

UPORABA MIKROSATELITOV ZA ODKRIVANJE TETRASOMNIH REGIJ V GENOMU LIPANA (*Thymallus thymallus*)*

Simona SUŠNIK^{a)}, Aleš SNOJ^{b)}, Jurij POHAR^{c)} in Peter DOVČ^{c)}

^{a)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, mag.

^{b)} Prav tam, asist., dr., mag., e-pošta: ales.snoj@bfro.uni-lj.si.

^{c)} Prav tam, izr.prof., dr., mag.

Delo je prispelo 02. oktobra 2000, sprejeto 16. oktobra 2000.

Received October 02, 2000, accepted October 16, 2000.

IZVLEČEK

Proučevali smo način dedovanja 18 mikrosatelitnih lokusov v genomu lipana. Pri treh mikrosatelitnih lokusih smo v postopku tipizacije poleg dveh pričakovanih fragmentov pričakovane velikosti našli še dodatne fragmente. Na osnovi dedovanja teh treh mikrosatelitnih lokusov, ki smo ga proučevali na potomcih iz štirih križanj, smo ovrgli možnost, da bi bili ti dodatni produkti posledica nespecifičnega pomnoževanja v PCR. Nekatere regije genoma lipana torej kažejo delno tetrasomnost genoma oziroma podvojitve nekaterih kromosomskih regij.

Ključne besede: ribe / lipan / molekularna genetika / genom / mikrosateliti / tetraploidnost

APPLICATION OF MICROSATELLITES FOR DETECTION OF TETRASOMIC REGIONS IN GRAYLING (*Thymallus thymallus*) GENOME[†]

ABSTRACT

The mode of inheritance of 18 microsatellite loci in grayling genome was studied. At fifteen microsatellite loci two alleles were found and additional amplification products at three loci. The possibility that additional products would be the consequence of non-specific amplification, was rejected. There is an indication that some regions of grayling genome reflect partial tetrasomic state of the genome or duplication of some chromosomal regions.

Keywords: fish / grayling / molecular genetics / genome / microsatellites / tetraploidy

UVOD

Lipani spadajo v poddružino Thymallinae, ki skupaj s poddružinama Coregoninae in Salmoninae sestavlja družino Salmonidae (Allendorf in Thorgaard, 1984). Naseljujejo vode zmernega severnega pasu Evrope, Azije in Severne Amerike. V Evropi živi ena sama vrsta *Thymallus thymallus*, ki jo nekateri zaradi značilnega zemljepisnega območja, kjer živi, imenujejo tudi evropski lipan. Severne predele Evrope, Amerike in Azije naseljuje *T. arcticus*, preostali dve vrsti *T. nigrescens* in *T. brevirostris* pa živita le v Aziji (Povž in Sket, 1990).

V razvoju vretenčarjev je večkrat prišlo do podvojitve genoma (Ohno, 1993). Po podvojitvi genoma so se posamezni podvojeni lokusi razvijali samostojno, zato je nastal funkcionalno diploidni genom. Pri nekaterih linijah vretenčarjev, tudi pri predniku današnjih salmonidov, je

* Prispevek je del doktorske disertacije, mentor izr.prof. dr. Peter Dovč.

[†] This paper is a part of dissertation thesis, supervisor assoc.prof. Peter Dovč Ph.D.

neodvisno od drugih linij prišlo do ponovne podvojitve in s tem do nastanka tetraploidnega genoma. Po hipotezi, ki sta jo postavila Allendorf in Thorgaard (1984), je za celotno družino Salmonidae značilen skupen tetraploiden izvor genoma. Do tetraploidizacije, verjetno avtoploidizacije, naj bi prišlo pred 25–100 milijoni let. Da imajo vsi salmonidi skupnega tetraploidnega prednika, potrjuje več lastnosti, ki so skupne predstavnikom te družine: približno dvakrat večja celična vsebnost DNK kot pri drugih ribah, povečano število kromosomskih ročic, multivalenti v mejozah, veliko podvojenih encimskih lokusov (Allendorf in Thorgaard, 1984); to hipotezo pa podpira tudi analiza vezave genov, s katero so Johnson in sod. (1987) pokazali, da se podvojeni encimski lokusi ne dedujejo vezano.

