مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال چهارم، شماره چهارم، پیاپی شانزدهم، بهار ۱۳۹۵ (۱۷-۱۱)

تهیه کاریوتیپ *Nereis* sp. در سواحل غربی خلیج فارس

فروغ پاپهن[۱]، اشرف جزایری[۲]، سرور عچرشاوی[۳*]
۱. دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم،
دانشگاه شهید چمران اهواز
۲. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم،
دانشگاه شهید چمران اهواز
۳. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوسیستماتیک، گروه زیست‌شناسی
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۱/۲٦ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۲/۵)

چکیده

به‌منظور شناسایی گونه‌ها، آشنایی با ویژگی‌های گونه‌ای، بررسی احتمال گونه‌زایی، مطالعه جهش در جمعیت‌ها و بسیاری از اهداف دیگر لازم است. در این تحقیق، از روش حمام کلچسین جهت مطالعه کاریولوژی کرم‌های پرتار نابالغ استفاده شد. پس از بررسی اسلایدهای کاریوتیپی از نمونه‌های کرم پرتار *Nereis* sp. و مشاهده و آنالیز بیش از ۵۰ پلاک متافازی، عدد کروموزومی این گونه ۲n=۲۸ مشخص گردید. از مجموع ١٤ جفت کروموزوم شناسایی شده، ۳ جفت از نوع متاسانتریک، ۹ جفت از نوع ساب متاسانتریک و ۲ جفت کروموزوم از نوع تلوسانتریک بودند؛ باتوجه به این که نمونه‌های مورد آزمایش نابالغ بودند؛ (در نمونه برداری فصلی هیچ کرم بالغ یا هترونرئیدی یافت نشد). بنابراین کروموزوم‌های جنسی قابل تشخیصی رؤیت نشد.

واژه‌های کلیدی: پرتاران، *Nereis* sp.، خلیج فارس، کاریوتیپ.

Create karyotype *Nereis* sp. in Persian Gulf on the West Coast

Forough Papani[1], Ashraf Jazayeri[2], Sorour Echreshavi[3*]
1. Associate Professor of Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Chamran University, Ahwaz, Iran
2.Assistant Professor of Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Chamran University, Ahwaz, Iran
3. Graduate Student, Department of Biology, Faculty of Science, Chamran University, Ahwaz, Iran
(Received: Apr. 15, 2015 - Accepted: Apr. 24, 2016)

Abstract

To identify the species, understanding the characteristics of the species, explore the possibility of speciation, mutations in the study population, and many other purposes. In this method for studying colchesin bath, karyotype use for immature worms. After reviewing the slide karyotype of polychaeta (*Nereis* sp.) and observation and analysis of 50 plaque metaphase plate chromosome number of the species found 2n=28 from all set chromosome, 14 pairs of chromosome detected 3 pairs metacentric , 9 pairs from sub metacentric and 2 pairs from telocentric. Since the samples were immature (in seasonal samples weren't found any adult worm). The sex chromosome are not visible discernable.

Keywords: Polychaeta, *Nereis* sp., Persian Gulf, karyotype.

* نویسنده مسئول: E-mail: sorourechreshavi@gmail.com

مقدمه

به منظور شناسایی گونه‌ها، آشنایی با ویژگی‌های گونه‌ای، بررسی احتمال گونه‌زایی، مطالعه جهش در جمعیت‌ها و بسیاری از اهداف دیگر، لازم است مطالعات سیتوژنتیکی کاملی صورت گیرد (Tosuji *et al*., 2010). چنین تحقیقاتی در نخستین گام، نیازمند انجام مطالعات کاریولوژیکی است. ضمن استخراج کروموزوم‌ها و تعیین عدد کروموزومی گونه، مهم‌ترین ویژگی‌های کروموزومی از قبیل طول کل کروموزوم، طول بازوهای بلند و کوتاه، محل استقرار سانترومر، شاخص سانترومری و غیره مشخص می‌شود (Gold *et al*., 1990).

