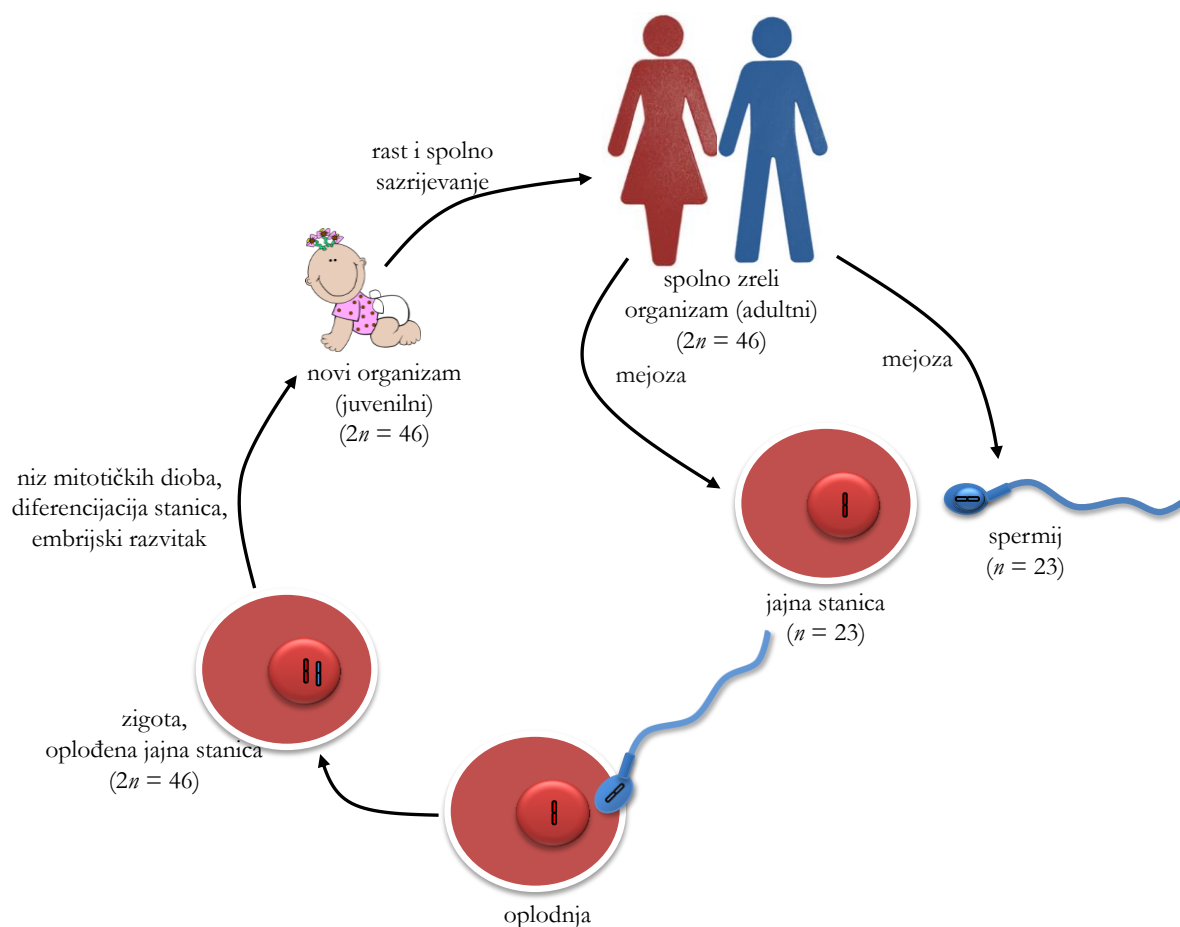
U sklopu ove vježbe govorit će se o spolnom razmnožavanju životinja i u tom kontekstu mejoza je dioba kojom nastaju gamete. Međutim, treba napomenuti da mejozom kod većine biljaka, algi, gljiva i protozoa nastaju **spore**, jednostanične haploidne nespolne stanice čija je uloga rasprostiranje i preživljavanje nepovoljnih uvjeta. Spore u biljaka, algi i gljiva nastaju u sporangijima, posebnim dijelovima sporofita (sporofit je, primjerice u biljaka, tijelo izgrađeno od diploidnih stanica). U povoljnim uvjetima mitotskim diobama spore nastaje višestanični haploidni gametofit koji će mitozom (a ne mejozom!) proizvesti gamete. Dvije gamete spojit će se u zigotu, koja se razvija u novi diploidni sporofit. Ovaj je ciklus poznat kao izmjena generacija i bit će detaljnije objašnjen u sklopu modula Biologija 2. **Bakterijske spore** služe za preživljavanje nepovoljnih uvjeta i nisu dio spolnog ciklusa.

Tjelesne (somatske) i spolne stanice

U organizmu koji se razmnožava spolnim putem razlikujemo dvije vrste stanica, a to su **tjelesne (somatske) stanice** nastale mitozom i **spolne stanice (gamete)** nastale mejozom. Za razliku od tjelesnih stanica koje izgrađuju najveći dio višestaničnog organizma, spolne stanice nekog organizma nastaju u specijaliziranim spolnim organima. Tjelesne stanice u jezgri sadržavaju određen broj kromosoma, koji je najčešće diploidan – $2n$ (vidi Poglavlje 10). Npr. tjelesna stanica čovjeka sadržava 46 kromosoma. Za razliku od tog gamete višestaničnih organizama imaju **haploidan**, n broj kromosoma. Haploidna stanica sadrži po jednu kopiju svakog kromosoma, odnosno ima jedan **kromosomski set**.

Gamete čovjeka, spermij i jajašce, imaju tako 23 kromosoma ($n = 23$). Sva 23 kromosoma

međusobno se razlikuju po veličini, obliku i svojstvima koje nose, dakle, nijedan kromosom nema svoj homologni par.



Slika 11. 2. Životni ciklus čovjeka. Radi jednostavnosti prikazan je samo jedan kromosom u haploidnim stanicama, odnosno jedan par homolognih kromosoma u diploidnoj zigoti. Izvor: autori.

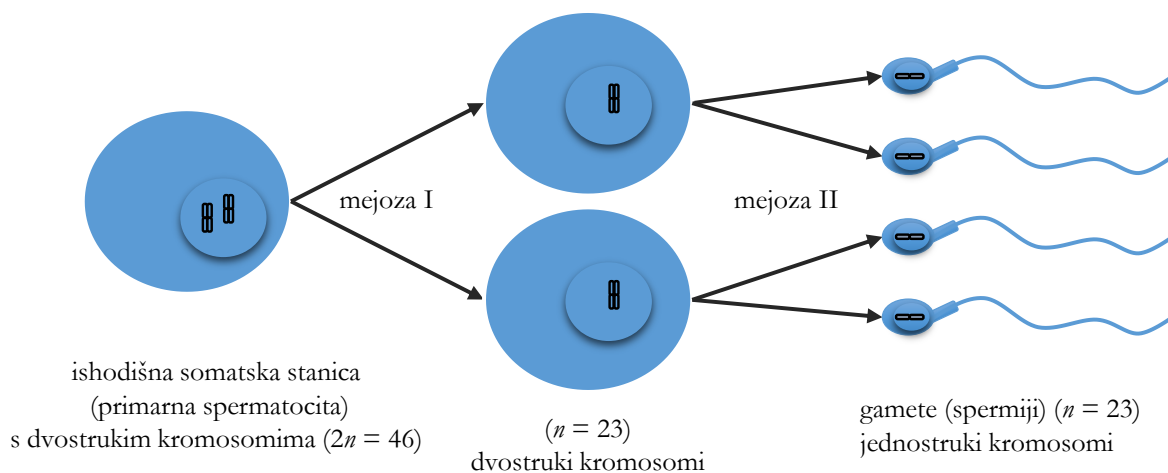
Spajanjem dvije haploidne gamete (ženske jajne stanice i muškog spermija) koje imaju polovični broj kromosoma nastat će oplodena jajna stanica **zigota** – diploidna stanica s 46 kromosoma, odnosno 22 para homolognih somatskih i jednim parom spolnih kromosoma (gonosoma), tj. stanica s dva seta kromosoma (pri spolnom razmnožavanju po jedan set kromosoma podrijetlom je od svakog roditelja). Ako se radi o višestaničnom organizmu, uzastopnim mitotskim diobama zigote nastaje niz stanica koje se diferenciraju (specijaliziraju za neku točno određenu funkciju) dok ne nastane odrasli organizam (Slika 11. 2).

Mejoza – redukcijska dioba

Mejoza je proces rezerviran samo za **specifične somatske stanice** (diploidne, $2n$) koje,

za razliku od svih drugih tjelesnih stanica, mogu ući u redukcijsku diobu – mejozu, kojom će kao rezultat nastati spolne stanice, gamete (haploidne, n).

Kao i kod mitoze, stanice iz kojih nastaju gamete prolaze stanični ciklus (Poglavlje 10). Period interfaze također se sastoji od G_1 -, S- i G_2 -faze, u kojima se zbivaju procesi slični onima u interfazi mitoze. Mejozi, kao i mitozu, prethodi replikacija kromosoma u S-fazi. Međutim, jedno udvostručavanje DNA, tj. kromosoma, slijede dvije uzastopne stanične diobe nazvane mejoza I i mejoza II (Slika 11. 3).



Slika 11. 3. Shematski prikaz mejotske diobe: nastanak četiriju haploidnih stanica iz jedne diploidne. Radi jednostavnosti prikazan je samo jedan kromosom u haploidnim stanicama, odnosno jedan par homolognih kromosoma u diploidnoj ishodišnoj stanici. Izvor: autori.

Mejoza I redukcijska je **dioba** jer njome iz stanice majke koja je diploidna nastaju dvije haploidne stanice kćeri (reducira se broj kromosoma s $2n$ na n). Za vrijeme te redukcijske diobe razdvajaju se homologni kromosomi u dvije različite stanice, o čemu će kasnije biti više riječi. **Mejoza II** slična je mitozu i tom diobom u konačnici nastaju četiri haploidne stanice (odvajaju se dvije sestrinske kromatide svakog dvostrukog kromosoma, što će također kasnije biti detaljno objašnjeno). Rezultat obiju mejotskih dioba jesu četiri nove stanice (u mitozu samo dvije) s upola manjim brojem kromosoma od ishodišne stanice.

Interfaza

Kao primjer pratit ćemo redukcijsku diobu kojom nastaje ljudska muška spolna stanica. U čovjeka somatska stanica ima diploidan broj kromosoma ($2n = 46$). Svaki se kromosom u G_1 -fazi sastoji od jedne molekule DNA. Dakle, kromosomi su jednostruki. Nakon replikacije u S-fazi stanica je i dalje diploidna ($2n = 46$), ali su kromosomi dvostruki, tj. svaki je izgrađen od dvije kromatide pa se u jezgri nalaze 92 molekule DNA.

Nakon S-faze slijedi G_2 -faza, a potom prva mejotska dioba. Zbivanja tijekom mnogih faza

mejoze slične odgovarajućim fazama mitoze. Obje su mejotske diobe, poput mitoze, podijeljene u četiri faze (profaza, metafaza, anafaza, telofaza). Na Slici 11. 5 shematski je prikazan skupni pregled događaja u stanici prilikom obiju mejotskih dioba.

Prva mejotska dioba (mejoza I)

Profaza I

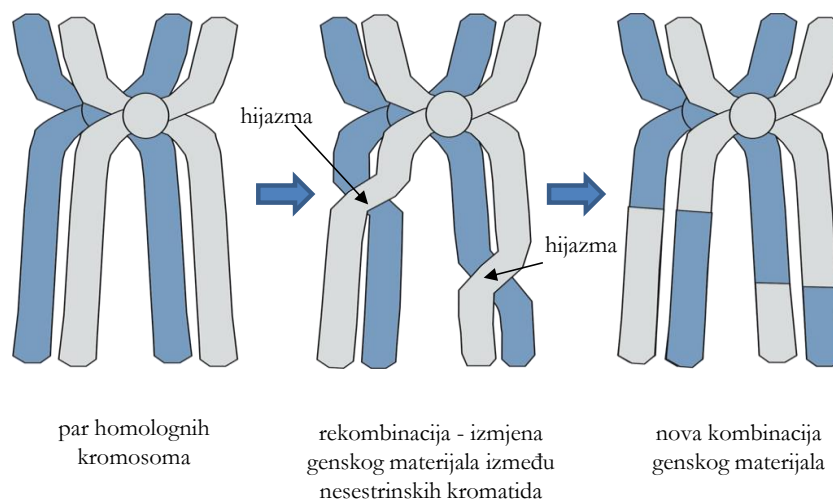
Prva mejotska dioba počinje profazom I. Mejotska profaza I traje duže od mitotske profaze (u muškarca nekoliko dana, tj. i do 90 % ukupnog trajanja mejoze I). Podijeljena je na pet potfaza: leptoten, zigoten, pahiten, diploten i diakinezu.

Kao i mitotska profaza, profaza I počinje kondenzacijom kromatina u jezgri pa u **leptotenu** kromosomi izgledaju poput klupka vrlo tankih, dugih niti. Ne razaznaju se sestrinske kromatide u kromosomu.

U **zigotenu** počinje uzdužno sparivanje homolognih kromosoma (**sinapsa**), pri čemu se određeno područje jednog kromosoma poklapa s istim područjem drugog kromosoma (npr. lokusom istovrsnog gena). Između dva homologna kromosoma razvija se proteinska struktura koja ih drži zajedno i koja se naziva **sinaptonemskim kompleksom**. Povezani par homolognih kromosoma zove se **tetrada** (jer se u jednom paru nalaze četiri kromatide) ili **bivalent** (jer se u jednom paru nalaze dva homologna kromosoma). Ova struktura ne postoji u mitozu, a nužna je za mejozu. Shematski prikaz dvostrukih homolognih kromosoma u strukturi bivalenta prikazan je na Slici 11. 5b. Udvostručeni kromosomi sve se više spiraliziraju i kondenziraju te postaju vidljivi pod mikroskopom.

U **pahitenu** je dovršeno sparivanje (sinapsa). Nakon što su stvoreni bivalenti dolazi do sljedećeg događaja ključnog za mejozu – stvaranja prekrštenja između dvije nesestrinske kromatide homolognih kromosoma. **Sestrinske kromatide** su kromatide *istog* dvostrukog kromosoma i one su međusobno identične po slijedu nukleotida jer su nastale replikacijom jedne molekule DNA. **Nesestrinske kromatide** su kromatide *različitih, ali homolognih* kromosoma i one imaju na istim mjestima (lokusima) gene za ista svojstva, ali ti geni ne nose nužno isti slijed nukleotida, tj. informacija za to svojstvo ne mora biti istovjetna u oba homologna kromosoma pa takve varijante gena zovemo **aleli**. Tako, primjerice, X-kromosomi u ženki mačke nose na određenom lokusu gen za boju krzna, ali na jednom se homolognom kromosomu može nalaziti informacija za žutu boju krzna, a na drugom za crnu boju krzna. To je preduvjet odvijanju **rekombinacije** (miješanja postojećeg genskog materijala homolognih kromosoma, čime nastaju nove kombinacije alela) između nesestrinskih kromatida. Taj se proces izmjene genskog materijala

između nesestrinskih kromatida zove i **crossing-over**. Kako dolazi do rekombinacije i što je njezin rezultat, prikazano je na Slici 11. 4. Prvo vidimo jedan homologni par kromosoma spojenih u strukturu bivalenta (lijevo). Nakon toga se stvaraju prekrیženja (u sredini). Na tim mjestima dolazi do izmjene genskog materijala između nesestrinskih kromatida. Vidljivo je da nakon rekombinacije genskog materijala nijedna kromatida nije identična drugoj (Slike 11. 4 i 11. 5c). Proces rekombinacije vrlo je važan jer njime nastaju nove *kombinacije* nasljednih svojstava. Nakon rekombinacije, budući da je to slučajan događaj, nijedna kromatida u bivalentu (tetradi) neće biti identična drugoj. U tom je jedan od izvora različitosti među pripadnicima iste vrste.



Slika 11. 4. Homologni par kromosoma i rekombinacija. Izvor: autori.

Nakon rekombinacije u pahitenu nastupa **diploten**, faza u kojoj se razgrađuju proteinske strukture sinaptonemskog kompleksa, ali prekrیženja nesestrinskih kromatida još se ne razdvajaju pa je veza između homologa, iako i dalje prisutna, slabija. Mjesta prekrیženja nesestrinskih kromatida sad su vidljiva u stanici (Slika 11. 5c) i nazivaju se **hijazmama**.

U kasnoj profazi I, tijekom **dijakineze**, kromosomi postaju još deblji i kraći, nestaje jezgrina ovojnica te se kao i u mitozu stvara diobeno vreteno sastavljeno od dva poluvretena (između dva **centrosoma** ako se radi o animalnoj stanici). Kinetohorni mikrotubuli vežu se za **kinetohore** što se nalaze na centromerama dvostrukih kromosoma, koji se još uvijek nalaze u strukturi bivalenta zahvaljujući hijazmama (na svakom su bivalentu dvije kinetohore, po jedna na centromeri svakog homologa).

Ako pratimo mušku stanicu u mejozi, u profazu I ulazi stanica s $2n = 46$ dvostrukih kromosoma (92 molekule DNA, 92 kromatide), koji će tijekom profaze I stvoriti parove sa svojim homologima pa će na kraju profaze I u stanici postojati 23 bivalenta ili tetrade, odnosno 23 homologna para.

Metafaza I

Tijekom metafaze I homologni se parovi nalaze u ekvatorijalnoj ravnini i to tako da se hijazme nalaze u metafaznoj ploči, a centromere dvostrukih kromosoma okrenute su prema polovima (Slika 11. 5d) (u metafazi mitoze centromere se nalaze u ekvatorijalnoj ravnini, a kromatide strše prema polovima, vidi Poglavlje 10). Kinetohore koje se nalaze na centromerama vezane su za mikrotubule diobenog vretena. Kromosomi su maksimalno spiralizirani.

Anafaza I

Tijekom anafaze I kinetohorni mikrotubuli se skraćuju te tako povlače i razdvajaju homologne kromosome iz strukture bivalenta. Kako svaki kromosom u bivalentu ima samo jednu kinetohoru, prema polovima stanice se povlače cijeli kromosomi pa je rezultat razdvajanje dva (haploidna) seta kromosoma (Slika 11. 5e). Svaki je kromosom još uvijek građen od dvije sestrinske kromatide koje se sada međusobno razlikuju zbog rekombinacije genskog materijala (crossing-over) tijekom pahitena (sestrinske su kromatide nastale replikacijom u S-fazi interfaze i tad su bile međusobno identične). Struktura tetrada nestaje, ali stanica i dalje ima $2n = 46$ dvostrukih kromosoma (92 molekule DNA, odnosno 92 kromatide). Polarne, nekinetohorne niti se produžuju i tako dodatno odguruju centrosome. Stanica se izdužuje i priprema na podjelu citoplazme.

Telofaza I

Tijekom telofaze I (Slika 11. 5f) dolazi do ponovnog nastanka jezgrine membrane oko svakog seta dvostrukih kromosoma, od kojih se svaki nalazi na jednom polu stanice. Kromosomi se despiraliziraju i na kraju dolazi do citokineze, odnosno raspodjele organela, citosola i ostalih staničnih struktura između budućih stanica kćeri. Kod animalnih stanica u području metafazne ploče, odnosno ekvatorijalne ravnine, doći će do konstrikcije stanične membrane, a kod biljnih stanica sa stijenkom do stvaranja fragmoplasta i stanične ploče te stvaranja nove stanične membrane i nove stanične stijenke (vidi Poglavlje 10). U dvije novonastale stanice nalazi se po jedan set homolognih kromosoma tako da su dvije novonastale stanice sad haploidne, n . Na primjeru ljudskih stanica na kraju telofaze I imat ćemo dvije stanice kćeri, od kojih će svaka imati haploidan broj dvostrukih kromosoma, $n = 23$ (46 molekula DNA i 46 kromatida).

Interfaza II

Kod nekih se vrsta između dvije mejotske diobe ponovno stvore jezgrina membrana i jezgrice te stanice prolaze oblik interfaze, ali *bez* udvostručavanja nasljednog materijala (tj. bez S-

faze – sva je DNA replicirana prije početka mejoze). Ta se vrsta interfaze naziva **interkinezom**. Ova faza traje jako kratko, a kod većine vrsta interkineze nema, već stanice odmah ulaze u novu diobu – mejozu II.

Druga mejotska dioba (mejoza II)

Druga mejotska dioba jako nalikuje mitozu.

Profaza II

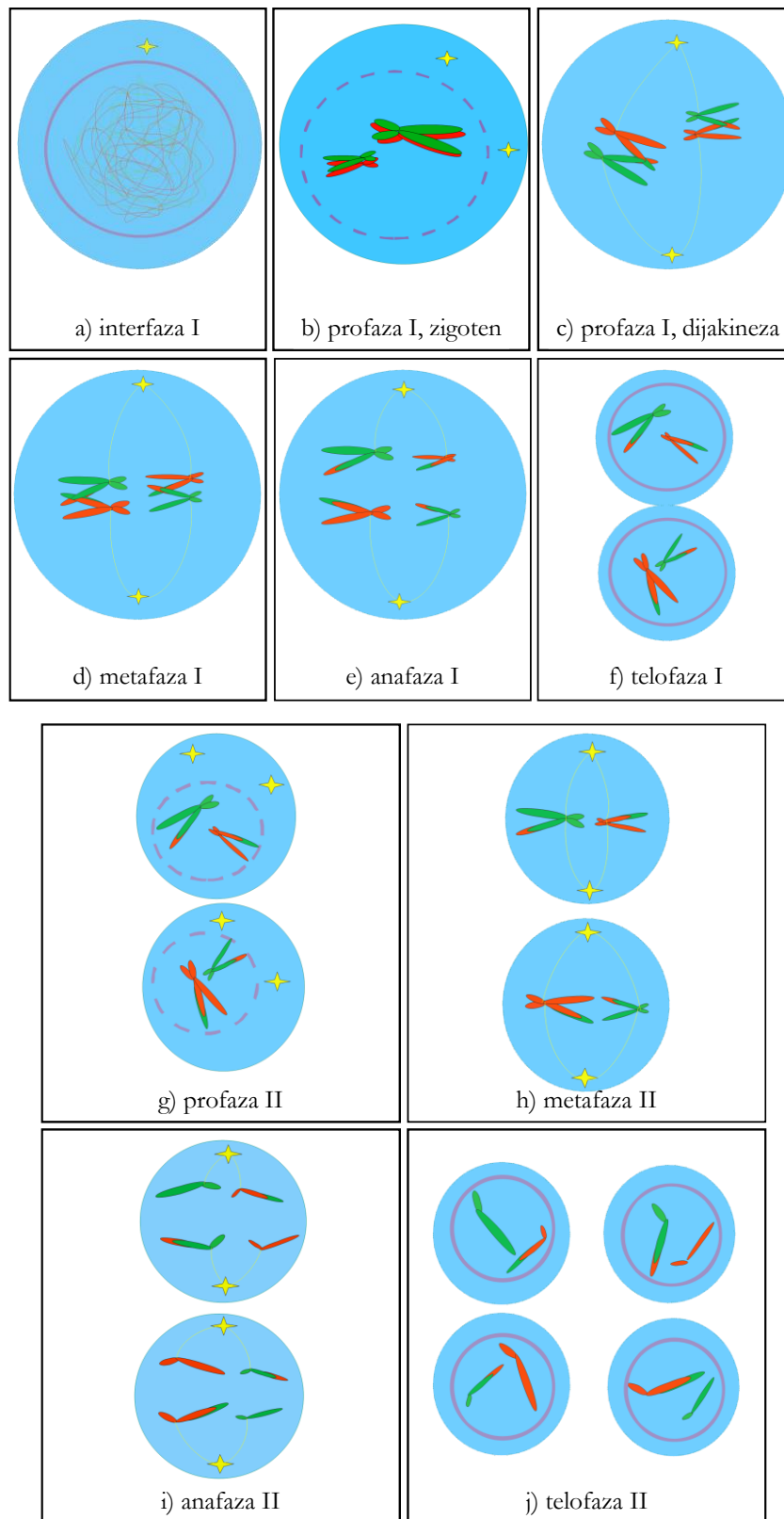
Kao i u profazi mitoze, kromosomi koji su se tijekom interfaze II despiralizirali počinju se ponovno kondenzirati te postaju vidljivi pod svjetlosnim mikroskopom. Na polovima stanice nalaze se centrosomi, a između njih se razvijaju dva diobena poluvretena, odnosno jedno diobeno vreteno. Jezgrina ovojnica i jezgrica nestaju (Slika 11. 5g). Dvije stanice kćeri iz mejoze I sadrže 23 dvostruka kromosoma, $n = 23$ (46 molekula DNA, odnosno 46 kromatida).

Metafaza II

Kromosomi su maksimalno spiralizirani, centromere se nalaze u ekvatorijalnoj ravnini, a kromatide su okrenute prema polovima (Slika 11. 5h) kao u metafazi mitoze. Za kinetohore koje se nalaze na centromerama dvostrukih kromosoma vežu se kinetohorni mikrotubuli diobnog vretena koji pomiču kromosome prema sredini stanice.

Anafaza II

Dvije se kromatide u strukturi dvostrukog kromosoma počinju razdvajati, čime kromosomi nisu više dvostruki, već svaka bivša kromatida postaje zasebni kromosom. Bivše kromatide, sada samostalni jednostruki kromosomi, počinju putovati prema polovima. U ovoj fazi stanica je ponovno diploidna (Slika 11. 5i) jer nepodijeljenom citoplazmom prema polovima stanice putuju dva seta jednostrukih kromosoma (u čovjeka, $n = 23 \times 2$, 46 molekula DNA). Kromatida više nema jer, prema konvenciji, o strukturi kromatida govorimo samo unutar dvostrukog kromosoma (kad su dvije molekule DNA spojene u području centromere). Na kraju



Slika 11. 5. Shematski prikaz pojedinih faza mejoze: od (a) do (f) mejoza I, od (g) do (j) mejoza II. U telofazi I i II se, radi jednostavnijeg praćenja diobe, vide kromosomi, iako se u stanici tad nalazi kromatin (koji je manje kondenziran od kromosoma). Isto tako, vidi se samo jedna nit diobenog vretena vezana za kinetohoru, iako je diobeno vreteno složenije građeno. Izvor: autori.

anafaze na svakom se polu nalazi jednak broj jednostrukih kromosoma. Ljudske stanice u anafazi II imaju $2n = 46$ jednostrukih kromosoma (46 molekula DNA).

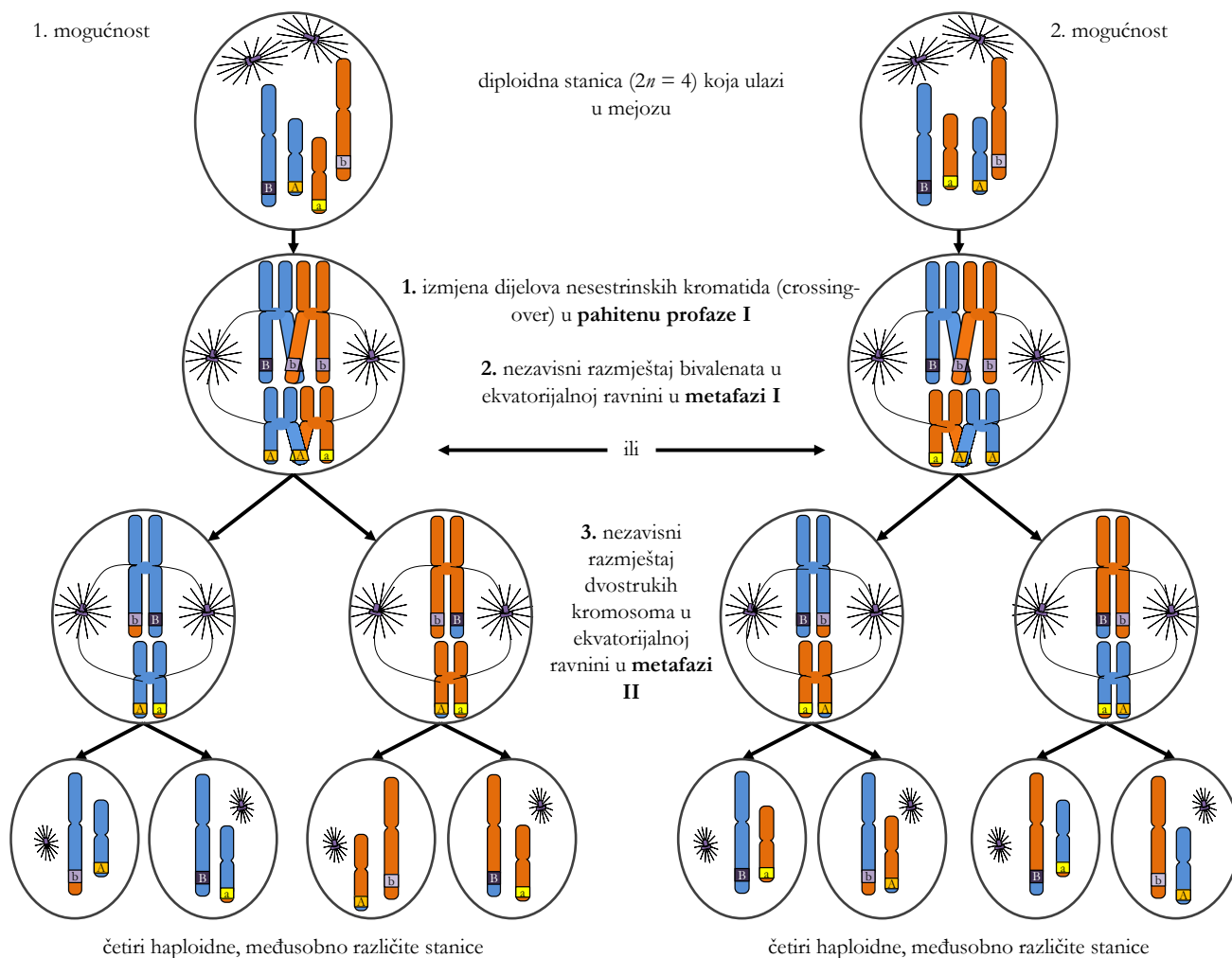
Telofaza II i citokineza

Tijekom telofaze II jednostruki se kromosomi nalaze na polovima stanica, oko njih se stvara jezgrina membrana, kromosomi se dekondenziraju, pojavljuje se jezgrica. Organele, citosol i druge stanične strukture raspoređuju se u buduće stanice kćeri (citokineza), a u području ekvatorijalne ravnine dolazi do konstrikcije stanične membrane. Dakle, kod muškarca iz svake od dvije stanice kćeri nastale I. mejotskom diobom nastaju još po dvije haploidne stanice s jednostrukim kromosomima (Slika 11. 5j). Drugim riječima, iz svake anafazne (diploidne) stanice s $2n = 46$ jednostrukih kromosoma nastat će po dvije haploidne stanice ($n = 23$ jednostruka kromosoma, odnosno 23 molekule DNA).

