

УДК 575.17:597.442

ПОЛИМОРФИЗМ КОНТРОЛЬНОГО РЕГИОНА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ВОСЬМИ ВИДОВ ОСЕТРОВЫХ И РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИДОВ

© 2008 г. Н. С. Мюге, А. Е. Барминцева, С. М. Расторгуев, В. Н. Мюге, В. А. Барминцев

*Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии,
Москва 107140; e-mail: tугue@mail.ru*

Поступила в редакцию 06.02.2008 г.

Нами исследована внутри- и межвидовая изменчивость последовательностей нуклеотидов контрольного региона (D-петли) митохондриальной ДНК, выделенной из образцов тканей более чем 1400 особей, принадлежащих к девяти видам осетровых (русский, персидский, сибирский, амурский осетры, шип, стерлядь, севрюга, белуга и калуга). На основании полученных данных проведен анализ внутривидовой изменчивости контрольного региона мтДНК данной группы и разработана тест-система, состоящая из 10 видоспецифичных праймеров, позволяющая проводить генетическую идентификацию как прижизненно взятых образцов ткани, так и икры и продуктов переработки восьми видов осетровых. Предлагаемый метод может быть использован в мультиплексной ПЦР. Впервые предложена методика, позволяющая с высокой степенью достоверности дифференцировать митотип сибирского осетра и митотип “сибиреподобного” типа (“baerii-like”) русского осетра. Показано, что, несмотря на генетическую подразделенность, русский и персидский осетры являются достаточно молодыми видами и несут в большой степени общие митохондриальные гаплотипы, что делает идентификацию этих видов только на анализе мтДНК невозможной. Для разработки методов видовой идентификации русского и персидского осетров требуется дальнейший анализ полиморфизма ядерных маркеров.

Осетровые рыбы являются древней и уникальной группой хрящевых ганоидов, имеющих важное экономическое значение. В настоящее время семейство Acipenseridae насчитывает 27 видов, включая два вида веслоносов и 25 видов осетров, населяющих северное полушарие. Спрос и высокая цена на черную икру и осетрину и связанные с этим перелов и браконьерство, а также разрушение естественных нерестилищ из-за строительства гидроинженерных сооружений и антропогенного загрязнения привели к катастрофическому снижению численности большинства видов, обитающих как в Евразии, так и в Северной Америке. С 1998 г. все виды осетров включены в приложение 1 или 2 СИТЕС (Конвенция о международной торговле видами дикой фауны и флоры, находящимися под угрозой исчезновения) и все, кроме двух, внесены в различные категории Международной Красной книги (IUCN) [1–3].

Официальное декларирование видового состава является необходимым для трансграничного перемещения любых видов, включенных в приложения СИТЕС, и продукции (в том числе и икру), полученной из животных, относящихся к этим видам. В связи с резким снижением численности природных популяций в последнее время одомашнивание и искусственное выращивание осетров становится все более распространенным в большинстве стран – производителей черной икры, включая и

Россию. Виды, используемые в аквакультуре, часто не являются природными для данной области, и это усложняет корректную видовую идентификацию. Примером широкой интродукции осетровых видов в аквакультуре вне природного ареала являются сибирский осетр (европейская часть России, Украина, Финляндия, Франция, США, Китай и др.), американский веслонос (страны Европы) и ряд других видов. Браконьерство и незаконное производство черной икры, фальсификация товарных этикеток и документации [4] также требуют разработки методов быстрой и надежной идентификации осетровой продукции.

Несмотря на огромную экологическую пластичность и морфологическую изменчивость, видовая идентификация взрослых форм осетров обычно не представляет сложности и может быть проведена по стандартным критериям, принятым в ихтиологии [5], исключение составляют зеленый (США) и сахалинский осетры, а также русский, адриатический и персидский осетры, дифференциация которых исторически считается трудноразрешимой. Определение осетров на ювенильных стадиях доступно только специалистам и представляет значительные сложности.