Za salmonide je značilno zelo različno število kromosomov pri različnih vrstah, kar kaže na hiter potek razvoja genoma po tetraploidizaciji v smeri ponovne vzpostavitve diploidnega stanja (Hartley in Horne, 1984). Večina vrst rib ima število kromosomov v območju $2n = 44 - 52$ (Gold in sod., 1980), zato predvidevajo, da je diploidni prednik salmonidov pred tetraploidizacijo verjetno imel 48 akrocentričnih kromosomov. Pri tetraploidnih organizmih je v mejozi lahko prihajalo tudi do nepravilnega parjenja kromosomov, zato so nastali neplodni osebki. V prednosti so bili torej organizmi, pri katerih se je število kromosomov zmanjševalo, predvsem z zlitjem centromer ali pa z izgubljanjem kromosomov. Kaže pa, da proces diploidizacije pri salmonidih še ni končan, saj pri nekaterih drugih vrstah v mejozi še vedno pojavljajo tetravalenti, prisotno pa je tudi tetrasomno dedovanje nekaterih kromosomov (Allendorf in Thorgaard, 1984).

Preglednica 1. Število kromosomov pri nekaterih vrstah salmonidov (Allendorf in Thorgaard, 1984)

Table 1. Number of chromosomes of some salmonid fish species (Allendorf in Thorgaard, 1984)

Vrsta Species	Število kromosomov Number of chromosomes
<i>Coregonus albula</i>	80
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	54
<i>Oncorhynchus kusutch</i>	60
<i>Salmo salar</i>	54-60
<i>Salmo trutta</i>	77-82
<i>Salvelinus alpinus</i>	78, 80
<i>Salvelinus fontinalis</i>	84
<i>Thymallus thymallus</i>	102

Lipani je glede števila kromosomov med salmonidi izjema. Ima namreč 102 kromosoma, ki se v mejozi pravilno razvrščajo v bivalente (Nygren in sod., 1971; preglednica 1). Kaže torej, da pri lipanu ni prišlo do zmanjševanja števila kromosomov po tetraploidizaciji; prišlo naj bi le do več pericentričnih inverzij in neregularnih translokacij (Allendorf in Thorgaard, 1984; Nei, 1987). To zmanjšuje verjetnost, da se je lipan razvil iz monofiletskega tetraploidnega prednika, ki bi bil skupen tako lipanu kot ostalim salmonidom. V nasprotju s hipotezo Allendorfa in Thorgaarda (1984) je do tetraploidnosti pri lipanu po teoriji Schmidtkeja in sod. (1979) prišlo pred 60 milijoni let neodvisno od ostalih salmonidov, medtem ko naj bi pri drugih salmonidih do tetraploidnega stanja prišlo pred tremi milijoni let. Lipan naj bi tako že končal proces diploidizacije genoma. Schmidtke in sod. (1979) so ob proučevanju termokinetičnih lastnosti DNK lipana ugotovili, da so se po avtotetraploidizaciji verjetno hitro spremenila nukleotidna zaporedja in preuredili kromosomi, kar še dodatno potrjuje hipotezo o diploidnosti lipanovega genoma. Na diploiden genom lipana kaže tudi vsebnost DNK, ki je pri lipanu kljub zelo

velikemu številu kromosomov v primerjavi z vsebnostjo DNK pri ostalih salmonidih relativno nizka. Povprečna vsebnost DNK pri lipanu je 4,45 pg (Lockwood in Derr, 1992) oz. 3,8 pg (Larhammar in Risinger, 1994), pri ostalih salmonidih pa je povprečna vrednost 5,43 pg (Lockwood in Derr, 1992). Lipan se od ostalih salmonidov razlikuje tudi po stanju izoencimskih lokusov. Ring in sod. (1994) so pri lipanu našli npr. en sam izražen lokus LDH-A, ki je pri večini salmonidov podvojen. Jasnega odgovora, ki bi pojasnjeval razvoj genoma lipana in njegovo današnje stanje, ni.