Izvori varijabilnosti gameta u mejozi

Iz gore navedenog teksta vidi se da su četiri stanice koje nastaju mejozom različite kako od ishodišne diploidne stanice, tako i međusobno. Od ishodišne se stanice razlikuju po količini nasljednog materijala (haploidne su, dok je ishodišna stanica bila diploidna). Osim toga, bitno je zapaziti da stanice kćeri nastale mejozom sadrže nove *kombinacije* gena koje nisu postojale kod ishodišne stanice. Te nove kombinacije gena posljedica su triju događaja tijekom mejoze (Slika 11. 6):

1. izmjene dijelova nesestrinskih kromatida (**crossing-over**) koja se događa u pahitenu profaze I;
2. nezavisnog razmještaja bivalenata u ekvatorijalnoj ravnini u metafazi I, što ima za posljedicu slučajnu raspodjelu homolognih kromosoma. Ova je pojava bitan uzročnik varijabilnosti gameta. Kod čovjeka ($2n = 46$) samo zahvaljujući nezavisnoj raspodjeli kromosoma može nastati $2^{23} = 8,388,608$ različitih gameta (broj različitih gameta računa se kao 2^n , gdje je n haploidan broj kromosoma). Dakle, i bez crossing-overa nezavisna raspodjela kromosoma uzrokovala bi velik broj različitih gameta. Crossing-over dodatno povećava ovu raznolikost;
3. nezavisnog razmještaja dvostrukih kromosoma u ekvatorijalnoj ravnini u metafazi II, što ima za posljedicu slučajnu raspodjelu sestrinskih kromatida (koje zbog crossing-overa više nisu nužno identične).



Slika 11. 6. Izvori varijabilnosti genetskog materijala tijekom mejoze. Prikazana je hipotetska stanica s $2n = 4$ kromosoma u kojoj se, tijekom pahitena, događa samo jedan crossing-over po bivalentu (1.). Bivalenti se u metafazi I orijentiraju u ekvatorijalnoj ravnini neovisno jedan o drugom te se u ovoj hipotetskoj stanici mogu orijentirati na dva načina (2.). Tijekom metafaze II dvostruki kromosomi također se nezavisno razmještaju u ekvatorijalnoj ravnini, što ima za posljedicu slučajnu raspodjelu sestrinskih kromatida (koje zbog crossing-overa više nisu nužno identične) (3.). Na ovoj slici nisu prikazane sve moguće kombinacije koje proizlaze iz nezavisnog razmještaja dvostrukih kromosoma u metafazi II. Izvor: autori.

Možemo zaključiti da je svrha mejoze nastanak haploidnih, međusobno različitih spolnih stanica. One omogućuju spolno razmnožavanje – spajanjem haploidnih gameta obnavlja se diploidan broj kromosoma roditelja (dakle, gamete moraju imati polovičan broj kromosoma kako ne bi dolazilo do udvostručavanja broja kromosoma u svakoj sljedećoj generaciji). Svaka gameta sadrži jedinstvenu kombinaciju gena. Bilo koja muška gameta može oploditi bilo koju žensku gametu, što se događa nasumično (**slučajna oplodnja**). Rezultat je toga da je svaka zigota (potomak) jedinstvena, što je i svrha spolnog razmnožavanja.

Nespolno razmnožavanje puno je brže od spolnog jer ne zahtijeva dvoje roditelja. Stoga

organizmi koji se nespolno razmnožavaju mogu vrlo brzo povećati brojnost svojih populacija. Međutim, budući da je varijabilnost nastalih jedinki vrlo niska (uzrokovana samo mutacijama DNA, koje su vrlo rijetke), sve su jedinke u populaciji podjednako ranjive. Stoga, ako dođe do promjene u okolišu (npr. pojava neke bolesti), čitava populacija može brzo biti uništena. (Iz tog razloga u brojnih vrsta koje u razmnožavanju koriste partenogenezu ne nastaju genski identični klonovi, već stanice iz kojih se razvijaju nove jedinke također prolaze mejozu s rekombinacijom nasljednog materijala, a eventualna oplodnja jajne stanice odvija se polocitama (stanice koje nastaju neravnomjernom citokinezom tijekom oogeneze, vidi Dodatak 2).

Nasuprot tomu spolno je razmnožavanje sporije i stvara se manji broj potomaka, ali su potomci međusobno različiti i samim tim ukupna je populacija otpornija na promjene okoliša (pojavi li se neka bolest, u raznolikoj populaciji naći će se jedinke otporne na nju).

ZADATCI ZA VJEŽBANJE (od ponuđenih, samo je jedan odgovor točan):

- 1) U mejozu je ušla stanica s 32 kromosoma. Što možete zaključiti?
 - a) Nakon završene mejoze I u svakoj novonastaloj stanici bila su po 32 jednostruka kromosoma.
 - b) U metafazi II bilo je 16 homolognih parova.
 - c) U profazi I ove mejoze bilo je 16 bivalenata.
 - d) Nakon završene mejoze I u svakoj novonastaloj stanici bilo je po 16 kromatida.
- 2) Diploidan je broj kromosoma kod čovjeka 46. Zaokružite točnu tvrdnju.
 - a) U gametama se nalazi 46 kromosoma.
 - b) U zigoti je jednak broj kromosoma kao i u somatskoj stanici.
 - c) U somatskim stanicama postoje 23 kromosoma.
 - d) U spermiju je broj kromosoma jednak onom u zigote.
- 3) Neka vrsta ima 12 parova homolognih kromosoma. Zaokružite točnu tvrdnju.
 - a) Somatske stanice imaju 12 kromosoma.
 - b) Nakon I. mejotske diobe nastale stanice imat će 12 kromosoma.
 - c) U anafazi II stanice će imati 12 kromosoma.
 - d) U metafazi II stanice će imati 12 tetrada.
- 4) Nakon završene mejoze I nastale su dvije stanice, svaka s 20 kromosoma. Može se zaključiti da je _____.
 - a) stanica koja je ušla u mejozu imala 20 dvostrukih kromosoma
 - b) u profazi I bilo 20 bivalenata
 - c) u profazi II bilo 20 bivalenata
 - d) nakon telofaze I u svakoj od dvije novonastale stanice bilo 40 kromosoma

- 5) Gamete neke vrste imaju 16 kromosoma. Što možete zaključiti?
 - a) Somatske stanice prije mejotske diobe imaju 16 kromosoma, kao i gamete.
 - b) Jajna stanica te vrste ima 8 tetrada.
 - c) Stanica koja je ušla u ovu mejotsku diobu imala je 32 kromatide.
 - d) Nakon II. mejotske diobe u stanici je 16 kromosoma.
- 6) Što je od navedenog netočno?
 - a) U mejozi se događaju jedna kariokineza i dvije citokineze.
 - b) Tijekom mejoze I dolazi do razdvajanja homolognih kromosoma koji su dvostruki.
 - c) U anafazi druge mejotske diobe razdvajaju se kromatide.
 - d) U diploidnim somatskim stanicama nalaze se dva seta kromosoma.

Zadatak 1: Simulacija promjena nasljednog materijala tijekom mejoze.

Pribor:

- plastelin
- bijela podloga (papir)

Postupak:

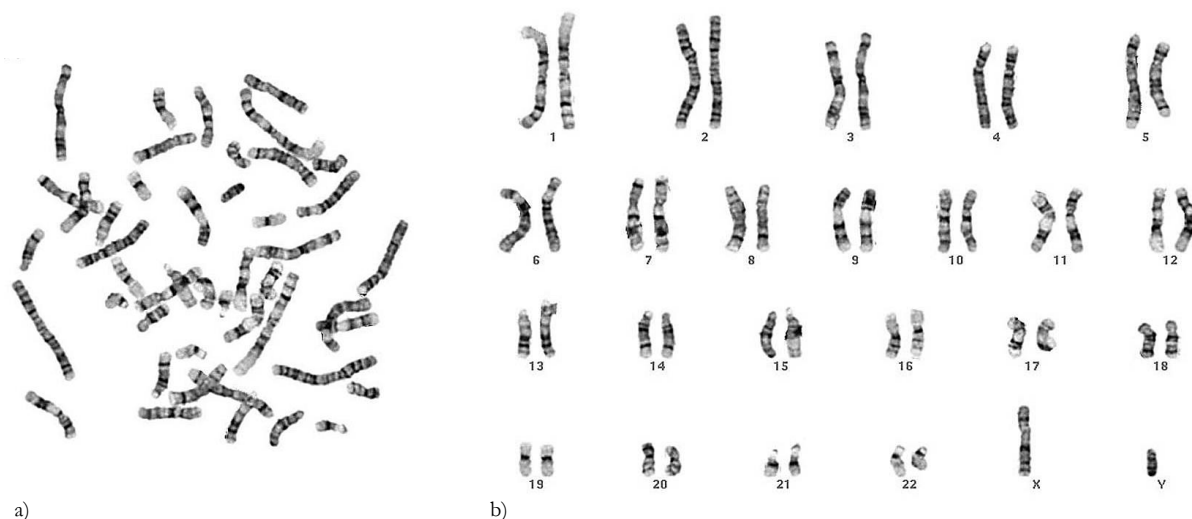
Izradite modele homolognih kromosoma od plastelina ($2n = 6$). Svaki set kromosoma izradite u drugoj boji (modele kromosoma izradite na podlozi od papira kako ne biste uprljali radni stol). Provedite uz pomoć modela kromosoma tu stanicu kroz obje mejotske diobe, prateći raspored kromosoma i građu genskog materijala u kromatidama/kromosomima.

Paralelno s izradom kromosoma od plastelina nacrtajte tri para kromosoma jedne diploidne somatske stanice nekog organizma predodređene za mejozu ($2n = 6$). Svaki set kromosoma nacrtajte u drugoj boji. Provedite tu stanicu kroz prvu i drugu mejotsku diobu, prateći raspored kromosoma i njihovu orijentaciju u stanici.

Nacrtajte sve faze mejoze i interfaze koja joj prethodi, počevši od G_1 -faze. Shematski naznačite promjene koje se događaju tijekom prve i druge mejotske diobe, s obzirom na promjenu broja kromosoma i broj stanica koje nastaju. Ne zaboravite na slici naznačiti crossing-over (recipročna rekombinacija genskog materijala) te pravilno nacrtati raspored kromosoma u prvoj i drugoj mejotskoj diobi. Uz svaku stanicu napišite stupanj ploidnosti, broj kromosoma, broj bivalenata te broj kromatida.

Kariotip i idiogram

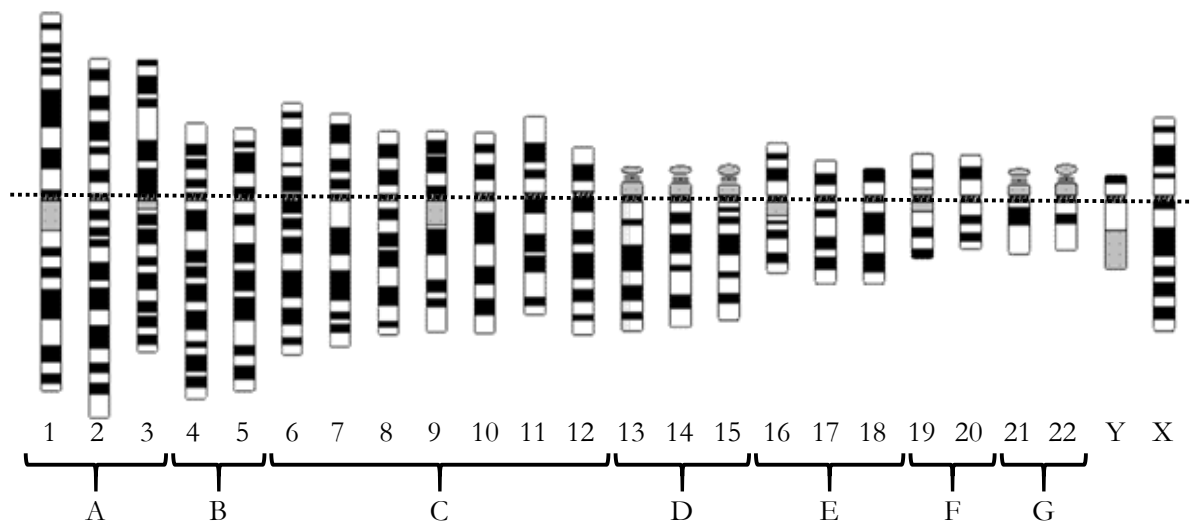
Kromosomi se međusobno razlikuju po veličini, strukturi, obliku, položaju centromere i informacijama koje nose. Zahvaljujući razlici u gustoći pakiranja, eukromatin i heterokromatin (vidi Poglavlje 7) različitim se intenzitetom označuju bojama specifičnim za DNA, čime nastaje karakterističan uzorak pruga na obojenim kromosomima. Nakon bojenja kromosoma lakše se pod mikroskopom uočavaju razlike među njima (Slika 11. 7).



Slika 11. 7. Kromosomi diploidne stanice muškarca. Svaki kromosom građen je od dvije kromatide koje su zalijepljene pa se čini da su kromosomi jednostruki. Označeni su bojama i tehnikom koja ističe pruge (G-pruge), a ne centromere. (a) Mikroskopska fotografija kromosoma u C-mitozi. (b) Kromosomi sa slike (a) poredani po obliku i veličini, odnosno ljudski kariotip (muškarca). Izvor: Department of Pathology, University of Washington, 2016.

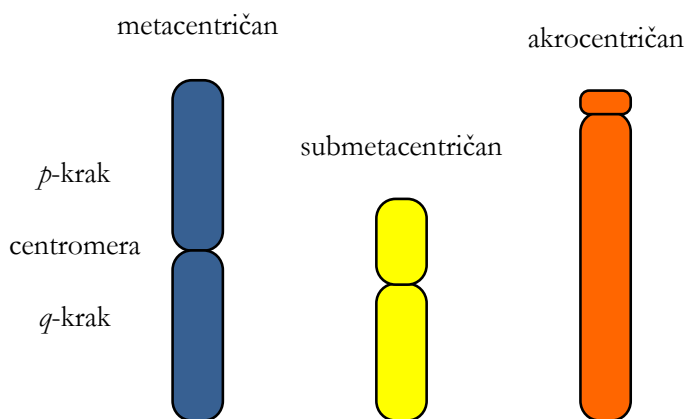
Kako bi se mogli utvrditi mogući defekti u broju i izgledu kromosoma, potrebno je izraditi **kariotip**, kromosomsku sliku organizma, koji čine mikroskopske fotografije kromosoma poredane (klasificirane) po obliku i veličini – od najvećeg prema najmanjem tjelesnom kromosomu (autosomu), a na kraju gonosomi (spolni kromosomi, X i Y) (objašnjenje pojmova autosom i gonosom slijedi dalje u tekstu). Pri izradi kariotipa koriste se stanice u C-mitozi (Slika 11. 7a). **C-mitoza** je posebni oblik mitoze (u eksperimentalnim uvjetima) pri kojem ne funkcionira diobeno vreteno pa su kromosomi u metafazi raspršeni, a ne pravilno posloženi u ekvatorijalnu ravninu. Stvaranje niti diobenog vretena blokira se djelovanjem citostatika, najčešće kolhicinom, pa se stoga i naziva C-mitozom. Za izradu kariotipa uzimaju se stanice u metafazi jer su tad kromosomi maksimalno kondenzirani, tj. mogu se najbolje vidjeti i razlikovati na mikroskopskoj slici. Napravi se mikroskopska fotografija kromosoma, a računalo sparuje slike homologa (parovi homolognih kromosoma) i slaže ih po veličini u kariotip (Slika 11. 7b).

Shematski, grafički prikaz kariotipa zove se **idiogram**. Dakle, u kariotipu su prikazane po veličini i strukturi posložene mikroskopske fotografije parova kromosoma (Slika 11. 7b), a u idiogramu crteži kromosoma napravljeni prema kariotipu (Slika 11. 8).



Slika 11. 8. Ljudski idiogram. Prikazan je haploidni set kromosoma muškarca s istaknutim G-prugama. Prema veličini i položaju centromere (područje centromera označeno točkastom linijom) podijeljeni su u 7 skupina, od A do G. Na akrocentričnim kromosomima 13-15 i 21-22 vidljivo je sekundarno suženje. X-kromosom pripada C-skupini, a Y-kromosom G-skupini. Prilagođeno prema: Department of Pathology, University of Washington, 2016.

Morfološki se kromosomi dijele prema položaju centromere (Slika 11. 9). Prema konvenciji, duži se krak kromosoma naziva *q*, a kraći *p* („*p*“ prema francuskoj riječi *petit*, što znači malen, a „*q*“ jer po abecedi slijedi nakon „*p*“). **Metacentrični** kromosomi imaju *p*- i *q*-krak približno jednake duljine (primjerice, kromosom 1, Slike 11. 8 i 11. 9), kod **submetacentričnih** je *p*-krak puno kraći od *q*-kraka (primjerice, kromosom 2), a kod **akrocentričnih** je *p*-krak toliko kratak da se gotovo i ne vidi (kromosom 13, Slike 11. 8 i 11. 9). Neke vrste, recimo miš (ali ne čovjek), imaju **telocentrične** kromosome kod kojih je centromera smještena na samom kraju kromosoma.



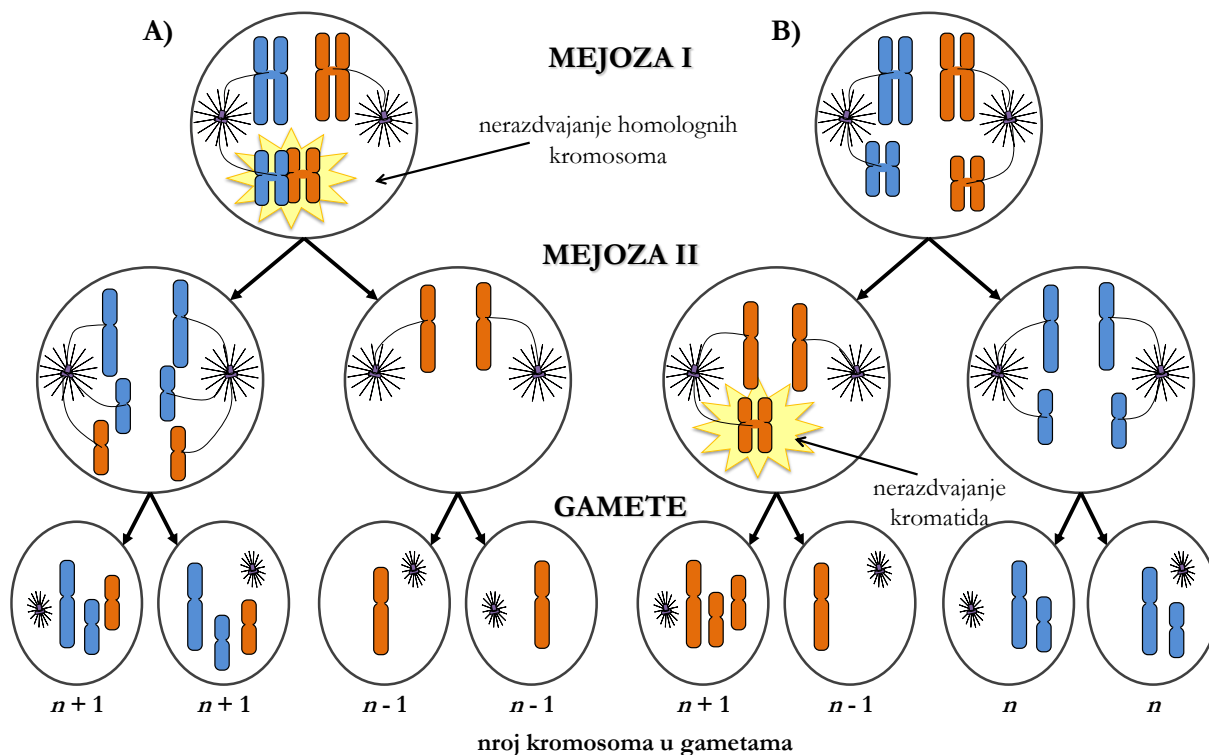
Slika 11. 9. Morfologija kromosoma prema položaju centromere. Izvor: autori.

Ljudski (humani) kariotip

Ljudska somatska stanica sadrži 46 kromosoma. **Spolni kromosomi** ili **gonosomi** par su kromosoma koji određuje spol osobe. Žene imaju par homolognih kromosoma nazvanih X-kromosomi (XX), a muškarci imaju jedan X- i jedan Y-kromosom (XY). Svi ostali kromosomi nazivaju se **tjelesnim (somatskim) kromosomima** ili **autosomima**. Tako u ljudskim somatskim stanicama koje imaju 46 kromosoma ($2n = 46$) govorimo o 22 para homolognih autosoma i jednom paru spolnih kromosoma (gonosoma) – X i Y. U ljudskom kariotipu autosomi su označeni brojevima od 1 do 22 (Slike 11. 7b i 11. 8). Dakle, ljudski kariotip sastoji se od 23 kromosomska para poredana u 7 skupina prema veličini i smještaju centromera (A – G, Slika 11. 8).

Promjene broja kromosoma – poliploidija i aneuploidija

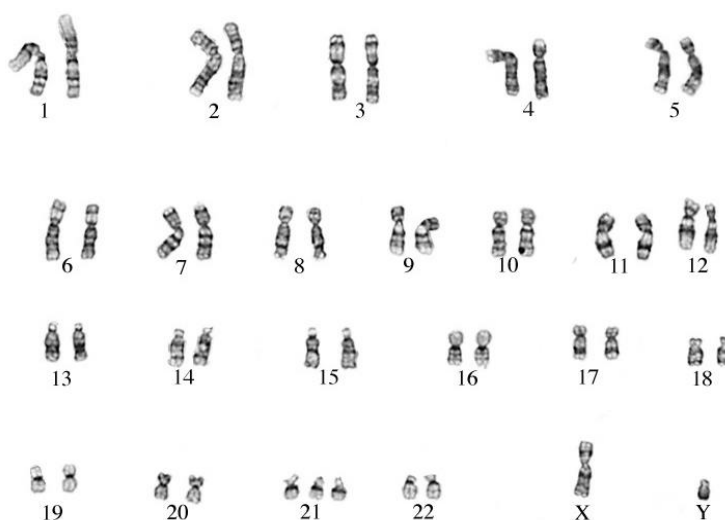
Pravilno funkcioniranje obiju mejotskih dioba nužno je za pravilnu raspodjelu nasljednog materijala u sve četiri novonastale haploidne stanice. Oštećenja nasljednog materijala u spolnim stanicama ili u somatskim stanicama prije nego uđu u mejozu mogu dovesti do pojave genskih poremećaja. Najčešća je greška koja se može dogoditi tijekom mejoze nepravilna raspodjela kromosoma tijekom prve ili druge mejotske diobe. To uzrokuje povećan ili smanjen broj pojedinačnih kromosoma kod potomaka. Ako je došlo do nepravilne raspodjele kromosoma prilikom diobe, tako nastala spolna stanica može sadržavati dvije kopije istog kromosoma (umjesto uobičajene jedne kopije). Ako se takva stanica oplodi s drugom spolnom stanicom koja je nastala pravilnom raspodjelom genskog materijala, zigota, odnosno jedinka koja će nastati iz te zigote, imat će u svim stanicama taj određeni kromosom u tri kopije. Na Slici 11. 10 vidi se da je bitno da se pravilna raspodjela nasljednog materijala odvija i u prvoj i u drugoj mejotskoj diobi. Nepravilno odjeljivanje dvostrukih kromosoma iz strukture tetrađa prilikom prve mejotske diobe rezultira time da dvije stanice na kraju druge mejotske diobe imaju dvije kopije istovrsnog kromosoma ($n + 1$), dok ga druge dvije stanice uopće nemaju ($n - 1$). U slučaju da prva mejotska dioba teče pravilno, no u drugoj mejotskoj diobi u jednoj od stanica ne dođe do odjeljivanja jednostrukih kromosoma iz strukture dvostrukih kromosoma, dioba rezultira time da u jednoj haploidnoj stanici na kraju mejoze II postoje dvije kopije istovrsnog kromosoma ($n + 1$), a u drugoj stanici tog kromosoma uopće nema ($n - 1$). Preostale dvije gamete nastale ovom mejozom imaju normalan broj kromosoma (n).



Slika 11. 10. Posljedice nepravilne raspodjele kromosoma u (a) prvoj ili (b) drugoj mejotskoj diobi.
Izvor: autori.

Tako nepravilne stanične diobe uzrokuju promjene u broju pojedinačnih kromosoma zvane **aneuploidije**. Ako npr. dođe do oplodnje jajne stanice s dvije kopije kromosoma 21 s normalnim spermijem koji sadržava po jednu kopiju svih kromosoma, doći će do trisomije kromosoma 21 u novonastaloj zigoti. Dijete koje će se roditi patit će od Downova sindroma. Kako izgleda kariotip takvog djeteta, prikazano je na Slici 11. 11.

Drugi je tip anomalije broja kromosoma, uz aneuploidiju, **poliploidija**. Ta pojava podrazumijeva da organizam ima više od dva seta homolognih kromosoma pa jedna stanica više ne sadrži 2, već 3,



Slika 11. 11. Kariotip osobe s Downovim sindromom – trisomija 21. Svaki kromosom građen je od dvije kromatide koje su zalijepljene pa se čini da su kromosomi jednostruki. Izvor: Wisconsin State Laboratory of Hygiene, 1998.

4 ili više setova. Poliploidne stanice mogu biti triploidne (3 seta kromosoma), tetraploidne (4 seta kromosoma), pentaploidne (5), heksaploidne (6) itd. Iako poliploidija postoji kao normalno stanje u prirodi (posebno je česta kod biljaka, a javlja se i kod nekih životinja, iako vrlo rijetko), za ljude je to letalno stanje. Do nje može doći zbog grešaka u funkcioniranju diobenog vretena (koje mogu biti uzrokovane nekim kemikalijama, primjerice kolhicinom), što ima za posljedicu nerazdvajanje cijelih kromosomskih setova. Tako nastale gamete nisu haploidne, već imaju više setova kromosoma i nakon oplodnje daju triploidne ili tetraploidne organizme. Nadalje, triploidija često nastaje kad dva spermija istovremeno oplode isto jajašce (polispermija) i javlja se u otprilike 2-3 % trudnoća i ~15 % pobačaja. Velika većina triploidnih začeca završi pobačajem, a zametci koji prežive obično umru brzo nakon poroda.

Ranije opisana tehnika slaganja kariotipa korisna je za utvrđivanje mogućih defekata u broju (i morfologiji) kromosoma u npr. uzorku plodne vode koji sadrži stanice fetusa (amniocenteza). Tako se može utvrditi je li broj i izgled (morfologija) svih kromosoma fetusa u redu.

Kod ljudi je aneuploidija puno češća od poliploidije. Najčešći su oblici aneuploidije **monosomija** (u jezgri postoji samo jedan kromosom iz određenog para) i **trisomija** (umjesto 2, u jezgri se nalaze 3 homologna kromosoma). Navest ćemo najčešće oblike aneuploidije kod ljudi.

1. Monosomije:

- Turnerov sindrom – Žena koja umjesto dva X-kromosoma ima samo jedan (45, X0). Osobe kod kojih postoje ženska spolna obilježja, ali su slabije razvijena. Sterilne.
- Sindrom mačjeg plača (franc. *cri du chat*) – Monosomija kromosoma 5. Plač oboljele novorođenčadi zvuči kao mačji zbog malformacija grkljana.

2. Može se pojaviti trisomija bilo kojeg kromosoma i, poput većine drugih abnormalnosti broja kromosoma, uzrokovati ozbiljna mentalna i tjelesna oštećenja te smrt. Većina trisomija završi spontanim pobačajem. Najčešće i najpoznatije trisomije:

a) Trisomije autosoma:

- Warkanyjev sindrom 2 – Trisomija kromosoma 8. Zbog teških deformacija ploda ova je trisomija čest uzrok spontanih pobačaja.
- Trisomija kromosoma 9 – Simptomi su različiti, ali najčešća su oštećenja lubanje i živčanog sustava te mentalna retardacija.
- Patauov sindrom – Trisomija kromosoma 13. Većina se embrija spontano pobaci, a ostali rijetko preživljavaju duže od godine dana.
- Edwardsov sindrom – Trisomija kromosoma 18. Stopa preživljenja je vrlo niska. Oko

50 % ih umire u maternici (intrauterino), a ostali većinom ne žive duže od jedne godine.

- Downov sindrom – Trisomija kromosoma 21. Osim specifičnih tjelesnih karakteristika (spljoštena lubanja, vertikalni nabor oka (epikantus), koji daje karakterističan izgled, jedna poprečna brazda na dlanu umjesto dvije, veliki prostor između nožnog palca i drugog prsta, veliki jezik, hipotonična muskulatura), prisutna je blaga do umjerena mentalna retardacija.
- b) Trisomije gonosoma:
- XXX-sindrom – Žene koje obično nemaju posebnih fizičkih obilježja ili medicinskih problema.
 - Klinefelterov sindrom (XXY) – Muškarci. Obično smanjene fertiliteti.
 - XYY-sindrom – Muškarci koji nemaju posebnih fizičkih obilježja ili medicinskih problema.

Osim što greške u radu diobenog vretena mogu nastati prilikom stvaranja gameta u mejotskoj diobi, mogu se javiti i pri diobama stanica ranog embrija (u mitotskim diobama). Takva će jedinka, ako preživi, imati mozaični kariotip (npr. stanice s normalnim brojem nekog kromosoma i stanice s monosomijom ili trisomijom istog kromosoma).

Zadatak 2: Slaganje ljudskog kariotipa.

