

جداسازی *HindIII* SatDNA در تاسماهی ایرانی *Acipenser persicus*

Isolation of *HindIII* SatDNA in Persian sturgeon *Acipenser persicus*

محمدرضا نوروزفشخامی^{۱*}، لیلا عزیززاده پرمهر^۱، فروزنده محجوبی^۲، محمد پورکاظمی^۱، بهرام کاظمی^۳،
محمد حسن زاده صابر^۱، مهتاب یارمحمدی^۱

۱- به ترتیب مربی، کارشناس ارشد، استادیار، کارشناس ارشد و استادیار موسسه تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دریای خزر، رشت

۲- استادیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و فن‌آوری زیستی

۳- استاد دانشگاه شهید بهشتی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و ملکولی، تهران

Nowruzfashkhami MR^{*1}, Azizzadeh pormehr L¹, Mahjoubi F², Pourkazemi M¹, Kazemi B³,
Hassanzadeh Saber M¹, Yarmohhamadi M¹

1. Instructor, Graduate Student, Assistant Professor, Graduate Student and Assistant Professor, International Sturgeon Research Institute
2. Assistant Professor, National Center Genetic Engineering and Biotechnology
3. Professor Shahid Beheshti University, Cellular and Molecular Biology Research Center

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Nowruzfashkhami@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۷ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۵)

چکیده

هدف از انجام این تحقیق بررسی وجود یا عدم وجود DNA ماهواره ای اختصاصی جنس *Acipenser* (*HindIII* SatDNA) در تاسماهی ایرانی *Acipenser persicus* بود. DNA ژنومی از باله دمی تاسماهی ایرانی به منظور تهیه *HindIII* SatDNA، به روش فنل-کلروفرم استخراج شد. *HindIII* SatDNA به روش PCR تکثیر و کیفیت محصول PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید بررسی شد. قطعه *HindIII* بدست آمده پس از خالص سازی به پلاسمید PTZ 57/R (Fermentas) متصل و در درون باکتری *E. coli* سویه DH5α (Fermentas) کلون شد و سه کلون حاوی قطعه *HindIII* SatDNA تعیین توالی شدند. تعیین توالی *HindIII* SatDNA جدا شده از ژنوم تاسماهی ایرانی حاکی از وجود ۱۶۳ جفت باز (۱۶۳ bp) در آن بود که در بانک ثبت ژن NCBI با شماره FJ429174 به ثبت رسید. مقایسه *HindIII* SatDNA استخراج شده از تاسماهی ایرانی در تحقیق حاضر با توالی *HindIII* SatDNA جدا شده از تاسماهی روسی *Acipenser gueldenstaedtii*، ماهی استرلیاد *A. ruthenus*، تاسماهی آدریاتیک *A. naccarii*، تاسماهی پوزه کوتاه *A. brevirostrum*، تاسماهی سبیری *A. baeri*، تاسماهی دریاچه‌ای *A. fulvescens*، ماهی ازون برون *A. stellatus* و تاسماهی چینی *A. sinensis* ۸۸ درصد و مقایسه آن با توالی *HindIII* SatDNA جدا شده از تاسماهی سفید *A. transmontanus* نیز نمایانگر ۹۰ درصد شباهت بود. وجود *HindIII* SatDNA در تاسماهی ایرانی و شباهت بسیار زیاد آن با *HindIII* SatDNA سایر تاسماهیان نشان داد که تاسماهی ایرانی به جنس *Acipenser* تعلق دارد.

