ژنتیک نوین
دوره نهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳
صفحه ۱۲۶- ۱۲۱

Downloaded from mg.genetics.ir at 11:19 +0330 on Friday November 27th 2020

جداسازی *Hind*III SatDNA در تاسماهی ایرانی *Acipenser persicus*

Isolation of *Hind*III SatDNA in Persian sturgeon *Acipenser persicus*

محمدرضا نوروزفشخامی*[۱]، لیلا عزیززاده‌پرمهر[۱]، فروزنده محجوبی[۲]، محمد پورکاظمی[۱]، بهرام کاظمی[۳]، محمد حسن‌زاده‌صابر[۱]، مهتاب یارمحمدی[۱]

۱- به ترتیب مربی، کارشناس‌ارشد، استادیار، کارشناس‌ارشد و استادیار موسسه تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دریای‌خزر، رشت
۲- استادیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و فن‌آوری زیستی
۳- استاد دانشگاه شهید بهشتی، مرکزتحقیقات بیولوژی سلولی و ملکولی، تهران

Nowruzfashkhami MR*[1], Azizzadeh pormehr L[1], Mahjoubi F[2], Pourkazemi M[1], Kazemi B[3], Hassanzadeh Saber M[1], Yarmohhamadi M[1]

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 (SatDNA *Hind*III) در تاسماهی ایرانی *Acipenser persicus* بود. DNA ژنومی از باله دمی تاسماهی ایرانی به منظور تهیه *Hind*III SatDNA، به روش فنل- کلروفرم استخراج شد. *Hind*III 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 SatDNA *Hind*III 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 *Hind*III SatDNA تعیین توالی شدند. تعیین توالی *Hind*III SatDNA جدا شده از ژنوم تاسماهی ایرانی حاکی از وجود ۱۶۳ جفت باز (bp ۱۶۳) در آن بود که در بانک ثبت ژن NCBI با شماره FJ429174 به ثبت رسید. مقایسه *Hind*III SatDNA استخراج شده از تاسماهی ایرانی در تحقیق حاضر با توالی *Hind*III SatDNA جدا شده از تاسماهی روسی *Acipenser gueldenstaedtii*، ماهی استرلیاد *A. ruthenus*، تاسماهی آدریاتیک *A. naccarii*، تاسماهی پوزه کوتاه *A. brevirostrum*، تاسماهی سیبری *A. baeri*، تاسماهی دریاچه‌ای*A. fulvescens*، ماهی ازون برون *A. stellatus* و تاسماهی چینی *A. sinensis*، ۸۸ درصد و مقایسه آن با توالی *Hind*III SatDNA جدا شده از تاسماهی سفید *A. transmontanus* نیز نمایانگر ۹۰ درصد شباهت بود. وجود *Hind*III SatDNA در تاسماهی ایرانی و شباهت بسیار زیاد آن با *Hind*III SatDNA سایر تاسماهیان نشان داد که تاسماهی ایرانی به جنس Acipenser تعلق دارد.

واژه‌های کلیدی

تاسماهی ایرانی
دریای خزر
Acipenser persicus
*Hind*III SatDNA

Downloaded from mg.genetics.ir at 11:19 +0330 on Friday November 27th 2020

DNA ماهواره‌ای (SatDNA) توالی‌های غیر کدکننده و تکراری هستند که عمدتاً در مناطق هتروکروماتین ساختاری موجود در سانترومرها و تلومرها مشاهده می شوند (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. 1999; Martins et al. 2006) 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; Mônaco 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 *Hind*III 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 *Hind*III SatDNA در اکثر گونه های 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.