Pribor:

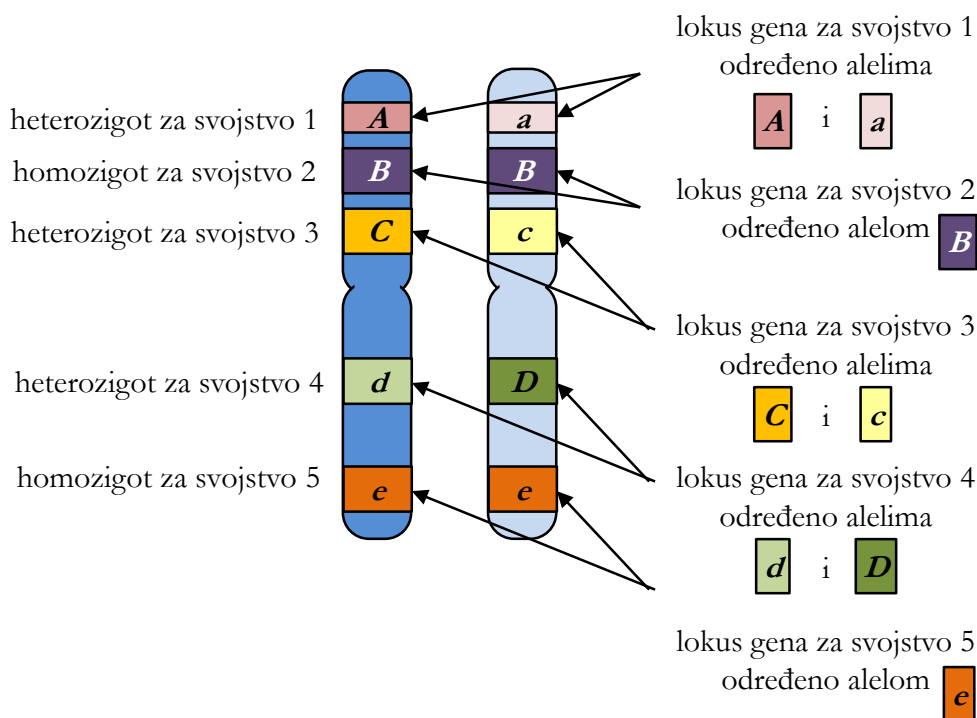
- mikroskopska slika kromosoma u C- mitozi
- škare
- ljepilo

Složite kariotip tako da izrežete kromosome iz dobivene mikroskopske slike kromosoma u C-mitozi i zalijepite ih uz odgovarajući homolog. Prilikom sparivanja homologa obratite pozornost na veličinu kromosoma, položaj centromere i uzorak tamnih i svijetlih pruga na njima. Rezultat provjerite na Slici 11. 7 i zalijepite u bilježnicu. Je li „uzorak“ koji ste imali pripadao muškoj ili ženskoj osobi? Radi li se o zdravoj osobi ili ste pronašli genski poremećaj? Ako ste našli poremećaj broja kromosoma, opišite ga ukratko uz pomoć gore navedenih primjera!

12. MENDELOVI ZAKONI NASLJEĐIVANJA – OSNOVE GENETIČKIH KRIŽANJA

Gregor Johann Mendel (1822. – 1884.) austrijski je svećenik koji je otkrio osnovne zakone nasljeđivanja iako tada nije bilo poznato kako se prenosi uputa za značajke s roditelja na potomke. Danas znamo da su nositelji nasljednih svojstava geni koji se nalaze na kromosomima pa još jednom ponovimo osnovne pojmove vezane uz gene i nasljeđivanje.

- **Gen** se najčešće definira kao *osnovna jedinica nasljeđivanja*. To je kodirajući odsječak molekule DNA koji nosi informaciju za sintezu određenog proteina ili funkcionalne RNA.
- U jezgrama eukariotskih stanica nalazi se veći broj linearnih molekula DNA. One su u interfazi staničnog ciklusa relativno razmotane (dekondenzirane) i, zajedno s histonskim i nehistskim proteinima, tvore **kromatin**. Za vrijeme stanične diobe (mitoze ili mejoze) svaka se linearna molekula DNA kondenzira u **kromosom**.
- U diploidnoj stanici kromosomi dolaze u parovima. Po dva kromosoma jednake su dužine, centromere su im na istom mjestu i nose gene za ista svojstva na istim položajima duž kromosoma (Slika 12. 1). Takva dva kromosoma nazivamo **homolognim kromosomima**, a čitava je stanica (budući da ima dva *seta* kromosoma, odnosno po dva od svakog homolognog kromosoma) **diploidna**, što označujemo s **$2n$** ; n predstavlja broj kromosoma u pojedinom setu (npr. kod čovjeka $n = 23$, $2n = 46$). Za stanicu u kojoj svaki homologni kromosom dolazi u samo jednom primjerku, odnosno stanicu koja ima jedan set kromosoma, kažemo da je **haploidna**, n .



Slika 12. 1. Par homolognih (jednostrukih) kromosoma s pet lokusa, odnosno pet parova alela (A , a , B , B , C , c , d , D i e , e). *Lokus* je položaj alela na kromosomu. Izvor: autori.

- Svaki diploidni organizam ima po dva gena za isto svojstvo koji se nazivaju **alelima** (Slika 12. 1). Oni se uvijek nalaze na paru homolognih kromosoma, po jedan alel na svakom kromosomu. Nadalje, uvijek se nalaze na točno određenom položaju (**lokusu**) na homolognim kromosomima. Aleli su varijante gena, odnosno linearni odsjeci molekule DNA koji mogu imati identičan slijed nukleotida (pa ih onda označujemo istim slovom, npr. B), ili se njihovi sljedovi nukleotida mogu međusobno manje ili više razlikovati (pa ih onda označujemo različitim simbolima, npr. velikim i malim slovom: A i a).
- Ako organizam ima dva ista alela za neko svojstvo, kažemo da je **homozigot** (npr. BB ili bb) za to svojstvo, a ako ima dva različita alela, kažemo da je **heterozigot** (npr. Aa , Cc ili Dd) (Slika 12. 1).
- U genetici je potrebno razlikovati dva pojma: genotip i fenotip. **Genotip** predstavlja točan set gena, odnosno alela koje jedinka posjeduje. Za dva organizma čiji se geni razlikuju na samo jednom lokusu kažemo da imaju različit genotip. Genotip je, dakle, potpuna nasljedna informacija organizma. **Fenotip**, s druge strane, predstavlja ukupni izražaj morfoloških i fizioloških svojstava organizma, odnosno konkretna fizička svojstva organizma, kao što su visina, težina, boja kose itd. Kako ćemo vidjeti, jedinke s istim fenotipom mogu imati različit genotip.

- S obzirom da diploidan organizam ima dva alela za neko svojstvo, fenotipski izražaj tog svojstva ovisi o njihovom međusobnom odnosu. Najčešći je odnos alela dominantno-recesivan. Jedan je alel dominantan, a drugi recesivan ako, kad su prisutni zajedno u heterozigotu, učinak dominantnog alela maskira učinak recesivnog. Dakle, **dominantni alel** maskira ekspresiju recesivnog, odnosno kodira za protein koji je zaslužan za vidljivu ekspresiju neke osobine. Npr. alel za tamnu boju očiju u ljudi kodira za protein (enzim) čija aktivnost ima za posljedicu prisutnost tamnog pigmenta (eumelanina) u šarenici oka. Ako je alel za boju očiju na homolognom kromosomu recesivan, on nosi informaciju za enzim koji će proizvesti svjetliji pigment (feomelanin) koji je „skriven“ tamnim pigmentom, produktom dominantnog alela. Stoga heterozigoti za ovo svojstvo imaju tamne oči. Ekspresija **recesivnog alela** vidljiva je samo kad osoba ima oba recesivna alela (recesivni homozigot). Tad osoba ima svijetle oči.
- Osim dominantno-recesivnog odnosa alela, taj odnos može biti i **kodominantan**. Tad se u fenotipu heterozigota izražavaju značajke određene obama alelima. Primjer su kodominacije aleli I^A i I^B kod krvnih grupa sustava AB0 u čovjeka (detaljno objašnjenje vidi u Poglavlju 14).
- Na kraju ističemo nekoliko pravila koja se koriste u genetičkim istraživanjima i čije će vam poznavanje olakšati rješavanje zadataka.
 - Prema konvenciji, geni i aleli označuju se kurzivom (*italic*, npr. alel *C*), a njihovi produkti (proteini) istim slovom, ali bez kurziva (protein *C*).
 - Također, prema konvenciji, dominantni se alel označuje velikim slovom (npr. *A*), a recesivan malim (npr. *a*). Drugi način označivanja češće se koristi kad postoji *više od dva alela za neko svojstvo u populaciji*. (Obratite pozornost na to da jedan diploidni organizam uvijek ima dva alela za neko svojstvo, ali u čitavoj populaciji može biti više od dva različita alela za to svojstvo i tad govorimo o multiplim alelima, o čemu će biti više riječi u Poglavlju 14). U tom se slučaju dominantan alel označuje s + (npr. genotip vinske mušice crvenih očiju, odnosno normalna, divljeg tipa, označuje se s ++), a recesivni se aleli označuju prvim slovom riječi koja opisuje fenotip (npr. *w* za bijele oči vinske mušice prema engl. *white*). Aleli ostalih fenotipova za isto svojstvo označuju se istim slovom, ali se u eksponentu naznači pobliža oznaka tog fenotipa (npr. w^e , eozin crvene oči, w^a , oči boje marelice prema engl. *apricot*). Geni koji se nalaze na spolnim kromosomima, X i Y, obično se označuju ovako: X^w za recesivni alel koji određuje bijelu boju očiju (engl. *white eyes*)

kod vinske mušice i nalazi se na X-kromosomu.

- U heterozigotima uvijek se prvo piše oznaka dominantne značajke, a zatim recesivne (npr. Aa , X^+X^w , $+w$ ili w^+w , ali ne aA , X^wX^+ , $w+$ ili ww^+).
- Diploidna jedinka ima po dva alela za svako svojstvo. Ako se prate četiri različita svojstva, genotip te jedinke označuje se tako da se napišu oba alela za prvo svojstvo pa za drugo itd. (npr. $aaBbCCDd$). Ovo pravilo vrijedi samo ako je riječ o genima koji se nalaze na različitim kromosomima (u ovom primjeru, na četiri različita homologna para).
- Ako u zadatku nije posebno istaknut genotip ili fenotip za neko svojstvo, podrazumijeva se da je riječ o dominantnom homozigotu za to svojstvo.

Gregor Mendel je od 1858. do 1866. godine uzgajao i križao grašak u vrtu svog samostana i analizirao potomstvo. Dobivene rezultate statistički je obradio i na temelju tih analiza formulirao dva genetička zakona koji opisuju kako se svojstva prenose iz jedne generacije u drugu. Mendelovi su zakoni:



1. **Zakon segregacije:** prilikom stvaranja gameta parovi alela za *isto* svojstvo neovisno se razdvajaju u različite gamete;
2. **Zakon nezavisnog nasljeđivanja:** aleli za *jedno* svojstvo razdvajaju se u gamete neovisno o alelima za *drugo* svojstvo.

Opisao je također kako se svojstva izražavaju u jedinkama te uveo termine dominantan i recesivan.

Kod istraživanja nasljeđivanja vrše se *križanja*. Mendel je križao grašak, a iste tipove križanja može se provesti i na drugim modelnim organizmima pa tako i na vinskoj mušici.

Monohibridno križanje

Kod monohibridnog križanja *prati se nasljeđivanje jednog svojstva* kroz generacije. Primijetite da se, iako istraživani organizmi imaju sva različita fenotipska svojstva, kod monohibridnog križanja odabere *jedno* svojstvo, npr. boja zrna graška, i prati se nasljeđivanje tog svojstva kroz generacije.

U sljedećem primjeru bit će prikazano monohibridno križanje u kojem će se pratiti nasljeđivanje boje zrna graška. Zrna graška mogu biti žuta  i zelena . Žuta boja zrna određena je dominantnim alelom A , a zelena recesivnim alelom a . Važno je primijetiti da, s

obzirom na ovo svojstvo, jedinke graška mogu imati dva različita fenotipa: žuto zrno i zeleno zrno. Nadalje, moguća su tri različita genotipa: AA (dominanti homozigot), Aa (heterozigot) i aa (recesivni homozigot), od kojih prva dva daju žuti fenotip, a genotip aa zeleni.

Kod prikaza križanja prvo se ispiše genotip roditelja (jedinke parentalne, roditeljske, generacije, P). Oznakom \times naznačuje se da se radi o križanju. U dolje prikazanom slučaju križaju se dvije jedinke graška: jedan roditelj ima žuto zrno (fenotip) i genotip AA (dominantni homozigot), a drugi zeleno zrno (fenotip) i genotip aa (recesivni homozigot).



Nakon tog odrede se sve moguće vrste gameta koje takvi roditelji mogu proizvesti. Prisjetite se da gamete nastaju mejozom (Poglavlje 11) i da su stoga haploidne, odnosno da u njima ostaje samo jedan set kromosoma, po jedan od svakog homolognog para kromosoma, a time i po jedan alel za svako svojstvo. Dakle, s obzirom na promatrane alele za boju zrna, jedinka AA može dati samo jedan tip gameta – gamete koje nose alel A , a jedinka aa daje gamete koje nose alel a :



Prilikom oplodnje gamete se spajaju u $2n$ zigotu iz koje se brojnim mitotskim diobama razvije nova jedinka. Jedinke nastale križanjem roditeljske (P) generacije njihovi su izravni potomci te se označuju s F_1 , jedinke prve filijalne generacije (prema lat. *filialis*, od potomaka), gdje indeks iza slova F označuje broj generacije iz koje potječu potomci (F_1 – prva filijalna generacija, F_2 – druga itd.). Kao rezultat gore navedenog križanja, odnosno spajanja gameta s obzirom na promatrano svojstvo, može nastati samo jedna kombinacija alela:



Dakle, sve jedinke (100 %) u F_1 -generaciji imat će dominantni fenotip (žuto zrno) i bit će heterozigoti za promatrano svojstvo.

Ako križamo jedinke iz F_1 -generacije međusobno ili dopustimo samooplodnju (primjerice, u graška), dobit ćemo F_2 -generaciju.

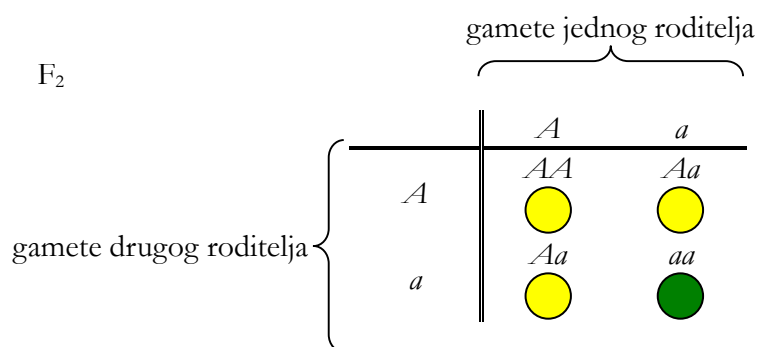


Heterozigoti s obzirom na promatrano svojstvo stvaraju dvije vrste gameta s jednakom

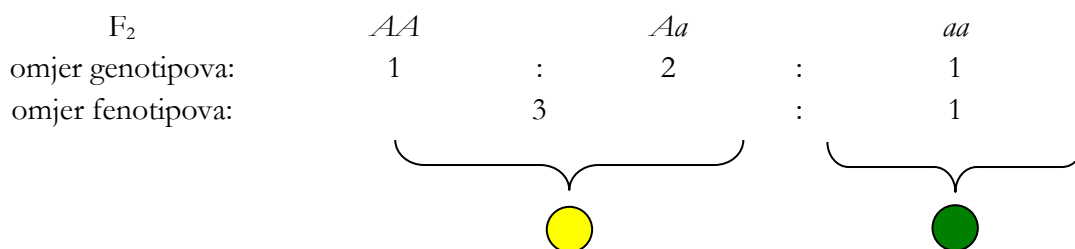
učestalošću: polovica gameta nosi alel A , a druga polovica alel a (1. Mendelov zakon: Zakon segregacije!). Moguće gamete koje proizvode jedinke iz F_1 jesu:

gamete A, a A, a

Prilikom oplodnje dolazi do nasumičnog kombiniranja, odnosno spajanja, gameta roditelja. Moguće kombinacije gameta najlakše se odrede uz pomoć tzv. **Punnettova kvadrata**:



Dakle, u drugoj filijalnoj, F_2 , generaciji očekujemo sljedeće omjere kod potomaka:



Iako ljudi još od davnina znaju da se osobine prenose s roditelja na potomstvo jer djeca sličje svojim roditeljima, u vrijeme dok je Mendel radio svoja istraživanja nije se znalo ništa o DNA i genima kao nositeljima nasljednih svojstava. Bilo je jasno da spolne stanice moraju nositi nasljedne informacije, ali nije se znalo kako su te informacije tamo uopće došle. Mendel je mogao samo promatrati fenotipska obilježja biljaka graška s kojima je radio križanja. Primijetio je da se neke osobine koje posjeduju roditelji izgube kod potomaka (F_1 -generacija kod gore opisanog monohibridnog križanja – nema potomaka sa zelenim zrnom, iako je jedan od roditelja imao zeleno zrno), ali se zato pojave u kasnijim generacijama (F_2 -generacija kod gore opisanog križanja). Mendel se pitao što je uzrok tomu i postoji li prepoznatljiv sustav po kojem se to događa. Nakon što je niz godina provodio križanja na grašku i pažljivo statistički obrađivao rezultate, uočio je određene pravilnosti nasljeđivanja (1. i 2. Mendelov zakon), a uveo je i pojmove gena i alela (iako ih Mendel nije nazvao tim imenom) te pojmove dominantnosti i recesivnosti.

Važno je napomenuti da očekivani omjeri genotipova 1:2:1 i fenotipova 3:1 vrijede samo za slučaj kad se prati jedno svojstvo (monohibridno križanje!) određeno dominantnim i recesivnim alelom prilikom križanja dvaju heterozigota. U slučaju da se, primjerice, križaju dominantni homozigot i recesivni homozigot, očekujemo da će svi potomci imati dominantan fenotip, odnosno biti heterozigoti (genotip) (vidi gore). Monohibridno je svako križanje u kojem se prati jedno svojstvo.

Zadatak 1:

Riješite monohibridno križanje između divljeg tipa vinske mušice i mutanta bez krila (a – engl. *apterous*). Oba su roditelja homozigoti. Koje omjere fenotipova i genotipova očekujete u prvoj filijalnoj (F_1) generaciji? Riješite križanje jedinki iz F_1 -generacije. Koje omjere fenotipova i genotipova očekujete u tako nastaloj drugoj filijalnoj (F_2) generaciji?

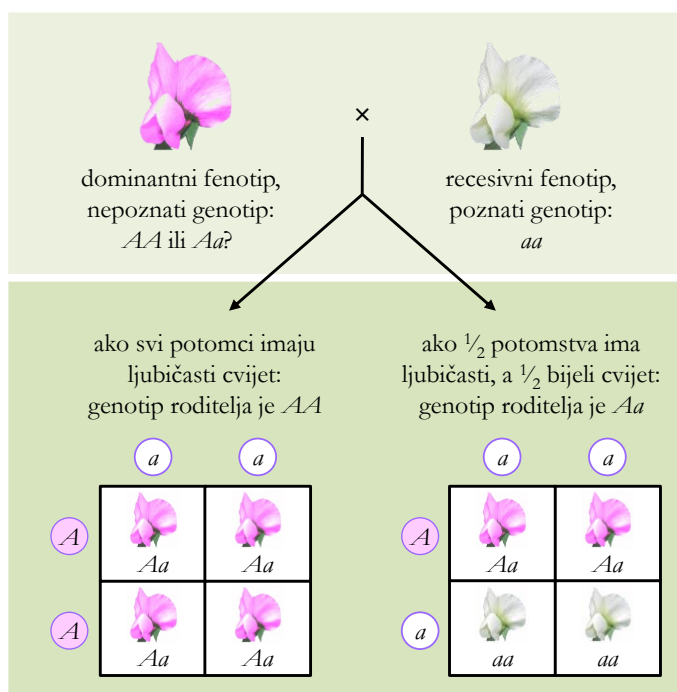
Zadatak 2:

Križanjem dviju vinskih mušica crvenih očiju dobiveno je potomstvo od 110 crvenookih i 35 smeđookih mušica. Prikažite ovo križanje i utvrdite koji je alel dominantan.

Test-križanje

Kao što se vidi na Slici 12. 2, jedinke dominantnog fenotipa (ljubičasta boja cvijeta) genotipski mogu biti dominantni homozigoti (AA) ili heterozigoti (Aa). Da bi se utvrdilo *kakav genotip ima jedinka dominantnog fenotipa*, koristi se tzv. **test-križanje**. Jedinka dominantnog fenotipa (ali nepoznatog genotipa) križa se s recesivnim homozigotom (jedinkom kojoj se prema fenotipu zna genotip – u primjeru na Slici 12. 2 to je biljka s bijelim cvjetovima). Prema fenotipu potomstva iz

F_1 -generacije može se zaključiti kakav genotip ima roditelj dominantnog fenotipa: ako sve potomstvo ima ljubičaste cvjetove, znači da roditelj dominantnog fenotipa ima genotip AA , a ako



Slika 12. 2. Test (analizirajuće) križanje. Izvor: autori





pola potomaka ima bijele cvjetove, genotip roditelja je Aa .

Zadatak 3:


U pasa postoji nasljedni oblik gluhoće koju uzrokuje recesivni gen d . Uzgajivač pasa ima mužjaka koji čuje i kojeg bi želio koristiti za parenje, ali ne zna njegov genotip. Na koji način vlasnik može ustanoviti je li genotip psa Dd ili DD ?

Dihybridno križanje

Kod dihibridnog križanja *prati se nasljeđivanje dvaju svojstava*, odnosno dvaju parova alela. Ovdje se primjenjuje 2. Mendelov zakon – Zakon nezavisnog odvajanja alela. Uzmimo Mendelov primjer s graškom. Pratimo nasljeđivanje dvaju svojstava:

- boja zrna graška – žuta (A)  ili zelena (a) 
- oblik zrna graška – okruglo (B)  ili naborano (b) 

Dominantna su svojstva žuta boja i okrugli oblik zrna, a recesivna zelena boja i naborani oblik zrna. Križamo li dva homozigota za oba svojstva, dominantnog homozigota ($AABB$, fenotip je žuto okruglo zrno) i recesivnog homozigota ($aabb$, fenotip je zeleno naborano zrno), to prikazujemo na sljedeći način:

P $AABB$ × $aabb$
 

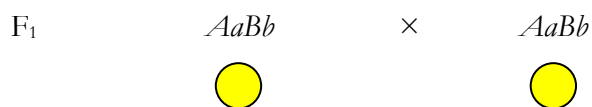
Sad treba odrediti gamete koje roditelji mogu proizvesti. Budući da se aleli za dva promatrana svojstva nalaze na *različitim* kromosomima, oni se u gamete odvajaju neovisno (2. Mendelov zakon) te **u svaku gametu odlazi samo jedan alel za svako svojstvo**. Kako promatramo dva svojstva (dihybridno križanje), u svaku od gameta rasporedit će se po jedan alel za boju zrna (A ili a) i po jedan alel za oblik zrna (B ili b). Budući da su oba roditelja homozigoti za oba svojstva, stvaraju svaki po jednu vrstu gameta:

gamete AB ab

Spajanjem ovih gameta nastaje samo jedna kombinacija u F_1 -generaciji pa su sve jedinke (100 %) iz F_1 -generacije heterozigoti za oba svojstva (genotip), a fenotipski imaju žuto okruglo zrno:

F_1 $AaBb$


Slijedi međusobno križanje (ili samooplodnja) jedinki F₁-generacije kako bi se dobila F₂-generacija:



















Budući da u svaku gametu dolazi po jedan alel za svako od dva promatrana svojstva i da je raspoređivanje kromosoma u gamete nasumično (vidi Poglavlje 11), heterozigoti za dva svojstva daju četiri vrste gameta u omjeru 1:1:1:1.

gamete *AB, Ab, aB, ab* *AB, Ab, aB, ab*

Uz pomoć Punnettova kvadrata određuje se koje kombinacije alela mogu nastati kao rezultat spajanja tih gameta:

F₂

	<i>AB</i>	<i>Ab</i>	<i>aB</i>	<i>ab</i>
<i>AB</i>	<i>AABB</i> 	<i>AABb</i> 	<i>AaBB</i> 	<i>AaBb</i> 
<i>Ab</i>	<i>AABb</i> 	<i>Aabb</i> 	<i>AaBb</i> 	<i>Aabb</i> 
<i>aB</i>	<i>AaBB</i> 	<i>AaBb</i> 	<i>aaBB</i> 	<i>aaBb</i> 
<i>ab</i>	<i>AaBb</i> 	<i>Aabb</i> 	<i>aaBb</i> 	<i>aabb</i> 

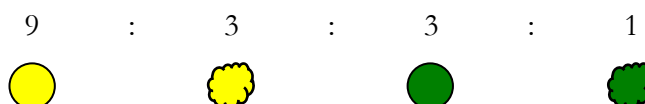
Dakle, u drugoj filijalnoj, F₂, generaciji očekivani je *omjer genotipova* sljedeći:

F ₂ :	<i>AABB</i>	1/16	<i>Aabb</i>	2/16
	<i>AABb</i>	2/16	<i>aaBB</i>	1/16
	<i>AAbb</i>	1/16	<i>aaBb</i>	2/16
	<i>AaBB</i>	2/16	<i>aabb</i>	1/16
	<i>AaBb</i>	4/16		

ili:

$$AABB : AABb : AAbb : AaBB : AaBb : Aabb : aaBB : aaBb : aabb = 1 : 2 : 1 : 2 : 4 : 2 : 1 : 2 : 1$$

Omjer fenotipova u F₂:



Primijetite da kod monohibridnog križanja postoje dva različita fenotipa i tri različita genotipa, a kod dihibridnog četiri različita fenotipa (žuto okruglo, žuto naborano, zeleno okruglo i zeleno naborano zrno) i devet različitih genotipova ($AABB$, $AABb$, $AAbb$, $AaBB$, $AaBb$, $Aabb$, $aaBB$, $aaBb$, $aabb$).

Zadatak 4:

Riješite križanje homozigotnog mužjaka vinske mušice s tamnim tijelom (e , prema engl. *ebony*) i homozigotne ženke bez krila (a , prema engl. *apterous*). Obje su mutacije autosomne i recesivne. Koje omjere fenotipova i genotipova očekujete u prvoj filijalnoj (F_1) generaciji?

Riješite križanje jedinki iz F_1 -generacije. Koje omjere fenotipova i genotipova očekujete u tako nastaloj drugoj filijalnoj (F_2) generaciji?

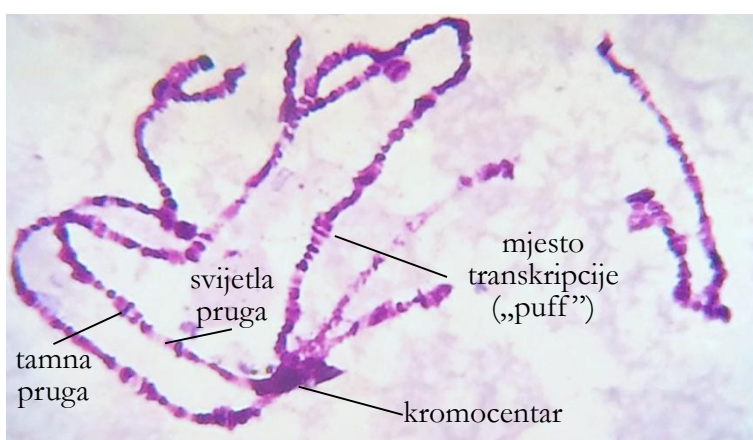
13. VINSKA MUŠICA KAO MODELNI ORGANIZAM

Vinske mušice (engl. *fruit fly*), znanstvenog naziva *Drosophila melanogaster*, maleni su kukci koji se skupljaju na trulom voću. U genetičkim istraživanjima koriste se od 1909. godine, kad ih je u svoje pokuse uveo **Thomas Hunt Morgan**. Postoji niz razloga za veliku omiljenost vinskih mušica kao modela u genetičkim (i embriološkim) istraživanjima. Malene su (duge oko 3 mm) i mogu se lako i uz mala materijalna sredstva uzgajati u laboratoriju u velikom broju. Nadalje, o njima je dostupna velika količina informacija jer se već čitavo stoljeće koriste kao modelni organizam. Na tržištu su dostupne mušice mutirane u bilo kojem od nekoliko tisuća gena, a čitav je genom sekvenciran. Osim toga, imaju kratak životni ciklus. Generacijsko je vrijeme (odnosno vrijeme od oplodnje do spolne zrelosti te generacije) oko dva tjedna. Ženka tijekom svog kratkog života može položiti stotine jajašaca pa istraživač dobije velik broj ličinki/potomaka i statistička je obrada podataka laka i pouzdana. Embrij se razvija izvan tijela i stoga se može lako proučavati u svakoj fazi razvoja. Za životinju imaju relativno malen genom (manje od 1/10 veličine ljudskog ili mišjeg genoma) i mali broj kromosoma ($2n = 8$).

Još je jedna specifičnost vinskih mušica (i ostalih kukaca iz skupine dvokrilaca, Diptera) to što zrele ličinke u jezgrama žlijezda slinovnica i drugih sekrecijskih tkiva imaju **divovske (politene) kromosome** (Slika 13. 1). Oni nastaju procesom **endomitoze** – uzastopnim replikacijama DNA bez diobe stanice, odnosno odvajanja stanica kćeri. Tako se DNA svakog od osam kromosoma u stanicama žlijezda slinovnica vinske mušice replicira tijekom deset ciklusa (deset endomitoza) bez odvajanja novonastalih kromatida. Na kraju procesa 1024 ($= 2^{10}$) kopije DNA ostaju slijepljene jedna do druge stvarajući divovske kromosome. Na njima se može razabrati mnogo više strukturnih detalja nego na kromosomima normalne veličine i prisutni su za vrijeme interfaze kad su kromosomi normalno nevidljivi, pa je vrsta *Drosophila melanogaster* dugo bila modelni organizam za proučavanje strukture kromosoma. Kad se politeni kromosomi oboje posebnim tehnikama i proučavaju svjetlosnim mikroskopom, vidljive su naizmjenično tamne i svijetle pruge (Slika 13. 1). Svaka pruga građena je od 1024 identična DNA-odsječka. Kromatin je u tamnim prugama puno kondenziraniji nego u svijetlim i zato se mnogo tamnije boji. Politeni kromosomi tijekom razvoja ličinki mijenjaju morfologiju tako da pojedina mjesta nabubre i nastaju **kromosomska zadebljanja** (engl. *puff*). To su mjesta genske aktivnosti, odnosno mjesta aktivne transkripcije (vidi Poglavlje 8). Proširenja kromosoma zapravo predstavljaju lokalnu dekonenzaciju kromosomskog materijala zbog aktivacije nekog gena. Na ostalim dijelovima politenih kromosoma kromatide su gusto zbijene pa RNA-polimeraza ne može doprijeti do njih i nema transkripcije. Stvaranje kromosomskih zadebljanja na pojedinim mjestima karakteristično je

za pojedina tkiva, a njihov se položaj mijenja tijekom različitih stadija u razvoju ličinke. Upravo u tom leži važnost politenih kromosoma za istraživanja. Budući da su veliki i karakterističnog izgleda, pružaju uvid u položaj i aktivnost određenih gena tijekom razvoja organizma. U cijelom genomu vinske mušice postoji ukupno oko 5000 tamnih i 5000 svijetlih pruga koje su numerirane da bi se dobila mapa politenih kromosoma.