Pri analizi populacij lipana smo predhodno ugotovili, da je pojavljanje alelov pri nekaterih mikrosatelitnih lokusih drugačno, kot če bi se le-ti pojavljali le v dveh kopijah. Z načrtnim križanjem smo skušali pojasniti način dedovanja na teh lokusih in s temi rezultati preveriti ali so deli genoma lipana še vedno v tetrasomnem stanju.

MATERIAL IN METODE

Material

V raziskavo smo vključili DNK šestih lipanov (tri samice in tri samce), ki smo jih v času drsti z elektroribolovom ujeli v jezeru Černava pri Preddvoru. Vse živali smo osmukali in jim iz lateralne vene vzeli po približno 0,5 ml krvi.

Z *in vitro* oploditvijo smo oblikovali štiri družine pravih bratov in sester. Potomce smo v bazenih vzdrževali do izgube rumenjake vrečke in nato iz cele živali izolirali genomsko DNK.

Metode

Genomsko DNK smo izolirali po protokolu, ki ga opisujejo Medrano in sod. (1990). Delno genomsko knjižnico lipana smo izdelali po že opisanem protokolu (Sušnik in sod., 1999a). Knjižnico smo presejali z oligonukleotidnimi sondami (CA)_n in (GA)_n in izolirali klone z dinukleotidnimi mikrosatelitnimi ponovitvami. Inserterom DNA v pozitivnih klonih smo določili nukleotidno zaporedje. Izbranim mikrosatelitnim ponovitvam smo na osnovi njihovih robnih nukleotidnih zaporedij določili specifične začetne oligonukleotide za pomnoževanje v PCR. Tako smo pridobili 18 mikrosatelitnih markerjev, ki smo jih uporabili za analizo populacij lipana. Trije markerji, ki jih obravnavamo v tem prispevku, so opisani v preglednici 2.

Preglednica 2. Mikrosatelitni motivi lokusov BFRO021, BFRO022 in BFRO023 ter začetni oligonukleotidi za njihovo pomnoževanje v PCR

Table 2. Core sequences of microsatellite loci BFRO021, BFRO022 and BFRO023 with primers for their PCR amplification

Lokus Locus	Mikrosatelitni motiv Microsatellite core sequence	Začetni oligonukleotidi Primers
BFRO021	(CA) ₁₃ ...(CA) ₄ ...(CA) ₃ ...(CA) ₅	F: 5'-ATGTCACATTGAGGGGGACC-3' R: 5'-GGAGTGAAGCAGCGGAGTCT-3'
BFRO022	(GT) ₅ TT(GT) ₃ C(GT) ₁₄	F: 5'-ATGCTGCCCTCTCCCTCT-3' R: 5'-AGCCCTTGGTCTGAGTGC-3'
BFRO023	(CA) ₃ AA(CA) ₁₁	F: 5'-TCCTCTTCCTCGTCTCCTTC-3' R: 5'-ATGTAGGGGAGAATGATGGTG-3'

Deset mikrolitrov PCR je vključevalo 50 ng genomske DNK, 0,5 μM obeh začetnih oligonukleotidov, 0,2 mM dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl in 0,5 enot Taq polimeraze (PE Applied Biosystems). PCR se je začela s tri-minutno začetno denaturacijo pri