Традиционно, видовой состав черной икры определялся органолептически, с большой долей субъективизма. Показано, что вкус, цвет и размер икры значительно варьируют, диапазон раз-

мера икринок перекрывается для разных видов, т.е. эти признаки не являются достоверными критериями для видового определения. Исследование структуры яйцевых оболочек показало, что икринки разных видов отличаются также по форме и структуре микропильных полей, однако эти признаки варьируют, кроме этого, становятся слаборазличимы при промышленной обработке икры [6].

Попытки видовой идентификации осетровых биохимическими методами оказались в целом неуспешными. Разделение белков икры методом изоэлектрического фокусирования дает несколько различные, но в целом перекрывающиеся спектры для разных видов [7, 8]. Использование различий в спектрах альбуминов [9] также не нашло практического применения.

Молекулярные методы определения видового состава коммерческой продукции разрабатываются уже более 15 лет [10]. В настоящее время генетическая идентификация осетровых рыб и продуктов их переработки, включая икру, стала одним из важнейших доказательств, принимаемых СИТЕС для импорта и экспорта включенных в приложения СИТЕС видов и продуктов из них.

Методы ДНК-идентификации можно условно разделить на две группы – анализ ядерных генетических маркеров и анализ митохондриальной ДНК (мтДНК). Преимущество использования первых состоит в том, что они позволяют идентифицировать не только чистые виды, но и особи гибридного происхождения. К недостаткам метода относится повышенная чувствительность к целостности ядерной ДНК, что делает эти методы малопригодными для анализа промышленно обработанной икры.

Использование митохондриальной ДНК для анализа видового состава имеет ряд преимуществ, таких как значительно большая копияемость мтДНК по сравнению с ядерной (особенно в икре) и, благодаря кольцевой структуре, большая устойчивость к деградации и лучшая сохранность.

Первоначально метод определения осетровых был применен в работах Бирштейна и соавт. [11–13] и основывался на анализе видоспецифичных замен в последовательности участка гена *CytB*. Метод был запатентован в США и Европе в виде набора праймеров, позволяющих видоспецифическую амплификацию фрагмента гена *CytB*. Недостатками данного метода было большое количество ПЦР, которые необходимо было поставить и затем проанализировать для определения каждого образца. Также почти все праймеры отличались на одонуклеотидную замену, что делало возможным ложное срабатывание тест-системы и требовало обязательной постановки рефе-

ренсной реакции (положительного контроля) для каждого вида.

Дальнейшее развитие метод, основанный на полиморфизме гена *CytB*, получил в работах Людвига и соавт. [14]. Идентификация видов, предложенная этими авторами, состояла в последовательном рестрикционном анализе ПЦР-фрагмента участка гена *CytB* семью различными рестриктазами и визуализацией полученных фрагментов рестрикции на агарозном или акрил-амидном геле.

Оба предложенных метода на настоящее время не вошли в практику, и определение видовой принадлежности импортируемой икры и другие вопросы, связанные с СИТЕС, в западных лабораториях осуществляются главным образом методом прямого секвенирования участка гена *CytB* и сопоставлением полученных данных с референсными последовательностями видов, депонированными в GenBank [15].

Нашей задачей являлась разработка метода идентификации видов осетровых, обитающих в России, не связанного с секвенированием и рестрикционным анализом. Основным требованием методики должна быть достоверность определения, простота и дешевизна методов, воспроизводимость результатов в различных лабораториях, оснащенных лишь минимальным комплектом оборудования. Нами проанализирован полиморфизм контрольного региона (D-петли) восьми видов осетровых с целью выявления участков, уникальных для каждого из видов, и создание праймеров, позволяющих проводить ПЦР-идентификацию каждого вида.