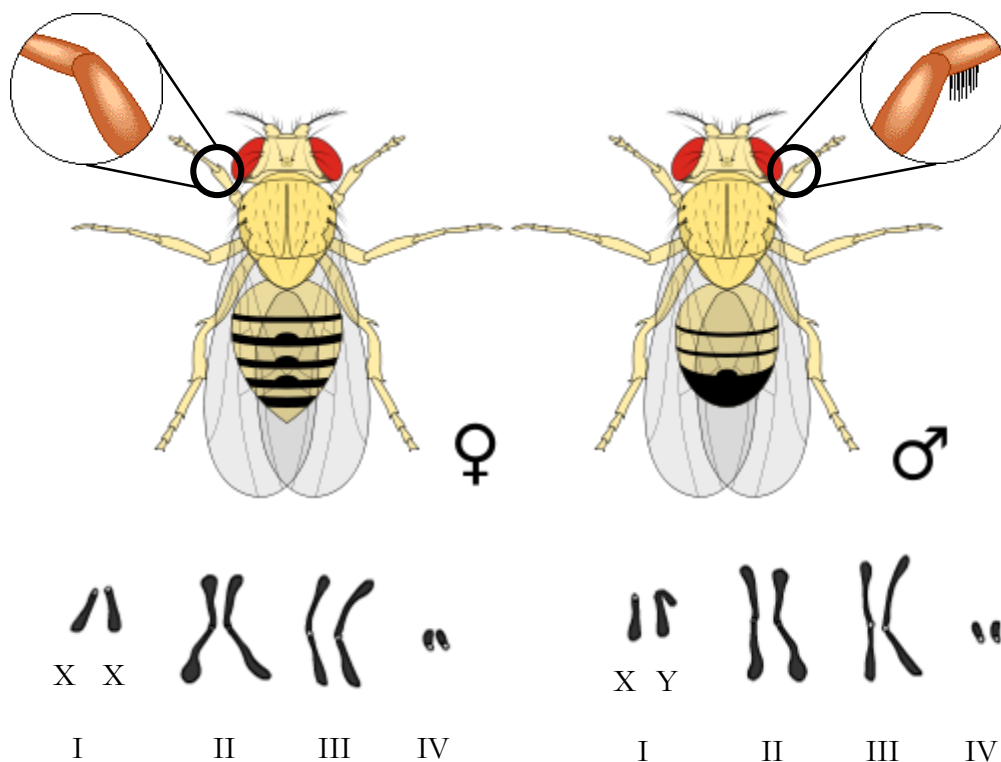
Vinska mušica toliko je popularan modelni organizam da bi bilo gotovo nemoguće nabrojiti sva istraživanja koja se vrše na njoj. Ranije se koristila većinom u genetičkim istraživanjima (npr. otkriće veze gena i proteina te proučavanje zakona nasljeđivanja), a u posljednje se vrijeme sve više koristi u razvojnoj biologiji.



Slika 13. 1. Politeni kromosomi iz stanica žlijezde slinovnice ličinke vinske mušice (*Drosophila melanogaster*). Homologni par politenih kromosoma međusobno je čvrsto povezan pa čini jedinstvenu strukturu. Homologni kromosomi obično su spojeni regijama blizu centromera, tzv. kromocentrima (600×). Izvor: autori.

Genom vinske mušice

Vinska mušica ima četiri para kromosoma, $2n = 8$: jedan par spolnih kromosoma (gonosoma) — X i Y (par I), i tri para autosoma (parovi II, III i IV; Slika 13. 2). Kromosom broj IV vrlo je malen. Veličina je genoma oko 165×10^6 parova baza i procijenjeno je da sadrži oko 13.600 gena (za usporedbu, ljudski genom ima 3300×10^6 pb i oko 30.000 gena, a genom kvasca, *Saccharomyces cerevisiae*, oko 5800 gena u $13,5 \times 10^6$ pb). Godine 2000. objavljena je sekvencija čitavog genoma vrste *Drosophila melanogaster*.

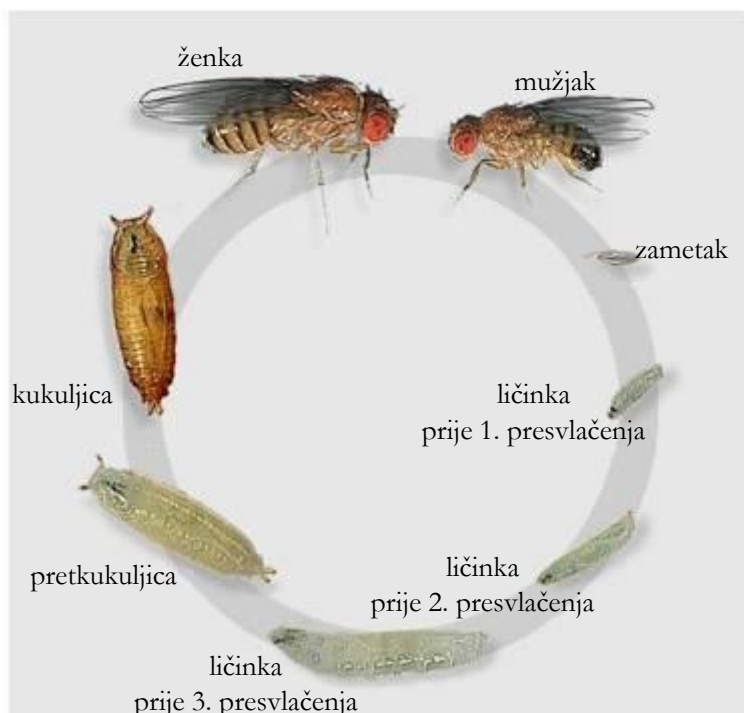


Slika 13. 2. Ženka i mužjak vinske mušice – vanjske spolne razlike i kariotip ($2n = 8$). Izvor: <http://bit.ly/2uRK6LY>, <http://bit.ly/2uy1Axv> i <http://bit.ly/2tPZED6>

Životni ciklus vinske mušice

Životni ciklus vinske mušice sastoji se od pet stadija: jaje, zametak, ličinka, kukuljica i odrasla mušica (Slika 13. 3). Broj jajašaca koje izleže oplodena ženka jako varira, tako da ženke divljeg tipa legu od 1000 do 3000 jajašaca tijekom života, dok mutanti ili visoko srodstveno parene linije (engl. *inbred* linije) daju puno manje jajašaca.

Jajašca su duga od 0,5 do 1 mm, bijela, s parom filamenata (Slika 13. 4). Iz oplodjenog jajašca razvija se zametak, a iz njega se, 22 do 24 sata



Slika 13. 3. Životni ciklus vinske mušice, *Drosophila melanogaster*. Izvor: FlyMove.

nakon polaganja jajašca, izleže crvolika **ličinka (larva, Slika 13. 3)**. Ona se neprestano hrani i raste te se tri puta presvlači (1, 2 i 3 dana nakon izlijevanja). Jedan do dva dana nakon trećeg presvlačenja ličinka se zakukulji (postane nepokretna **kukuljica, pupa**). Tijekom sljedeća četiri dana tijelo joj se posve preobrazi (metamorfoza) i razvije se **odrasli (adultni) oblik** s krilima koji izlazi iz kukuljice. (Navedena vremena vrijede za razvitak pri 25 °C; pri 18 °C razvoj traje otprilike dvostruko duže, tj. 18 umjesto 10 dana, Tablica 13. 1). Vinske mušice žive 2-3 tjedna i ženke tijekom cijelog tog razdoblja mogu leći jajašca.



Slika 13. 4. Oplođeno jajašce vinske mušice. Izvor: <http://bit.ly/2sNWn7N>

Tablica 13. 1. Vremenski raspored pojavljivanja različitih faza životnog ciklusa vinske mušice, *Drosophila melanogaster*, pri 25 °C.

dan	stadij
0	položeno oplođeno jajašce
1	izlaženje iz jajašca
2	prvo presvlačenje ličinke
3	drugo presvlačenje ličinke
4	treće presvlačenje ličinke
5	početak kukuljičenja
10	odrasla mušica

Uzgoj vinske mušice u laboratoriju

Optimalna je temperatura za praktični rad s vinskim mušicama 25 °C. Kulture vinske mušice treba držati zaštićene od izravnog sunčevog svjetla.

U laboratoriju se vinske mušice mogu uzgajati na relativno jednostavnim podlogama. Prvi istraživači koji su radili s vinskim mušicama uzgajali su ih na zgnječenim bananama uz dodatak suspenzije živog kvasca. Mi ćemo koristiti sljedeću podlogu:

podloga za uzgoj mušica

- voda 400 mL
- agar 4 g
- šećer 40 g
- svježi kvasac (ili 2 vrećice suhog kvasca) 40 g
- kukuruzna krupica 40 g
- maslačna (propionska) kiselina 4 mL

Kad se voda malo zagrije, uz miješanje se dodaju sastojci sljedećim redoslijedom: agar, šećer, kvasac, pa kukuruzna krupica. Nakon otprilike pet minuta kuhanja uz stalno miješanje dokapava se propionska kiselina. Podloga se u tekućem stanju lijeva u velike epruvete ili neke druge posude za uzgoj mušica. Ostavi se tijekom noći da ispari višak tekućine i tad se na krutu podlogu mogu nasaditi mušice.

Spolno dvoličje (seksualni dimorfizam)

Kod vinskih mušica relativno je dobro izraženo **spolno dvoličje** (razlike između mužjaka i ženki iste vrste; sekundarne spolne osobine). Na Slici 13. 2 i u Tablici 13. 2 navedene su razlike između ženki i mužjaka vinske mušice.

Tablica 13. 2. Sekundarne spolne osobine kod vinske mušice.

ženka	mužjak
veća	manji
zašiljen zadak	zaobljen zadak
na distalnom dijelu zatka tamne i svijetle pruge	distalni dio zatka tamno obojen
nema češlja na prvom paru nogu	na prvom paru nogu češalj za hvatanje ženke pri kopulaciji
vanjsko genitalno polje s legilicom	kopulacijski organi između dva genitalna nabora

Mutacije kod vinske mušice

Mutacije (lat. *mutatio* – promjena, zamjena) trajne su promjene genskog materijala koje nisu posljedica rekombinacije ili podjele genskog materijala (vidi Poglavlje 11). Prema opsegu razlikujemo genske mutacije (promjena slijeda nukleotida u DNA, točkaste mutacije) ili kromosomske mutacije (promjene strukture ili broja kromosoma). Točkaste mutacije zahvaćaju samo manji broj nukleotida u genu (jednu „točku“). Jedan se nukleotid može zamijeniti drugim (supstitucija), može doći do delecije jednog ili više nukleotida, ili do umetanja (insercije) jednog ili više nukleotida. Pojava mutacija prirodan je proces i često se događa (primjerice za vrijeme replikacije), ali enzimska mašinerija u stanici popravi većinu mutacija koje se pojave pa su „neispravljene“ mutacije rijetke. Ako do mutacija ipak dođe unutar kodirajućih regija (gena), one mogu utjecati na redoslijed aminokiselina u proteinu. Takve promjene mogu biti korisne, štetne ili neutralne. Primjerice, ako dođe do delecije jednog nukleotida unutar gena, promijenit će se cjelokupan genski kod (tripleti) nizvodno od tog mjesta. To će rezultirati stvaranjem vrlo

različitog i zbog toga nefunkcionalnog proteina. Nasuprot tomu, mutacija može rezultirati promjenom jedne ili više aminokiselina nekog enzima, što će uzrokovati njegovu veću učinkovitost (posljedica je veća brzina enzimske reakcije). Dakle, mutacije nisu uvijek štetne, već mogu rezultirati pojavom novih (korisnih) varijanti gena (alela).

Dakle, mutacije mogu uzrokovati promjenu određenih obilježja organizma. U genetičkim istraživanjima koriste se normalne mušice (**divlji tip, ++**, engl. **wild type, wt**) i različiti **mutanti** (Tablica 13. 3 i Slika 13. 5). Mušice divljeg tipa imaju duga ticala, ravna krila duža od tijela, duge noge, sivo tijelo i žarkocrvene oči (Slike 13. 2, 13. 3 i 13. 5a).

Thomas H. Morgan u svojoj je knjizi „The Genetics of *Drosophila*“ iz 1925. godine opisao 61 različitu mutaciju vinske mušice. Danas ih je poznato mnogo više i većina ih je komercijalno dostupna. Mutanti se od divljeg tipa mogu razlikovati po:

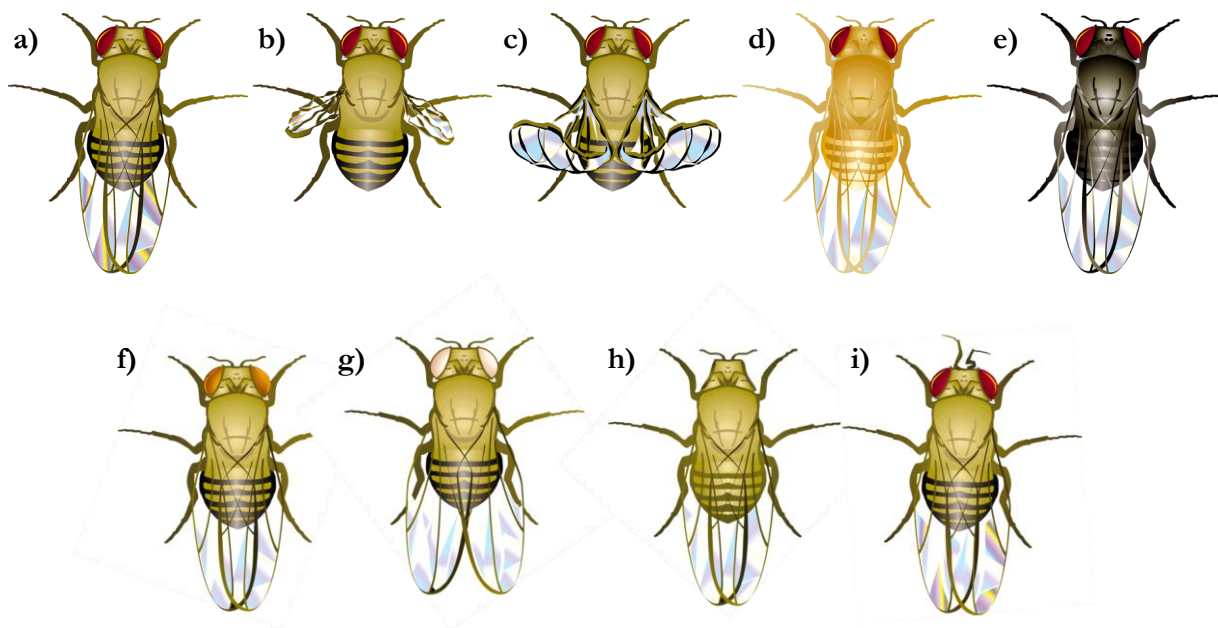
- **morfologiji** – obliku i veličini krila, rasporedu žila na krilima, boji tijela, obliku i boji očiju, mogu imati različite defekte na glavi itd.
- **dugovječnosti** – obično žive kraće
- **sterilnosti** – nemogućnosti stvaranja potomstva
- ako se radi o **smrtonosnoj (letalnoj) mutaciji**, ugibaju rano tijekom embrijskog razvitka.

Zapravo, većina mutanata u prirodi ne bi preživjela, ali u laboratorijima ih se može održavati tijekom niza generacija.

Mutacije mogu biti **recesivne** (mutantni fenotip se izražava samo ako se radi o recesivnom homozigotu) i **dominantne** (mutantni fenotip se izražava i kod dominantnog homozigota i kod heterozigota). Mogu se nalaziti na autosomima (autosomne mutacije; kod vinske mušice na kromosomima II do IV) ili na spolnim kromosomima, X i Y. Mutanti imaju različite nazive, ovisno o vrsti mutacije, odnosno o fenotipu. Recesivne se mutacije označuju malim slovom, a dominantne velikim. Neke poznate mutacije navedene su u Tablici 13. 3 i prikazane na Slici 13. 5.

Tablica 13. 3. Različite mutacije kod vinske mušice, *Drosophila melanogaster*.

kromosom	oznaka mutanta	naziv mutanta	fenotip
I, X	X^{w}	<i>white eyes</i>	bijele oči
	X^{wa}	<i>warty</i>	narančaste oči
II	<i>bw</i>	<i>brown</i>	smeđe oči
	<i>Cy</i>	<i>curly wings</i>	savijena krila, dominantna mutacija (dom. homozigoti ugibaju)
	<i>b</i>	<i>black body</i>	crno tijelo
	<i>cn</i>	<i>cinnabar</i>	cinober oči
	<i>vg</i>	<i>vestigial</i>	zakržljala krila
	<i>wg</i>	<i>wingless (apterous)</i>	bez krila, recesivna letalna mutacija
III	<i>Antp</i>	<i>antennapedia</i>	na glavi umjesto ticala narastu noge, dominantna letalna mutacija
	<i>e</i>	<i>ebony</i>	tamno tijelo
	<i>st</i>	<i>scarlet</i>	grimizne oči
IV	<i>ey</i>	<i>eyeless</i>	bez očiju



Slika 13. 5. Različiti fenotipovi vinskih mušica: (a) divlji tip (engl. *wild type*), (b) zakržljala krila (engl. *vestigial*), (c) savijena krila (engl. *curly wings*), (d) žuto tijelo (engl. *yellow body*), (e) tamno tijelo (engl. *ebony*), (f) narančaste oči (engl. *orange eyes*), (g) bijele oči (engl. *white eyes*), (h) bez očiju (engl. *eyeless*), (i) na glavi se nalaze noge umjesto ticala (lat. *antennapedia*). Izvor: The Exploratorium, www.exploratorium.edu

Zadatak 1: Rukovanje živim vinskim mušicama, određivanje spola i različitih mutacija.

Životinjski materijal:

- vinske mušice, *Drosophila melanogaster*, divlji tip i različiti mutanti u epruveti začepljenoj vatom

Kemikalije:

- eter

Pribor:

- lupa
- kapalice
- Petrijeve zdjelice
- mekani kist
- aluminijska folija
- začepljena epruveta s hranjivom podlogom
- flomaster

Postupak uspavljivanja vinskih mušica napravite u digestoru, kako ne biste bili izloženi parama etera. Kapalicom stavite 2-3 mL etera na vateni čep epruvete s vinskim mušicama. Pritom budite oprezni, eter je lako zapaljiv, ima snažan miris i može ubiti mušice ako su mu predugo izložene. Kad uspavate mušice, tj. kad one padnu na dno epruvete, uklonite komadić vate i ostavite ga u digestoru. Omamljene mušice stavite u Petrijevu zdjelicu i pregledajte pod lupom. Odvajajte ih mekanim kistom da ih ne biste oštetili.

Odvojite mužjake od ženki. Uočite spolne razlike navedene na Slici 13. 2 i u Tablici 2. Nacrtajte mužjaka i ženku. Strukture koje trebate označiti na crtežu:

- mužjak (manji)
- ženka (veća)
- zaobljen zadak
- zašiljen zadak
- distalni dio zatka tamno obojen
- tamne i svijetle pruge na distalnom dijelu zatka
- češalj za hvatanje ženke pri kopulaciji

Usporedite mušice divljeg tipa s različitim mutantima. Napišite:

- koliko ste ukupno vidjeli mušica, koliko od toga mužjaka, a koliko ženki;
- koje mutante ste vidjeli na vježbama te navedite njihove genotipove i opišite njihove fenotipove!

Odvojite jednu ženku i jednog mužjaka različitih fenotipova i premjestite ih na pripremljenu podlogu u epruveti. Označite epruvetu kako biste na idućim vježbama izbrojili potomke nastale križanjem.

Napišite:

- koliko ste ukupno dobili mušica, koliko od toga mužjaka, a koliko ženki;
- koje su fenotipove imali roditelji, a koje potomci i u kojem omjeru;
- izvedite zaključke o tipu nasljeđivanja odabranih mutacija!

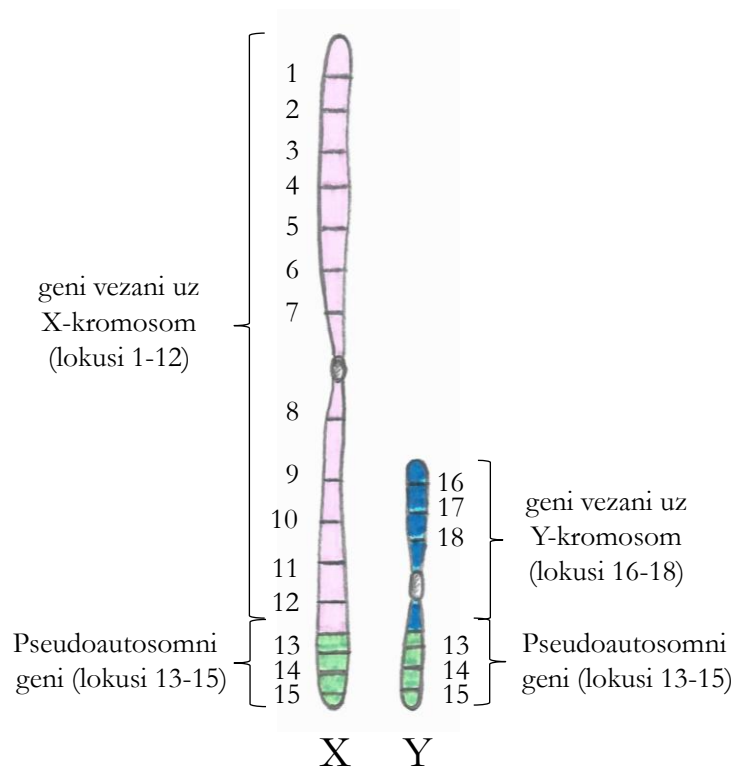
Nasljeđivanje svojstava vezanih uz spol

U čovjeka, vinske mušice i mnogih drugih vrsta spol je određen (determiniran) parom **spolnih kromosoma**. Ženke imaju homomorfan par kromosoma (XX), a mužjaci heteromorfan (XY) (Slika 13. 2). Zato se kaže da su mužjaci **heterogametni** (stvaraju dvije vrste gameta: jedne nose X-, a druge Y-kromosom), a ženke **homogametne** (sve gamete nose X-kromosom). Kod vinske mušice je, za razliku od čovjeka, Y-kromosom veći od X-a.

Treba naglasiti da sami kromosomi ne određuju spol, već to čine geni koje ti kromosomi nose. Geni određuju koji će se tip gonada razviti (sjemenci ili jajnici), a gonade kasnije počnu izlučivati spolne hormone koji oblikuju muški ili ženski fenotip.

Nasljeđivanje svojstava vezanih uz spol određuju geni koji se nalaze na spolnim kromosomima. Budući da su i X i Y spolni kromosomi, postoje tri mogućnosti: aleli koji se nasljeđuju mogu se nalaziti samo na X-u, samo na Y-u, ili i na X-u i na Y-u (Slika 13. 6). Međutim, pod terminom **gena vezanih uz spol** obično se misli samo na **gene vezane uz X-kromosom** (nalaze se samo na X-kromosomu) jer je gena vezanih uz Y-kromosom i gena koji se nalaze i na X- i na Y-kromosomu u ljudi vrlo malo. Geni koji se nalaze samo na Y-u obično se nazivaju **holandričnim** (ili Y-vezanim), a lokusi koji se nalaze i na X-u i na Y-u nazivaju se **pseudoautosomnim** (jer se nasljeđuju na isti način kao autosomni geni, a nalaze se na spolnim kromosomima).

Što se tiče gena vezanih uz X-kromosom, mužjaci imaju samo jedan alel, a ženke dva. Stoga ženke, budući da imaju dva X-kromosoma, mogu biti homozigotne ili heterozigotne s obzirom na X-vezani alel. Za razliku od njih, mužjaci imaju samo jedan X i stoga ne mogu biti ni homozigotni ni heterozigotni. Umjesto toga, za gene vezane uz X-kromosom kod mužjaka koristi se termin **hemizigotnost**. Budući da je prisutan samo jedan alel, jedna kopija recesivnog alela određuje fenotip i ta se pojava zove **pseudodominacija**.



Slika 13. 6. Shematski prikaz gena vezanih uz spol. Izvor: autori.

Slijedom gore navedenog, nasljeđivanje gena vezanih uz X-kromosom razlikuje se od nasljeđivanja autosomnih gena, koji uvijek dolaze u paru (po jedan na svakom homolognom kromosomu) i čije nasljeđivanje ne ovisi o spolu. Geni vezani uz X-kromosom nasljeđuju se ovisno o spolu potomaka – aleli s očeva X-kromosoma prenose se samo na ženske potomke (a ne na muške potomke). Isto tako, X-kromosom muških potomaka dolazi od ženskog roditelja, a Y od muškog.



Slika 13. 7. Vinska mušica crvenih očiju (divlji tip) (lijevo) i bijelih očiju (recesivno X-vezano svojstvo) (desno). Izvor: autori.

T. H. Morgan je 1910. prvi put demonstrirao nasljeđivanje vezano uz X-kromosom kad se mužjak s bijelim očima pojavio u kulturi crvenookih ženki (divlji tip) (Slika 13. 7). Izvršio je sljedeće križanje (dani su samo fenotipovi):

P	Ženka divlji tip	×	Mužjak bijeke oči
---	---------------------	---	----------------------

F ₁	Ženke i mužjaci divlji tip
----------------	----------------------------

F ₂	Ženke divlji tip	Mužjaci 50 % divlji tip 50 % bijele oči
----------------	---------------------	---

Dakle, sve potomstvo F₁-generacije nastalo križanjem crvenooke ženke i bjelookog mužjaka imalo je crvene oči. Nakon međusobnog križanja jedinki prve filijalne generacije sve ženke i polovica mužjaka iz F₂-generacije bili su crvenooki, a druga polovica mužjaka imala je bijele oči. Na temelju ovakvih rezultata Morgan je zaključio da se lokus za bijele oči nalazi na X-kromosomu. Isto križanje možemo prikazati i genotipski (X-kromosom koji nosi alel za bijele oči (*white eyes*) označen je kao X^w, a X⁺ je X-kromosom koji nosi alel divljeg tipa):

P	Ženka, divlji tip X ⁺ X ⁺	×	Mužjak, bijele oči X ^w Y
gamete	X ⁺		X ^w , Y
F ₁	Ženke i mužjaci divlji tip X ⁺ X ^w × X ⁺ Y		
gamete	ženka: X ⁺ , X ^w		mužjak: X ⁺ , Y
F ₂	$\begin{array}{cccc} X^+X^+ & : & X^+X^w & : & X^+Y & : & X^wY \\ 1 & : & 1 & : & 1 & : & 1 \end{array}$ <div style="display: flex; justify-content: center; gap: 20px; margin-top: 10px;"> <div style="text-align: center;"> $\underbrace{\hspace{10em}}$ ženke divlji tip </div> <div style="text-align: center;"> $\underbrace{\hspace{10em}}$ mužjaci $\underbrace{\hspace{5em}} \quad \underbrace{\hspace{5em}}$ divlji bijele tip oči </div> </div>		

Vidi se da mužjak sa samo jednim alelom X^w ima bijele oči pa se taj recesivni alel „ponaša“ kao dominantni (pseudodominacija).

Zadatak 2:

Kod ljudi, recesivne mutacije određenih gena vezanih uz X-kromosom uzrokuju neke poremećaje, poput daltonizma i hemofilije. Riješite sljedeće probleme.

- a) Par ljudi normalnog vida dobije sina s daltonizmom. Prikažite ovo križanje!
- b) Kakvo potomstvo može očekivati žena iz zadatka (a) ako se uda za muškarca s daltonizmom? Prikažite to križanje!

Zadatak 3:

Kod vinske mušice podrezana krila (engl. *cut*) kontrolira recesivni spolno vezani alel (X^c), a kovrčavo tijelo (engl. *fuzzy*) autosomni recesivni alel (*f*). *Fuzzy* ženka se križa s mužjakom podrezanih krila i sve potomstvo iz F₁-generacije divlji je tip. Kakvi su očekivani fenotipski omjeri potomstva iz F₂-generacije prema spolu?

14. MEĐUDJELOVANJE GENA

U klasičnim Mendelovim eksperimentima s graškom pojedino se svojstvo javlja u dva moguća stanja koja su određena dvama alelima od kojih je jedan u potpunosti dominantan nad drugim. Primjerice, boja zrna graška ili je žuta ili zelena, a oblik zrna graška ili je okrugao ili naboran (Poglavlje 12). No zakonitosti nasljeđivanja i odnosi među alelima često su puno složeniji od tog i ne mogu se objasniti Mendelovim zakonima nasljeđivanja. U ovom ćemo poglavlju objasniti nekoliko primjera takvih tipova nasljeđivanja.

Odnosi između alela

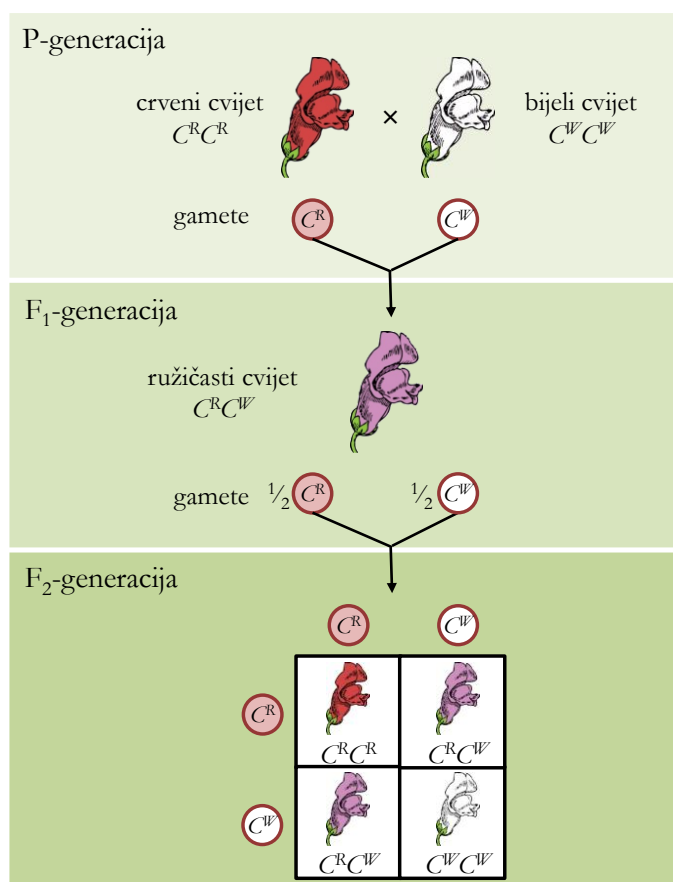
Dva različita alela za isto svojstvo mogu biti u različitom međusobnom odnosu i ovisno o tom heterozigoti za to svojstvo imat će različit fenotip (Slika 14. 1).



Slika 14. 1. Mogući odnosi između alela. Potpuna dominacija – alel za crvenu boju u potpunosti prikriva alel za bijelu boju pa heterozigoti imaju crveni fenotip. Nepotpuna dominacija – heterozigoti pokazuju fenotipski intermedijer pa nisu ni crveni ni bijeli, već ružičasti. Kodominacija – oba su alela izražena u heterozigotu pa on ima istovremeno i crveni i bijeli fenotip. Izvor: autori.