واژه‌های کلیدی

تاسماهی ایرانی

دریای خزر

Acipenser persicus
HindIII SatDNA

DNA ماهواره‌ای (SatDNA) توالی‌های غیر کدکننده و تکراری هستند که عمدتاً در مناطق هتروکروماتین ساختاری موجود در سانترومرها و تلومرها مشاهده می‌شوند (Robles et al. 2004) و به خاطر تکامل سریع خود برای بررسی‌های تاکسونومیک و فیلوژنیک استفاده می‌شوند. چنانچه به طور مشترک در چندین گونه وجود داشته باشد می‌تواند برای بررسی فیلوژنی آنها مورد استفاده قرار گیرد (Arnason 1990; Garrido-Ramos et al. 2006; Martins et al. 1999). زیرا گونه‌هایی که رابطه خویشاوندی خیلی نزدیکی دارند دارای SatDNA یکسان هستند (Pons et al. 2002; Pons and Gillespie 2003). علیرغم اینکه جایگاه هتروکروماتین بر روی کروموزوم‌های ماهیان با استفاده از روش‌های رنگ‌آمیزی هسیتولوژیک یا باندینگ کروموزومی بررسی شده ولی اطلاعات مولکولی در مورد SatDNA آنها اندک است. اولین گزارش‌های مربوط به SatDNA ماهیان مربوط به اواخر دهه ۱۹۸۰ می‌باشد (Datta et al. 1988; Monaco et al. 1989; Moyer et al. 1988). در ارتباط با بررسی SatDNA در ماهیان خاویاری، Garrido-Ramos et al. (1994) موفق شدند با استفاده از آنزیم *HindIII* برای اولین بار یک SatDNA (۱۷۰ bp) را از ژنوم تاسماهی آدریاتیک *Acipenser naccarii* جدا نمایند. بعدها وجود آن در تعدادی از سایر گونه‌های ماهیان خاویاری (جنس *Acipenser*) نیز توسط Lanfredi et al. (2001) گزارش شد. با توجه به اینکه *HindIII* SatDNA در اکثر گونه‌های جنس *Acipenser* وجود دارد لذا برخی این مارکر را خاص جنس مذکور می‌دانند و معتقدند برای بررسی فیلوژنی ماهیان خاویاری مناسب می‌باشد. با توجه به اینکه وجود یا عدم وجود این مارکر مولکولی در تاسماهی ایرانی تاکنون مطالعه نشده است لذا این تحقیق به منظور پی بردن به وجود یا عدم وجود SatDNA مورد نظر در تاسماهی ایرانی انجام شد. زیرا در صورت وجود مارکر مذکور در ژنوم این ماهی و تعیین توالی آن، ضمن تایید تعلق داشتن تاسماهی ایرانی به جنس *Acipenser*، میزان قرابت آن با سایر تاسماهیان نیز می‌تواند مورد مطالعه قرار گیرد.

به منظور دستیابی به DNA مطلوب و مارکر مورد نظر، ابتدا DNA ژنومی از باله دمی ۲۷ عدد تاسماهی ایرانی پرورشی سه ساله به روش فنل-کلروفرم (Pourkazemi 1996) استخراج و