کاریوتایپ، به کلیه خصوصیاتی اطلاق می‌شود که می‌توان، به وسیله آن هر کروموزوم را در مجموعه کروموزوم‌های جانداران تعیین کرد (Scheffer, 1990). تهیه کاریوتایپ امکان بررسی ساختار ژنتیکی موجودات را فراهم می‌کند (Gold etal,1990). کاریوتایپ، را می‌توان برای یک فرد، نژاد، جنس و یا گروهی از جمعیت‌های مشخص به کاربرد کاریوتیپ در واقع تصویری است که در آن، جفت کروموزوم‌های همولوگ از نظر سایز، به ترتیب نزولی، ردیف شده‌اند. بر این اساس هر گونه، دارای کاریوتایپ خاص خود می‌باشد (Ackermann, 2005). مطالعات کاریولوژیک نقش مهمی در طبقه‌بندی گونه‌های مختلف دارند (Abdel *et al*., 1993).

با توجه به ماهیت چرخه سلولی و مراحل متوالی تقسیمات میتوزی، بدیهی است بهترین مرحله مشاهده و مطالعه میکروسکوپی کروموزوم‌ها، مرحله متافاز است (Virgilio *et al*., 2009)؛ زیرا در این مرحله، کروموزوم‌ها به حداکثر ضخامت و فشردگی و حداقل طول رسیده‌اند. بنابراین به راحتی توسط میکروسکوپ نوری قابل مشاهده و بررسی هستند (Abdel *et al*., 1993).

به منظور دسترسی به کروموزوم‌های متافازی، می‌بایستی در این فاز از ادامه روند میتوز ممانعت کرد (Tosuji *et al*., 2004). به این منظور می‌توان از اثرات برخی مواد سمی از قبیل کلچسین (Colchesin) و یا وین بلاستین (Vinbelastin) بهره برد (Lipari *et al*., 1994). این ترکیبات از تشکیل دوک تقسیم جلوگیری می‌کنند تا تقسیم میتوزی در مرحله متافازی متوقف گردد. نکته مهم در این زمینه، اطلاع کافی از مدت زمان یک چرخه میتوزی در هر گونه است. بدیهی است برای بسیاری از جانوران مدت سیکل میتوزی مشخص شده و در غیر این صورت بایستی به روش آزمون و خطا عمل نمود (Gold *et al*., 1990).

استخراج کروموزوم‌های متافازی می‌تواند از بافت‌های مختلف بدن هر جانور، صورت گیرد؛ به شرط آن که بافت مورد نظر از تقسیمات میتوزی قابل توجهی برخوردار باشد (Ahmad, 2008). بر این اساس مناسبترین بافت‌ها در اکثر جانوران عبارتند از: بافت‌های مغز استخوان، خون، غدد جنسی و کلیه. در آبزیان علاوه بر بافت‌های فوق از آبشش‌ها نیز استفاده می‌شود (Gold *et al*., 1990).

پس از تهیه کاریوتایپ می‌توان با تکنیک رنگ‌آمیزی گیمسا، صرفاً به منظور دستیابی به عدد کروموزومی و ویژگی‌های هر کروموزوم اقدام نمود (Tosuji *et al*., 2010). به علاوه جهت دستیابی به نتایج بیشتر می‌توان از تکنیک‌های رنگ‌آمیزی *C. Band* و *G. Band* که به شناسایی محل سانترومر و نحوه آرایش هتروکروماتین‌ها (Hetrochromatin) و یوکروماتین‌ها (Euchromatin) بر روی هر کروموزوم می‌پردازد نیز استفاده کرد (Selo *et al*., 2009). در چنین روش‌هایی، شناسایی و تشخیص کروموزوم‌های همولوگ (Homolog)، کروموزوم‌های جنسی و نیز ناهنجاری‌های کروموزومی، به مراتب ساده‌تر خواهد بود (Ackermann *et al*., 2005).

از سوی دیگر، مکانیسم تعیین جنسیت در کرم‌های پرتار همواره مورد توجه محققان بوده است (Alcantra

et al., 2008). پژوهش‌هایی که بر روی ژنتیک تعیین جنسیت در کرم‌های پرتار انجام گرفته است، نشان می‌دهد که نرها و ماده‌های هتروگامت (XX–XY) هستند (Bantha *et al*., 1870).