Ranije opisani aleli koji određuju boju zrna kod graška (Poglavlje 12) u odnosu su **potpune dominacije** – žuta boja zrna određena je dominantnim alelom A i u heterozigotnoj jedinici u potpunosti prikriva recesivnu značajku, zelenu boju zrna, određenu alelom a . Dakle, heterozigoti genotipa Aa imaju žuto zrno (fenotip). Međutim, postoje slučajevi kad se kod heterozigota mogu fenotipski izraziti značajke obaju alela. Ako je fenotip heterozigotne jedinice Aa različit od fenotipa obiju vrsta homozigotnih jedinki (AA i aa) i često je „mješavina“ (intermedijer) homozigotnih fenotipova, govorimo o **nepotpunoj dominaciji**. Primjeri su boja cvijeta u zijevalice (Slika 14. 2), noćurka i tulipana te boja perja u andaluzijske kokoši. U

kodominantnom odnosu alela, u heterozigotnoj se jedinci fenotipski izražavaju značajke određene obama alelima. Primjeri su kodominacije alela: (i) aleli I^A i I^B koji kodiraju za enzime i, posredno, glikoproteinske antigene A i B na membrani eritrocita čovjeka krvne grupe AB (vidi Tablicu 14. 1 i detaljno objašnjenje kasnije u tekstu); (ii) aleli koji kodiraju za antigene M i N krvne grupe MN; (iii) aleli koji kodiraju za različite varijante proteina hemoglobina, normalni hemoglobin Hb^A i mutirani hemoglobin Hb^S (heterozigoti imaju istovremeno obje vrste hemoglobina u eritrocitima pa se radi o kodominaciji, dok osobe koje su homozigoti za alel Hb^S imaju samo mutirani hemoglobin, a oblik eritrocita im je srpast, odnosno boluju od srpaste anemije); (iv) kestenjasto-smeđa i bijela boja dlake u konja i goveda itd.



Slika 14. 2. Nepotpuna dominacija boje cvijeta u zijevalice. Križanjem zijevalice crvene boje cvijeta (C^{RR}) i bijele boje cvijeta (C^{WW}) nastaju potomci koji imaju ružičastu boju cvijeta ($C^R C^W$). Samooplodnjom potomaka F₁-generacije koji proizvode dvije vrste gameta: C^R i C^W , nastat će potomci s crvenim, ružičastim i bijelim cvjetovima u fenotipskom i genotipskom omjeru 1:2:1 (F₂-generacija). Izvor: autori.

Multipli aleli

U svojim istraživanjima na grašku kao modelnom organizmu Mendel je odabrao svojstva koja se pojavljuju u dva moguća oblika (Poglavlje 12). To znači da se jedan gen, koji kontrolira

fenotipski izražaj određenog svojstva, javlja u dvije varijante, tj. postoje dva alela za to svojstvo, od kojih je jedan u potpunosti dominantan nad drugim. Međutim, kako su geni vrlo složene strukture, sačinjeni od stotina parova linearno poredanih nukleotida molekule DNA, oni se mogu mijenjati – mutirati, dajući velik broj različitih varijanti (alela). Stoga se u populacijama mnogi geni javljaju u većem broju varijanti, tj. u populaciji najčešće postoji više od dva alela za jedno svojstvo koji se mogu pojaviti na određenom lokusu (**multipli aleli**). Bez obzira na to koliko multiplih alela za jedno svojstvo postoji u populaciji, u jednom diploidnom organizmu prisutna su uvijek samo dva. Simboli za označivanje multiplih alela su različiti, a hijerarhija dominantnosti obično se navodi kod svakog problema. Postoji mnogo primjera multiplih alela kao što su boja krzna u kunića, boja kućice i broj pruga šumskog puža (*Cepaea nemoralis*) te boja očiju vinske mušice (*Drosophila melanogaster*), no najpoznatiji su primjeri krvne grupe sustava AB0 kod čovjeka i humani leukocitni antigeni (HLA-sustav).

Krvne grupe sustava AB0

Antigeni (aglutinogeni) su molekule (glikolipidi i glikoproteini) čiji oligosaharidni dijelovi „strše“ s vanjske strane membrane crvenih krvnih stanica (eritrocita) i koji mogu potaknuti imunosnu reakciju ako dođu u kontakt s komponentama imunosnog sustava druge nekompatibilne jedinice. Ovisno o tipovima antigena na eritrocitima, krv se dijeli u različite sustave **krvnih grupa**, a danas je kod čovjeka poznato ukupno 35 različitih sustava krvnih grupa.


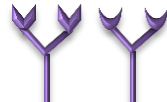
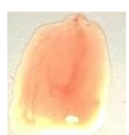



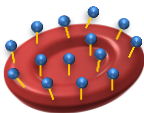

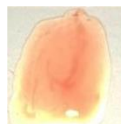
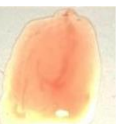




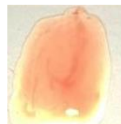

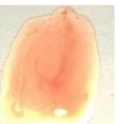

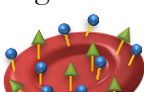
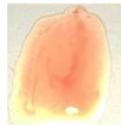
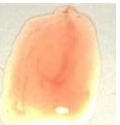
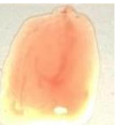
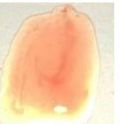
Sustav krvnih grupa AB0 je najpoznatiji jer je najvažniji za transfuziju krvi.

Sustav krvnih grupa AB0 kontrolira gen *I* koji u ljudskoj populaciji dolazi u tri varijante, odnosno ima tri alela: I^A , I^B te *i*. Dakle, budući da u populaciji postoji više od dva alela za ovo svojstvo, sustav krvnih grupa AB0 primjer je multiplih alela. Naravno, svaki pojedinac, budući da je diploidan, ima u svojim stanicama dva (od moguća tri) alela na ovom lokusu. Aleli I^A i I^B kodiraju za proteine koji su po svojoj funkciji enzimi glikoziltransferaze. Rezultat je njihove enzimske aktivnosti pretvorba postojećeg antigena H na membrani eritrocita u antigen A, odnosno B. Naime, glikoziltransferaza A dodaje monosaharid N-acetilgalaktozamin na postojeći lanac od pet šećernih ostataka antigena H i time se antigen H pretvara u antigen A. Slično tomu, glikoziltransferaza B dodaje monosaharid galaktozu na postojeći lanac od pet šećernih ostataka antigena H i time se antigen H pretvara u antigen B sa šest šećernih ostataka. Nasuprot tomu, alel *i* je mutiran pa ne kodira za nastajanje funkcionalnog enzima. Stoga nema dodavanja šestog šećernog ostatka i na eritrocitima ostaje nepromijenjen antigen H koji ima (samo) pet šećernih ostataka. Važno je naglasiti da antigeni A i B mogu potaknuti imunosnu reakciju ako dođu u

kontakt s komponentama imunskog sustava druge nekompatibilne jedinke (povezivanje s protutijelima), dok nepromijenjeni antigen H to ne može.

S obzirom na to da postoje tri moguća alela AB0 kod ljudi i da kod svake pojedine (2n) osobe dolazi neka kombinacija od dva alela, moguće je šest kombinacija po dva alela, odnosno šest genotipova (Tablica 14. 1). Nadalje, u kontekstu krvnih grupa, fenotip je određen tipom antigena koji se javljaju na površini eritrocita i mogu izazvati imunski odgovor u druge nekompatibilne jedinke. Stoga su moguća četiri različita fenotipa, odnosno četiri različite krvne grupe (Tablica 14. 1). Za osobe koje na eritrocitima imaju antigen A kažemo da imaju krvnu grupu A, dok antigen B određuje krvnu grupu B. Isto tako, osobe genotipa $I^A I^B$ na eritrocitima imaju oba tipa antigena, odnosno fenotip im je krvna grupa AB. Budući da su u ovom slučaju kod heterozigota fenotipski izražena oba alela, za alele I^A i I^B kažemo da su kodominantni. I^A i I^B su dominantni nad alelom i jer se primjerice kod heterozigota $I^A i$ fenotipski izražava samo alel I^A .

Tablica 14. 1. Krvne grupe sustava AB0 kod čovjeka. Izvor: autori.

krvna grupa (fenotip)	genotip	antigeni (aglutinogeni) na eritrocitima	protutijela u krvi	reakcija koja će se dogoditi u tijelu primatelja pri transfuziji krvi različitih krvnih grupa			
				0	A	B	AB
0	ii	antigen H* 	anti-A i anti-B 				
A	$I^A I^A$ ili $I^A i$	antigen A 	anti-B 				
B	$I^B I^B$ ili $I^B i$	antigen B 	anti-A 				
AB	$I^A I^B$	antigeni A i B 	–				

*Antigen H, za razliku od antigena A i B, ne izaziva imunsku reakciju.

Da bi transfuzija krvi bila uspješna, krvne grupe davatelja i primatelja moraju biti kompatibilne. To znači da primatelju ne smijemo dati krv koja sadrži njemu strane antigene.

Primjerice, ako osoba krvne grupe B primi krv krvne grupe A, imunostani sustava primatelja prepoznaju dobivene antigene A na eritrocitima kao nešto strano organizmu. Postojeća protutijela specifična za te antigene (anti-A) iz plazme primatelja vežu se na površinu eritrocita dobivenih transfuzijom i to dovodi do sljepljivanja (aglutinacije) krvnih stanica iz donirane krvi u optjecajnom sustavu primatelja (Tablica 14. 1 i Slika 14. 3). Dakle, **aglutinacija** je međusobno sljepljivanje eritrocita zbog reakcije antigena na površini eritrocita i odgovarajućih protutijela (Slika 14. 3).

Budući da osobe krvne grupe 0 nemaju ni antigen A ni antigen B na membrani eritrocita, one su **univerzalni davatelji krvi**. Osobe krvne grupe AB nemaju ni protutijela anti-A ni protutijela anti-B u serumu pa su **univerzalni primatelji** (Tablica 14. 1).

Transfuzijske reakcije koje uključuju manje važne antigene ili slabija protutijela mogu dovesti do manjih problema. Međutim, ozbiljnija nepodudaranja (primjerice, u sustavu krvnih grupa AB0 ili Rh-faktoru) mogu dovesti do snažnog imunostnog odgovora te posljedično do masovnog uništavanja eritrocita. Aglutinirani eritrociti mogu začepiti krvne žile i zaustaviti protok krvi u različite dijelove tijela. Eritrociti sadrže hemoglobin koji izvan stanice postaje toksičan. To može dovesti čak i do smrti pacijenta.

Krvne grupe nisu jednakomjerno rasprostranjene u svim dijelovima svijeta (Tablica 14. 2). Budući da krvna grupa ne utječe na izbor partnera i da nema prirodnog odabira za to svojstvo, na učestalost krvnih grupa u pojedinim etničkim grupama očito su utjecali neki drugi mikroevolucijski (genski otklon, protok gena) i socijalni čimbenici.

Tablica 14. 2. Učestalost krvnih grupa AB0 u nekim dijelovima svijeta.

krvne grupe AB0	Hrvatska	Europa	Američki Indijanci	Eskimi
A	42 %	30 – 40 %	12 %	43 %
0	34 %	34 – 50 %	88 %	53 %
B	17 %	9 – 17 %	0	1,5 %
AB	7 %	3 – 6,5 %	0	1,5 %

Zadatak 1: Određivanje krvne grupe.

U ovom ćete si zadatku odrediti krvnu grupu s obzirom na sustav AB0 i s obzirom na Rh-faktor.

Rhesus-krvne grupe određuje antigen D na membrani eritrocita. Mogući genotipovi i fenotipovi navedeni su u Tablici 14. 3. Zamijetite da se kod ovog sustava krvnih grupa ne radi o multiplim alelima jer postoje samo dva moguća alela u populaciji – *D* i *d*. Naziv „Rhesus“ potječe

od znanstvenog naziva majmuna *Macacusc rhesus* na čijim je eritrocitima prvi put otkriven antigen D. U Tablici 14. 4 navedeni su podatci za rasprostranjenost Rhesus-krvnih grupa u Hrvatskoj i nekim dijelovima svijeta.

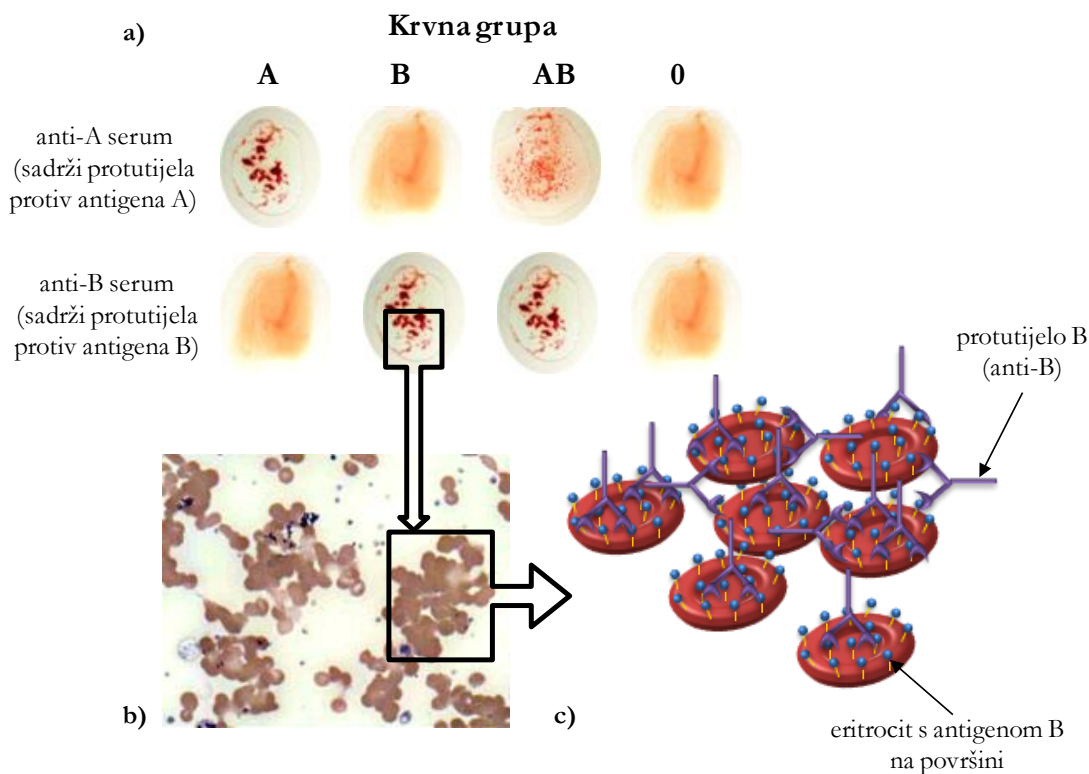
Tablica 14. 3. Rhesus-krvne grupe.

genotip	antigen	fenotip
Rh ⁺ Rh ⁺	D	Rh-pozitivan
Rh ⁺ Rh ⁻	D	Rh-pozitivan
Rh ⁻ Rh ⁻	-	Rh-negativan

Tablica 14. 4. Rasprostranjenost Rh-krvnih grupa u nekim dijelovima svijeta.

RhD krvna grupa	Hrvatska	Europa	Kina
Rh-pozitivna	85 %	85 %	100 %
Rh-negativna	15 %	15 %	0

Određivanje krvne grupe temelji se na reakciji antigen-protutijelo, odnosno reakciji aglutinacije (Tablica 14. 1 i Slika 14. 3).



Slika 14. 3. Reakcija aglutinacije: (a) na predmetnom stakalcu prilikom određivanja krvnih grupa, (b) krvni razmaz pod mikroskopom, (c) shematski prikaz. Izvor: (a) i (c) autori, (b) <http://bit.ly/2tQaPMa>

Pri izvođenju ovog zadatka u kapljice (svoje) krvi dodat ćete različita komercijalno proizvedena protutijela kako biste ispitali jesu li na površini eritrocita prisutni određeni antigeni i time odrediti krvnu grupu s obzirom na sustav AB0 i s obzirom na Rh-faktor. Koristit ćete tri vrste protutijela: anti-A serum sadrži protutijela koja se specifično vežu na antigen A, anti-B serum na antigen B, a anti-D serum sadrži protutijela koja se vežu na antigen D Rh-sustava krvnih grupa (Slika 14.



Slika 14. 4. Određivanje krvnih grupa. Krvna grupa A+. Izvor: autori.

4). Dakle, ako uslijed kontakta krvi i određenog antiseruma dođe do aglutinacije, možemo zaključiti da je na eritrocitima prisutan određeni antigen. Primjerice, ako u kontaktu kapljice krvi i anti-A seruma dođe do aglutinacije, možemo zaključiti da je na eritrocitima prisutan antigen A, odnosno da osoba posjeduje alel I^A (Slika 14. 4). Ako ne dođe do aglutinacije, antigena A nema, ni I^A alela. Koristeći tri navedene vrste antiseruma, moći ćemo zaključiti o kojoj se krvnoj grupi radi s obzirom na sustav AB0 i s obzirom na Rh-faktor. Svaka se krvna grupa imenuje prema sustavu AB0 i tom se imenu dodaje oznaka „+“ ili „-“ ovisno o tom je li osoba Rh-pozitivna ili Rh-negativna.

Materijal:

- krv

Kemikalije:

- anti-A, anti-B i anti-D serumi
- alkohol

Pribor:

- predmetna stakalca
- sterilne lancete
- vata
- čačkalice
- voodootporni flomasteri

Postupak:

Uzmite predmetno stakalce i dobro ga očistite etanolom. Voodootpornim flomasterom napišite na stakalce oznake triju antiseruma koje ćete koristiti: A, B i D.

Sad alkoholom očistite jagodicu prsta i ubodite se sterilnom lancetom. Istisnite po

kapljicu krvi kraj svake oznake na predmetnom stakalcu. Pokraj svake kapljice krvi dodajte po jednu (malu!) kapljicu pripadajućih antiseruma. Pomiješajte čačkalicom dvije kapljice. Mijenjajte čačkalice od jednog do drugog uzorka, kako ne biste dobili pogrešne rezultate zbog kontaminacije! Ostavite pet minuta na sobnoj temperaturi, pritom lagano nagnjući stakalce s jedne na drugu stranu i pazeći da se kapljice međusobno ne dodiruju. Pozitivna reakcija javlja se kao dobro vidljiv aglutinat – u kapljici se prostim okom vide male čestice, tj. aglutinirani eritrociti. Izostanak aglutinacije (kapljica ostaje homogeno obojena) upućuje na odsutnost ispitivanog antigena (Slike 14. 3 i 14. 4).

Nacrtajte predmetno stakalce s kapljicama krvi i objasnite dobivene rezultate!

Pleiotropni učinak

Dosad smo proučavali samo one osobine gdje je jedan alel određivao samo jednu fenotipsku značajku. Međutim, većina gena ima višestruke fenotipske učinke, odnosno utječe na više naizgled nepovezanih svojstava. Tu pojavu nazivamo **pleiotropnim učinkom** (grč. *pleion*, više i *tropos*, način). Dođe li do mutacije u takvom genu, to će se odraziti na sva povezana svojstva. Primjer su ranije spomenuti aleli koji kodiraju za različite varijante proteina hemoglobina – normalni hemoglobin Hb^A i mutirani hemoglobin Hb^S. U nasljednoj bolesti srpastoj anemiji zamjena samo jedne aminokiseline u lancu hemoglobina uzrokuje povezivanje mutiranog hemoglobina (Hb^S) u duge lance i deformiranje eritrocita u srpasti oblik. Eritrociti pritom gube fleksibilnost, što rezultira njihovom ograničenom pokretljivošću kroz krvne žile i nizom drugih fenotipskih učinaka, primjerice stvaranjem ugrušaka u manjim žilama, smanjenim dopremanjem kisika tkivima te posljedično fizičkoj slabosti, boli, oštećenju organa i čak paralizi. Pleiotropne učinke imaju i poremećaji u metabolizmu aminokiseline fenilalanina (fenilketonurija) i tirozina (alkaptonurija).

Poligensko nasljeđivanje

Nasljeđivanje svojstava organizama najčešće ovisi o međusobnom djelovanju više gena kao i utjecaju okoliša (unutarnjeg i vanjskog). Tako nastaju značajke koje se ne mogu svrstati u nekoliko jasno razlučenih kategorija (kao što npr. možemo odrediti četiri različite krvne grupe sustava AB0). Nasuprot tomu, većina značajki u populaciji varira i pojavljuje se u širokom rasponu, odnosno gradaciji. Primjeri su za takve **kvantitativne značajke** niz različitih nijansi boje kose i kože, visina itd. Kvantitativne značajke obično su kumulativni rezultat djelovanja dvaju ili više gena na jednu fenotipsku osobinu, odnosno nasljeđuju se **poligenski**. Boju kože u ljudi određuju barem tri različita gena od kojih svaki ima dva alela u odnosu nepotpune

dominacije ($AaBbCc$). Osoba genotipa $AABBCC$ imat će tamnu put, osoba genotipa $aabbcc$ izrazito svijetlu, dok će osobe genotipa $AABbcc$, $AaBbCc$ i $aabBCC$ imati sličnu, intermedijarnu boju puti.

Epistaza (grč. *epistanai*, zaustavljati) slučaj je kad fenotipski izričaj jednog svojstva određuje izričaj različitih drugih gena i to tako da alel s jednog lokusa može suprimirati ekspresiju alela s drugog lokusa. Postoje dvije osnovne vrste epistaze – dominantna i recesivna, ali i niz



Slika 14. 5. Plodovi tikvice patišon (*Cucurbita pepo* var. *chryseata* ili var. *patissoniana*) bijele boje. Izvor: autori.

















kombinacija (vidi Tablicu 14. 5 samo kao informaciju) koje se razlikuju prema omjeru mogućih fenotipova potomaka nakon križanja dvaju heterozigota za oba svojstva. U **dominantnoj epistazi** dominantni epistatski gen suprimira ekspresiju drugog gena bez obzira na to je li ovaj dominantan ili recesivan. Primjerice, boja ploda tikvice patišon može biti bijela, žuta ili zelena (Slika 14. 5).

Alel Y određuje žutu boju ploda tikvice (engl. *yellow*) i dominantan je nad alelom y za zelenu boju ploda. Međutim, na drugom lokusu nalazi se epistatski gen W (engl. *white*), koji, ako je dominantan, „skriva“ učinak alela Y i y te nastaju tikvice bijele boje. Ako je recesivan (w), omogućuje izražavanje boje koje kodiraju geni Y i y . Stoga je fenotipski

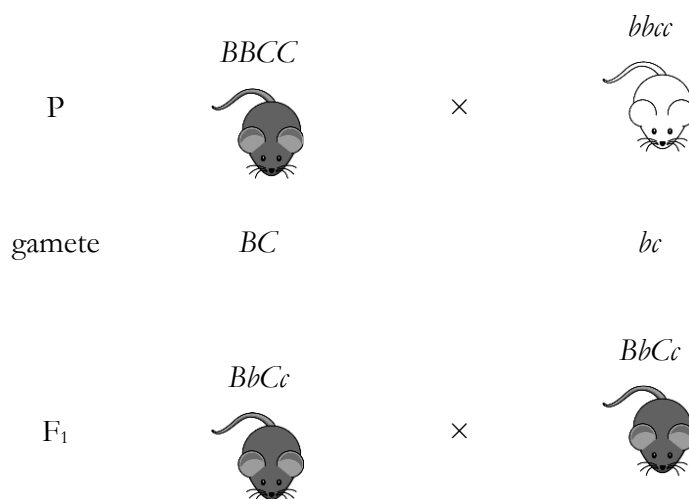
omjer potomaka F_2 -generacije ove dominantne epistaze – 12 bijelih tikvica : 3 žute tikvice : 1 zelena tikvica.

P	$WWYY$	×	$wwyy$
			
gamete	WY		wy
F ₁	$WwYy$	×	$WwYy$
			

















F₂

gamete	WY	Wy	wY	wy
WY	WWYY 	WWYy 	WwYY 	WwYy 
Wy	WWYy 	WWyy 	WwYy 	Wwyy 
wY	WwYY 	WwYy 	wwYY 	wwYy 
wy	WwYy 	Wwyy 	wwYy 	wwyy 

Najčešći je primjer **recesivne epistaze** boja dlake u miša i mnogih drugih sisavaca. Boju dlake određuje međudjelovanje dvaju gena. Prvi je gen što omogućuje proizvodnju pigmenta koji postoji kao dominantni alel *B* za crnu (engl. *black*) boju ili recesivni alel *b* za smeđu boju. Drugi je gen *C* (engl. *color*) što određuje može li se proizvedeni pigment nakupljati u dlaci. Recesivni alel *c* sprječava nakupljanje pigmenta te je životinja, bez obzira na genotip gena *B*, bijela. Slijedi primjer križanja:

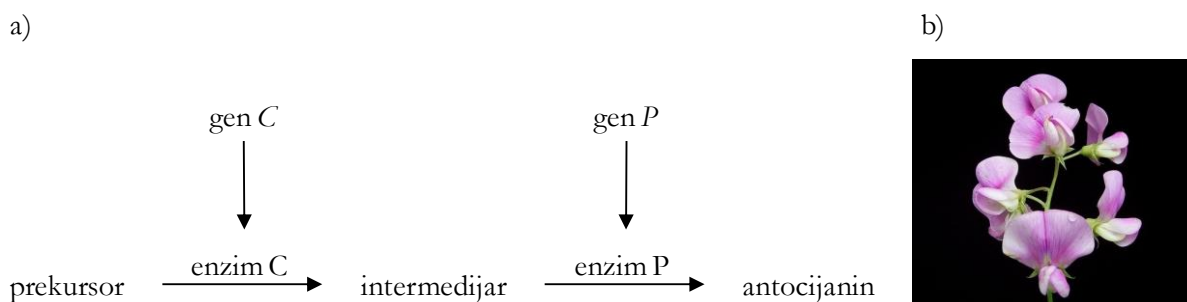


Fenotipski omjer F₂-generacije u ovom je slučaju 9 crnih miševa : 3 smeđa miša : 4 bijela miša. Dakle, u recesivnoj epistazi recesivni aleli gena jednog svojstva (u ovom slučaju alel *c*) zaustavljaju fenotipsku ekspresiju gena za drugo svojstvo (u ovom slučaju alela *B* ili *b*).

gamete	<i>BC</i>	<i>Bc</i>	<i>bC</i>	<i>bc</i>
<i>BC</i>	<i>BBCC</i> 	<i>BBCc</i> 	<i>BbCC</i> 	<i>BbCc</i> 
<i>Bc</i>	<i>BBCc</i> 	<i>BBcc</i> 	<i>BbCc</i> 	<i>Bbcc</i> 
<i>bC</i>	<i>BbCC</i> 	<i>BbCc</i> 	<i>bbCC</i> 	<i>bbCc</i> 
<i>bc</i>	<i>BbCc</i> 	<i>Bbcc</i> 	<i>bbCc</i> 	<i>bbcc</i> 

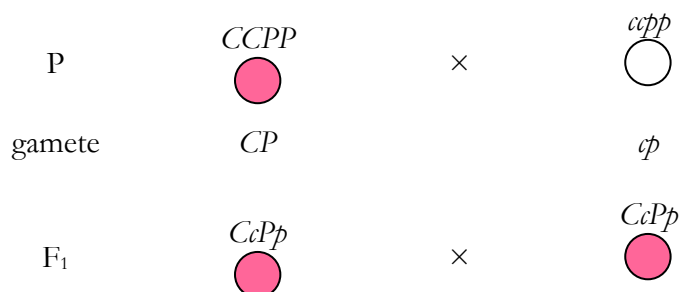
Još je jedan primjer recesivne epistaze međudjelovanje dvaju gena/lokusa kod fenotipske ekspresije sustava krvnih grupa AB0. Kao što je ranije spomenuto, glikoziltransferaze koje su produkti alela I^A i I^B dodaju monosaharide na postojeći antigen H i tako nastaju antigeni A i B koji određuju krvne grupe sustava AB0. Dakle, da bi glikoziltransferaze A i B imale na čemu izraziti svoju aktivnost, mora prethodno postojati funkcionalan antigen H, produkt gena H s drugog lokusa. Drugim riječima, antigen H je prekursor antigena A i B. Ako je osoba recesivna za gen H (genotip hh), bez obzira na genotip I lokusa njezin će fenotip biti krvna grupa 0. Ovaj se slučaj zove Bombay-fenotip prema osobi iz Bombaya u Indiji kod koje je prvi put ustanovljen genotip hh .

Primjer **dvostruke recesivne epistaze** ili komplementarnog učinka dvaju gena jest boja cvijeta mirisne grahorice (*Lathyrus odoratus*). Da bi došlo do proizvodnje pigmenta antocijanina koji daje ružičastu boja cvijeta, potrebna su dva enzima, produkta dvaju gena (Slika 14. 6). Samo ako jedinka ima dominantne alele C i P , proizvodit će funkcionalne enzime C i P te će njihovom aktivnošću doći do proizvodnje antocijanina i biljka će imati ružičaste cvjetove. Nasuprot tomu, ako je jedinka *recesivni* homozigot, imat će samo recesivne alele c i p te će joj pripadajući enzimi biti nefunkcionalni, neće doći do sinteze pigmenta antocijanina i cvjetovi će biti bijeli.



Slika 14. 6. Primjer dvostruke recesivne epistaze. (a) Metabolički put sinteze antocijanina, (b) mirisna grahorica (*Lathyrus odoratus*). Izvor: (a) autori, (b) <http://bit.ly/2uybUFE>

Križanjem dominantnog (ružičasti cvijet) i recesivnog (bijeli cvijet) homozigota svi su nastali potomci u F₁-generaciji heterozigoti (*CcPp*) i imaju ružičasti cvijet.



Da se radi o dva gena koji određuju dva različita svojstva (klasično dihibridno križanje detaljno opisano u Poglavlju 12), križanjem dvaju heterozigota za oba svojstva dobili bismo fenotipski omjer potomaka 9:3:3:1. Međutim, ovdje se radi o epistatskom međudjelovanju gena *C* i *P* koji zajedno određuju samo jedno svojstvo, a to je boja cvjetova. Stoga će dobiveni fenotipski omjer F₂-generacije biti 9 ružičastih cvjetova : 7 bijelih cvjetova, odnosno do proizvodnje antocijanina doći će samo ako je dominantan bar jedan alel svakog gena.