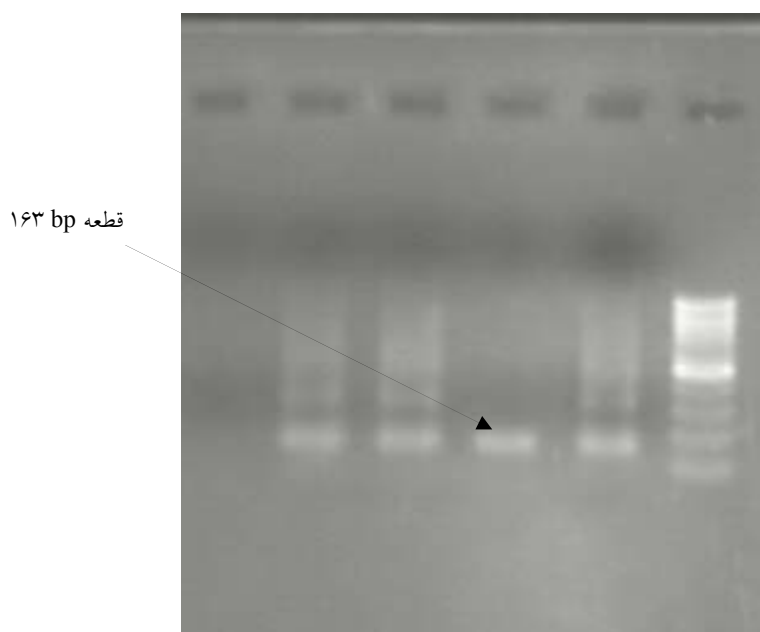
کمیت آنها با استفاده از دستگاه نانودراپ و کیفیت آنها با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز طی سه مرحله (هر مرحله ۹ نمونه) بررسی شد. به دلیل وجود شباهت‌های ژنتیکی و قرابت خویشاوندی بسیار زیاد بین تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی (Mugue et al. 2008) آغازگرهای مورد نیاز با توجه به توالی *HindIII* SatDNA استخراج شده از تاسماهی روسی که در NCBI با شماره AJ286597 به ثبت رسیده بود با استفاده از برنامه Oligo5 با توالی 5'-AAA GCT CGG GCA TTG AAA T-3' (F) و 3'-GGT TCG TTC CTG TC-3' (R) طراحی و سفارش ساخت آن از طریق شرکت سیناژن به شرکت ISOGEN کشور هلند داده شد. بعد از کسب اطمینان از کیفیت و کمیت مطلوب ۹ نمونه DNA استخراج شده متعلق به ۹ عدد تاسماهی ایرانی و ساخت آغازگرهای سفارش داده شده، توالی *HindIII* SatDNA با استفاده از آغازگرهای تهیه شده تکثیر شد. حجم مخلوط واکنش PCR شامل ۵/۰ میکرولیتر آنزیم TaqDNA polymerase و ۲۰ (۵ U/μl)، ۵/۰ میکرولیتر dNTPs (۱۰ mM)، یک میکرولیتر (۱۰×) PCR پیکومول) از هر آغازگر، ۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰×)، ۳ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ mM)، یک میکرولیتر (۱۰۰ نانوگرم) DNA ژنومی و آب مقطر با حجم نهایی ۵۰ μl بود. برای انجام واکنش PCR از دستگاه Eppendorf (مدل AG22331) استفاده شد. واکنش PCR شامل یک مرحله واسرشته‌سازی (دنا توره کردن) اولیه DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، متعاقب آن ۳۵ چرخه واسرشته‌سازی DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال آغازگرها در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله توسعه DNA در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه بود و یک مرحله به عنوان توسعه انتهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و رنگ آمیزی ژل بدست آمده با اتیدیوم بروماید بررسی شد. پس از اطمینان از تولید محصول PCR و در نتیجه وجود *HindIII* SatDNA چون در توالی‌یابی مستقیم محصول PCR، توالی اول و آخر ژن از دست داده شد و مشخص نبود بنابراین برای بدست آوردن توالی کامل قطعه مذکور (*HindIII* SatDNA) انجام کلونینگ آن ضروری بود. بدین منظور ابتدا قطعه SatDNA