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری به وسیله گرب، مدل ون وین با سطح پوشش ۰/۰۶۲۵ انجام گرفت و نمونه‌ها به صورت زنده همراه با آب دریا به آزمایشگاه منتقل شدند (Harris, 2001). سپس به منظور متوقف نمودن تقسیمات سلولی در مرحله متافازی (جهت رؤیت و بررسی کروموزوم‌های ضخیم و قابل تشخیص) از روش حمام کلچسین، استفاده گردید. به این ترتیب که در آکواریوم هوادهی شده، از آب دریا (با شوری ppt ۳۵–۳۳ و دمای $^{\circ}c$ ۲۵–۲۳) جهت تهیه حمام کلچسین با غلظت ۱٪ استفاده شد و سپس کرم‌ها به مدت ۶ ساعت در شرایط فوق انکوبه شدند (Leitao *et al*., 2010).

پس از اتمام زمان انکوباسیون، جهت هیپوتونیزاسیون و متورم شدن و ترکیدن یاخته از محلول هیپوتونیک کلریدپتاسیم ۰/۰۷۵ مولار استفاده شد. به این ترتیب که پس از خارج کردن کرم‌ها از آکواریوم، هر نمونه به هاون چینی حاوی محلول هیپوتونیک، انتقال یافته و کاملاً له و هموژنیزه گردیدند به مدت ۴۵ دقیقه سوسپانسیون بافتی فوق در محلول هیپوتونیک نگهداری شد (Carvalo, 2007). سپس جهت تثبیت بافتی ml ۲ محلول فیکساتور کارنوی تازه و سرد ($۴^{\circ}c$) اضافه شده و سوسپانسیون بافتی کاملاً مخلوط شد (Ipucha *et al*., 2007) پس از ۳۰ دقیقه، سوسپانسیون به لوله سانتریفوژ انتقال یافت در ادامه نخستین مرحله سانتریفوژ با شرایط rpm ۱۰۰۰ و مدت ۱۰ دقیقه انجام شد، سپس محلول رویی (Sup) تخلیه و به رسوب باقی‌مانده (Pellett)، مجدداً فیکساتور تازه و سرد به صورت قطره قطره افزوده شد و همگن‌سازی رسوب با فیکساتور به وسیله همزن شیشه‌ای انجام گردید، سانتریفوژ مجدداً با شرایط قبلی انجام شد (رسوب این مرحله برای دومین بار تحت شرایط مشابه شستشو گردید). در خاتمه به رسوب باقی مانده میزان ۱ml فیکساتور تازه و سرد اضافه شده و همگن‌سازی صورت گرفت و به وسیله پی‌پت پاستور و به روش چکاندن پرتابی از ارتفاع cm ۵۰ روی لام‌های تمیز و سرد، لام‌گیری انجام شد (Gold *et al*., 1990)، لام‌های حاصل بلافاصله روی سطح شیب‌دار و در دمای آزمایشگاه خشک گردید. پس از ۲۴ ساعت، لام‌های حاصل به وسیله گیمسای ۵٪ برای مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شد، بلافاصله شستشوی لام‌ها با آب مقطر انجام و لام‌ها با آب مقطر انجام و لام‌ها در دمای آزمایشگاه، خشک شد (Leitao *et al*., 2010).

اسلایدهای رنگ‌آمیزی شده به‌وسیله میکروسکوپ مجهز به دوربین بررسی گردید و از بهترین پلاک‌های متافازی عکسبرداری (دوربین مدل BELL500) شد. به منظور آنالیز کاریوتیپ گونه پس از اندازه‌گیری طول هر کروموزوم (بر حسب میکرومتر) طول بازوهای بلند و کوتاه نیز اندازه گیری شد سپس طول کل هاپلوئید گونه محاسبه گردید (مجموع طول کروموزوم‌های هاپلوئید ۱۴ عدد) تا طول نسبی هر کروموزوم محاسبه گردد (Leitao *et al*., 2010).

$$\text{طول نسبی هر کروموزوم} = \frac{\text{طول کروموزوم}}{\text{طول کل هاپلوئید گونه}}$$

به علاوه جهت تعیین موقعیت سانترومر از پارامترهای شاخص سانترومری و نیز نسبت بازوها استفاده شد (Glasby *et al*., 2005) که بر اساس فرمول‌های زیر محاسبه گردید (اندازه‌گیری کروموزوم برحسب واحد میکرومتر می‌باشد) (Leitao *et al*., 2010).