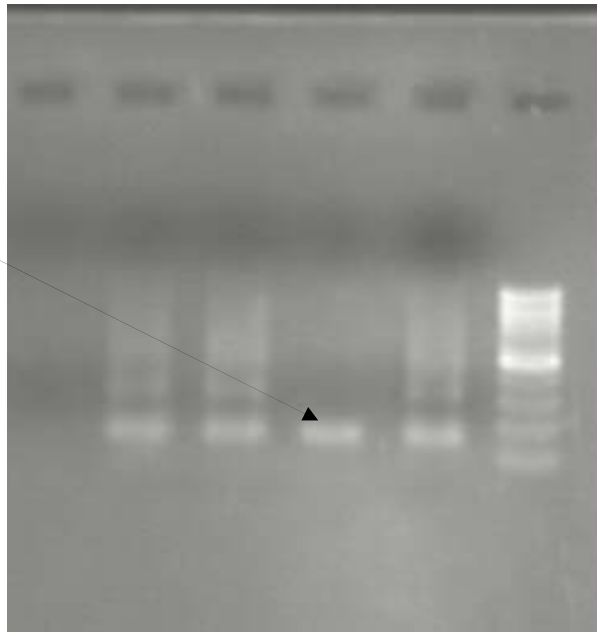
به منظور دستیابی به DNA مطلوب و مارکر مورد نظر، ابتدا DNA ژنومی از باله دمی ۲۷ عدد تاسماهی ایرانی پرورشی سه ساله به روش فنل- کلروفرم (Pourkazemi 1996) استخراج و کمیت آنها با استفاده از دستگاه نانودراپ و کیفیت آنها با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز طی سه مرحله (هر مرحله ۹ نمونه) بررسی شد. به دلیل وجود شباهت‌های ژنتیکی و قرابت خویشاوندی بسیار زیاد بین تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی (Mugue et al. 2008) آغازگرهای مورد نیاز با توجه به توالی *Hind*III 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 5′-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 *Hind*III SatDNA با استفاده از آغازگرهای تهیه شده تکثیر شد. حجم مخلوط واکنش PCR شامل ۰/۵ میکرولیتر آنزیم TaqDNA polymerase (5 U/µl)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (۱۰ mM)، یک میکرولیتر (۲۰ 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 µl ۵۰ بود. برای انجام واکنش PCR از دستگاه Eppendorf (مدل AG22331) استفاده شد. واکنش PCR شامل یک مرحله واسرشته‌سازی (دناتوره کردن) اولیه DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، متعاقب آن ۳۵ چرخه واسرشته‌سازی DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت۳۰ ثانیه، مرحله اتصال آغازگرها در دمای۵۰ 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 *Hind*III 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 (*Hind*III SatDNA) انجام کلونینگ آن ضروری بود. بدین منظور ابتدا قطعه SatDNA

Downloaded from mg.genetics.ir at 11:19 +0330 on Friday November 27th 2020

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 میلی‌لیتری 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 × ۱۳۰۰ سانتریفوژ شد. پس از جدا کردن مایع زیرین، بافرQG 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 × ۱۳۰۰ سانتریفوژ شد. سپس مایع زیرین را جدا کرده و ستون دوباره روی همان تیوب قرار داده شد. برای جمع‌آوری DNA ، ۵۰ میکرولیتر بافر EB یا آب دی یونیزه به مرکز ستون Qiaquick اضافه شد و ستون به مدت یک دقیقه در g × ۱۳۰۰ سانتریفوژ شد. پس از خالص سازی DNA، غلظت آن با دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری 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 میلی‌لیتری ریخته و به مدت ۱۲ ساعت در انکوباتور ۲۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس به منظور ازدیاد پلاسمید نوترکیب 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) و 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 آمپی‌سیلین به مدت ۲۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در مرحله بعد محیط کشت حاوی باکتری به مدت یک دقیقه در g × ۱۳۰۰۰ 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 نوترکیب 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، X-gal و IPTG 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 آمپی‌سیلین انجام شد و سرانجام در مرحله پایانی DNA پلاسمید توسط شرکت BIONEER کره‌جنوبی توالی‌یابی شد. DNAهای استخراج شده از ۹ عدد تاسماهی ایرانی دارای کیفیت مناسب بودند. همچنین بررسی پلیت‌ها و ژل‌های حاصل از PCR کلونی-ها حاکی از انجام کلونینگ مثبت در بیشتر کلونی‌ها بود (شکل ۱). نتایج حاصل از تعیین توالی *Hind*III 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 *Hind*III SatDNA جدا شده از تاسماهی روسی *Acipenser gueldenstaedtii* (۱۶۹ bp، ۱۷۰ bp، ۱۷۱ bp)، تاسماهی استرلیاد *Acipenser ruthenus* (۱۷۱ bp)، تاسماهی سیبری *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 et) تعداد بازهای موجود در *Hind*III SatDNA جدا شده از ماهی ازون برون *Acipenser stellatus* (۱۶۹ bp)، تاسماهی چینی *Acipenser sinensis* (۱۶۴ bp، ۱۷۰ bp)، تاسماهی دریاچه‌ای *Acipenser fulvescens* (۱۷۱ bp) و تاسماهی پوزه کوتاه *Acipenser brevirostrum* (۱۷۰ bp، ۱۷۱ bp) را نیز قبلا گزارش کردند. حداقل و حداکثر تعداد بازهای

Downloaded from mg.genetics.ir at 11:19 +0330 on Friday November 27th 2020

شکل۱- باکتری‌های تکثیر شده بر روی محیط کشت (کلنی‌های آبی نمایانگر باکتری‌های فاقد قطعه bp ۱۶۳و کلنی‌های سفید نمایانگر باکتری‌های حاوی قطعه bp ۱۶۳ می‌باشد)



شکل۲- *Hind*III SatDNA (۱۶۳ bp) استخراج شده از تاسماهی ایرانی بر روی ژل آگارز دو درصد پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید.