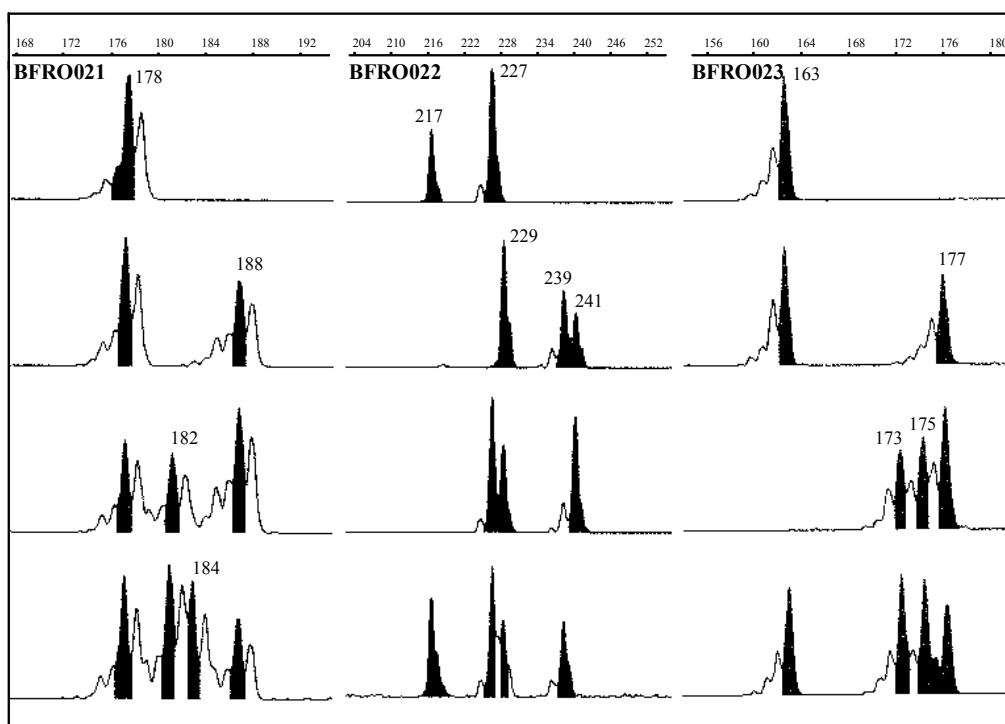
Zb. Biotehniške fak. Univ. v Ljubljani. Kmetijstvo. Zootehnika, 76(2000)2

94° C, čemur je sledilo 30 ciklov z naslednjim časovno temperaturnim profilom: 45 s na 94° C, 15 s na 55° C in 5 s na 72° C. Produkta PCR smo tipizirali na kapilarni elektroforezi ABI Prism 310.

Način dedovanja treh mikrosatelitnih lokusov (BFRO021, BFRO022 in BFRO023) smo preverili na štirih družinah (A, B, C, D). Genotipizirali smo 15 potomcev iz vsake družine; pri družini B pa smo analizo razširili na 40 potomcev.