محیط کشت حاوی باکتری به مدت یک دقیقه در $g \times 13000$ سانتریفوژ شد و باکتری جمع شده در ته میکروتیوب را در محلول T solution حل کرده و به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. پس از سانتریفوژ کردن و جداکردن محلول رویی، باکتریهای ته تیوب دوباره در محلول T solution حل شد و به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. پلاسمید نو ترکیب آماده شده برای ترانسفورماسیون را به میکروتیوب دیگر منتقل و پس از افزودن ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری، به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ گذاشته شد. باکتریها را روی پلیت حاوی آمپی سیلین، IPTG و X-gal کشت داده و به مدت یک شبانه روز در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. به منظور تایید انجام کلونینگ، کلونیهای سفید PCR شدند، سپس محصول PCR با استفاده از ژل آگارز الکتروفورز شد. در مرحله بعد کشت شبانه باکتریهای حاوی پلاسمید در محیط کشت حاوی آمپی سیلین انجام شد و سرانجام در مرحله پایانی DNA پلاسمید توسط شرکت BIONEER کره جنوبی توالی یابی شد. DNAهای استخراج شده از ۹ عدد تاسماهی ایرانی دارای کیفیت مناسب بودند. همچنین بررسی پلیتها و ژلهای حاصل از PCR کلونیها حاکی از انجام کلونینگ مثبت در بیشتر کلونیها بود (شکل ۱). نتایج حاصل از تعیین توالی HindIII SatDNA جدا شده از ژنوم تاسماهی ایرانی در این تحقیق حاکی از وجود ۱۶۳ جفت باز (۱۶۳bp) در آن بود (شکل ۲). (De La Herran et al. 2001). تعداد بازهای موجود در HindIII SatDNA جدا شده از تاسماهی روسی *Acipenser gueldenstaedtii* (۱۶۹ bp، ۱۷۰ bp، ۱۷۱ bp)، تاسماهی استرلیاد *Acipenser ruthenus* (۱۷۱ bp)، تاسماهی سبیری *Acipenser baeri* (۱۶۶ bp، ۱۶۹ bp، ۱۷۰ bp، ۱۷۱ bp)، تاسماهی سفید *Acipenser transmontanus* (۱۶۹ bp، ۱۷۰ bp، ۱۷۱ bp) و تاسماهی آدریاتیک (۱۷۰ bp و ۱۷۱ bp)، همچنین (Robles al. 2004) تعداد بازهای موجود در HindIII SatDNA جدا شده از ماهی ازون برون *Acipenser stellatus* (۱۶۹ bp)، تاسماهی چینی *Acipenser sinensis* (۱۶۴ bp، ۱۷۰ bp)، تاسماهی دریایچه ای *Acipenser fulvescens* (۱۷۱ bp) و تاسماهی پوزه کوتاه *Acipenser brevirostrum* (۱۷۰ bp، ۱۷۱ bp) را نیز قبلاً گزارش کردند. حداقل و حداکثر تعداد بازهای

موجود در ژل آگارز با اسکالپل از آن جدا و با استفاده از کیت مخصوص (QIAGEN) خالص سازی شد. برای این کار قطعه ژل را پس از وزن کردن در یک میکروتیوب اپندورف ۱/۵ میلی لیتری ریخته و ۳ برابر وزن ژل به آن بافر موجود در کیت اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس هم وزن ژل به آن ایزوپروپانول افزوده و پس از هم زدن بر روی ستون Qiaquick (مخصوص جدا کردن DNA از ژل) ریخته و به مدت یک دقیقه در $g \times 1300$ سانتریفوژ شد. پس از جدا کردن مایع زیرین، بافر QG به ستون افزوده و به مدت یک دقیقه سانتریفوژ شد. سپس بافر PE به منظور شستشو به ستون Qiaquick افزوده و به مدت یک دقیقه در دور $g \times 1300$ سانتریفوژ شد. سپس مایع زیرین را جدا کرده و ستون دوباره روی همان تیوب قرار داده شد. برای جمع آوری DNA، ۵۰ میکرولیتر بافر EB یا آب دی یونیزه به مرکز ستون Qiaquick اضافه شد و ستون به مدت یک دقیقه در $g \times 1300$ سانتریفوژ شد. پس از خالص سازی DNA، غلظت آن با دستگاه نانودراپ اندازه گیری و برای اتصال به پلاسمید (واکنش Ligation) مورد استفاده قرار گرفت. واکنش اتصال طبق پروتکل کیت InsTA clone TM (Fermentas) انجام شد. برای این کار ابتدا پلاسمید PTZ57R/T، ۴ میکرولیتر قطعه DNA خالص شده، ۶ میکرولیتر Ligation buffer (۵X)، آب مقطر (عاری از نوکلئاز) و آنزیم T4 DNA Ligase را درون یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری ریخته و به مدت ۱۲ ساعت در انکوباتور ۲۲ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس به منظور ازدیاد پلاسمید نو ترکیب تولید شده، پلاسمید مذکور درون یک باکتری جای داده شد (ترانسفورماسیون). برای ترانسفورماسیون پلاسمید از باکتری *E. coli* (سویه DH5α) و کیت InsTA clone TM (Fermentas) دستور کار ذکر شده در کیت مذکور استفاده شد. برای تهیه Competent cell، پلیت LB به مدت یک شبانه روز در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد سپس مقدار کمی باکتری در محیط کشت مذکور تلقیح و به مدت دو ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. به منظور وارد کردن پلاسمید به درون باکتری، محیط کشت حاوی آمپی سیلین به مدت ۲۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. در مرحله بعد