Контрольный регион митохондриальной ДНК ранее не рассматривался как перспективный для целей видовой идентификации, так как известна его гипервариабельность по сравнению с митохондриальными белок- и РНК-кодирующими генами. Выявление видоспецифичных последовательностей возможно только путем охвата всего природного полиморфизма и анализа последовательностей большого числа особей и из различных участков ареала. В противном случае существует вероятность, что праймеры, разработанные по последовательностям рыб из одной популяции, дадут ошибочный результат при анализе особи из другой популяции. С другой стороны, контрольный регион имеет несомненное преимущество для целей генотипирования, так как в этой некодирующей области часто встречаются вставки, делеции и замещения по несколько нуклеотидов подряд. Подобные участки являются идеальными для разработки видоспецифичных праймеров, так как позволяют создавать тест-системы, менее чувствительные к условиям ПЦР и качеству оборудования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для анализа природной изменчивости контрольного региона митохондриальной ДНК нами использовались образцы ткани (главным образом кусочки плавника) и икры осетровых рыб, хранящиеся в Российской национальной коллекции эталонных генетических материалов (РНКЭГМ). В настоящее время в коллекции находится более 9 тыс. образцов тканей осетровых, собранных в различных регионах страны как сотрудниками Сектора молекулярной генетики гидробионтов ВНИРО, так и ихтиологами ряда других научных организаций по договору с ВНИРО. Каждый образец имеет данные о виде (определяется ихтиологами в момент сбора), месте и дате сбора, а также фамилию специалиста, осуществляющего сбор материала. Первичная фиксация проводилась в полевых условиях в 96%-ном этаноле с последующей перезаливкой в свежий этанол в лабораторных условиях. Все образцы, внесенные в коллекцию, сопровождалось подробным описанием видовой принадлежности, места вылова, принадлежности к определенной популяции, полу и возрасту, типу ткани и морфометрическими параметрами. Эти данные заносились в протокол сбора, подписанный специалистом, осуществлявшим сбор проб. Коллекционный материал хранится в этаноле при температуре -70°C .

Выделение ДНК проводили стандартным фенольным [16] или солевым [17] методом с лизированием протеиназой К или максатазой.

Полноразмерные последовательности контрольного региона (D-loop) митохондриальной ДНК были амплифицированы с использованием праймеров LproF (AACTCTCACCCSTAGCTCCAAAG) и DL651 (ATCTTAACATCTTCAGTG), расположенных на граничащих с контрольным регионом генах транспортных РНК *tPro* и *tPhe* соответственно. Амплификацию проводили в стандартных условиях, при температуре отжига 52°C . Длина продукта варьировала от 950 до 1280 пар оснований, в зависимости от количества присутствующих в гаплотипе 82-нуклеотидных повторов, а также от видовой принадлежности осетра.

Секвенирование проводили с тех же праймеров, что и ПЦР, на автоматическом секвенаторе ABI 3100 Genetic Analyzer (США) с использованием набора для секвенирования BigDye v.1.1. Часть исследованных особей имела полиморфизм по числу 82-нуклеотидных повторов на 3'-участке контрольного региона, граничащего с тРНК пролина. Чтобы избежать наложения сиквенсов с матрицы, имеющей разное число повторов, также применялся праймер ANR3 (CATACCATAATGTTTCATCTACC), комплементарный участку непосредственно перед повторяющимся фрагментом контрольного региона.

Таблица 1. Проанализированные последовательности контрольного региона, используемые в данной работе

Вид	Количество полученных последовательностей	Количество последовательностей из GenBank	Всего
<i>Acipenser gueldenstaedtii</i> , русский осетр (типичный митотип)	95	56	151
<i>A. gueldenstaedtii</i> , русский осетр ("baerii-like" митотип)	68	9	77
<i>A. baerii</i> , сибирский осетр	48	35	83
<i>A. nudiventris</i> , шип	14	2	16
<i>A. stellatus</i> , севрюга	18	38	56
<i>A. persicus</i> , персидский осетр	26	28	54
<i>A. schrenkii</i> , амурский осетр	17	1	18
<i>A. ruthenus</i> , стерлядь	10	1	11
<i>Huso huso</i> , белуга	45	25	70
<i>Huso dauricus</i> , калуга	18	2	20

Кроме данных, полученных путем секвенирования, нами использованы последовательности, депонированные в базе данных GenBank, NCBI. Общее количество полученных последовательностей, а также использованные для анализа последовательности из GenBank приведены в табл. 1.