$$\text{شاخص سانترومری} = \frac{\text{طول بازوی کوتاه}}{\text{طول کل هر کروموزوم}}$$

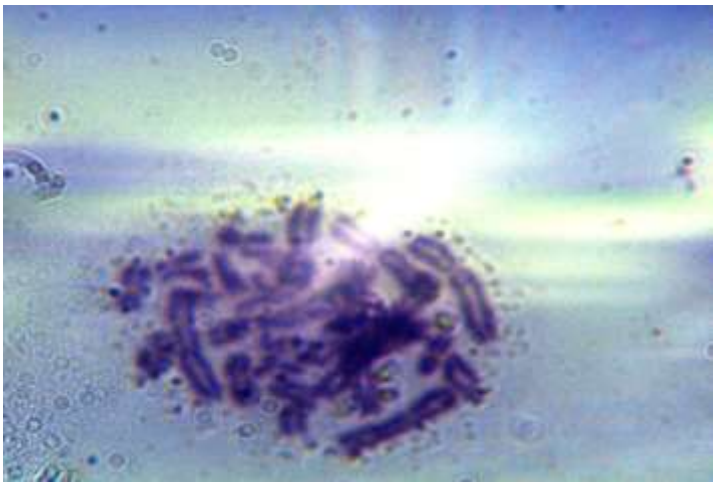
$$\text{نسبت بازوها} = \frac{\text{طول بازوی کوتاه}}{\text{طول بازوی بلند}}$$

نتایج

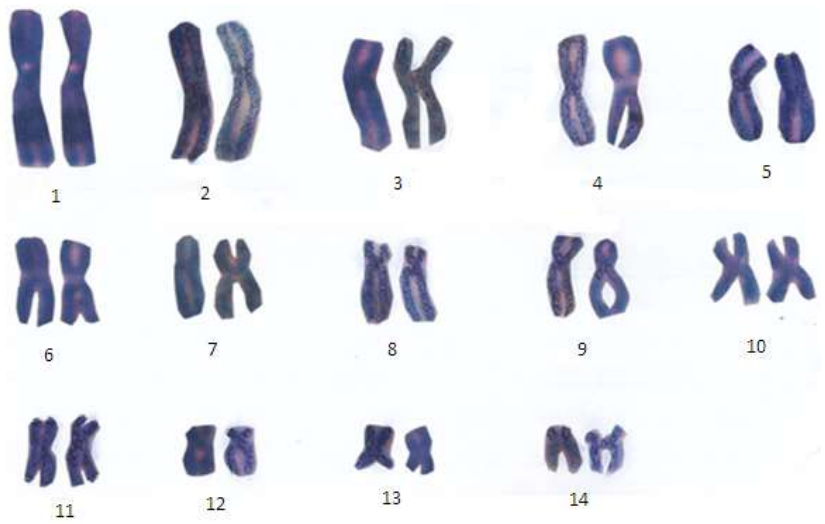
پس از بررسی اسلایدهای کاریوتیپی از نمونه‌های کرم پرتار *Nereis* sp. و مشاهده و آنالیز بیش از ۵۰ پلاک متافازی، عدد کروموزومی این گونه ۲n=۲۸ مشخص گردید. بر اساس محل استقرار سانترومر از مجموع ۱۴ جفت کروموزوم شناسایی شده ۳ جفت از نوع متاسانتریک (جفت کروموزوم‌های شماره ۱، ۴ و ۶)، ۹ جفت از نوع ساب متاسانتریک (جفت کروموزوم‌های شماره ۲، ۳، ۵، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۳) و ۲ جفت کروموزوم‌های شماره ۱۲ و ۱۴ از نوع تلوسانتریک بودند (شکل‌های ۱ و ۲). بزرگترین کروموزوم‌ها (جفت کروموزوم شماره ۱) دارای طول نسبی ۱۴/۳۲±۰/۲۹ با شاخص سانترومری ۴۶/۵۵±۰/۴۷ بود درحالی‌که کوچک‌ترین کروموزوم‌ها (جفت کروموزوم شماره ۱۴) طول نسبی ۲/۷۶±۰/۱۵ و شاخص سانترومری ۲۷/۲۵±۰/۳۳ داشتند. با توجه به اینکه، نمونه‌های مورد آزمایش نابالغ بودند (در نمونه‌برداری فصلی هیچ کرم بالغ یا هترونرئیدی یافت نشد). بنابراین کروموزوم‌های جنسی قابل تشخیصی رؤیت نشد (جدول ۱).