شکل ۱- باکتری‌های تکثیر شده بر روی محیط کشت (کلنی‌های آبی نمایانگر باکتری‌های فاقد قطعه ۱۶۳ bp و کلنی‌های سفید نمایانگر باکتری‌های حاوی قطعه ۱۶۳ bp می‌باشد)



شکل ۲- *HindIII* SatDNA (۱۶۳ bp) استخراج شده از تاسماهی ایرانی بر روی ژل آگارز دو درصد پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید.

کروموزومی (تاسماهی پوزه کوتاه) علیرغم متفاوت بودن تعداد کروموزوم‌ها، سطح پلویدی این سه گروه و قدمت ۹۰ میلیون ساله SatDNA مذکور تقریباً یکسان گزارش شده است که علت آن می‌تواند پایین بودن میزان تغییرات در توالی SatDNA مذکور در جنس *Acipenser* طی تکامل باشد. بنابر عقیده (2004) et al.

HindIII SatDNA جدا شده از ماهیان مذکور به ترتیب ۱۶۴ bp و ۱۷۱ bp بود. تعداد بازهای *HindIII* SatDNA تاسماهیان ۱۲۰ کروموزومی (تاسماهی استرلیاد، تاسماهی آدریاتیک، ماهی ازون برون)، ۲۴۰ کروموزومی (تاسماهی روسی، تاسماهی سیبری، تاسماهی چینی، تاسماهی سفید، تاسماهی دریاچه‌ای) و ۳۶۰

Robles میزان وقوع تغییرات در توالی *HindIII* SatDNA تاسماهیان بر خلاف SatDNA سایر مهره داران بسیار کم و میزان جهش در آن بین ۰/۰۷ تا ۰/۱۱ درصد در هر یک میلیون سال می باشد. این وضعیت در مورد تعدادی دیگر از ژن های هسته ای و میتوکندریایی ماهیان خاویاری نیز گزارش شده است (Krieger Birstein and DeSalle 1998; and Fuerst 2002). به نظر می رسد میزان وقوع جهش در ژنوم ماهیان کمتر از سایر مهره داران است. Martin (1999) علت آن را پایین بودن میزان متابولیسم این موجودات می داند. همچنین از بین ماهیان مختلف، کمترین جهش در ماهیان خاویاری مشاهده می شود که دلایل آن هنوز بطور کامل مشخص نیست ولی (Krieger and Fuerst 2002) عوامل فیزیولوژیک (طول عمر زیاد، بزرگی جنه، خونسرد بودن و پایین بودن میزان متابولیسم) و (Ludwig et al. 2001) عوامل ژنتیکی از جمله وقوع پلی پلویدی را عامل آن می دانند. متغیر بودن تعداد بازهای موجود در *HindIII* SatDNA جدا شده از یک گونه ممکن است به علت استفاده از کلون های مختلف و وقوع حذف شدگی^۱، الحاق^۲ و جانشینی^۳ در بازها باشد. Martins et al. (2006) وقوع چنین پدیده هایی را در مورد *HindIII* SatDNA جدا شده (۳۵۰bp) از DNA ژنومی ماهی *Hoplias malabaricus* گزارش کردند.