Выравнивание и сборка контигов проводились путем анализа хроматограмм в программе SeqMan, множественное выравнивание – в программе MegAlign и разработка праймеров – в программе PrimerSelect (все программы входят в пакет DNASTar, Lasergene Inc).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изменчивость контрольного региона мтДНК осетровых

Нами получены 218 и проанализированы (с учетом депонированных в GenBank) 322 последовательности нуклеотидов D-петли. Как и у большинства позвоночных, в контрольном регионе осетровых наблюдаются два гипервариабельных региона (ГВР-1 и ГВР-2) и расположенный между ними относительно консервативный регион (КР). ГВР-2 состоит из 2.5–5.5 повторов длиной 81–82 пн, несущих TAA-мотив, предположительно участвующий в процессе инициации синтеза тяжелой митохондриальной цепи [18, 19]. Также наблюдались многочисленные случаи ге-

Таблица 2. Праймеры для видовой идентификации видов осетровых

Название	Последовательность	Используется с	Длина продукта, пн	Видоспецифичность
AHR	TATACACCATATCTCTATGT			Все виды
AGF	GCACAGACTATGTGGTATCCAGAA	AHR	420	Русский осетр
ABF	CAGATGCCAGTAACAGGCTGA	AHR	215	Русский (<i>baerii</i> -like) и сибирский осетры
ABRM	TGTCTGTCTAGAACATAiG	ABF	182	Сибирский осетр
HusF	TATCTATTACCTGCGAGCAGGCTG	AHR	374	Белуга
DauF	CCTCTTATGTACGCGGTGT	AHR	439	Калуга
NudF	TGTCTTTTCTGAAGGAGCTTTGC	AHR	329	Шип
RutF	GGGAATAACCGTTAATTTGG	AHR	190	Стерлядь
SteF	GGGGTTCTTGGCATGTTGTGAGCG	AHR	266	Севрюга
SchF	TGTGGGGTCACGGAcTTTACAG	AHR	254	Амурский осетр

тероплазмии – присутствие у одного экземпляра митохондриальной ДНК с различным (до 5 вариантов) числом повторов. Нами проведен анализ наследования митохондриальной ДНК у особей с несколькими митотипами, отличающимися по числу повторов, и показано, что число копий 82-пн повтора меняется в течение жизни и не может служить информативным генетическим маркером особи.

В ГВР-1 изменчивость по длине наблюдалась только у амурского осетра – нами показано наличие вставки в 12 нуклеотидов у части особей амурской популяции. У остальных исследованных видов изменчивость ГВР-1 представлена точечными мутациями и единичными вставками и делециями.

Выделение консервативного участка позволило разработать праймер, являющийся общим для всех видов осетровых (праймер AHR, табл. 2).

Проведенный филогенетический анализ по полученным последовательностям контрольного региона показал сходство с дендрограммами, построенными ранее на основании анализа гена цитохромоксидазы I [20]. Все проанализированные виды четко распределяются на две клады – атлантическую (понто-каспийского происхождения), включающую в себя комплекс русский–персидский–адриатический осетры, сибирский осетр, шип, стерлядь, белуга и севрюга. Также монофилетической является тихоокеанская группа видов – из изученных нами это амурский осетр и калуга. Таким образом, анализ контрольного региона мтДНК подтверждает ранее отмеченную полифилетичность рода *Huso* (калуга и белуга), основанную на конвергентном сходстве морфологических признаков этих самых крупных представителей осетровых. Подробный филогеографический анализ осетровых, основанный на анализе контрольного региона, будет представлен в отдельной работе.