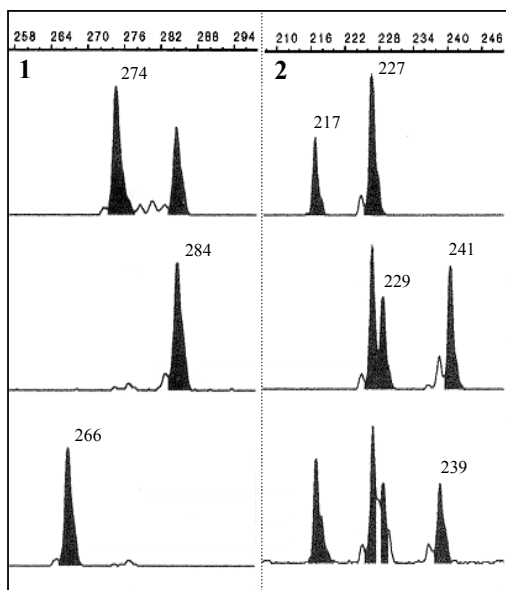
REZULTATI

Med 18 testiranimi mikrosatelitnimi lokusi smo našli tri lokuse (BFRO021, BFRO022, BFRO023), pri katerih so se v PCR pojavili dodatni produkti (slika 1), ki jih ni mogoče pojasniti z enostavnim Mendelističnim dedovanjem, značilnim za diploidni genom. V proučevanem materialu smo našli osebkke z enim, dvema, tremi ali celo štirimi produkti pomnoževanja z enim parom začetnih oligonukleotidov. Vse tri mikrosatelitne lokuse smo testirali tudi na postrvi (*Salmo trutta*). Na ta način smo skušali ugotoviti ali imajo lokusi, pomnoženi z istimi začetnimi oligonukleotidi, tudi pri postrvi enem znotraj posameznih osebkov več kot dva alela. Genomsko DNK postrvi smo uspeli pomnožiti le z oligonukleotidnim parom za lokus BFRO022. Pri postrvi na tem lokusu nismo našli dodatnih produktov; pri vseh tipiziranih živalih smo opazili le en ali dva alela. To je razvidno tudi iz slike 2, kjer je stanje na lokusu BFRO022 pri lipanu veliko bolj zapleteno kot pri postrvi, pri kateri produkti pomnoževanja kažejo enostavno diploidno stanje.

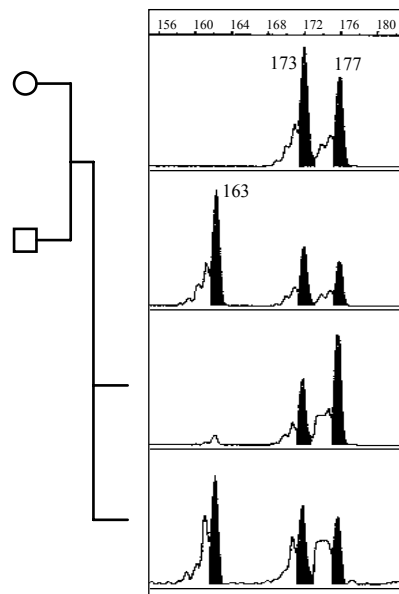


Slika 1. Rezultati genotipiziranja na lokusih BFRO021, BFRO022, BFRO023.
Figure 1. Genotyping results on loci BFRO021, BFRO022, BFRO023.

Slika 3 prikazuje primer dedovanja produktov pomnoževanja na mikrosatelitnem lokusu BFRO023, kjer sta poleg staršev prikazana še dva potomca. Vzorec dedovanja lahko pojasnimo z enostavnimi Mendelističnimi pravili. Enako načelo dedovanja smo zasledili tudi na lokusih BFRO021 in BFRO022.



Slika 2. Polimorfizem na lokusu BFRO022 (1) pri postrvi in (2) pri lipanu.
Figure 2. Polymorphism at locus BFRO022 in (1) brown trout and (2) grayling.



Slika 3. Dedovanja produktov pomnoževanja na lokusu BFRO023 pri družini A.
Figure 3. Inheritance pattern of PCR products at locus BFRO023 within family A.

Iz števila alelov na proučevanih lokusih, ki so prisotni pri enem osebk, in iz modusa dedovanja teh alelov v poskusnih družinah smo sklepali, da so pri vseh osebkih omenjeni lokusi prisotni v štirih kopijah. Iz razmerja površin pod posameznimi vrhovi na elektroforegramu smo sklepali na število kopij posameznega alela v genotipu. Na ta način smo določili agregatne genotipe staršev in potomcev in jih uporabili za določitev haplotipov gamet. V preglednici 3 prikazujemo možne haplotipe gamet na lokusu BFRO023, na katerem je bila polimorfnost staršev največja. Iz razporeditve alelov lahko zaključimo, da so v gametah samice kombinacije alelov, ki smo jih identificirali v poskusnem materialu, možne le v primeru, ko ti aleli ležijo na različnih kromosomih.