جدول ۱. مطالعه طول بازو و شاخص سانترومری کروموزوم گونه (*Nereis* sp) بر حسب میکرومتر

نسبت بازوها	شاخص سانترومری	طول نسبی (٪)	نوع کروموزم بر اساس محل سانترومر	شماره کروموزوم
۰/۹۳±۰/۰۳	۴۶/۵۵±۰/۴۷	۱۴/۳۲±۰/۲۹	متاسانتریک	۱
۰/۶۷±۰/۱۲	۴۰/۳۸±۰/۳۲	۱۲/۸۳±۰/۳۹	ساب متاسانتریک	۲
۰/۵۷±۰/۰۷	۳۶/۵۸±۰/ ۱۷	۱۰/۲۲±۰/۴۱	ساب متاسانتریک	۳
۰/۹۱±۰/۰۸	۴۵/۱۵±۰/۲۳	۹/۶۲±۰/۳۳	متاسانتریک	۴
۰/۸۵±۰/۰۳	۴۵/۹۰±۰/۵۲	۹/۱۳±۰/ ۵۸	ساب متاسانتریک	۵
۰/۹۹±۰/۱۸	۵۱/۷۲±۰/۴۴	۷/۱۶±۰/۴۹	متاسانتریک	۶
۰/۷۸±۰/۱۲	۴۳/۸۲±۰/۱۷	۶/۱۷±۰/۶۴	ساب متاسانتریک	۷
۰/۸۳±۰/۰۲	۳۴/۷۸±۰/۲۶	۵/۶۷±۰/۱۶	ساب متاسانتریک	۸
۰/۹۰±۰/۲۵	۴۷/۱۶±۰/۷۶	۵/۱۸±۰/۵۱	ساب متاسانتریک	۹
۰/۷۸±۰/۲۵	۶۳/۱۵±۰/۱۷	۴/۶۹±۰/۳۶	ساب متاسانتریک	۱۰
۰/۷۲±۰/۲۰	۵۲/۵۰±۰/۲۷	۴/۲۹±۰/۲۸	ساب متاسانتریک	۱۱
۰/۴۵±۰/۰۵	۳۱/۲۵±۰/۱۵ .	۳/۹۸±۰/۱۸	تلوسانتریک	۱۲
۰/۷۵±۰/۱۱	۴۲/۱۸±۰/۴۳	۳/۳۵±۰/۲۹	ساب متاسانتریک	۱۳
۰/۳۷±۰/۱۵	۲۷/۲۵±۰/۳۳	۲/۷۶±۰/۱۵	تلوسانتریک	۱۴



شکل ۱. پلاک متافازی از سلول‌های گونه *Nereis* sp.



شکل ۲. کاریوتیپ چیده شده گونه *Nereis* sp.

بحث و نتیجه‌گیری

به وسیله کاریوتایپ می‌توان هر کروموزوم را در مجموعه کروموزوم‌های جانداران تعیین کرد (Bakken *et al*., 2006). مهمترین خصوصیات در شناسایی کروموزوم‌ها عبارتند از طول نسبی، طول بازوها و شاخص سانترومری به علاوه تعداد کروموزوم‌ها یا عدد کروموزومی گونه که بر اساس دیپلوئید (۲n) و یا هاپلوئید (n) بیان می‌شود نیز جهت معرفی هر گونه ضروری است (Gode *et al*., 2010).

کرم‌های پرتار جانورانی جنس جدا و دارای لقاح خارجی هستند (Bakken *et al*., 2006) که در طی سیکل زندگی خود و پس از بالغ شدن در پیکره شان دچار تغییرات مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی می‌شوند که در این حالت به آنها هترونرئید گفته می‌شود (Benbow, 2009) که آماده رهاسازی گامتی و لقاح در آب دریا هستند (Barnes, 1997).