Создание панели видоспецифичных праймеров

На основании полученных нами, а также депонированных в GenBank последовательностей для каждого вида была составлена строго консенсусная последовательность, выявляющая инварибельные нуклеотидные основания для каждого из видов. Множественное выравнивание строго консенсусных последовательностей позволило определить видоспецифичные участки исследуемого региона митохондриальной ДНК и спроектировать набор видоспецифических праймеров. Выбор праймеров определялся двумя параметрами – наличием участка, характерного для всех особей этого вида и отличающегося от всех других видов, а также отсутствием участков, приводящих к формированию праймер-димеров на себя и с праймером AHR. Также для удобства генотипирования все видоспецифичные праймеры располагались на разном удалении от якорного (общего) праймера AHR, с таким расчетом, чтобы продукты амплификации у разных видов были разной длины и могли быть идентифицированы на 2%-ном агарозном геле (рисунок). Набор диагностических праймеров представлен в табл. 2.

Распознавание гаплотипа сибирского осетра и “сибиреподобного” (“*baerii*-like”) гаплотипа русского осетра

Как было показано, около 30% особей русского осетра из бассейна Каспия имеют митохондриальную ДНК, сходную с мтДНК сибирского осетра [13, 21]. Последовательность гена *CytB* не позволяет различить эти два митохондриальных типа, и, таким образом, все имеющиеся на настоящее время методики молекулярной идентификации осетровых не позволяли достоверно различить *A. baerii* и *A. gueldenstaedtii*. Учитывая, что изменчивость контрольного региона в 4–5 раз выше, чем гена *CytB*, был проведен анализ полимор-

физма в 56 последовательностях сибирского и 45 “baerii-like” русского осетра и выявлена одна замена, характерная для “baerii-like”, но отсутствующая у сибирского осетра.

С учетом найденной точечной замены был создан праймер ABRM (табл. 2), который отжигается только на мтДНК сибирского осетра и в паре с праймером ABF дает ПЦР-продукт длиной 182 пн.

Верификация тест-системы

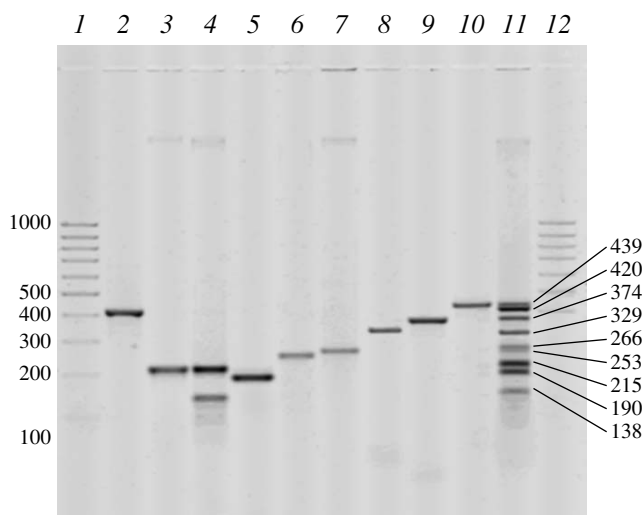
Набор праймеров был протестирован на нескольких наиболее распространенных в Москве наборах для ПЦР (Диалат, Силекс, Fermentas и др.) с использованием различного пластика и на различных типах амплификаторов, включая Терцик (МС-2, ДНК-Технология) и MJ Research PTC-225, USA. Для рутинного анализа нами применяется следующий состав ПЦР: 1× *Taq*-буфер (Силекс, Москва); 2.5 mM MgCl₂, 2.5 mM каждого dNTP (Диалат, Москва), 2.5–5 пМ праймеров (праймеры согласно табл. 2), 2.8 мкл крезол-глицерин (3.5 mM крезоловый красный, 50%-ный водный раствор глицерина), 2.5U *Taq*-полимеразы (Силекс) и 2 мкл экстракта ДНК и воды (milliQ) до 25 мкл.