	<i>CP</i>	<i>Cp</i>	<i>cP</i>	<i>cp</i>
<i>CP</i>	<i>CCPP</i> ●	<i>CCPp</i> ●	<i>CcPP</i> ●	<i>CcPp</i> ●
<i>Cp</i>	<i>CCPp</i> ●	<i>CCpp</i> ○	<i>CcPp</i> ●	<i>Ccpp</i> ○
<i>cP</i>	<i>CcPP</i> ●	<i>CcPp</i> ●	<i>ccPP</i> ○	<i>ccPp</i> ○
<i>cp</i>	<i>CcPp</i> ●	<i>Ccpp</i> ○	<i>ccPp</i> ○	<i>ccpp</i> ○

Tablica 14. 5. Primjeri odnosa i međudjelovanja alela u poligenom nasljeđivanju.

fenotipski odnos potomaka*	opis i primjer	naziv odnosa (prema nekim autorima)
12:3:1	Kad je dominantan jedan alel epistatskog gena, on prikriva izražaj (fenotip) drugog gena. Odnos potpune dominacije / recesivnosti na oba genska para Primjer: boja ploda tikvice patišon	dominantna epistaza
9:4:3	Kad je jedinka recesivni homozigot za epistatski gen, on prikriva izražaj (fenotip) drugog gena. Odnos potpune dominacije / recesivnosti na oba genska para Primjer: boja dlake u miša	recesivna epistaza
9:7	Kad je jedinka za bilo koji od gena recesivni homozigot, on suprimira učinak drugog gena. Odnos potpune dominacije / recesivnosti na oba genska para Primjer: boja cvijeta grahorice	dvostruka recesivna epistaza
15:1	Samo recesivni homozigoti za oba gena izražavaju drugačiji fenotip. Odnos potpune dominacije / recesivnosti na oba genska para Primjer: oblik ploda (komaške) u rusomače (<i>Capsella bursa pastoris</i>)	dvostruka dominantna epistaza
13:3	Jedan je gen dominantno epistatski u odnosu na drugi gen, no kad je jedinka recesivni homozigot za drugi gen, tad je drugi gen epistatski za fenotipski izražaj prvog. Odnos potpune dominacije / recesivnosti na oba genska para Primjer: boja perja u kokoši; genski par <i>A</i> inhibira boju perja koju određuju aleli gena <i>B</i> (bijelo perje). Samo će jedinka genotipa - - <i>bb</i> imati obojeno perje.	dominantna i recesivna epistaza

*nakon križanja dvaju heterozigota za oba svojstva

Zadatak 2:

U istoj bolnici rođene su četiri bebe. Igrom slučaja došlo je do zamjene njihovih identifikacijskih brojeva. Krvne grupe beba bile su: A, B, 0 i AB. Krvne grupe roditelja:

1. bračni par Anić: otac A, majka B
2. bračni par Papić: otac B, majka 0
3. bračni par Babić: otac 0, majka 0
4. bračni par Nikolić: otac AB, majka 0.

Pronađite roditelje i prikažite *sva moguća* križanja kod ovih bračnih parova!

Zadatak 3:

Suprug tuži suprugu zbog nevjere. Njihovo prvo i drugo dijete imaju krvne grupe 0 i AB. Treće dijete za koje postoji sumnja da nije njegovo ima krvnu grupu B.

- a) Možete li na temelju ovih podataka donijeti bilo kakav zaključak o očinstvu?
- b) Učinjen je još jedan krvni test sa sustavom krvnih grupa MN. Test je pokazao da suprug ima krvnu grupu N, a treće dijete krvnu grupu M. Što možete zaključiti na temelju ovog testa?

Zadatak 4:

Vinska mušica, *Drosophila melanogaster*, ima nekoliko desetaka alela gena za boju očiju, čiji se lokus nalazi na X-kromosomu): bijele su oči (engl. *white*, oznaka w) recesivne, crvene dominantne (w^+), dok ostale boje imaju različit stupanj izražajnosti (intenzitet ovisi o količini ugrađenog pigmenta). Tako je alel za eozin crvenu boju (w^e) recesivan u odnosu na alel za crvenu boju (w^+), ali dominantan nad alelima za boju trešnje (*cherry*, w^{ch}), marelice (apricot, w^a) i bijelu boju (w). Prema dominaciji, stupanj izražajnosti pojedinih alela možemo prikazati: $w^+ > w^e > w^{ch} > w^a > w$.

Koje će boje očiju imati mušice potomci ženke eozin crvene boje očiju ($w^e w^a$) i mužjaka očiju boje trešnje (hemizigot)? Prikažite ovo križanje.

Zadatak 5:

Boja krzna u kunića pod kontrolom je četiriju alela različitog stupnja izražajnosti pa se stoga javljaju četiri različita fenotipa: agouti (C), činčila (c^{ch}), himalajski (c^h) i albino (c). Hijerarhija je dominacije $C > c^{ch} > c^h > c$.

Križanjem kunića činčila boje krzna potomci su imali činčila i himalajsku boju krzna u

omjeru 3:1. Pretpostavite genotip roditelja.

Zadatak 6:

Andaluzijske kokoši genotipa $C^B C^B$ imaju perje crne boje, one genotipa $C^W C^W$ bijele su boje perja, dok su kokoši genotipa $C^B C^W$ sive boje. Koji je očekivani fenotipski omjer potomaka nastao križanjem kokoši $C^B C^W \times C^B C^W$? U kakvom su međusobnom odnosu aleli C^B i C^W ?

Zadatak 7:

Izračunajte i iskažite u postotcima koliko djece može imati tamniju put od roditelja ako je majka genotipa $aaBBcc$, a otac genotipa $aaBbCc$. Objasnite kakav je to oblik nasljeđivanja.

Zadatak 8:

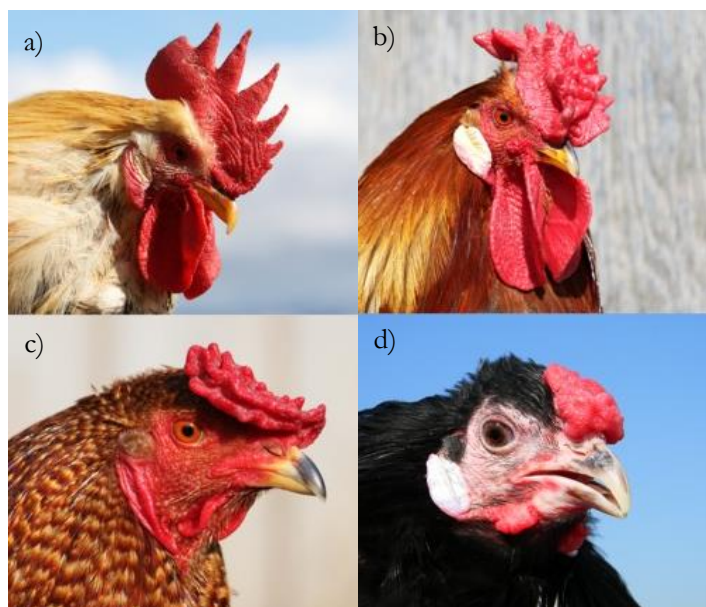
Prikažite križanje pasa pasmine labrador retriver žute (genotip $BBee$) i crne (genotip $BbEE$) boje krzna. Koju boju krzna imaju potomci? Objasnite!

Zadatak 9:

Roditelji krvne grupe 0 i genotipa $iiHH$ i $I^A I^A bb$ dobili su dijete krvne grupe A. Izvedite križanje i objasnite!

Zadatak 10:

Oblik kreste kod kokoši određuje interakcija dvaju gena – R i P – od kojih svaki ima dva alela u međusobnom odnosu potpune dominacije i recesivnosti (aleli R i r te P i p) (Slika 14. 6). Ako je prisutan barem jedan dominantni alel svakog gena, kresta će biti orašastog oblika, tzv. *walnut-tip* ($R- P-$). Kresta oblika ruže (engl. *rose*) javlja se kad je prisutan bar jedan dominantan alel R , dok je jedinka za drugi alel recesivni homozigot ($R- pp$). Kresta oblika mahune graška (engl. *pea*) nastaje kad



Slika 14. 7. Oblik kreste u kokoši: (a) jednostavan oblik, *single*; (b) oblik cvijeta ruže, *rose*; (c) oblik mahune graška, *pea*; (d) orašast oblik kreste, *walnut*. Izvor: Freyja Imsland (A–C) i David Gourichon (D), doi:10.1371/journal.pgen.1002775

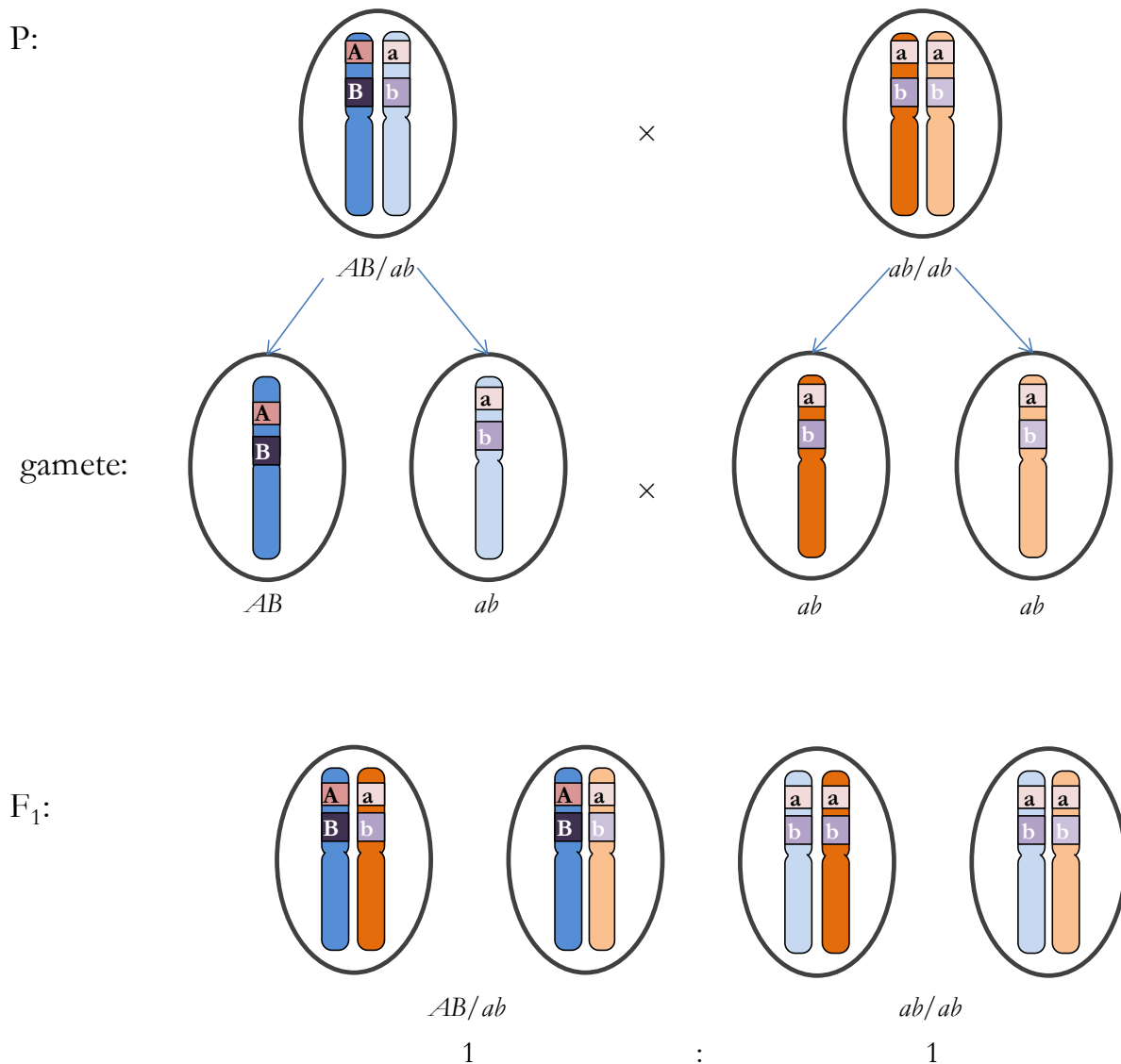
jedinka ima bar jedan dominantni alel P , a recesivni homozigot je za drugi alel ($rr P$). Obična, jednostavna kresta (engl. *single*) javlja se kod recesivnih homozigota za oba svojstva. Predvidite fenotipske omjere kod potomaka sljedećih križanja:

- a) $RRPP \times rrp$
- b) $Rrpp \times Rrpp$
- c) $RrPp \times rrp$
- d) $Rrpp \times rrPp$
- e) $RrPp \times RrPp$
- f) $rrpp \times rrPp$.

15. VEZANI GENI

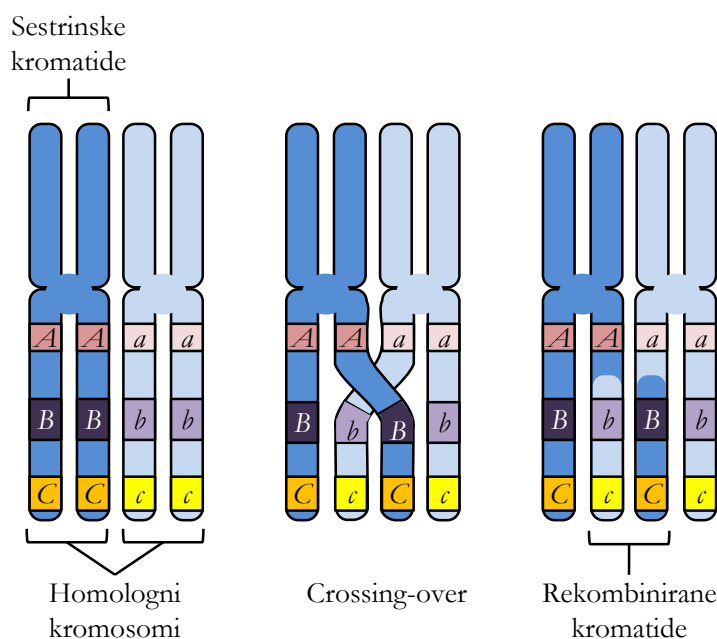
Dosad smo govorili o genima koji se nalaze na različitim kromosomima. Kod dihibridnog križanja promatrana su dva svojstva/alela koji se nalaze na *različitim* kromosomima (vidi Poglavlje 12). Nasuprot tomu mogu se promatrati dva svojstva što ih određuju geni koji se nalaze na istom kromosomu. Takvi se geni nazivaju **vezanim genima** (= dva ili više gena koji se nalaze na *istom* kromosomu). Baš zbog toga što se nalaze na istom kromosomu, za vezane gene ne vrijedi Mendelov zakon nezavisnog odvajanja alela, već se oni većinom nasljeđuju zajedno. Npr. geni za svojstva 1 – 5 sa Slike 12. 1 jesu vezani. Vezani se geni u križanju prikazuju tako da se prvo napišu *aleli s jednog homolognog kromosoma* pa se stavi kosa crta, a nakon nje *aleli s drugog homolognog kromosoma*. Dakle, alele s dva homologna kromosoma na Slici 12. 1 prikazali bismo: $ABCDe/aBcDe$. Primijetite da postoje dvije mogućnosti kako dva promatrana vezana gena mogu biti „raspoređena“ na homolognim kromosomima. Ako jedinka na istom homolognom kromosomu ima oba alela dominantna (A i C), a recesivne (a i c) na drugom kromosomu homolognog para, kažemo da su aleli u *cis*-razmještau (Slika 12. 1). *Trans*-razmještaj označuje da se na svakom homolognom kromosomu nalazi po jedan dominantni alel i jedan recesivni alel za navedena svojstva (A i d na jednom homologu, a a i D na drugom, Slika 12. 1). Ako su vezani aleli za ista svojstva na homolognim kromosomima isti (ili dominantni ili recesivni), ne utječu na *cis*-/*trans*-raspored, odnosno aleli B i e nemaju *cis*-/*trans*-raspored jer su aleli identični na oba homologna kromosoma.

Vežanost može biti potpuna i djelomična (parcijalna). **Potpunu vežanost** pokazuju *geni između kojih ne dolazi do rekombinacije* (crossing-overa), odnosno ne postoji izmjena između majčinih i očevih kromatida u bivalentu. Zbog toga se dva potpuno vezana gena/alela *uvijek nasljeđuju zajedno*, kao što je slučaj s alelima A i B te a i b na Slici 15. 1. Primijetite da su roditeljski kromosomi nosili kombinacije alela AB i ab , a takve iste kombinacije imaju i kromosomi potomstva. Drugim riječima, aleli A i B , odnosno aleli a i b , jesu potpuno vezani jer su bili naslijeđeni zajedno i između njih nije došlo do crossing-overa. Mejoza bez crossing-overa poznata je kod mužjaka vinske mušice, a utvrđena je i kod nekih drugih kukaca i biljaka. Osim toga, između dva gena koja su jako blizu na kromosomu vrlo se rijetko događa crossing-over (crossing-over je slučajan događaj i mala je vjerojatnost da se dogodi baš između dva vrlo blisko smještena gena).



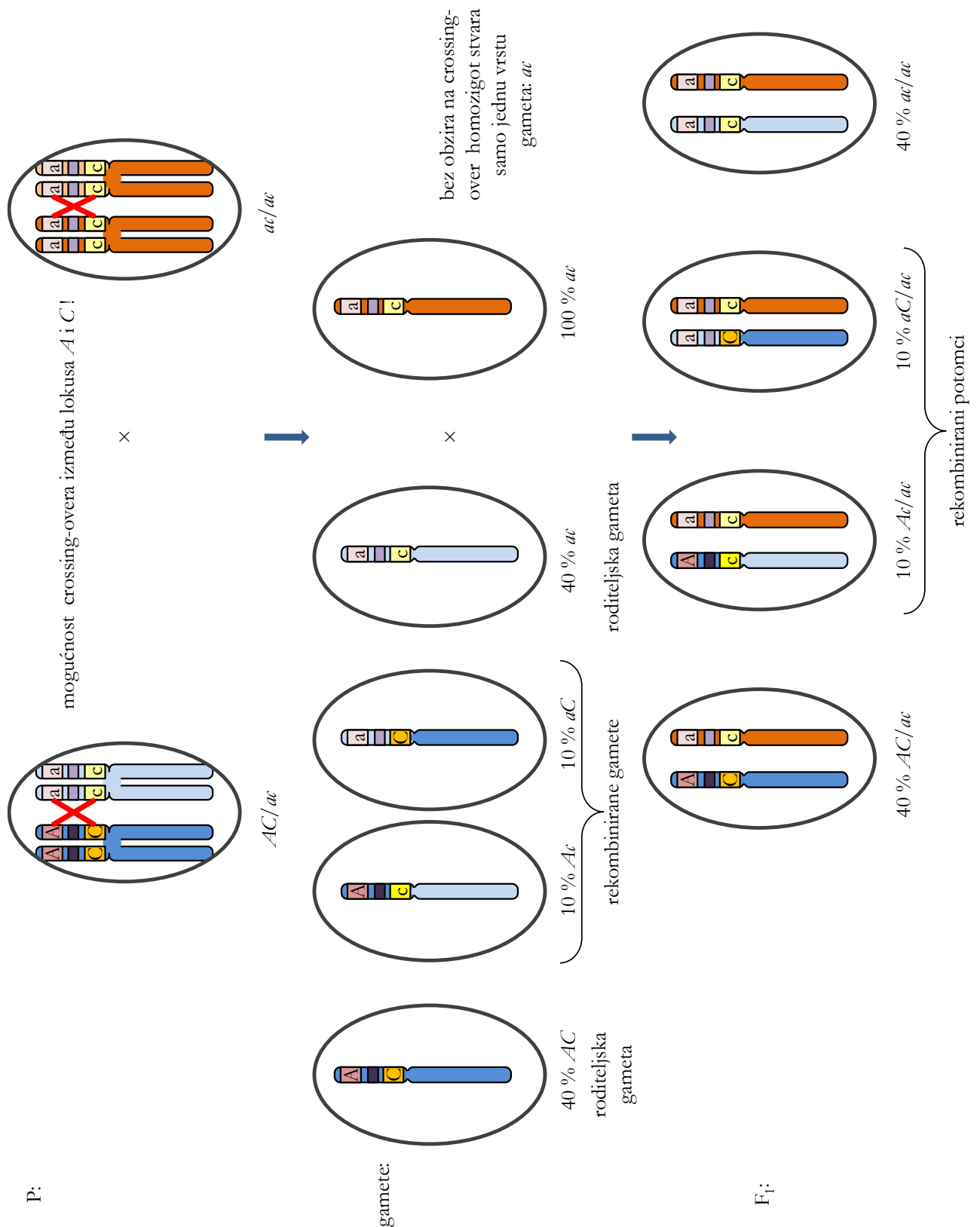
Slika 15. 1. Križanje u kojem se prati nasljeđivanje dvaju potpuno vezanih gena, *A* i *B*. Radi jednostavnosti u roditeljskoj generaciji nisu prikazane sestrinske kromatide dvostrukih homolognih kromosoma kao ni po dvije istovrsne gamete. Izvor: autori.

Kada između vezanih gena dolazi do rekombinacije putem crossing-overa, govorimo o **djelomičnoj vezanosti**. Kao što je objašnjeno u Poglavlju 11, crossing-over je izmjena dijelova nesestrinskih kromatida homolognih kromosoma (Slika 15. 2). To je slučajni događaj, odnosno tijekom svake pojedinačne mejoze događa se na drugom mjestu na kromosomu.



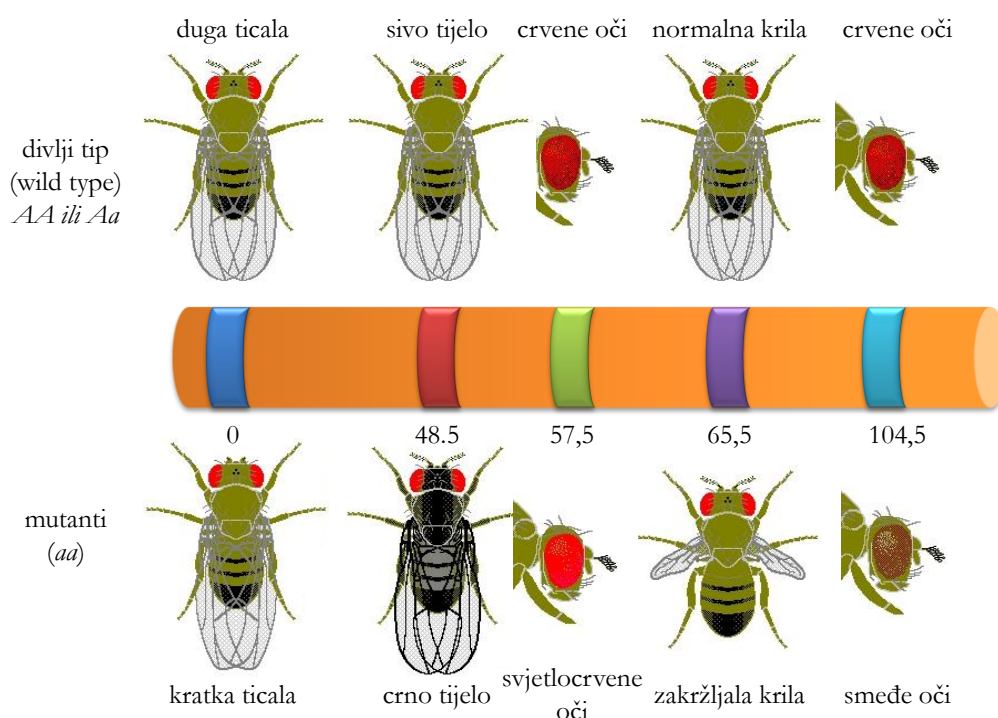
Slika 15. 2. Crossing-over. Izvor: autori.

Na Slici 15. 3 prikazano je križanje u kojem se prati nasljeđivanje dvaju djelomično vezanih gena, A i C . Jedan od roditelja ima genotip AC/ac . U njemu mejozom nastaju gamete. Tijekom svake pojedinačne mejotske diobe, s obzirom na lokuse A i C , moguća su dva razvoja događaja: između ova dva lokusa može ili ne mora doći do crossing-overa. Ne dođe li do njega, nastat će gamete koje će imati iste kombinacije alela kao i roditelj. To su tzv. **roditeljske gamete** i nose kombinacije AC i ac . Ako između ova dva lokusa dođe do crossing-overa, nastat će gamete koje više nemaju roditeljske kombinacije alela (AC i ac), već nose *nove kombinacije alela* – Ac i aC . Takve se gamete nazivaju **rekombiniranimi**. Primijetite da su na Slici 15. 3 prikazane učestalosti pojavljivanja roditeljskih i rekombiniranih gameta u potomcima. To znači da ove četiri vrste gameta nisu rezultat jedne mejotske diobe, već ukupne učestalosti gameta nastalih mnogim mejozama. S obzirom na to da je drugi roditelj recesivni homozigot za oba svojstva (test-križanje), učestalosti različitih fenotipova kod potomstva odražavaju učestalosti različitih gameta prvog roditelja. Primjerice, budući da 10 % potomaka ima genotip Ac/ac , možemo zaključiti da je 10 % gameta imalo genotip Ac . Isto tako možemo zaključiti da je u 20 % gameta došlo do crossing-overa jer 20 % potomaka ima rekombinirane genotipove (Ac/ac i aC/ac), koji nisu bili prisutni kod roditelja i mogli su nastati samo kao rezultat rekombinacije.



Slika 15. 3. Test-križanje u kojem se prati nasljeđivanje dvaju djelomično vezanih gena, A i C . Učestalost je potomaka (40 % i 10 %) proizvoljna i mijenja se ovisno o udaljenosti dvaju promatranih gena na kromosomu. Izvor: autori.

Nadalje, budući da geni zauzimaju točno određena mjesta (lokuse) na kromosomu, učestalost je rekombinacija (tj. crossing-overa) između dva genska lokusa stalna (konstantna) za svaki par gena i može se eksperimentalno utvrditi test-križanjem (kao što je prikazano na Slici 15. 3). Drugim riječima, za određeni par gena postotak rekombinanata uvijek će biti približno isti za svako test-križanje. Na Slici 15. 3 dan je proizvoljan udio rekombiniranih gameta od 20 % te 80 % nerekombiniranih gameta, odnosno potomaka. Postotak rekombiniranih potomaka test-križanja predstavlja **rekombinacijsku učestalost** ili crossing-over-vrijednost. Ona nam daje podatak o tom koliko su dva gena udaljena na kromosomu te varira ovisno o paru gena koji se promatra: *što su dva vezana gena udaljenija, to se između njih češće događa crossing-over*. Na temelju rekombinacijskih učestalosti izrađuju se **genske karte**, odnosno određuju međusobne udaljenosti gena na kromosomu (Slika 15. 4). Učestalost rekombinacija od 1 % predstavlja jednu jedinicu karte na kromosomu, odnosno 1 cM (centiMorgan). Odnos između cM i parova baza u DNA visoko je varijabilan te ovisi o vrsti, spolu i regiji na kromosomu. Npr. u čovjeka se 1 cM kreće od 100.000 do 10.000.000 pb, dok u kvasca 1 cM iznosi oko 2500 pb.



Slika 15. 4. Genska karta kromosoma II vinske mušice. Izvor: Otto PA, *Drosophila Viewer Program*, V.6.0, 2000.

Zadatak 1:

Vinske mušice s kojima rukujete fenotipski su divlji tip, a genotip im je $+b +vg$ (nose recesivne gene za crno tijelo, engl. *black body*, b i zakržljala krila, engl. *vestigial*, vg).

a) Nakon test-križanja dobili ste 500 potomaka sljedećih fenotipova:

fenotip	ženke	mušjaci
normalno tijelo i normalna krila	132	131
crno tijelo i zakržljala krila	121	116

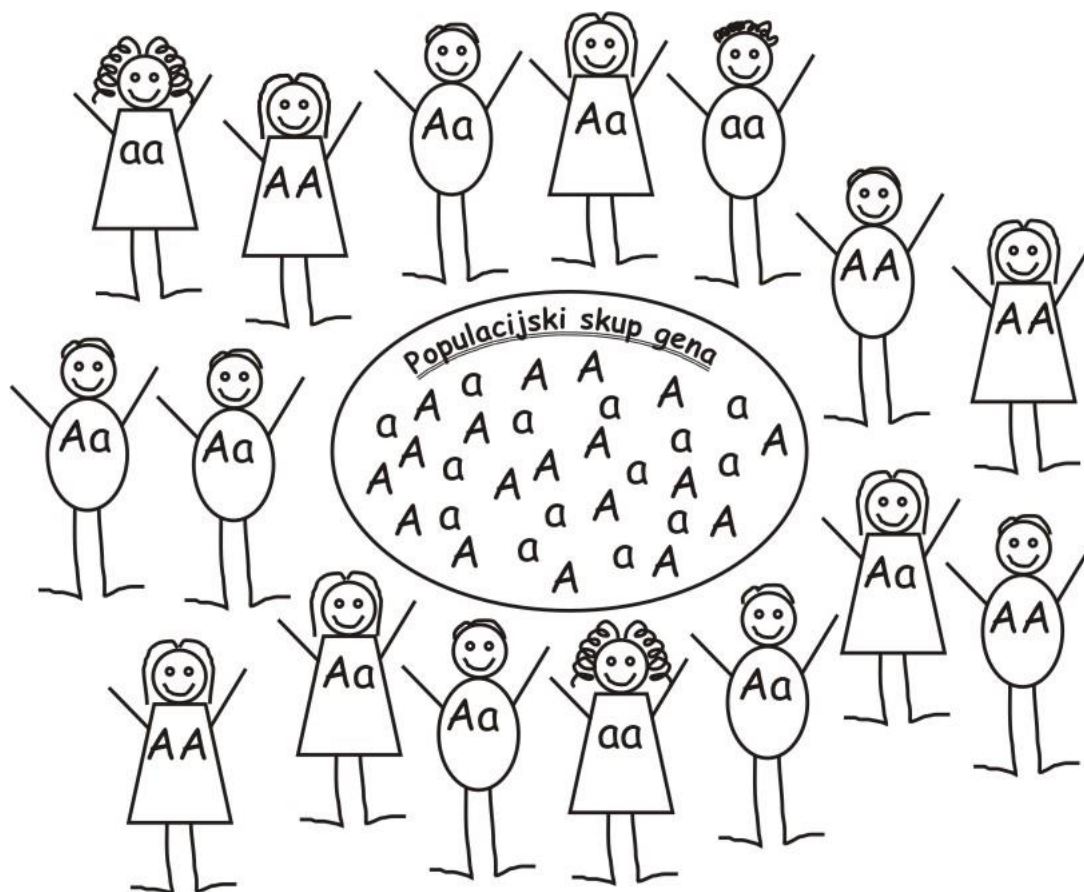
Utvrđite radi li se o vezanim genima ili o genima koji se nalaze na različitim kromosomima! Jesu li ova dva gena djelomično ili potpuno vezana? Obrazložite!

b) Da ste nakon istog križanja dobili sljedećih 500 potomaka, što biste tad zaključili o položaju gena b i vg na kromosomu/kromosomima vinske mušice:

fenotip	ženke	mušjaci
normalno tijelo i normalna krila	90	103
normalno tijelo i zakržljala krila	25	23
crno tijelo i normalna krila	31	26
crno tijelo i zakržljala krila	102	100

16. POPULACIJSKA GENETIKA

U prethodnim vježbama iz modula Biologija 1 obrađivani su procesi nasljeđivanja na razini pojedine jedinke (npr. ima li određena jedinka graška žuto ili zeleno zrno te kakav je bio genotip i fenotip roditeljskih jedinki). Međutim, procesi nasljeđivanja mogu se proučavati i *na razini populacije* (definicija pojma populacije slijedi dalje u tekstu). Uzmimo kao primjer daltonizam, nasljednu sljepoću za boje, koju najčešće uzrokuju mutacije gena na X-kromosomu. Mogu nas zanimati odgovori na pitanja poput: koliki je postotak oboljelih od daltonizma u ukupnoj populaciji neke zemlje, koliko je među njima žena, a koliko muškaraca, kolika je učestalost pojavljivanja mutiranog gena, mijenjaju li se učestalosti ispitivanih alela tijekom vremena i zbog čega.