با توجه به اینکه *HindIII* SatDNA در اکثر گونه های جنس *Acipenser* وجود دارد لذا ابزار خوبی را برای بررسی فیلوژنی این ماهیان فراهم کرده است. به عنوان مثال (Robles et al. 2004) از آن برای بررسی فیلوژنی تاسماهی اروپا، تاسماهی سبیری، تاسماهی آدریاتیک و فیلماهی *Huso huso* استفاده کردند و اعلام کردند فیلماهی را به واسطه دارا بودن SatDNA مذکور باید از جنس *Huso* خارج کرد و آن را گونه ای از جنس *Acipenser* در نظر گرفت. این محققین به واسطه وجود تنها ۲/۳ درصد اختلاف در توالی *HindIII* SatDNA استخراج شده از تاسماهی آدریاتیک و تاسماهی سبیری، وجود رابطه فیلوژنی نزدیک بین این دو گونه را گزارش کردند. آنها همچنین اعلام کردند *HindIII* SatDNA می تواند ابزار مولکولی مناسبی

برای تشخیص گونه های مختلف تاسماهیانی که در نقاط مختلف صید می شوند باشد. وجود *HindIII* SatDNA و الگوی تکاملی آن در تاسماهی آدریاتیک، تاسماهی سبیری، ماهی استرلیاد، تاسماهی اروپا *Acipenser sturio*، تاسماهی سفید، تاسماهی روسی و فیلماهی توسط (De La Herran et al. 2001) بررسی شد. این محققین نیز معتقد بودند به واسطه وجود SatDNA *HindIII* در فیلماهی باید آن را گونه ای از جنس *Acipenser* محسوب نمود و از طرف دیگر تاسماهی اروپا به دلیل نداشتن SatDNA مذکور متعلق به جنس *Acipenser* نیست و متعلق به زنجیره تکاملی مجزایی است. این محققین همچنین اعلام کردند توالی های *HindIII* SatDNA تاسماهی روسی و تاسماهی آدریاتیک تقریباً یکسان هستند و شباهت بسیار زیادی را با تاسماهی سبیری نشان می دهند لذا با توجه به تشابه موجود، باید این سه گونه را به همراه تاسماهی سفید در یک گروه قرار داد در حالی که ماهی استرلیاد و فیلماهی در گروهی جداگانه قرار می گیرند. مقایسه *HindIII* SatDNA استخراج شده از تاسماهی ایرانی در تحقیق حاضر با توالی *HindIII* SatDNA جدا شده از تاسماهی روسی، تاسماهی سبیری، ماهی استرلیاد و تاسماهی آدریاتیک توسط (De La Herran et al. 2001)، ماهی ازون برون، تاسماهی پوزه کوتاه، تاسماهی دریاچه ای و تاسماهی چینی توسط (Robles et al. 2004) با استفاده از Blast کردن توالی بدست آمده با توالی های مربوط به *HindIII* SatDNA ماهیان نامبرده شده حاکی از وجود ۸۸ درصد تشابه و مقایسه آن با توالی SatDNA *HindIII* جدا شده از تاسماهی سفید توسط (De La Herran et al. 2001) نیز نمایانگر وجود ۹۰ درصد شباهت بود. اثبات وجود *HindIII* SatDNA در تاسماهی ایرانی در نتیجه انجام این تحقیق و شباهت بسیار زیاد توالی آن با *HindIII* SatDNA تعداد زیادی از تاسماهیان جنس *Acipenser* تایید می کند تاسماهی ایرانی نیز به جنس مذکور تعلق دارد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از رییس و معاون محترم پژوهشی موسسه تحقیقات شیلات ایران به خاطر پشتیبانی مالی و تجهیزاتی این تحقیق، همچنین از تمامی بزرگوارانی که در انجام این تحقیق همکاری داشتند سپاسگزاری می شود.