در این تحقیق با توجه به فصل نمونه‌برداری، که در پائیز- زمستان صورت گرفت، نمونه‌های حاصل، کرم‌های پیش از مرحله بلوغ را شامل می‌شد. بنابراین تشخیص جنسیت کرم‌ها بر اساس مرفولوژی مقدور نبود. به‌علاوه از تمامی بافت بدنی جانور جهت متافازی کردن و تهیه پلاک متافازی استفاده شد. عدد کروموزومی این گونه ۲n=۲۸ شمارش گردید. در تحقیقات مشابه روی خانواده پرتاران (Nereidae) بیشترین اعداد کروموزومی گزارش شده ۲n=۲۸ بوده است (Ipucha *et al*., 2007). به علاوه وجود کروموزوم‌های عمدتاً متاسانتریک و ساب متاسانتریک در مطالعات مشابه تایید شده است (Jha *et al*., 1995). استفاده از روش حمام کلچسین برای کرم‌های پرتار نابالغ در بسیاری از مطالعات پیشنهاد گردیده است که نتایج بیانگر ایجاد پلاک‌های متافازی مناسبی بوده است (Bantha *et al*., 2003).

نتایج آنالیز کروموزومی این گونه (جدول ۴) نشان می‌دهد که ۱۴ جفت کروموزومی مشاهده شده دارای شاخص سانترومری قابل توجه بوده‌اند (Christopher *et al*., 2009). بنابراین تشخیص جایگاه سانترومری به سهولت امکان‌پذیر گردید نتایج مطالعات مشابه روی سایر گونه‌های این خانواده نیز نشان داده است (Tosuji *et al*., 2004) که کروموزوم‌های این جانوران برخلاف بسیاری از بی‌مهرگان دریازی که عمدتاً از نوع میکروکروموزوم می‌باشند، دارای بازوها و سانترومر قابل تشخیص هستند (Fauchald *et al*., 2008). به علاوه با توجه به ویژگی شاخص سانترومری در این گونه می‌توان علاوه بر عدد

کروموزومی دیپلوئید ۲n=۲۸، از عدد هاپلوئید n=۱۴، استفاده کرد (Bantha *et al*., 2003).

در مطالعه‌ای دیگر استفاده از کرم بالغ *Nereis* sp. به صورت قطعه‌ای از ناحیه انتهایی دم و سپس انکوبه کردن در آکواریوم تا زمان ظهور بافت بازسازی شده به مدت ۴ هفته پیشنهاد شده است که نتایج تحقیق فوق علاوه بر اعلام عدد کروموزومی ۲n=۲۸، بیانگر عدم شناسایی کروموزوم‌های جنسی بوده است (Carvalo, 2007). اگرچه نوعی کروموزوم متفاوت تحت عنوان کروموزوم B را در برخی گونه‌های این خانواده از جمله گونه *Hediste diversicolor* نشان داده است که موجب تغییر عدد کروموزومی گونه‌های فوق به ۲n=۲۹ بوده است (Jha *et al*., 1995).

در تحقیقات مشابه روی کرم‌های *Nereis* sp.، مشاهده شده که در صورت وجود رفتارهای تولیدمثلی متفاوت (الگوهای تولیدمثل متمایز و وابسته به زیستگاه) که در بروز نسبت جنسی جمعیتی هم اثر خواهد داشت، اعداد کروموزومی بسیار متنوعی مشاهده خواهد داشت، از جمله ۲n=۱۸ و ۲n=۲۴ (Muller *et al*., 1990).

بر این اساس *Nereis* sp. را در دو گروه تقسیم‌بندی می‌کنند، گروه اول دارای الگوی تولیدمثلی متنوع و دارای اعداد کروموزومی متغییر از جمله *Hediste japonica* و *H .diadroma* و گروه دوم که الگوی تولیدمثلی ثابتی داشته و عدد کروموزومی غالب آن ها ۲n=۲۸ گزارش شده است (Jones *et al*., 2003). به نظر می‌رسد گونه مورد مطالعه در این تحقیق (*Nereis* sp.) در کرم‌های پرتار گروه دوم قرار می‌گیرد.