Slika 16. 1. Populacijski skup gena (engl. *gene pool*). Alel A – ravna kosa, alel a – kovrčava kosa. Izvor: autori.

Populacija je skupina jedinki iste vrste koje žive na određenom prostoru i aktivno se razmnožavaju (razmjenjuju genski materijal) dajući plodno potomstvo. **Populacijska genetika** je znanost koja proučava gensku strukturu populacije, odnosno učestalosti* alela i genotipova. Osim toga, populacijska genetika proučava kako se te učestalosti *mijenjaju* tijekom vremena pod

utjecajem pet glavnih evolucijskih sila: prirodnog odabira (prirodne selekcije), genskog otklona (engl. *genetic drift*), mutacija, protoka gena (engl. *gene flow*) i usmjerenog (neslučajnog) razmnožavanja. Tako populacijska genetika ima svoju ulogu u objašnjavanju procesa kojim su nastali svi organizmi koji danas žive na Zemlji – evolucije. Evolucijske promjene organizama i populacija mogu se promatrati na više razina. **Mikroevolucija** obuhvaća male i ponekad nezamjetljive promjene učestalosti alela i genotipova tijekom vremena, čime se bavi upravo populacijska genetika. Nakupljanjem ovakvih malih promjena tijekom vremena dolazi i do puno većih događaja (**makroevolucija**), poput specijacije – nastanka novih vrsta, ali i nastanka čitavih novih skupina organizama (primjerice, nastanak ptica iz predaka sličnih današnjim gmazovima). Metode istraživanja u populacijskoj genetici temelje se na brojnim matematičkim modelima.

U genetičkom smislu populacija nije samo skupina jedinki već skupina koja razmjenjuje svoj nasljedni materijal i daje potomstvo. Drugim riječima, geni roditeljske generacije prenose se u iduću – generaciju potomstva. Tijekom tog prijenosa diploidni roditelji mejozom stvaraju haploidne gamete. Haploidne gamete spajaju se u nove diploidne potomke sljedeće generacije. To znači da aleli, odnosno geni, koje populacija sadržava imaju kontinuitet iz jedne u drugu generaciju.

Stoga je važan pojam u populacijskoj genetici **genska zaliha** (engl. *gene pool*) ili **populacijski skup gena**, koji čine svi geni što se nalaze u svim gametama populacije (Slika 16. 1).

*Relativna učestalost (**frekvencija**) (f_i) nekog događaja/stanja/alela (i) predstavlja broj pojavljivanja tog događaja/stanja/alela (n_i) podijeljen s ukupnim brojem događaja/stanja/alela.

$$(N): f_i = \frac{n_i}{N}$$

Hardy-Weinbergov zakon

Hardy-Weinbergov zakon jedna je od osnovnih postavki populacijske genetike, a postavili su ga G. H. Hardy i W. Weinberg neovisno jedan o drugome 1908. godine. Povezuje učestalosti alela i genotipova u populaciji diploidnih jedinki koje se spolno razmnožavaju. Vrijedi za jedan autosomni lokus koji ima (samo) dva alela. **Hardy-Weinbergov zakon** glasi:

Ako je populacija u *ravnoteži*, učestalosti alela, gena i genotipova ostaju nepromijenjene tijekom niza generacija.

Hardy-Weinbergov zakon opisuje populaciju koja se ne mijenja, odnosno ne evoluira, tj. odnosi se na hipotetsku populaciju u kojoj ne djeluju evolucionijske sile:

1. **Neograničeno je velika.** Genski otklon (genski drift) promjena je učestalosti alela u populaciji koja je nastala slučajnim događajem, primjerice nekom katastrofom. Genski drift ne utječe (ili tek zanemarivo utječe) na velike populacije, a u malim populacijama dolazi do izražaja.
2. Svi se članovi populacije mogu pariti, a odabir partnera potpuno je slučajan (svaki član populacije ima jednaku mogućnost parenja s bilo kojim drugim članom populacije) – **panmiksija** (engl. *random mating*). Nasuprot tomu, u prirodnim populacijama često dolazi do usmjerenog, neslučajnog razmnožavanja kad su neke jedinke, koje imaju određeni genotip, „privlačnije“ od ostalih (primjerice, paun s većim i raskošnijim repom lakše pronalazi partnericu, lakše proizvede veći broj potomaka i lakše prenese svoje gene u sljedeću generaciju), a često je i parenje s geografski bližim jedinkama te *inbreeding* (parenje sa srodnim jedinkama i samooplodnja).
3. U populaciji **nema mutacija** (nema nastanka novih alela) **ni migracija**, odnosno u populaciju ne ulaze novi aleli, a niti iz nje nestaju postojeći.
4. U populaciji **nema prirodnog odabira** (Zadatak 1), odnosno nijedna jedinka zbog svog genotipa nema veći ili manji reproduktivni uspjeh (veći ili manji broj potomaka).

Za populaciju s takvim osobinama kažemo da je *u ravnoteži*. Takva populacija u prirodi ne postoji, odnosno prirodne populacije više ili manje odstupaju od Hardy-Weinbergova zakona. On ipak ima smisla iz dva razloga. Prvi je taj što ako neku populaciju promatramo u dovoljno kratkom vremenskom razdoblju, djelovanje evolucionijskih sila tako je slabo da ga možemo zanemariti (evolucija se najčešće odvija tako sporo da je u kraćim vremenskim razmacima ne možemo primijetiti). Osim toga, ako u nekoj populaciji pratimo učestalosti alela tijekom vremena i primijetimo da vrijednosti odstupaju od onih koje bismo očekivali prema Hardy-Weinbergovu zakonu, možemo zaključiti da se ispitivana populacija mijenja, odnosno evoluira.

Utvrđivanje učestalosti alela u populaciji

Učestalosti alela u populaciji možemo odrediti na dva načina:

A) Ako su ispitivani aleli u kodominantnom (Poglavlje 14) ili bilo kojem drugom odnosu gdje prema fenotipu znamo genotip, učestalost alela odredi se tako da broj pojedinih alela

podijelimo s njihovim ukupnim brojem.

B) Ako su aleli u dominantno-recesivnom odnosu, pa jedino za recesivne homozigote možemo prema fenotipu znati i genotip, učestalost alela u populaciji može se odrediti uz pomoć Hardy-Weinbergove jednadžbe.

A) Utvrđivanje učestalosti kodominantnih alela

Za primjer možemo uzeti sustav krvnih grupa MN. Danas je poznat velik broj genski određenih sustava krvnih grupa u čovjeka, od kojih su najpoznatiji i najvažniji za transfuziju krvi ABO i Rh-sustav (Poglavlje 14). Sustav krvnih grupa MN određen je dvama alelima – M i N – pa su moguća tri različita genotipa: MM, MN i NN. S obzirom na to da su aleli *kodominantni*, moguća su tri fenotipa, odnosno krvne grupe: M, MN i N. U Tablici 16. 1 navedeni su podatci za jednu populaciju australskih domorodaca.

Tablica 16. 1. Učestalosti genotipova sustava krvnih grupa MN za jednu populaciju australskih domorodaca.

fenotip	genotip	broj osoba	učestalosti genotipova
M	MM	22	$f(MM) = \frac{22}{730} = 0,03$ (3 %)
MN	MN	220	$f(MN) = \frac{220}{730} = 0,30$ (30 %)
N	NN	488	$f(NN) = \frac{488}{730} = 0,67$ (67 %)
	ukupno	730	1 (100 %)

Već smo napomenuli da sustav krvnih grupa MN ima dva različita alela na istraživanom lokusu pa će svaka jedinka unutar populacije imati neku od mogućih kombinacija tih dvaju alela. Ukupan je broj alela u istraživanoj populaciji 1460 (730×2) jer su sve jedinice diploidne, odnosno imaju po dva alela. Kako bismo odredili **učestalosti pojedinih alela** u populaciji, treba jednostavno prebrojiti *M*- ili *N*-alele i taj broj podijeliti s ukupnim brojem alela:

$$f(M) = \frac{(2 \times 22) + 220}{1460} = 0,18 \text{ (18 \%)}$$

$$f(N) = \frac{(2 \times 488) + 220}{1460} = 0,82 \text{ (82 \%)}.$$

Primijetite da zbroj učestalosti svih mogućih genotipova mora biti 1 (100 %):

$$f(MM) + f(MN) + f(NN) = 0,03 + 0,30 + 0,67 = 1$$

kao i zbroj učestalosti svih različitih alela:

$$f(M) + f(N) = 0,18 + 0,82 = 1.$$

Sljedeći primjer pokazuje kako možemo izračunati učestalosti alela ako su poznate učestalosti genotipova (Tablica 16. 2).

Tablica 16. 2. Učestalosti genotipova sustava krvnih grupa MN za grenlandsku i islandsku populaciju.

lokacija	f(MM)	f(MN)	f(NN)
Grenland	0,83	0,16	0,01
Island	0,31	0,52	0,17

$$f(M) = f(MM) + [0,5 \times f(MN)]$$

$$f(N) = f(NN) + [0,5 \times f(MN)]$$

Zastupljenost alela *M* u heterozigotu jest 0,5, a drugu polovicu čini alel *N*.

Tako učestalosti alela *M* i *N* za Grenland jesu:

$$f(M) = 0,83 + (0,5 \times 0,16) = 0,91$$

$$f(N) = 0,01 + (0,5 \times 0,16) = 0,09.$$

Za Island:

$$f(M) = 0,31 + (0,5 \times 0,52) = 0,57$$

$$f(N) = 0,17 + (0,5 \times 0,52) = 0,43.$$

Važno je uočiti da dvije različite populacije iste vrste ne moraju imati iste učestalosti alela. Također vrijedi $f(M) + f(N) = 1$ za svaku populaciju.

B) Utvrđivanje učestalosti alela koji su u dominantno-recesivnom odnosu: Hardy-Weinbergova jednadžba

Neka su *A* i *a* par alela koji kontroliraju nasljeđivanje jednog svojstva, *p* je učestalost dominantnog alela *A* [$f(A)$], a *q* je učestalost recesivnog alela *a* [$f(a)$]. Slobodnim kombiniranjem gameta koje sadrže te alele mogu nastati tri različita genotipa:

AA – dominantni homozigoti,

Aa – heterozigoti,

aa – recesivni homozigoti.

Ako u čitavoj populaciji postoje samo ova dva alela na tom genskom lokusu, onda zbroj učestalosti jednog i drugog alela mora biti 1:

$$p + q = 1 \text{ (100 \%)}.$$

Naravno, vrijedi i

$$p = 1 - q$$

$$q = 1 - p.$$

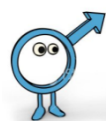
Ako je populacija u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži (vrijede sve pretpostavke: neograničeno je velika, panmiksija, nema mutacija, migracija i prirodnog odabira), tri moguća genotipa pojavljuju se u populaciji s učestalostima kojima se parovi gameta nasumično izvlače iz genske zalihe (Tablica 16. 3):


$$f(AA) = (p \times p) = p^2$$

$$f(Aa) = (p \times q) + (q \times p) = 2pq$$

$$f(aa) = (q \times q) = q^2.$$

Tablica 16. 3. Koncept stvaranja zigota iz genske zalihe. Mužjaci i ženke imaju iste učestalosti dvaju alela: $p = f(A)$ i $q = f(a)$. Nakon jedne generacije nasumičnog parenja tri će se genotipa pojavljivati sa sljedećim učestalostima: $f(AA) = p^2$, $f(Aa) = 2pq$, $f(aa) = q^2$.



		<i>A</i>	<i>a</i>
		$f(A) = p$	$f(a) = q$
	<i>A</i>	<i>AA</i> $f(AA) = p^2$	<i>Aa</i> $f(Aa) = pq$
	<i>a</i>	<i>Aa</i> $f(Aa) = pq$	<i>aa</i> $f(aa) = q^2$
		$f(A) = p$	$f(a) = q$

Vrijedi i:

$$(p + q)^2 = 1.$$

Iz ovog proizlazi **Hardy-Weinbergova jednadžba**:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

- p^2 predstavlja učestalost dominantnih homozigota *AA* u populaciji;
- $2pq$ je učestalost heterozigota *Aa*;
- q^2 učestalost recesivnih homozigota *aa*.

Vidi se da je Hardy-Weinbergova jednadžba zapravo binomna jednadžba.

U ranije navedenom primjeru sa sustavom krvnih grupa MN radi se o dva kodominantna alela, tj. o slučaju kad se iz fenotipa vidi genotip. Međutim, kod *dominantno-recesivnog* odnosa (koji je mnogo češći) za jedinke s dominantnim fenotipom ne možemo znati kakav im je genotip (radi li se o heterozigotu ili o dominantnom homozigotu). Iz promatranja fenotipova obično je moguće izravno zaključiti samo kolika je učestalost recesivnih homozigota (q^2). Jedinke koje imaju dominantni fenotip mogu biti homozigoti (čija je učestalost p^2) ili heterozigoti (čija je učestalost $2pq$). U sljedećem primjeru bit će pokazano kako se uz pomoć Hardy-Weinbergove jednadžbe može izračunati učestalost različitih genotipova i alela u populaciji za koju se pretpostavlja da je u ravnoteži.

Primjer Hardy-Weinbergova problema: albinizam

Albinizam je rijetka nasljedna bolest koja se fenotipski eksplicira samo kod recesivnih homozigota (aa). U koži i kosi albino-osoba nedostaje tamni pigment melanin. Albinizam se može javiti kod svih etničkih skupina ljudi, kao i kod životinja. U Sjevernoj Americi i Europi javlja se kod prosječno 5 osoba na 100.000 stanovnika. Uz pomoć Hardy-Weinbergove jednadžbe može se izračunati kolike su učestalosti pojedinih alela i genotipova u populaciji.

U rješavanju ovakvih problema uvijek se kreće od recesivnih homozigota jer kod njih na osnovi fenotipa znamo genotip. Prema Hardy-Weinbergovoj jednadžbi učestalost recesivnih homozigota $f(aa)$, odnosno u našem slučaju albino-osoba, jest q^2 . Lako se izračuna i učestalost alela $q = f(a)$:

$$q^2 = \frac{5}{100000} = 0,00005$$

$$q = \sqrt{0,00005} = 0,007.$$

Dakle, učestalost recesivnog alela za albinizam (a) jest 0,007. Iz tog se izračuna učestalost dominantnog alela p :

$$p = 1 - q$$

$$p = 1 - 0,007 = 0,993.$$

Učestalost dominantnog, normalnog alela (A) jest 0,993 ili oko 99 alela na 100.

Sljedeći je korak uvrštenje vrijednosti p i q u Hardy-Weinbergovu jednadžbu kako bismo izračunali učestalosti različitih genotipova u populaciji:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

$$0,993^2 + 2 \times 0,993 \times 0,007 + 0,007^2 = 1$$

$$0,986 + 0,014 + 0,00005 = 1.$$

p^2	= učestalost dominantnih homozigota	0,986 = 98,6 %
$2pq$	= učestalost heterozigota (prenositelja)	0,014 = 1,4 %
q^2	= učestalost recesivnih homozigota (albino-osoba)	0,00005 = 0,005 %

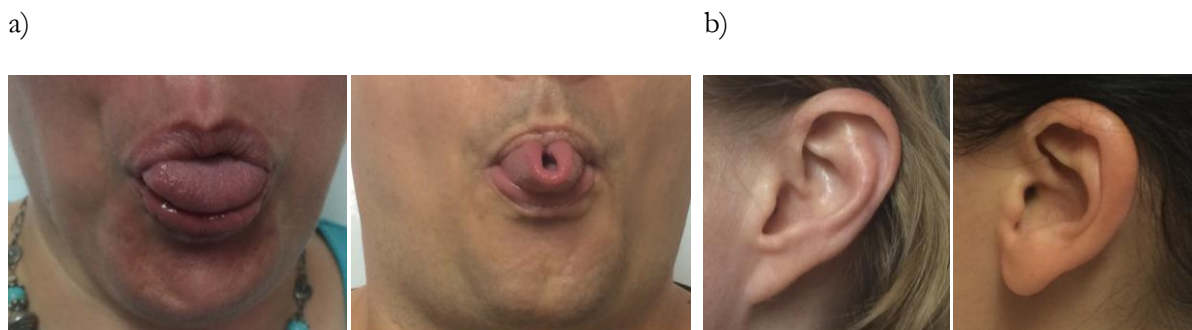
S učestalošću od 0,005 %, albino-osobe vrlo su rijetke u populaciji (1 na 20.000). Međutim, heterozigotni nositelji za ovu osobinu imaju učestalost od otprilike 1,4 % (približno jedna osoba od njih 72). U populaciji ima otprilike 278 puta više nositelja nego oboljelih. Ipak, velika većina od 98,6 % ljudi u Sjevernoj Americi i Europi dominantni su homozigoti i nemaju recesivni alel za albinizam.

Zadatak 1: Primjeri dominantno-recesivnog nasljeđivanja kod čovjeka. Primjena Hardy-Weinbergova zakona.

- Sposobnost uzdužnog savijanja jezika dominantno je svojstvo (S), a nesposobnost savijanja recesivno (s) (Tablica 16. 2 i Slika 16. 2a). Koliko studenata u vašoj grupi ima tu sposobnost? Izračunajte učestalost alela S i s ! Primijenite Hardy-Weinbergovu jednadžbu i izračunajte učestalosti genotipova!
- Izračunajte iste parametre za slobodan ili vezan ušni režanj (Tablica 16. 4 i Slika 16. 2b)!

Važno je napomenuti da je uzorak na kojem ćete raditi ovaj zadatak premalen (do 20 studenata u grupi) da bi rezultati koje ćete dobiti bili statistički reprezentativni, odnosno oni ne moraju nužno vrijediti za širu populaciju (npr. čitavu populaciju grada Zagreba ili Hrvatske).

Primjeri nekih osobina kod čovjeka koje se nasljeđuju dominantno-recesivno navedeni su u Tablici 16. 4 i na Slici 16. 2.



Slika 16. 2. Primjeri dominantno-recesivnog nasljeđivanja nekih osobina kod čovjeka: (a) nesposobnost (recesivno) ili sposobnost (dominantno) uzdužnog savijanja jezika, (b) ušni režanj vezan (recesivno) ili slobodan (dominantno). Izvor: autori.

Tablica 16. 4. Primjeri dominantno-recesivnog nasljeđivanja kod čovjeka.

DOMINANTNO	RECESIVNO
ušni režanj slobodan	ušni režanj vezan
ivica kose na sredini čela izvijena	ravna ivica kose na čelu
bijeli pramen u kosi kod muškaraca	bijeli pramen u kosi kod žena
ćelavost kod muškaraca	prorijeđenost kose kod žena
tamna kosa	crvena kosa
ravna kosa	kovrčava kosa
rupica u bradi (kost)	bez rupice u bradi
kratki prsti (brahidaktilija)	normalna dužina prstiju
više prstiju (polidaktilija)	normalan broj prstiju
nemogućnost savijanja palca	distalna hiperekstenzibilnost palca (savijanje i do 45 %)
posljednji članak malog prsta savijen k domalom	mali prst ravan
dlačice na srednjem članku prstiju	odsutnost dlačica na srednjem članku svih prstiju
sposobnost uzdužnog savijanja jezika	nesposobnost uzdužnog savijanja jezika
normalna usna	zečja usna
sposobnost poprečnog savijanja jezika	nesposobnost poprečnog savijanja jezika
lijevi palac preko desnog	desni palac preko lijevog (pri sklopljenim šakama)
kažiprst kraći od četvrtog prsta kod muškaraca	kažiprst kraći od četvrtog prsta kod žena
pjegavost (izražena)	odsutnost pjegavosti
oči pigmentirane	oči plave
katarakt očiju	zdrave oči
normalan vid	kratkovidnost
normalno razlikovanje boja	sljepoća za boje
normalna pigmentacija	albinizam
normalan metabolizam	alkaptonurija (Tyr), fenilketonurija (Phe)
normalno zgrušavanje krvi	hemofilija

Zadatak 2: Demonstracija Hardy-Weinbergova zakona i utjecaja prirodnog odabira na populaciju.

U ovom će zadatku na jednostavan način biti demonstriran Hardy-Weinbergov zakon (populacija u ravnoteži) te kako prirodni odabir utječe na učestalost alela u populaciji.

Prirodni odabir (prirodna selekcija) jedna je od glavnih evolucijskih sila. Ona djeluje na populacije tako da tijekom vremena (odnosno kroz generacije) povoljne osobine postaju sve učestalije, a nepovoljne sve rjeđe. Treba naglasiti da je termin *povoljna osobina* promjenjiv, odnosno, u različitim okolišima prirodni odabir odabire različite osobine (primjerice, na populacije vodenih organizama djeluje posve drugačiji prirodni odabir nego na kopnene organizme). Također, prirodni odabir sam po sebi ne može stvoriti nove osobine, već samo izabrati između već postojeće genske raznolikosti u određenoj populaciji.

Prirodni odabir djeluje na određeni fenotip (fizičke osobine, metabolizam, ponašanje, fiziologija...). To znači da jedinke s povoljnijim fenotipom (povoljnijim svojstvima) imaju veću vjerojatnost da prežive i stvore potomke nego ostale jedinke. Stoga će s vremenom u populaciji biti sve učestaliji *genotip* koji određuje povoljan fenotip, odnosno onaj genotip koji ima veći reproduktivni uspjeh.



Na ovaj se način populacija prilagođuje (adaptira) svom okolišu putem povišenja ili održavanja učestalosti povoljnih genotipova. Proces može u dužim vremenskim periodima rezultirati pojavom novih vrsta (specijacija).

Pribor:

- kutija s crnim i bijelim kvadratićima (po 2 kvadratića mogu se pričvrstiti zajedno)
- škare
- ljepilo
- milimetarski papir
- ravnalo
- kalkulator

Postupak:

Zadatak ćete raditi s crnim i bijelim kvadratićima, a svaki kvadratić predstavlja jedan alel:

- crni kvadratić – dominantan alel ***R*** 
- bijeli kvadratić – recesivan alel ***r*** 

Dva se kvadratića mogu pričvrstiti zajedno i tad predstavljaju jednu diploidnu jedinku. Dva crna kvadratića zajedno predstavljaju jedinku s genotipom ***RR*** (dominantni homozigot),

heterozigote **Rr** predstavlja kombinacija bijelog i crnog kvadratića, a recesivne homozigote **rr** predstavlja kombinacija dvaju bijelih kvadratića.

Ekperiment 1 – Populacija u ravnoteži:

1. Stavite 16 crno/crnih (RR), 32 crno/bijela (Rr) i 16 bijelo/bijelih (rr) kombinacija kvadratića u kutiju. Oni predstavljaju početnu populaciju (1. generacija, 64 jedinke).
2. Protresite kutiju i nasumično izvlačite po 2 para kvadratića (2 jedinke). Zabilježite njihove genotipove u stupac „roditelji“ u Tablici (1. generacija) u nastavku. Ponavljajte postupak dok ne ispraznite kutiju s kvadratićima, odnosno ispišete 32 roditeljska para u Tablici.
3. Neka svaki roditeljski par ima četvero potomaka. Odredite njihove genotipove (monohibridno križanje) i upišite ih u Tablicu.

***Napomena:** Kako imate kombinacije kvadratića (jedinke) svih triju različitih genotipa – RR, Rr i rr; nasumičnim izvlačenjem kombinacija kvadratića (jedinki) možete dobiti 6 različitih kombinacija potomaka:

- i. roditelji: $RR \times RR \rightarrow$ potomci: 4 RR
- ii. roditelji: $RR \times rr \rightarrow$ potomci: 4 Rr
- iii. roditelji: $RR \times Rr \rightarrow$ potomci: 2 RR, 2 Rr
- iv. roditelji: $Rr \times Rr \rightarrow$ potomci: 1 RR, 2 Rr, 1 rr
- v. roditelji: $Rr \times rr \rightarrow$ potomci: 2 Rr, 2 rr
- vi. roditelji: $rr \times rr \rightarrow$ potomci: 4 rr.

4. Izračunajte ukupan broj potomaka svakog genotipa i upišite u Tablicu.
5. Potomci različitih genotipova bit će roditelji sljedeće generacije. Kako broj jedinki u pokusu ne bi eksponencijalno rastao, sad ćete proporcionalno smanjiti broj potomaka svakog genotipa da biste u sljedeću generaciju ponovno krenuli sa 64 roditeljske jedinke. Stoga svaki dobiveni broj podijelite s 2, tako da i sljedeća generacija ima 64 jedinke. (Ako dijeljenjem ne dobijete cijeli broj, zaokružite ga na prvi cijeli broj, tako da ukupna veličina populacije bude 64 jedinke.)
6. Izračunajte učestalosti alela R i r te ih upišite u Tablicu.
7. Od roditeljskih i rezervnih kvadratića složite genotipove potomstva, odnosno sljedeće generacije, i stavite ih u kutiju (2. generacija, 64 jedinke).
8. Ponovite korake 2. – 6. ukupno tri puta da dobijete učestalosti genotipova i alela u ukupno četiri uzastopne generacije (Tablice 2. generacija i 3. generacija).
9. Na milimetarskom papiru nacrtajte graf kojem je na X-osi vrijeme (Generacije 1 – 4), a na Y-osi učestalost recesivnog alela r!

10. Objasnite dobivene rezultate!

Ekperiment 2 – Evoluirajuća populacija:

Pretpostavite da jedinke s genotipom rr uginu prije nego stvore potomstvo, odnosno da na njih djeluje negativan prirodni odabir. Uklonit ćete bijele/bijele (rr) kvadratiće iz svake generacije.

1. Prva generacija sastoji se od ukupno 64 jedinke: 16 crno/crnih, 32 crno/bijele i 16 bijelo/bijele kombinacije kvadratića. Budući da jedinke s genotipom rr uginu prije nego stvore potomstvo (negativan prirodni odabir), uklonite bijelo/bijele kvadratiće.
2. Stavite preostalu populaciju od 48 jedinki (16 crno/crnih i 32 crno/bijele kombinacije kvadratića) u kutiju.
3. Protresite kutiju i nasumično izvlačite po 2 para kvadratića (2 jedinke). Zabilježite njihove genotipove u stupac „roditelji“ u Tablici (1. generacija) u nastavku. Ponavljajte postupak dok ne ispraznite kutiju s kvadratićima.
4. Neka svaki roditeljski par ima četvero potomaka. Odredite njihove genotipove (monohibridno križanje) i upišite ih u Tablicu.

***Napomena:** Kako imate kombinacije kvadratića (jedinke) dvaju različitih genotipa – RR i Rr , nasumičnim izvlačenjem kombinacija kvadratića (jedinke) možete dobiti 3 različite kombinacije potomaka:

- ii. roditelji: $RR \times RR \rightarrow$ potomci: 4 RR
- iii. roditelji: $RR \times Rr \rightarrow$ potomci: 2 RR , 2 Rr
- iv. roditelji: $Rr \times Rr \rightarrow$ potomci: 1 RR , 2 Rr , 1 rr .

5. Izračunajte ukupan broj potomaka svakog genotipa i upišite u Tablicu.
6. Potomci različitih genotipova bit će roditelji sljedeće generacije. Kako broj jedinki u pokusu ne bi eksponencijalno rastao, sad ćete proporcionalno smanjiti broj potomaka svakog genotipa da biste u sljedeću generaciju ponovno krenuli s ukupno 64 roditeljske jedinke. To napravite prema formuli:

broj potomaka genotipa RR u sljedećoj generaciji

= broj potomaka genotipa RR iz prethodne generacije

\times (željena veličina populacije u sljedećoj generaciji/veličina populacije prethodne generacije)

= dobiveni broj potomaka genotipa $RR \times (64/96)$.

Zbroj jedinki svih triju genotipa dobiven na ovaj način trebao bi biti 64. (Ako množenjem ne dobijete cijeli broj, zaokružite ga na prvi cijeli broj, tako da ukupna veličina populacije

bude 64.)

7. Izračunajte učestalosti alela R i r te ih upišite u Tablicu.
8. Od roditeljskih i rezervnih kvadratića složite genotipove potomstva, odnosno sljedeće generacije (2. generacija).
9. Uklonite bijelo/bijele kombinacije kvadratića. Stavite preostale kombinacije kvadratića u kutiju.
10. Ponovite korake 2. – 9. ukupno tri puta da dobijete učestalosti genotipova i alela u ukupno četiri uzastopne generacije.
11. Na milimetarskom papiru nacrtajte graf kojem je na X-osi vrijeme (Generacije 1 – 4), a na Y-osi učestalost recesivnog alela r !
12. Objasnite dobivene rezultate!

Opaska: U nekim se krugovima može dogoditi da u kutiji nakon izvlačenja parova ostane jedan nespareni par kvadratića. Njega treba ukloniti iz populacije jer predstavlja jedinku koja nema priliku pariti se.

Pitanja i zadatci:

- a) Usporedite grafove koji prikazuju učestalost alela r tijekom vremena za eksperiment 1 (populacija u ravnoteži) i eksperiment 2 (evoluirajuća populacija). Razlikuju li se i zbog čega?
- b) Kako prirodni odabir utječe na učestalosti alela u populaciji tijekom vremena?
- c) Hoće li dominantni alel uvijek imati veću učestalost u populaciji, a recesivni manju? Objasnite svoj odgovor!

	1. generacija		genotipovi potomaka		
	genotipovi roditelja		<i>RR</i>	<i>Rr</i>	<i>rr</i>
1.					
2.					
3.					
4.					
5.					
6.					
7.					
8.					
9.					
10.					
11.					
12.					
13.					
14.					
15.					
16.					
17.					
18.					
19.					
20.					
21.					
22.					
23.					
24.					
25.					
26.					
27.					
28.					
29.					
30.					
31.					
32.					
ukupno:					
ukupno jedinki u sljedećoj generaciji:					
$f(R)$					
$f(r)$					

	2. generacija		genotipovi potomaka		
	genotipovi roditelja		<i>RR</i>	<i>Rr</i>	<i>rr</i>
1.					
2.					
3.					
4.					
5.					
6.					
7.					
8.					
9.					
10.					
11.					
12.					
13.					
14.					
15.					
16.					
17.					
18.					
19.					
20.					
21.					
22.					
23.					
24.					
25.					
26.					
27.					
28.					
29.					
30.					
31.					
32.					
ukupno:					
ukupno jedinki u sljedećoj generaciji:					
$f(R)$					
$f(r)$					

	3. generacija		genotipovi potomaka		
	genotipovi roditelja		<i>RR</i>	<i>Rr</i>	<i>rr</i>
33.					
34.					
35.					
36.					
37.					
38.					
39.					
40.					
41.					
42.					
43.					
44.					
45.					
46.					
47.					
48.					
49.					
50.					
51.					
52.					
53.					
54.					
55.					
56.					
57.					
58.					
59.					
60.					
61.					
62.					
63.					
64.					
ukupno:					
ukupno jedinki u sljedećoj generaciji:					
$f(R)$					
$f(r)$					

Zadatak 3:

Boju krzna mačke određuje par kodominantnih X-vezanih alela koji daju sljedeće fenotipove:

- $X^B X^B$ ili X^B – crno krzno (engl. *black*)
- $X^Y X^Y$ ili X^Y – žuto krzno (engl. *yellow*)
- $X^B X^Y$ – „calico“ krzno (mješavina žutog i crnog).