Preglednica 3. Genotipi staršev iz družine B, genotipi potomcev in vsi možni haplotipi gamet ob upoštevanju Mendelističnega dedovanja dveh kopij lokusa BFRO023

Table 3. Parental genotypes from family B, genotypes of progeny and all possible haplotypes of germ cells, assuming Medelian inheritance for two copies of locus BFRO023

Genotipi potomcev Progeny genotype	n	Genotip staršev / Parental genotype	
		ž / f 163/175/177/177	m / m 173/177/177/177
Možni haplotipi gamet Possible germ cell haplotypes			
163/177/177/177	5	163/177	177/177
173/177/177/177	3	177/177	173/177
177/177/177/177	19	177/177	177/177
163/175/177/177	11	163/175	177/177
163/173/175/177	2	163/175	173/177

RAZPRAVA

Proučili smo izražanje in dedovanje 18 polimorfnih mikrosatelitnih lokusov v genomu lipana in ugotovili, da se jih 15 pojavlja v dveh kopijah, pri treh pa smo v postopku tipizacije poleg enega ali dveh produktov našli še dodatne produkte. Vzrok za pojav teh dodatnih produktov bi bil lahko v nespecifičnem pomnoževanju v PCR, podvojitvi lokusov ali pa tetrasomnosti genoma lipana. Dedovanje po enostavnih Mendelističnih pravilih, ki je bilo značilno za vse tri lokuse, kaže na to, da dodatni produkti niso rezultat nespecifičnega pomnoževanja v PCR, ampak predstavljajo alele. Prek genotipov potomcev smo sklepali na možne haplotipe gamet njihovih staršev in ugotovili, da so nekatere kombinacije alelov v gametah možne le v primeru, če ti aleli ležijo na ločenih kromosomih (preglednica 3). Če predpostavimo, da se dva polimorfna lokusa dedujeta vezano, t.j., ko sta na istem kromosomu in med njima ni rekombinacije, sta na primeru teh dveh lokusov znotraj ene mejeze možna le dva različna haplotipa gamet. V primeru analize družine B pa smo ugotovili, da so pri samici možne tri različne kombinacije alelov v gametah, kar je sicer lahko posledica rekombinacije, bolj verjetno pa je, da gre za podvojen lokus, ki leži na različnih kromosomih. Na ta način smo pokazali, da lokus BFRO023 najbrž ni podvojen na istem kromosomu, ampak se zelo verjetno nahaja na različnih kromosomih, kar kaže na tetrasomno razporejenost njegovih alelov.

Lokus BFRO022 pri postrvi ni kazal tetrasomnega stanja. Zanimivo je, da se vsi mikrosatelitni markerji, specifični za postrv (Slettan in sod., 1995; Estoup in sod., 1998), pri tej vrsti nahajajo v dveh kopijah; pri nobenem od teh markerjev niso poleg pričakovanih produktov pomnoževanja našli dodatnih produktov. Podvojeni mikrosatelitni lokusi pa so poznani in tudi že kartirani pri vrsti *Oncorhynchus mykiss* (Sakamoto in sod., 2000). Pri tej vrsti je bilo preskušanih veliko mikrosatelitnih markerjev, med njimi tudi veliko heterolognih, zato neposredne primerjave glede podvojenosti posameznih lokusov pri tej vrsti in pri lipanu oz. postrvi na drugi strani niso mogoče. V nasprotju s trditvami nekaterih avtorjev (Schmidtke in sod., 1979) naši rezultati nakazujejo, da bi bil vzrok za prisotnost podvojenih mikrosatelitnih lokusov pri lipanu in odsotnost le-teh pri postrvi lahko v hitrejšem procesu diploidizacije pri postrvi in počasnejšem pri lipanu. Na to kaže tudi zelo veliko število kromosomov pri lipanu v primerjavi s postrvjo pa tudi višje ocenjeno število dinukleotidnih mikrosatelitnih ponovitev v genomu lipana kot pri postrvi (Sušnik in sod., 1999b). Pri krapu (*Cyprinus carpio*), predstavniku družine Cyprinidae, ki je prav tako tetraploidnega izvora, so Crooijmans in sod. (1997) med 41 mikrosatelitnimi markerji odkrili tudi šest takih, za katere so bili značilni dodatni produkti. Avtorji kot najverjetnejši vzrok za ta pojav navajajo razvoj genoma prek tetraploidizacije. Pri ciprinidih je položaj sicer malo drugačen kot pri salmonidih, saj je po procesu poliploidizacije v nasprotju s salmonidih selekcija dajala prednost zmanjševanju vsebnosti DNK; ta proces naj bi se kazal v delecijah nekodirajočih regij, kjer so tudi mikrosateliti. Tako je bilo v genomu, značilnem za vrste iz rodu *Barbus* (družina Cyprinidae), v primerjavi s salmonidi ugotovljeno manjše število mikrosatelitov (Chenuil in sod., 1997). Kljub različnemu poteku razvoja po procesu tetraploidizacije pri salmonidih in ciprinidih pa najdemo nekatere lastnosti, kot so npr. podvojeni mikrosatelitni lokusi, ki so značilne za obe družini, in kažejo, da proces diploidizacije v obeh družinah še ni v celoti končan.