*Hind*III SatDNA جدا شده از ماهیان مذکور به ترتیب bp ۱۶۴ و bp ۱۷۱ بود. تعداد بازهای *Hind*III SatDNA تاسماهیان ۱۲۰ کروموزومی (تاسماهی استرلیاد، تاسماهی آدریاتیک، ماهی ازون برون)، ۲۴۰ کروموزومی (تاسماهی روسی، تاسماهی سیبری، تاسماهی چینی، تاسماهی سفید، تاسماهی دریاچه‌ای) و۳۶۰ کروموزومی (تاسماهی پوزه کوتاه) علیرغم متفاوت بودن تعداد کروموزوم‌ها، سطح پلوییدی 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

Downloaded from mg.genetics.ir at 11:19 +0330 on Friday November 27th 2020

Robles میـــزان وقـــوع تغییـــرات در تـــوالی *Hind*III SatDNA تاسماهیان بر خلاف SatDNA سایر مهره داران بسیار کم و میزان جهش در آن بین ۰/۰۷ تا ۰/۱۱ درصد در هـر یـک میلیـون سـال می‌باشد. این وضعیت در مورد تعدادی دیگر از ژن‌های هسته‌ای و میتوکندریایی ماهیان خاویاری نیز گزارش شـده اسـت (Krieger Birstein and DeSalle 1998; and Fuerst 2002). به نظر می‌رسد میزان وقـوع جهـش در ژنـوم ماهیـان کمتـر از سـایر مهـره‌داران است. Martin (1999) علت آن را پایین بـودن میـزان متابولیسـم این موجودات می‌داند. همچنین از بین ماهیان مختلـف، کمتـرین جهش در ماهیان خاویاری مشاهده می‌شـود کـه دلایـل آن هنـوز بطور کامل مشـخص نیسـت ولـی Krieger and Fuerst (2002) عوامل فیزیولوژیک (طول عمر زیاد، بزرگی جثه، خونسرد بودن و پایین بـودن میـزان متابولیسـم) و Ludwig et al. (2001) عوامـل ژنتیکی از جمله وقوع پلی پلوییدی را عامل آن مـی‌داننـد. متغیـر بودن تعداد بازهـای موجـود در *Hind*III SatDNA جـدا شـده از یک گونه ممکن است به علت اسـتفاده از کلـون‌هـای مختلـف و وقـوع حـذف شـدگی[1]، الحـاق[2] و جانشـینی[3] در بازهـا باشـد. Martins et al. (2006) وقـوع چنـین پدیـده‌هـایی را در مـورد *Hind*III SatDNA جـدا شـده (۳۵۰bp) از DNA ژنـومی مـاهی *Hoplias malabaricus* گزارش کردند.

با توجه به اینکه *Hind*III SatDNA در اکثر گونه‌های 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 سیبری، 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 گونه‌ای از جنس Acipenser در نظر گرفت. این محققین به واسطه وجود تنها ۲/۳ درصد اختلاف در توالی *Hind*III SatDNA استخراج شده از تاسماهی آدریاتیک و تاسماهی سیبری، وجود رابطه فیلوژنی نزدیک بین این دو گونه را گزارش کردند. آنها همچنین اعلام کردند *Hind*III SatDNA می‌تواند ابزار مولکولی مناسبی برای تشخیص گونه های مختلف تاسماهیانی که در نقاط مختلف صید می‌شوند باشد. وجود *Hind*III SatDNA و الگوی تکاملی آن در تاسماهی آدریاتیک، تاسماهی سیبری، 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 *Hind*III در فیلماهی باید آن را گونه‌ای 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 توالی‌های *Hind*III SatDNA تاسماهی روسی و تاسماهی آدریاتیک تقریبا یکسان هستند و شباهت بسیار زیادی را با تاسماهی سیبری نشان می‌دهند 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 *Hind*III SatDNA استخراج شده از تاسماهی ایرانی در تحقیق حاضر با توالی *Hind*III SatDNA جدا شده از تاسماهی روسی، تاسماهی سیبری، ماهی استرلیاد و تاسماهی آدریاتیک توسط De La Herran et al. (2001)، ماهی ازون برون، تاسماهی پوزه کوتاه، تاسماهی دریاچه‌ای و تاسماهی چینی توسط Robles et al. (2004) با استفاده از Blast کردن توالی بدست آمده با توالی‌های مربوط به *Hind*III SatDNA ماهیان نامبرده شده حاکی از وجود ۸۸ درصد تشابه و مقایسه آن با توالی SatDNA *Hind*III جدا شده از تاسماهی سفید توسط De La Herran et al. (2001) نیز نمایانگر وجود ۹۰ درصد شباهت بود. اثبات وجود *Hind*III SatDNA در تاسماهی ایرانی در نتیجه انجام این تحقیق و شباهت بسیار زیاد توالی آن با *Hind*III SatDNA تعداد زیادی از تاسماهیان جنس Acipenser تایید می‌کند 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 می‌شود.

[1] Deletion
[2] Insertion
[3] Substitution

Downloaded from mg.genetics.ir at 11:19 +0330 on Friday November 27th 2020

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 Bioliology 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 *Mbo*I 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 Bioliogy 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.