REFERENCES

Abdel, K.; Williams, K.; Grieve, C.; (1993). Blue swimmer crab-Australian Fisheries Resources. Bureau of Rural Science and the fish Society London; 2: 29-52.

Ackermann, Ch.; (2005). Clonal domains in postlarval *Platynereis dumerilii* (Annelida: Polychaeta). Journal of Morphology; 226: 258-280.

Ahmad, MM.; (2008). Systematic study on Polychaeta from Persian Gulf and Shatt Al-Arab. Iraq University of Basrah; 4: 1-55.

Alcantra, PH.; Hernadez, MA.; (2008). Polychaetes descriped for the Mexican pacific. labortorio de Ecology Biodeversided the Invertebra Marions; 36: 37-61.

Bakken, T.; Wilson, RS.; (2006). Phylogeny of Nereidids (Polychaeta, Nereididae) with paragnaths. Zoologica Scripta; 34: 507-547.

Bantha, GT.; Anderson, O.; (1997). Bioturbation and the fate of sediment pollutants. Zootaxa; 53: 233-248.

Barnes, RD.; (1997). Invrtabrate zoology, 5th ed. saunders collage publications. Philadelphia; USA: 179-225.

Benbow, ME.; (2009). Annelidae Polychaeta. Zootaxa; 17: 124-127.

Carvalho, S.; Barata, M.; (2007). Enrichment of aquaculture earthen ponds with *Nereis* sp. Aquaculture; 262: 227-236.

Christopher, J.; Glasby-Hsieh, HL.; (2009). New species and new record of the *perinereis nuntia* species from Taiwan and other Indo-West pacific Shores. Museum and Art Gallary of the Northern Territory; 496: 95-105.

Fauchald, K.; Glasby, CJ.; (2008). An information system for Polychaeta families and higher taxa. Ocean Science Journal; 3: 45-51.

Glasby, CJ.; Hsieh, HL.; (2005). New species and New Record of the *Perinereis nuntia* group. Zoological Studies; 45: 226-234.

Gode, L.; Lemao, P.; Grant, C.; (2010). Marine invertebrate fauna of the chausey archipelago. Zootaxa; 51: 147-165.

Gold, JR.; Li, CY.; Shipley, NS.; Power, PK.; (1990). Improve methods for working with fish chromosomes with a

review of metaphase chromosome banding. Journal of Fish Biology; 37: 563-575.

Harris, L.; (2001). Polychaeta. Scamit Newsletter; 19: 11-17.

Ipucha, MC.; Santos, CG.; (2007). Cytogenetics characterization of Nereididae. Journal Basic Application Genetics; 18: 15-22.

Jha, NA.; Hutchinson, TH.; (1995). The chromosome of *Platynereise dumerilii*. Biology Association; 75: 551-562.

Jones, PK.; Giangrande, A.; (2003). Two new species of an atypical group of pseudo Branchiomma. Ocean Science Journal; 496: 95-103.

Leitao, A.; Carvalho, S.; (2010). Cytogenetics of *Hediste diversicolor* and comparative karyological analysis within Nereididae. Aquatic Biology, 10: 193-200.

Lipari, R.; Vitturi, R.; (1994). Cariotipoe organizatori nucleolari in *Perinereis macropus*. Biological Marin Mediterrane; 1: 361-362.

Muller, C.; Weinberg, JR.; (1990). Divergence between populations of a monogamous Polychaete with male parental care: Premating isolation and chromosome variation. Biology Science, 107: 205-213.

Selo, M,; Kopecka-Pilarczyk, J.; (2009). Biomarkers in two estuarine invertebrates *Nereis* sp. Marin Biology; 35: 523-531.

Tosuji, H.; Miyamoto, J.; (2004). Karyotyping of female and male *Hediste japonica*. Zoology Science; 21: 147-152.

Tosuji, H.; Togami, K.; (2010). Karyotype analysis of the hermaphroditic viviparous polychaeta, *Hediste limnicola*. Journal Marin Biology Assocociation; 90: 613-6162.

Virgilio, M.; Fauvelot, C.; (2009). Phylogeography of the common ragworm *Nereis* sp. reveals cryptic divercity. Marin Biology; 18: 1980-1998.