Zaključimo lahko, da so dodatni aleli na nekaterih mikrosatelitnih lokusih verjetno odraz tetraploidnosti predniškega genoma. Ta je še vedno tako pri salmonidih kot pri ciprinidih v procesu diploidizacije. Pri družini Salmonidae diploidizacija poteka v različnih smereh. Pri nekaterih predstavnikih poddružine Salmoninae je tako še opazen nastanek tetračetnih v mejozi in večje število podvojenih izoencimskih lokusov, diploidizacija pa je napredovala v smeri zmanjševanja števila kromosomov in podvojenih nekodirajočih regij, kot so npr. mikrosateliti. Pri lipanu se število kromosomov ni zmanjševalo, ampak je, kot kaže, med njimi

prišlo do tako velikih sprememb, da v mejozi ne nastajajo več tetravalenti; očitno pa so se ohranili vsaj nekateri podvojeni odseki, na kar kažejo tudi naše raziskave mikrosatelitov.

Za natančnejši odgovor o izvoru in lastnostih nekaterih regij v genomu lipana, ki kažejo tetrasomnost, bi bilo potrebno uvesti metodo fluorescenčne *in situ* hibridizacije (FISH), pri kateri bi kot sonde uporabili fluorescenčno označeno nukleotidno zaporedje inserta genomske DNK z nukleotidnim zaporedjem, ki obdaja mikrosatelitno ponovitev. Po hibridizaciji s kromosomskimi preparati bi lahko iz števila in položaja fluorescenčnih signalov skleпали na izvor proučevanih regij genoma.

S pričujočo raziskavo smo pokazali, da proučevanje razvoja mikrosatelitnih lokusov predstavlja zanimivo podlago za razumevanje razvojne dinamike genoma.

SUMMARY

Grayling (*Thymallus thymallus*) belongs to Salmonidae family, which is characterised by its evolutionary transition from diploid to tetraploid state of genome, followed by reduction of genome towards diploidy. A process of diploidisation has already been completed for most salmonid fish species that is evident from the absence of tetravalents in meiosis and from the ratio of nuclear DNA amount to number of chromosomes. Earlier investigations of grayling genome supported this view indicating that diploidisation process has already been completed in grayling, too.

In our investigation, in which we analysed population genetic structure of grayling based on 18 microsatellite loci, we observed at some loci an unusual genotyping results: besides polymorphic amplification products in the expected size-range additional unexpected amplification products were detected. Using *in vitro* fertilisation, four full-sib families were established, providing a suitable model for analysing inheritance pattern of such microsatellite loci (BFRO021, BFRO022, BFRO023).

By genotyping these three loci, we found individuals, exhibiting one, two, three or even four amplification products, amplified by a single pair of oligonucleotides. Due to its highest level of polymorphism, locus BFRO023 was selected for inheritance study. We compared parental and progeny genotypes, and constructed, based on these data, all possible haplotypes of parental germ cells. Assuming Mendelian inheritance and absence of recombinations we concluded that some observed haplotypes would be possible only if alleles were located on different chromosomes. According to this observation we presume that additional amplification products might represent alleles, originating from four homologous chromosomes, rather than being a result of an intra-chromosomal duplication.

In spite of the fact that diploidisation of the genome in grayling has been considered as completed, our results indicate the presence of tetrasomic chromosomes, which may be considered as a relict of the tetraploid ancestral genome.