ПЦР-реакцию проводили при следующих параметрах: предварительное плавление при 95 °С – 2 мин, 35 циклов: 92 °С – 20 с, 57 °С – 30 с, 72 °С – 30 с и окончательный досинтез 72 °С – 10 мин.

Длина получаемых в ходе реакции видоспецифичных ампликонов (продукты ПЦР) представлена в табл. 2, а пример визуализации продуктов ПЦР в 2%-ном агарозном геле – на рисунке.

Праймеры разработаны таким образом, что имеется возможность постановки мультиплексной ПЦР, т.е. с добавлением более двух праймеров в реакционную смесь. Однако подбор условий ПЦР-реакции и концентрации каждого из праймеров должен проводиться в каждой лаборатории самостоятельно и может зависеть от марки применяемого оборудования, реактивов и пластика. Нами рутинно используется набор для мультиплексной реакции на определение русского и сибирского осетров (AGF, ABF, ABRM, ANR) в пропорции 1 : 2 : 1.2 : 1 и тех же параметрах амплификации, что и для одиночных реакций

Продукт ПЦР наносится на 2%-ный агарозный гель (0.5× TBE) и разгоняется 30 мин при напряжении 15 В/см. Определение видового состава проводится по наличию амплификата в реакции с праймерами, специфичными для данного вида. В реакциях с другими праймерами ПЦР-продукт должен отсутствовать. Допускается нанесение в одну лунку продукта всех реакций данной особи. В этом случае видовая принадлежность определяется по длине ПЦР-продукта. Для удобства определения вида в процессе тестирования была составлена смесь из ПЦР-продуктов всех возмож-



Визуализация ПЦР-фрагментов для разных видов осетров в агарозном геле. 1 – маркер 100–1000 пн; 2 – русский осетр (AGF-ANR, 420 пн); 3 – русский осетр с “baerii-like” мтДНК (ABF-ANR, 215 пн); 4 – сибирский осетр (ABF-ANR, 215 пн и ABF-ABRM, 138 пн); 5 – стерлядь (RutF-ANR, 190 пн); 6 – амурский осетр (SchF-ANR, 253 пн); 7 – севрюга (SteF-ANR, 266 пн); 8 – шип (NudF-ANR, 329 пн); 9 – белуга (HusF-ANR, 374 пн); 10 – калуга (DauF-ANR, 439 пн); 11 – маркер масс ПЦР-продуктов осетровых; 12 – маркер 100–1000 пн.

ных длин, получаемых в процессе реакции (182, 190, 215, 253, 266, 329, 374, 420 и 429 пн). Смесь ПЦР-продуктов наносится на агарозный гель одновременно с тестируемыми образцами и является реперным маркером молекулярной массы, позволяющим визуально идентифицировать результаты тестирования (рисунок).

Количество протестированных особей и результаты теста представлены в табл. 3 и показано полное отсутствие ложных срабатываний для большинства видов, за исключением пары сибирский осетр–“сибиреподобный” митотип русского осетра (менее 1% ошибки). Строгое соответствие позиции видоспецифичной замены, диагностируемой для сибирского осетра праймером ABRM, подтверждено большим количеством проанализированных образцов этих видов, однако в трех случаях наблюдалось несоответствие между декларированным видовым определением и результатом ПЦР-теста. Контрольный регион мтДНК спорных особей был секвенирован, две особи оказались с типичным гаплотипом сибирского осетра и, возможно, являются гибридами (особи собраны в рыбхозе, в котором наряду с русским давно содержатся и сибирский осетр, и гибриды сибирского и русского осетров). В одном случае нами отмечена возвратная мутация. И хотя митотип принадлежит к кластеру близкородственных последовательностей “baerii-like”, он несет характерную для сибирского осетра замену.