Istraživanje populacije mačaka u Rimu pokazalo je sljedeće:

	crno	žuto	calico	ukupno
ženke	554	14	108	676
mušjaci	622	84	0	706

Izračunajte učestalosti alela X^B i X^Y u ovoj populaciji!

Zadatak 4: Amiloidoze.

Amiloidoze su skupina urođenih metaboličkih pogrešaka kad se u pojedinim organima nakupljaju ljepljivi proteini. Amiloidoza uzrokovana mutacijom gena za krvni protein transtiretin oštećuje srce i/ili živčani sustav. Radi se o autosomnoj recesivnoj mutaciji. U populaciji od 177 zdravih Afroamerikanaca za četvero je uz pomoć testova dokazano da imaju jedan mutirani alel gena za transtiretin. Kolika je učestalost osoba prenositelja, a kolika mutiranog alela u ovoj populaciji?

Zadatak 5:

Od 2400 poroda u područnoj bolnici šest je beba umrlo ubrzo nakon rođenja zbog autosomne recesivne letalne disfunkcije (opstrukcija debelog crijeva, genotip cc).

- Koja je učestalost recesivnog alela c u populaciji?
- Koliki je udio populacije heterozigotan za alel c ?
- Koliki je udio populacije homozigotan za normalni alel C ?

Zadatak 6:

Bijelu vunu ovaca određuje dominantni alel B , a crnu vunu recesivni alel b . U uzorku od 900 ovaca nađena je 891 bijela i 9 crnih. Odredite frekvenciju alela B i b !

Zadatak 7:

Kod goveda pasmine Shorthorn (kratkorogo govedo) genotip $C^R C^R$ ima crvenu dlaku,

$C^R C^W$ šarenu dlaku (mješavina crvene i bijele) i $C^W C^W$ bijelu dlaku. U jednom uzorku kratkorogih goveda bilo je 108 crvenih, 48 bijelih i 144 šarena. Odredite učestalosti alela! Kakav je odnos među navedenim alelima?

KAZALO POJMOVA

A

adenin, 78
adipozno tkivo, 56, 58
aglutinacija, 183, 185
aglutinogen, 181
aktin, 45, 50
aktivni transport, 23
albinizam, 207
albumini, 117
aldoza, 60, 67
aleli, 142, 158
 dominantni, 159
 kodominantni, 159, 180, 182
 multipli, 181
 nepotpuna dominacija, 179
 potpuna dominacija, 179
 recesivni, 159
aleuronska zrnca, 116
alfa-uzvojnica (α -uzvojnica), 113
alge kremenjašice, 19, 34
alkaptonurija, 186
ameba, 47, 49, 50
amiloplasti, 53
aminokiselina, 76, 88
anafaza I, 144
anafaza II, 145
anafaza mitoze, 129
aneuploidija, 154
antigen, 181
antikodon, 101, 104
antiparalelnost, 102

antocijan, 30, 31
autosomi, 140

B

Benedictov reagens, 68
beta-nabrana ploča (β -nabrana ploča), 113
bič, 44, 48, 49
bijele krvne stanice (leukociti), 117
biljna stanica, 15, 27, 28, 35, 36, 37, 38, 39,
 44, 75, 125, 126, 132
binarna dioba, 119, 138
biuretska reakcija, 115
bivalent, 142, 147
bjelančevine, 32, 56, 76, 111, 114, 117
 enzimi, 114
 kvartarna struktura, 113
 pričuvne, 114
 primarna struktura, 113
 rezervne, 114
 sekundarna struktura, 113
 strukturne, 114
 tercijarna struktura, 113
bočni ogranci aminokiselina, 111
bromelin, 88
brzorastući lanac DNA, 84

C

celuloza, 34, 35, 59, 60, 62
centralna dogma molekularne biologije, 95
centriol, 126
centromera, 85, 87, 121, 124, 126, 143, 144,
 145, 151

centrosom, 126, 129, 143, 145
cijepanje animalnih stanica, 130
cistolit, 42
citokineza, 124, 129, 130, 144, 147
citoplazma, 130
citoskelet, 20, 43, 114, 130
citosol, 130
citostatik, 151
citozin, 78
C-mitoza, 151
crossing-over, 143, 144, 147, 196
crossingover-vrijednost, 199
crvene krvne stanice (eritrociti), 31, 117, 183

D

degeneracija genskog koda, 101
deoksiribonukleinska kiselina (DNA), 76, 78
(-) lanac molekule DNA, 98
(+) lanac molekule DNA, 98
brzorastući lanac DNA, 84
kalup, 98
kodirajuća molekula DNA, 98
kontinuirani lanac DNA, 84
nekdirajuća molekula DNA, 98
nekontinuirani lanac DNA, 85
netranskribirajuća molekula DNA, 98
spororastući lanac DNA, 85
transkribirajuća molekula DNA, 98
tromi lanac DNA, 85
vodeći lanac DNA, 84
deoksiriboza, 78
deplazmoliza, 29, 31
diferencijalno bojenje, 18
difuzija, 23, 24, 25, 26

jednostavna, 23
olakšana, 23
dihybridno križanje, 164
dijakineza, 143
diobeno poluvreteno, 126, 143, 145
diobeno vreteno, 126, 143, 145, 151
diploidna stanica, 121, 147, 157
diploten, 143
disaharidi, 60, 61, 65, 67
divergentna leća, 5
divovski kromosomi (politeni), 167
DNA-helikaza, 83
DNA-ligaza, 85
DNA-polimeraza, 84
dominantan alel, 159
dominantno-recesivan odnos alela, 159
dušična baza, 77, 78, 81
dvostruka uzvojnica, 77, 81

E

ekson, 99, 100
ekvatorijalna ravnina stanice, 129, 144, 147
embrij, 119
endomitoza, 167
enzimi, 114
epiderma, 29, 30, 38, 42, 55
epistaza, 187
dominantna, 187
recesivna, 188
eritrociti (crvene krvne stanice, 31, 117, 183
etioplasti, 52
eukariotska stanica, 20, 43, 82, 85, 96, 121
eukromatin, 87, 151

F

fenilketonurija, 186
fenotip, 158
feoplasti, 51, 52
fibrin, 118
fibrinogen, 118
fikoeritrin, 52
filijalna generacija, 161
fokus, 5
fosfatna skupina, 77, 78
fosfodieterska okosnica, 81
fosfodieterska veza, 79
fosfolipidi, 20
fosfolipidni dvosloj, 21, 88
fragmentacija, 139
fragmoplast, 130, 144
fragmosom, 125
fruktani, 64
fruktoza, 60, 61, 66, 67
fukoksantin, 52
funkcionalne skupine aminokiselina, 111

G

G₀-faza, 123
G₁ faza, 141
G₁-faza, 122
G₂ faza, 141
G₂-faza, 124
galaktoza, 61, 67, 69
gama-globulini (γ -globulini), 117
gameta, 139, 148
gen, 76, 82, 96, 121, 142, 157
 holandrični, 175

pseudoautosomalni, 175
vezan uz spol, 175
X-vezani, 175
Y-vezani, 175
geni vezani uz spol, 175
geni vezani uz X-kromosom, 175
geni vezani uz Y-kromosom, 175
genotip, 158
genska karta, 199
genska zaliha, 202
genski drift, 203
genski kod, 101
genski otklon, 203
glasnička molekula RNA (mRNA), 97
 5'-kapa, 100
 7-metil gvanozinska kapa, 100
 poli-A kraj, 100
 prekursorska molekula mRNA, 99
 pre-mRNA, 99
 primarni transkript mRNA, 99
 zrela molekula mRNA, 99, 100
glikogen, 62, 63
glikozidna veza, 35
globulini, 117
glukoza, 23, 60, 61, 62, 66, 67, 69, 72, 73
gonosom, 140
granični kut totalne refleksije, 3
gvantin, 78

H

haploidna stanica, 139, 147, 148, 157
Hardy-Weinbergov zakon, 202
Hardy-Weinbergova jednadžba, 206
Hechtove niti, 29, 31

helikaza, 83

hemizigotnost, 175

hemoglobin, 180, 186

hemoliza, 32

heparin, 118

heterogametnost, 175

heterokromatin, 87, 151

heteromorfni par spolnih kromosoma, 175

heterozigot, 158

hijazma, 143, 144

hipertonična otopina, 27, 30, 33

hipotonična otopina, 27, 30, 33

hirudin, 118

histon, 85

hitin, 34, 59, 62, 64

holandrični geni, 175

homogametnost, 175

homologni kromosomi (homoloji), 121,
142, 147, 151, 157

homomorfni par spolnih kromosoma, 175

homozigot, 158

I

idiogram, 152

imerzijska tekućina, 10

imerzijski objektiv, 9, 12, 13

imunoglobulini, 117

indeks loma svjetlosti, 4, 10, 12

integralni proteini, 21

interfaza, 122, 141

interfaza II, 144

interkineza, 145

intermedijarni filamenti, 43

intron, 99, 100

inulin, 65

iris-zastor, 8, 12, 14

izotonična otopina, 27, 31, 33

izvorište replikacije, 83, 84, 119

J

jažice, 37

jednostavna difuzija, 23

jezgrica, 87, 126, 130

jezgrina lamina, 44

K

kariokineza, 124, 130

kariotip, 151, 155

karotenoidi, 52, 53

ketoza, 60, 68

kinetohora, 126, 127, 143, 144, 145

kinetohorni mikrotubuli, 128, 129, 143, 144,
145

klon, 138, 149

klorofil, 51, 52, 53

 klorofil *a*, 51

 klorofil *b*, 51

kloroplasti, 20, 47, 51, 52, 53

kodominantan odnos alela, 159, 180, 182

kodon, 101

kohezin, 85

kolesterol, 22, 57, 65

komplementarnost, 98, 102

koncentracijski gradijent, 24, 26

kondenzacija DNA, 85, 126

kondenzor, 8

kontinuirani lanac DNA, 84

konvergentna leća, 4, 8

konjugirani proteini, 115
korijenova kapa, 133
kromatida, 85, 87, 144, 145
kromatide
 nesestrinske, 142
 sestrinske, 124, 129, 141, 142, 144
kromatin, 86, 123, 124, 130, 157
kromosom, 77, 82, 87, 121, 123, 124, 126,
 130, 145, 151, 157
 akrocentrični, 152
 autosom, 151, 153
 gonosom, 140, 151, 153
 homologni, 121, 142, 147, 151, 157
 metacentrični, 152
 p krak, 152
 q krak, 152
 spolni, 151, 153, 175
 submetacentrični, 152
 tjelesni kromosom, 151, 153
 X-kromosom, 153
 Y-kromosom, 153
kromosomski set, 139
krv, 31, 117
krvna plazma, 117
krvne grupe
 Rhesus sustav, 183
 sustav AB0, 181
 sustav MN, 204
krvne stanice, 117
krvni serum, 118
krvni ugrušak, 118
ksantoproteinska reakcija, 115
kutikula, 38, 42
kutin, 35, 38

kutinizacija, 38
kvantitativne značajke, 186
kvartarna struktura proteina, 113

L

laktoza, 61, 67
leća, 4
 divergentna, 5
 konvergentna, 4, 8
leptoten, 142
leukociti (bijeke krvne stanice), 117
leukoplasti, 53, 55
ligaza, 85
lignin, 37, 38
lipidi, 20, 57
lokus, 142, 158
lom svjetlosti, 2
Lugolova otopina, 69, 70, 74
lukovica, 30

M

macerat stanica, 54
makrovijak, 7
maltoza, 61, 66, 67
masti, 53, 56, 57, 58, 87, 116
mehanički dijelovi mikroskopa, 7
mejoza, 139, 140, 148
mejoza I, 141, 142, 153
mejoza II, 141, 145, 153
membranski proteini, 21
Mendel, Gregor Johann, 157, 160
Mendelov zakon nezavisnog odvajanja alela,
 160, 164
Mendelov zakon segregacije, 160

meristem, 133
metafaza I, 144, 147
metafaza II, 145, 147
metafaza mitoze, 129, 151
metafazna ploča, 129, 144
micelarni snop, 35
mikrofibrila, 35
mikrofibrilno vlakno, 36
mikrofilamenti, 43, 47, 50, 125
mikroskop, 1
mikroskopija, 1
mikroskopski preparati
 nativni, 15
 trajni, 8, 15
mikrotubuli, 43, 44, 48, 50, 124, 125, 126,
 127, 131, 132, 143
 astralni, 127
 kinetohorni, 127
 polarni, 127
mikrovijak, 7
Millonova reakcija, 116
mineralizacija, 38
mitohondrij, 120
mitotska faza, 121, 122, 124
mitotski indeks, 137
mitoza, 138
 C-mitoza, 151
moć razdvajanja mikroskopa, 11
model tekućeg mozaika, 21
Molischov reagens, 66, 67
Molischova reakcija, 66
monohibridno križanje, 160, 163
monosaharidi, 60, 61, 62, 65, 67, 69
Morgan, Thomas Hunt, 167

multipli aleli, 181
murein, 34
mutacije, 171

N

nativni preparati, 15
nekontinuirani lanac DNA, 85
nepotpuna dominacija, 179
nesestrinske kromatide, 142
nespolno razmnožavanje, 119, 138, 148
 biljke, 138
 fragmentacija, 139
 partenogeneza, 139
 pupanje, 138
 vegetativno razmnožavanje, 138
nezavisna raspodjela kromatida, 147
nezavisna raspodjela kromosoma, 147
N-glikozidna veza, 78
nukleinske kiseline, 77
nukleoid, 82, 119
nukleolus, 87, 126, 130
nukleosom, 86
nukleotid, 76, 77
numerička apertura, 11, 12

O

objektiv, 9
 imerzijski, 9
 suhi, 9
odrvnjavanje, 38
Okazakijevi fragmenti, 85
okular, 10
olakšana difuzija, 23
oplodnja, slučajna, 148

- oplutnjavanje, 38
optički dijelovi mikroskopa, 8
organela, 20, 28, 130
organele, 82
organeli, 75
osmoregulacija, 27
osmotski tlak, 26
osmoza, 26
- P**
- pahiten, 142, 147
panmiksija, 203
papučica, 47, 48, 50, 138
parentalna generacija, P, 161
partenogeneza, 139, 149
pasivni transport, 23
pentoza, 77
peptidna veza, 88, 112
periferni proteini, 21
pirimidinska baza, 78
plastidi, 51, 120
plazmodezmija, 37
plazmoliza, 29
pleiotropni učinak, 186
ploidnost, 121
početnica, 84
podloga za uzgoj vinske mušice, 170
pokrovno staklo (pokrovnica), 16
polarni mikrotubuli, 129, 144
poligensko nasljeđivanje, 186
polimeraza
 DNA-, 84
 RNA-, 98
polinukleotidni lanac, 79
poliploidija, 154
poliribosom, 108
polisaharidi, 34, 37, 60, 61, 62, 65, 69
polisom, 108
politeni kromosomi (divovski), 167
polocita, 149
populacija, 149, 201
 u ravnoteži, 203
populacijska genetika, 201
populacijski skup gena, 202
postolje mikroskopa, 7
potpuna dominacija, 179
povećanje mikroskopa, 10
praživotinje, 47, 48, 49, 50
prebiotik, 65
predmetno staklo (predmetnica), 14, 16
prepisivanje, 98, 109
pretprofaza, 125
pretprofazni prsten, 125
prevođenje, 103, 109
pričuvni proteini, 116
primarna struktura proteina, 113
primarno suženje kromosoma, 87
primaza, 84
primer, 84
prirodni odabir, 210
probiotik, 65
procesiranje molekule mRNA, 99
profaza I, 142, 147
profaza II, 145
profaza mitoze, 126
prokariotska stanica, 82, 85, 119
promotor, 98
proplastidi, 51

proteaza, 88
proteidi, 115
proteini SSB, 83
Protista, 47
protok gena, 202
pseudoautosomalni geni, 175
pseudodominacija, 175
pseudopodiji, 49, 50
Punnettov kvadrat, 162
pupanje, 138
purinska baza, 78

R

radikali aminokiselina, 111
rascjepna brazda, 130
recesivan alel, 159
redukcijska dioba, 141
rekombinacija, 142, 144
rekombinacijska učestalost, 199
replikacija DNA, 83, 84, 119, 123, 124, 141
replikacijska vilica, 84
revolver mikroskopa, 7
rezervne tvari, 56
rezervni proteini, 116
ribonukleinska kiselina (RNA), 77, 78, 97
ribosom, 51, 87, 104, 120
 A mjesto, 105
 E mjesto, 105
 P mjesto, 105
ribosomska molekula RNA (rRNA), 97
ribosomska molekula RNA, rRNA, 104
riboza, 61, 68, 78, 97
RNA-polimeraza, 98
roditeljska generacija, 161

rodoplasti, 51
rotacijsko gibanje citoplazme, 46
R-skupine aminokiselina, 111

S

S faza, 141, 145
saharidi, 59
saharoza, 61, 62, 66, 67
seksualni dimorfizam, 171
sekundarna struktura proteina, 113
selektivna propusnost, 22
semikonzervativna replikacija, 83, 124
septum, 119
sestrinske kromatide, 124, 129, 141, 142, 144
set kromosoma, 139
S-faza, 123
sinapsa (kromosomska), 142
sinaptonemski kompleks, 142, 143
sklereide, 41
slučajna oplodnja, 148
smeđe masno tkivo, 58
somatska stanica, 122, 139
specijacija, 202, 210
spliceosom, 100
spolna stanica, 139, 148, 153
spolni kromosomi, 175
spolno dvoličje, 171
spolno razmnožavanje, 138, 148
spore, 139
spororastući lanac DNA, 85
srčika, 39
stalak mikroskopa, 7
stanica majka, 83, 119, 141
stanice kćeri, 77, 83, 119, 124, 130, 141, 147

stanična dioba, 77, 83, 119, 122, 124
stanična jezgra, 77, 82
stanična membrana, 20, 21, 88, 131
stanična ploča, 131, 144
stanična stijenka, 20, 27, 28, 29, 34, 35, 36,
38, 39, 40, 47, 75, 130, 131
alge, 34
arheje, 34
bakterije, 34
biljke, 34
gljive, 34
stanični ciklus, 77, 121, 122, 141
start kodon, 101
stolić mikroskopa, 7
stop kodon, 101
suberin, 35, 37, 38
suberinizacija, 38
suhi objektiv, 9, 12
Svedberg, 21
svjetlosni mikroskop, 1

Š

šećeri, 61, 67, 68
škrob, 53, 56, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 69, 70,
72, 73, 116
škrobna zrnca, 54, 72, 73, 74

T

telofaza I, 144
telofaza II, 147
telofaza mitoze, 130
tercijarna struktura proteina, 113
test-križanje, 163
tetrada, 142, 144, 153

timin, 78
tjelesna stanica, 122, 139
Tollensov reagens, 70
Tollensova reakcija, 68, 71
tonicitet, 27
tonoplast, 28, 29, 31
topoizomeraza, 83
totalna refleksija, 3
trajni preparat, 8, 18
trajni preparati, 15
transfuzija krvi, 182
transkripcija, 98, 109
transkripcijski terminator, 99
translacija, 103, 109
translokacija ribosoma, 106
transportna molekula RNA (tRNA)
peptidil-tRNA, 105
transportna molekula RNA (tRNA), 97
aminoacil-tRNA, 105
transportna molekula RNA, tRNA, 103, 104
trepetljikaši, 48
trepetljike, 43, 44, 48, 49, 50
trigliceridi, 57
triplet, 101
trisomija, 154
trombin, 118
tromi lanac DNA, 85
tubulin, 43, 44, 48
tubus mikroskopa, 7
turgorski tlak, 28

U

uglovni kolenhim, 40
ugljikohidrati, 20, 22, 34, 56, 59, 60, 61, 65,

66, 67, 116

ulja, 56, 57

univerzalni davatelj krvi, 183

univerzalni primatelj krvi, 183

uracil, 78

V

vakuola, 20, 28, 29, 30, 31, 47, 65, 125

valna duljina svjetlosti, 11

varijabilnost gameta, 147

vegetativno razmnožavanje, 138

vezani geni, 195

 djelomično, 196

 parcijalno, 196

 potpuno, 195

vidljiva svjetlost, 1

vinska mušica, *Drosophila melanogaster*, 167

višestanični organizam, 119

vodeći lanac DNA, 84

vodena kuga, 46

vodikova veza, 81

vršni meristem, 133

Z

zametak, 119

zigota, 119, 140, 148

zigoten, 142

zona diferencijacije, 133

zona diobe, 133

zona elongacije, 133

zrcalo, 5, 8

Ž

žarište, 5

životinjska stanica, 31

IZVORI SLIKA

Svim web stranicama koje su korištene kao izvori slika pristupljeno je 29. kolovoza 2016. godine.

Poglavlje 1.

Slika 1.1. Ljubaznošću gosp. Damira Repića, Mikrosvijet. Slike 1.2., 1.3., 1.4., 1.5., 1.6., 1.7., 1.8., 1.9., 1.10., 1.11., 1.12., 1.13., 1.14., 1.15., 1.16. i 1.17. izradili autori.

Poglavlje 2.

Slika 2.2. prilagođena iz

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cell_membrane_detailed_diagram_blank.svg. Slika 2.6.

prilagođena iz

https://en.wikipedia.org/wiki/Tonicity#/media/File:Osmotic_pressure_on_blood_cells_diagram.svg i

https://en.wikipedia.org/wiki/Turgor_pressure#/media/File:Turgor_pressure_on_plant_cells_diagram.svg. Slike 2.1., 2.3., 2.4., 2.5., 2.7. i 2.8. izradili autori.

Poglavlje 3

Slike 3.1., 3.2., 3.3. 3.4., 3.5., 3.6. i 3.7. izradili autori.

Poglavlje 4

Slike 4.1.a, 4.2.a. i 4.3.a prilagođene iz

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:0317_Cytoskeletal_Components.jpg. Slika 4.6.

prilagođena iz https://su.wikipedia.org/wiki/Ciliata#/media/File:Paramecium_sp.jpg i

https://en.wikipedia.org/wiki/Paramecium_caudatum#/media/File:Paramecium_caudatum_Ehrenberg,_1833.jpg. Slika 4.7. prilagođena iz

https://en.wikipedia.org/wiki/Cilium#/media/File:Eukaryotic_cilium_diagram_en.svg. Slika 4.8.

prilagođena iz https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Euglena_Anatomy_Diagram.svg. Slika 4.9.

prilagođena od Proyecto Agua, Logroño, Španjolska;

<https://www.flickr.com/photos/microagua/2695978355>. Slike 4.1.b, 4.1.c, 4.2.b, 4.3.b, 4.3.c, 4.4. i 4.5. izradili autori.

Poglavlje 5

Slika 5.1. prilagođena iz <https://en.wikipedia.org/wiki/Leucoplast>. Slika 5.2. prilagođena iz

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Scheme_Chloroplast-en.svg. Slika 5.4. Ljubaznošću gosp.

Damira Repića, Mikrosvijet. Slike 5.3., 5.5., 5.6. i 5.7. izradili autori.

Poglavlje 6

Slika 6.1.a preuzeta iz <https://en.wikipedia.org/wiki/Potato#/media/File:Patates.jpg>. Slika 6.1.b preuzeta iz <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/10/Olive-tree-fruit-august-0.jpg>. Slika 6.6. prilagođena iz https://commons.wikimedia.org/wiki/File:219_Three_Important_Polysaccharides-01.jpg. Slike 6.2., 6.3., 6.4., 6.5., 6.7., 6.8., 6.9., 6.10., 6.11., 6.12. i 6.13. izradili autori.

Poglavlje 7

Slika 7.1. preuzeta iz http://en.wikipedia.org/wiki/File:HeLa_cells_stained_with_Hoechst_33258.jpg. Slika 7.5. prilagođena iz https://en.wikipedia.org/wiki/DNA#/media/File:DNA_Structure%2BKey%2BLabelled.pn_NoBB.pn. Slika 7.7. preuzeta iz https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA_Under_electron_microscope_Image_3576B-PH.jpg. Slika 7.8. prilagođena iz http://en.wikipedia.org/wiki/File:DNA_replication_en.svg. Slike 7.2., 7.3., 7.4., 7.6., 7.9., 7.10., 7.11. i 7.12. izradili autori.

Poglavlje 8

Slika 8.5.c preuzeta iz https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/ba/TRNA-Phe_yeast_1ehz.png. Slike 8.1., 8.2., 8.3., 8.4., 8.5.a, 8.5.b, 8.6., 8.7. i 8.8. izradili autori. Elementi za Sliku 8.1. prilagođeni iz <https://en.wikipedia.org/wiki/Insulin#/media/File:InsulinMonomer.jpg>, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:1bkv_collagen_02.png i https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/45/G6PD_-_3D_structure_-_PDB1qki.png.

Poglavlje 9

Slika 9.3. prilagođena iz https://en.wikipedia.org/wiki/Protein_structure#/media/File:Main_protein_structure_levels_en.svg. Slike 9.1., 9.2., 9.4. i 9.5. izradili autori.

Poglavlje 10

Slika 10. 6. prilagođena iz <https://en.wikipedia.org/wiki/Phragmosome#/media/File:Phragmosome.svg>. Slike 10.7 i 10.9. prilagođene iz [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mitosis_\(261_03\)_Pressed;_root_meristem_of_Vicia_faba_\(cells_in_prophase,_metaphase\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mitosis_(261_03)_Pressed;_root_meristem_of_Vicia_faba_(cells_in_prophase,_metaphase).jpg). Slika 10.10. prilagođena iz [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mitosis_\(261_10\)_Pressed;_root_meristem_of_Vicia_faba_\(cells_in_anaphase,_prophase\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mitosis_(261_10)_Pressed;_root_meristem_of_Vicia_faba_(cells_in_anaphase,_prophase).jpg). Slika 10.11. preuzeta iz https://en.wikibooks.org/wiki/An_Introduction_to_Molecular_Biology/Cell_Cycle#/media/File:Anaph

ase_IF.jpg. Slika 10.12. prilagođena iz

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mitosis_\(261_08\)_Pressed;_root_meristem_of_Vicia_faba_\(cells_in_telophase\)](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mitosis_(261_08)_Pressed;_root_meristem_of_Vicia_faba_(cells_in_telophase)). Slike 10.1., 10.2., 10.3., 10.4., 10.5., 10.8.a i b, 10.13., 10.14. i 10.16. izradili autori.

Poglavlje 11

Slika 11.1 prilagođena s https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/15/Hydra_biology.jpg.

Slike 11.7. i 11.8. prilagođene iz

<http://www.pathology.washington.edu/galleries/Cytogallery/main.php?file=human%20karyotypes>. Slika 11.11. preuzeta iz <http://worms.zoology.wisc.edu/zooweb/Phelps/ZWK99025k.jpeg>. Slike 11.2., 11.3., 11.4., 11.5., 11.6., 11.9. i 11.10. izradili autori.

Poglavlje 12

Slike 12.1. i 12.2. izradili autori. Element za Sliku 12.2. prilagođen iz

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pisum_sativum_flower.jpg.

Poglavlje 13

Slika 13.2. prilagođena iz http://www.phschool.com/science/biology_place/labbench/lab7/design.html,

<http://www.bioplek.org/animaties/drosophila/bananenvliegingleiding.html> i

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/cb/Biology_Illustration_Animals_Insects_Drosophila_melanogaster.svg. Slika 13.3. prilagođena iz [http://flymove.uni-](http://flymove.uni-muenster.de/Genetics/Flies/LifeCycle/LifeCyclePict/life_cycle.jpg)

[muenster.de/Genetics/Flies/LifeCycle/LifeCyclePict/life_cycle.jpg](http://flymove.uni-muenster.de/Genetics/Flies/LifeCycle/LifeCyclePict/life_cycle.jpg). Slika 13.4. preuzeta iz

https://en.wikipedia.org/wiki/Drosophila_melanogaster#/media/File:Drosophila_egg.png. Slika 13.5.

prilagođena iz http://www.exploratorium.edu/exhibits/mutant_flies/mutant_flies.html. Slike 13.1., 13.6. i 13.7. izradili autori.

Poglavlje 14

Slika 14.3.b prilagođena iz https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Red_cell_agglutination.jpg. Slika

14.6.b preuzeta s https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lathyrus_odoratus_2_ies.jpg. Slika 14.7.

preuzeta s <http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1002775>. Photos by

Freyja Imsland (A–C) and David Gourichon (D). Slike 14.1., 14.2., 14.3.a i c, 14.4., 14.5. i 14.6.a izradili

autori. Element za Sliku 14.2. prilagođen iz <https://pixabay.com/en/snapdragon-flower-pink-lilac-plant-146850/>

Poglavlje 15

Slika 15.4. prilagođena iz <http://cgslab.com/phenotypes/> odnosno Otto PA, Drosophila Viewer Program (V. 6.0), Department of Biology, University of São Paulo, 2000. Slike 15.1., 15.2. i 15.3. izradili autori.

Poglavlje 16

Tablica 16.2. preuzeta iz Papeš i sur., 1995. Slike 16.1. i 16.2. izradili autori.

LITERATURA

1. Blaženčić, J. (1979) Praktikum iz anatomije biljaka sa osnovama mikroskopske tehnike, Naučna knjiga, Beograd.
2. Cooper, G. M. (2000) The Cell – a Molecular Approach. 2. izdanje, ASM Press, Washington, D.C. i Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
3. Campbell, N. A., Reece, J. B. (2005) Biology. 7th edition Pearson Education, Inc. publishing as Benjamin Cummings.; San Francisco, Calif: Benjamin Cummings.
4. Reece, J. B. (2013) Campbell Biology. 10th edition (2005) Pearson Education, Inc. publishing as Benjamin Cummings.; San Francisco, Calif: Benjamin Cummings.
5. Denffer, D. von, Ziegler, H. (1991) Botanika. Morfologija i fiziologija. Školska knjiga, Zagreb.
6. Gužvica, G., Šver, L. (2000) Osnove evolucije živih bića. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
7. Krsnik-Rasol, M., Besendorfer, V., Jelenić, J., Balen, B., Malenica, N., Peharec, P. (šk. god. 2005/2006) Praktikum iz stanične i molekularne biologije. Interna skripta za studente biologije. Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.
8. Papeš, D., Pavlica, M., Besendorfer, V. (1995) Praktikum iz genetike. Interna skripta. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
9. Sorić, J., Lončarek, J., Krsnik-Rasol, M. (2000) Biologija stanice - vježbe. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
10. Hilyard, N. C., Biggin, H. C. (1984) Fizika za biologe, Školska knjiga, Zagreb
11. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002) Molecular Biology of the Cell. 4. izdanje, Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, SAD
12. Tamarin, R.H. (1993) Principles of Genetics. 4. izdanje, Wm. C. Brown Publishers, Dubuque, SAD