ZAHVALA

Zahvaljujemo se članom Ribiške družine iz Kranja za pomoč pri zbiranju vzorcev in Janezu Vidmarju za vzrejo ribjih družin. Zahvala za tehnično pomoč v laboratoriju gre gospe Vidi Štuhec.

VIRI

Allendorf F. W./ Thorgaard G. H. Tetraploidy and Evolution of Salmonid Fishes. V: Evolutionary Genetics of Fishes (ur.: Turner, B. J.). Plenum Press, 1984, 1-41.

- Chenuil, A./ Desmarais, E./ Pouyaud, L./ Berrebi, P. Does polyploidy lead to fewer and shorter microsatellites in *Barbus* (Teleostei: *Cyprinidae*). *Molecular Ecology*, 6(1997), 169-178.
- Crooijmans, R.P.M.A./ Bierbooms, V.A.F./ Komen, J./ Van der Poel, J.J./ Groenen, M.A.M. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Animal Genetics*, 28(1997), 129-134.
- Estoup, A./ Rousset, F./ Michalakis, Y./ Cornuet, J.M./ Adriamanga, M./ Guyomard, R. Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). *Molecular Ecology*, 7(1998), 339-353.
- Gold J. R./ Karel W.J./ Strand M.R. Chromosome formulae of North American fishes. *Prog. Fish Cult.* 42(1980), 10-23.
- Hartley, S.E./ Horne, M.T. Chromosome relationships in the genus *Salmo*. *Chromosoma*, 90(1984), 229-237.
- Johnson, K.R./ Wright, J.E./ May, B. Linkage relationships reflecting ancestral tetraploidy in salmonid fishes. *Genetics*, 116(1987), 579-591.
- Larhammar D./ Risinger C. Molecular genetic aspects of tetraploidy in the common carp *Cyprinus carpio*. *Molecular phylogenetics and evolution*, 3(1994), 59-68.
- Lockwood, S.F./ Derr, J.N. Intra- and interspecific genome-size variation in the Salmonidae. *Cytogenet Cell Genet*, 59(1992), 303-306.
- Medrano F.J./ Aasen E./ Sharrow L. DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques*, 8(1990), 43.
- Nei M. Population theory: stochastic models. V: *Molecular evolutionary genetics*. New York, Colombia University Press, 1987, 327-352.
- Nygren, A./ Nilsson, B./ Jahnke, M. Cytological studies in *Thymallus thymallus* and *Coregonus albula*. *Hereditas*, 67(1971), 269-274.
- Ohno S. Patterns in genome evolution. *Current Opinion in Genetics and Development*, 3(1993), 911-914.
- Povž M./ Sket B. Naše sladkovodne ribe. Ljubljana, Založba Mladinska knjiga, 1990, 375 s.
- Ring, O./ Jansson, H./ Ost, T./ Andersson, T. Inheritance of allozyme in the European grayling (*Thymallus thymallus* L.). *Hereditas*, 120(1994), 159-163.
- Schmidtke, J./ Schmitt, E./ Matzke, E./ Engel, W. Non-repetitive DNA sequence divergence in phylogenetically diploid and tetraploid teleostean species of the family *Cyprinidae* and the order *Isospondyli*. *Chromosoma*, 75(1979), 185-198.
- Slettan, A./ Olsaker, I./ Lie, O. Atlantic salmon, *Salmo salar*, microsatellites at the SSOSL25, SSOSL85, SSOSL 311, SSOSL 417 loci. *Animal Genetics*, 26(1995), 281-282.
- Sušnik S./ Snoj A./ Dovč P. Microsatellites in grayling (*Thymallus thymallus*): comparison of two geographically remote populations from the Danubian and Adriatic river basin in Slovenia. *Molecular Ecology*, 8(1999a), 1756-1758.
- Sušnik S./ Snoj A./ Dovč P. Ponovitve dinukleotidnih in trinukleotidnih motivov v genomu lipana (*Thymallus thymallus*, L.). *Acta Biologica Slovenica*, 42(1999b), 23-29.