Таблица 3. Результаты апробации тест-системы на коллекции образцов РНКЭГМ

Вид	Количество протестированных образцов	Результат идентификации	%
<i>Acipenser gueldenstaedtii</i> , русский осетр (типичный митотип)	480	480	100
<i>A. gueldenstaedtii</i> , русский осетр ("baerii-like" митотип)	152	149	98*
<i>A. baerii</i> , сибирский осетр	356	356	100
<i>A. nudiventris</i> , шип	20	20	100
<i>A. stellatus</i> , севрюга	68	68	100
<i>A. persicus</i> , персидский осетр	180	180	100**
<i>A. schrenkii</i> , амурский осетр	17	17	100
<i>A. ruthenus</i> , стерлядь	15	15	100
<i>Huso huso</i> , белуга	120	120	100
<i>Huso dauricus</i> , калуга	25	25	100

* В трех случаях идентифицировался как сибирский осетр (см. обсуждение в тексте).

** Персидский осетр идентифицируется как типичный митотип русского осетра (100%), в то время как у симпатричного с ним русского осетра каспийской популяции наблюдается до 30% "baerii-like" и 70% типичного митотипа.

Учитывая высокую изменчивость контрольного региона мтДНК, следует ожидать наличие обратных мутаций всегда, так что полиморфизм по данному сайту не может служить 100%-ным идентификационным признаком вида. Учитывая все ложнопозитивные срабатывания, отмеченные при апробации теста, вероятность ошибки определения русского (оба митотипа) и сибирского осетра составляет около 1% и является допустимой для целей сертификации видового состава.

Таким образом, предлагаемая нами система молекулярной идентификации восьми видов осетровых является надежным методом видовой идентификации как осетров, так и икры и других продуктов их переработки для всех видов, за исключением персидского осетра. Для идентификации персидского осетра необходима разработка тест-системы с учетом полиморфизма ядерных маркеров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Birstein V.J., Bemis W.E., Waldman J. The threatened status of acipenseriform species: a summary // *Sturgeon Biodiversity and Conservation* / Eds V.J. Birstein,

W.E. Bemis, J. Waldman. Dordrecht (Netherlands): Kluwer Acad. Publ., 1997. P. 427–435.

2. Raymakers C., Hoover C. Acipenseriformes: CITES implementation from Range States to consumer countries. // *J. Applied Ichthyol.* 2002. V. 18 (4–6). P. 629–638.
3. Raymakers C. CITES, the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora: its role in the conservation of Acipenseriformes // *J. Applied Ichthyol.* 2006. V. 22 (Suppl. 1). P. 53–65.
4. Vaisman A., Raymakers C. Legal status of sturgeon fishery in the Russian federation // *Traffic Bul.* 2001. V. 19. P. 33–44.
5. Vecsei P., Charette R., Hochleithner M. et al. Guide to the Identification of Sturgeon and Paddlefish Species Controlled under the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. 2001. CITES. 38 p.
6. Debus L., Winkler M., Billard R. Structure of micropyle surface on oocytes and caviar grains in sturgeons // *Internat. Rev. Hydrobiol.* 2002. V. 87(5–6). P. 585–603.
7. Chen I.-C., Chapman F.A., Wei C.I. et al. Preliminary studies on SDS-PAGE and isoelectric focusing identification of sturgeon sources of caviar // *J. Food Sci.* 1998. V. 61. P. 533–359.
8. Rehbein H. Fischartbestimmung von caviar durch protein- und DNA-analyse // *Informationen der Fischwirtschaft.* 1997. B. 44. S. 27–30.
9. Иваненков В.В., Камишлин И.Н. Возможность использования фракций альбумина осетровых для генетического маркирования популяций // *Вопр. ихтиологии.* 1991. V. 31. P. 232–237.
10. Bartlett S.E., Davidson W.S. FINS (Forensically informative nucleotide sequences): A procedure for identifying the animal origin of biological specimens // *Bio-Techniques.* 1992. V. 12. P. 408–411.
11. DeSalle R., Birstein V.J. PCR identification of black caviar // *Nature.* 1996. V. 381. P. 197–198.
12. Birstein V.J., Doukakis P., Sorkin B., DeSalle R. Population aggregation analysis of three caviar-producing species of sturgeons and implications for the species identification of black caviar // *Conservation Biol.* 1998. V. 12(4). P. 766–775.
13. Birstein V.J., Doukakis P., DeSalle R. Polyphyly of mtDNA lineages in the Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*: Forensic and evolutionary implications // *Conservation Genetics.* 2000. V. 1(1). P. 81–88.
14. Ludwig A., Debus L., Jenneckens I. A molecular approach to control the international trade in black caviar // *Internat. Rev. Hydrobiol.* 2002. V. 87(5–6). P. 661–674.
15. Wuertz S., Belay M., Kirschbaum F. On the risk of criminal manipulation in caviar trade by intended contamination of caviar with PCR products // *Aquaculture.* 2007. V. 269(1–4). P. 130–134.
16. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
17. Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based

