

DNA identification of sturgeon species available in Georgian markets

Tamar Beridze

Master's thesis is presented at the Ilia State University of Natural Sciences and Engineering

Faculty for Applied Genetics Master's Degree

According to the requirements

Master's Program of Applied Genetics

Supervisor Cort Anderson, Full Professor

Ilia State University

Tbilisi, 2018

Contents

Statement	3
List of abbreviations	4
Abstract	7
Review of the literature and scientific background.....	9
<i>Sturgeon Hybrids and Ploidy level</i>	12
<i>Distinguishing wild from cultivated sturgeon species</i>	14
The object and methods of research	14
<i>Sample collection and DNA extraction</i>	14
<i>PCR for cyt b amplification</i>	15
<i>PCR for S7 amplification</i>	15
Results.....	17
<i>MtDNA analysis</i>	17
<i>Nuclear S7 fragment analysis</i>	20
Discussion.....	21
Conclusion	26
Bibliography	27
Appendix	31

Statement

As the author of the presented Master's Thesis, I declare that the work is my original work and does not contain materials submitted to the publication, published or protected by other authors, which are not mentioned in the work or quoted in accordance with the relevant rules.

T. Beridze

List of abbreviations

IUCN- International Union for Conservation of Nature

CITES- Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora

Cytb- Cytochrome b, one of the gene of Mitochondrial DNA, often used for phylogenetic analyses of vertebrates

S7- Nuclear encoded *S7* ribosomal protein in sturgeon

NCBI- National Center for Biotechnology Information

bp- A base pair of two complementary nucleotides

SNP- Single nucleotide polymorphism in DNA

IUPAC- International Union of Pure and Applied Chemistry

აბსტრაქტი

არსებულ ინფორმაციაზე დაყრდნობით, შავ ზღვაში, საქართველოს სანაპირო წყლებში გავრცელებულია ზუთხების 6 სახეობა: *Acipenser sturio*, *A. nudiventris*, *A. stellatus*, *A. gueldenstaedtii*, *A. persicus*, *Huso huso*. შესაძლებელია არსებობდესმეშვიდე *A. colchicus* (Ninua et al., 2013), რომლის, როგორცალკე სახეობის სატატუსი ჯერჯერობით დადგენილი არ არის. მაღალი კვებითი ღირებულებისა და შავი ხიზილალის წარმოებისთვის ისინი წარმოადგენენ ეკონომიკურად მომგებიან სახეობებს. სწორედ მაღალი ეკონომიკური ღირებულების გამო ხდებოდა მათი გადამეტებული მოპოვება, ამას დაემატა მდინარეებზე კაშხლების მშენებლობა და გარემოს დაბინძურება, რამაც მეოცე საუკუნის ბოლოს გამოიწვია ზუთხისებრთა სახეობების სწრაფი კლება (Billard & Lecointre, 2000). დღეისათვის, IUCN წითელი ნუსხის მონაცემების თანახმად, ყველა ზემოთ აღნიშნული ზუთხის სახეობას მინიჭებული აქვს კრიტიკულად საფრთხეში მყოფი (CR) სახეობის კონსერვაციული სტატუსი. გამონაკლისს წარმოადგენს *A. colchicus*, რომელიც არ არის შეფასებული IUCN წითელი ნუსხის კრიტერიუმით, შესაბამისად მისი კონსერვაციული სტატუსი უცნობია. CITES დანართების მიხედვით *A. sturio* შესულია დანართ I, ყველა დანარჩენი სახეობა შესულია დანართ II (CITES, 2017). აზრთა სხვადასხვაობაა საქართველოში *A. sturio*-ს არსებობის შესახებ, მეცნიერების ნაწილი თვლის, რომ ის უკვე გადაშენებულია შავ ზღვაში (IUCN Red List, 2017), მეორე ნაწილის აზრით კი ის მცირე რაოდენობით, მაგრამ ჯერ კიდევ არის შემორჩენილი მდინარე რიონში (Kolman 2011; Ninua et al., 2013).

მათი, როგორც დაცული სახეობების სატატუსის მიუხედავად, სიტუაცია ჯერ კიდევ პრობლემურია, ხდება არალეგალური მოპოვება. კონსერვაციული ღონისძიებების გატარებისთვის საჭიროა მათ შესახებ ვფლობდეთ უფრო სრულყოფილ ინფორმაციას. ჩვენს მიერ, მიტოქონდრიულ დნმ-ზე ჩატარებული კვლევის მიხედვით, საქართველოს ბაზარზე იყიდება ერთ-ერთი კრიტიკულად საფრთხეში მყოფი სახეობა, რუსული ზუთხი (*A. gueldenstaedtii*). თუმცა იმის გამო, რომ მიტოქონდრიული დნმ მხოლოდ

მემკვიდრეობს დედის ხაზით, მიღებული სურათი არ არის სრულყოფილი - შესაძლებელია არსებობდეს ჰიბრიდი, ზუთხსაშენიდან, რომელიც გვიჩვენებს იგივე შედეგს. ამ კვლევაში ჩვენ გამოვიყენეთ, ბირთვული და მიტოქონდრიული დნმ-ის თანმიმდევრობები, იმისთვის, რომ მიგვეღო გენეტიკური ინფორმაცია ორივე მშობლის შესახებ და დაგვედგინა რომელი ზუთხს სახეობები იყიდება საქართველოს ბაზარზე და ხდება თუ არა დაცული ველური ზუთხის სახეობებით ვაჭრობა.

ძირითადი თემატური საძიებო სიტყვები: ზუთხი, დნმ, საქართველოს ბაზარი, პჯრ, სექვენირება, *cytb*, *S7*.

Abstract

According to existing information, there are 6 species of sturgeon in waters off the Georgian Black Sea coast: *Acipenser sturio*, *A. nudiventris*, *A. stellatus*, *A. gueldenstaedtii*, *A. persicus*, and *Huso huso*, and potentially a seventh species *A. colchicus* (Ninua et al., 2013), although this taxon's status is not clear. These species are economically important for black caviar production, and for their flesh. However, because of their commercial value, they are subject to overfishing. In addition, the damming of rivers, water pollution, and environmental degradation has caused an extreme decline of sturgeon populations at the end of the 20th century (Billard & Lecointre, 2000). Currently, according to IUCN Red List data, all these species are critically endangered. *A. colchicus* may be an exception, this taxon has not yet been assessed for the IUCN Red List, and consequently, its current conservation status must be described as unknown. From CITES three ranking appendices, *A. sturio* is listed in Appendix I, and all other species are listed in Appendix II (CITES, 2017). There is some disagreement regarding *A. sturio*; some describe this species as extinct in the Black Sea (IUCN Red List, 2017), while other sources cite it as rare but still extant in Black Sea waters (Kolman 2011; Ninua et al., 2013).

Despite their nominal status as protected species, the situation is still problematic—some illegal harvest takes place. In order to ensure preservation of these aquatic species, more complete information is needed to guide conservation efforts. Our results from mitochondrial DNA show that mostly Russian Sturgeon (*A. gueldenstaedtii*) are being sold in Georgian markets. However, because mitochondrial DNA only tracks the maternal lineage, our data are not conclusive on this finding—there are farmed hybrid sturgeon, not protected, which would give a similar result. In this research study, we used DNA sequence, from nuclear and mitochondrial genes, to track maternal and paternal lineages, in order to determine which sturgeon species are being sold commercially and whether current commercial trade in sturgeon in Georgia involves protected species.

Key words: Sturgeon, DNA, Georgian market, PCR, sequencing, *cyt b*, *S7*.