¹ Deletion

² Insertion

³ Substitution

منابع

- Arnason U (1990) Phylogeny of marine mammals-evidence from chromosomes and DNA. *Chromosome Today* 10:267-278.
- Birstein VJ, DeSalle R (1998) Molecular phylogeny of Acipenserinae. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 9:141-155.
- Datta U, Dutta P, Mandal K (1988) Cloning and characterization of a highly repetitive fish nucleotide sequence. *Genetics* 62:331-336.
- De La Herrán R, Fontana F, Lanfredi M, Congiu L, Leis M, Rossi R, Ruiz Rejon C, Ruiz Rejon M, Garrido-Ramos MA (2001) Slow rates of evolution and sequence homogenization in an ancient satellite DNA family of sturgeons. *Journal of Molecular Biology Evolution* 18:432-436.
- Garrido-Ramos MA, Jamilena M, Lozano R, Ruiz Rejon C, Ruiz Rejon M (1994) Cloning and characterization of a fish centromeric satellite DNA. *Cytogenetic and Cell Genetics* 65:233-237.
- Garrido-Ramos MA, De La Herrán R, Jamilena M, Lozano R, Ruiz-Rejón C, Ruiz-Rejón M (1999) Evolution of centromeric satellite-DNA and its use in phylogenetic studies of the Sparidae family (Pisces, Perciformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12:200-204.
- Krieger J, Fuerst PA (2002) Evidence for a slowed rate of molecular evolution in the order Acipenseriformes. *Molecular Biology Evolution* 19:891-897.
- Lanfredi M, Congiu L, Garrido-Ramos MA, De La Herrán R, Leis M, Chicca M, Rossi R, Tagliavini J, Ruiz Rejon M, Fontana F (2001) Chromosomal location and evolution of a satellite DNA family in seven sturgeon species. *Chromosome Research* 9:47-52.
- Ludwig A, Belfiore NM, Pitra C, Svirsky V, Jenneckens I (2001) Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (Acipenser, Huso and Scaphirhynchus). *Genetics* 158:1203-1215.
- Martin AP (1999) Substitution rates of organelle and nuclear genes in sharks: implicating metabolic rate (again). *Molecular Biology Evolution* 16:996-1002.
- Martins C, Ferreira IA, Oliveira C, Foresti F, Galetti PM Jr (2006) A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica* 127:133-141.
- Mônaco PJ, Swan KF, Rasch EM, Musich PR (1989) Characterization of a repetitive DNA in the unisexual fish *Poecilia formosa*. I. Isolation and cloning of the *MboI* family. *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates* 466:123-131.
- Moyer SP, Ma DP, Thomas TL, Gold JR (1988) Characterization of a highly repeated satellite DNA from the cyprinidae fish *Notropis lutrensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 91B:639-646.
- Mugue NS, Barmintseva AE, Rastorguev SM, Mugue VN, Barmintsev VA (2008) Polymorphism of the Mitochondrial DNA Control Region in Eight Sturgeon Species and Development of a System for DNA-Based Species Identification. *Genetika* 44:913-920.
- Pons J, Petitpierre E, Juan C (2002) Evolutionary dynamics of satellite DNA family PIM357 in species of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae, Coleoptera). *Molecular Biology Evolution* 19:1329-1340.
- Pons J, Gillespie RG (2003) Common origin of the satellite DNAs of the Hawaiian spiders of the genus *Tetragnatha*: evolutionary constraints on the length and nucleotide composition of the repeats. *Gene* 313: 169-177.
- Pourkazemi M (1996) Molecular and biochemical genetic analysis of sturgeon stocks from the south Caspian. Dissertation, University of Wales, England.
- Robles F, De la Herrán R, Ludwig A, Ruiz-Rejón C, Ruiz-Rejón M, Garrido-Ramos MA (2004) Evolution of ancient satellite DNAs in sturgeon genome. *Genetics* 338:133-142.