- techniques // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25(20). P. 4692–4693.
18. Ludwig A., May B., Debus L., Jenneckens I. Heteroplasmy in the mtDNA control region of sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*) // Genetics. 2000. V. 156(4). P. 1933–1947.
19. Buroker N.E., Brown J.R., Gilbert T.A. et al. Length heteroplasmy of sturgeon mitochondrial DNA: an illegitimate elongation model // Genetics. 1990. V. 124(1). P. 157–163.
20. Birstein, V.J., Hanner R., DeSalle. R. Phylogeny of the Acipenseriformes: cytogenetic and molecular approaches // Sturgeon Biodiversity and Conservation / Eds. V.J. Birstein, W.E. Bemis, J. Waldman, Dordrecht, Netherlands: Kluwer Acad. Publ., 1997. P. 127–155.
21. Jenneckens I., Meyer J.-N., Debus L. et al. Evidence of mitochondrial DNA clones of Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*, within Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*, caught in the River Volga // Ecol. Letters. 2000. V. 3(6). P. 503–508.

Polymorphism of the Mitochondrial DNA Control Region in Eight Sturgeon Species and Development of a System for DNA-Based Species Identification

N. S. Mugue, A. E. Barmintseva, S. M. Rastorguev, V. N. Mugue, and V. A. Barmintsev

Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography (VNIRO), 107140 Russia

e-mail: mugue@mail.ru

Abstract—Intraspecific and interspecific nucleotide sequence variations of the mtDNA control region (D-loop) were studied with mtDNAs isolated from tissue specimens of more than 1400 sturgeons of nine species: Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii*, Persian sturgeon *A. persicus*, Siberian sturgeon *A. baerii*, Amur sturgeon *A. schrenkii*, Fringebarbel sturgeon *A. nudiventris*, sterlet *A. ruthenus*, stellate sturgeon *A. stellatus*, beluga *Huso huso*, and kaluga *H. dauricus*. The results were used to analyze the interspecific variation of the mtDNA control region in the given set of species and to develop a test system of ten species-specific primers, which allowed genetic identification intravital tissue specimens, spawn, and food products of eight species. The system proved suitable for multiplex PCR. A method was developed for the first time to reliably differentiate the *A. baerii* mitotype and the *baerii*-like mitotype of *A. gueldenstaedtii*. It was found that, although genetically separate, *A. gueldenstaedtii* and *A. persicus* are relatively young species and have common mitochondrial haplotypes, precluding their identification via mtDNA analysis alone. To develop a system for species identification of *A. gueldenstaedtii* and *A. persicus*, it is necessary to study the polymorphism of nuclear markers.