



بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت دهان گرد دریای خزر (*Caspiomyzon wagneri*)  
در رودخانه شیروود در فصل‌های بهار و پاییز با روش  
مولکولی ریزماهوره

حامد مفتاح<sup>۱</sup>، محمدعلی سالاری علی‌آبادی<sup>۲\*</sup>، رحیم عبدی<sup>۲</sup>، محمد پورکازمی<sup>۲</sup>، ایوب فرهادی<sup>۴</sup>

تاریخ پذیرش: مهر ۹۸

تاریخ دریافت: شهریور ۹۸

چکیده

در این پژوهش تنوع ژنتیکی دهان گرد دریای خزر در رودخانه شیروود توسط نشانگر ریزماهوره مورد مطالعه قرار گرفت. برای این منظور، از بافت نرم باله پشتی و دمی ۶۷ قطعه ماهی بالغ از رودخانه شیروود در دو فصل پاییز ۱۳۹۵ و بهار ۱۳۹۶ نمونه برداری شد. استخراج DNA ژنومی به روش استات آمونیوم و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) با استفاده از ۱۰ جفت آغازگر صورت گرفت. کمیت و کیفیت DNA با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز افقی ژل آگاروز ۱ درصد بررسی و رنگ آمیزی با روش نیترات نقره انجام شد. نتایج نشان داد که ۶ جفت از آغازگرها چندشکل و ۴ جفت تک‌شکل بودند. میانگین کل آل‌های واقعی و موثر در ماهیان مولد پاییزه به ترتیب ۲/۶۶ و ۱/۸۸ و در ماهیان مولد بهاره ۳/۱۶ و ۲/۰۶ بود. همچنین هتروزویگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در ماهیان مولد پاییزه به ترتیب ۰/۰±۲۳۹/۱۰۱ و ۰/۳۶۳±۰/۱۱۶ و در ماهیان مولد بهاره ۰/۳۷۴±۰/۱۱۰ و ۰/۴۳۴±۰/۰۹۳ محاسبه شد. در بررسی تعادل هاردی-واینبرگ (H-W)، بیشتر لوکوس‌ها خارج از تعادل بودند ( $P < 0.05$ ). میزان Rst و Fst به دست آمده بر اساس آزمون AMOVA، به ترتیب ۰/۱۵۳ و ۰/۲۰۰ بود که دارای اختلاف معنی‌داری بود ( $P < 0.01$ ). نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد دو جمعیت مجزا از لحاظ ژنتیکی در رودخانه شیروود وجود دارد که در باسازی ذخایر آن باید توجه لازم را به کار گرفت.

واژگان کلیدی: *Caspiomyzon wagneri*، ساختار ژنتیکی، ریزماهوره، رودخانه شیروود.

- ۱- دکتری زیست‌شناسی دریا، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.
  - ۲- دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.
  - ۳- استاد موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، تهران، ایران.
  - ۴- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
- \* نویسنده مسئول: [salari@kmsu.ac.ir](mailto:salari@kmsu.ac.ir)

## مقدمه

بیشینه برداشت پایدار ذخایر ماهیان یکی از اهداف مدیریت شیلاتی است که دستیابی به آن نیازمند آگاهی از ذخایر ماهیان است. یکی از روش‌های مورد استفاده برای ارزیابی ساختار ذخایر تشخیص گونه، جمعیت و نژادها، به کارگیری صفات مورفومتریکی و مریستیک است. اما صفات مورفومتریکی و مریستیک نسبت به تغییرات محیطی دارای حساسیت زیادی هستند و نیز داشتن اثرات منفی دستکاری هنگام نشانه‌گذاری بر سلامت و بقای ماهیان و همچنین محدود بودن تفسیر داده‌های نشانه‌گذاری به زمان جمع‌آوری آن‌ها (Adams and Hutchings, 2003). همگام با پیشرفت علم از نشانگرهای مولکولی مثل ریزماهوره، آلوزایم، RAPD، AFLP و RFLP که متاثر از عوامل محیطی نیستند برای شناسایی ساختار ژنتیکی ذخایر بیش از پیش رایج شده است (Ryman, 1991). امروزه هدف اصلی مطالعات ژنتیکی-مولکولی در آبزیان درک صحیح و مناسبی از ساختار جمعیتی، تنوع ژنتیکی، ارتباطات گونه‌ای و طبقه‌بندی آن‌ها است (Rezvani Gilkolaei, 1997; Lu, 1998). بی‌توجهی به اصول صحیح ژنتیکی، تکاملی و اکولوژیکی در زمینه آمیزش هدفمند برای تکثیر

لامپری‌های خانواده Petromyzontidae یکی از قدیمی‌ترین و ابتدایی‌ترین ماهیان با قدمت ۵۰۰-۳۰۰ میلیون سال هستند (Gess et al., 2006) و از نظر اقتصادی، پرورشی و اکولوژیکی از اهمیت بسیار بالایی در دنیا برخوردار هستند. این خانواده ۹ جنس و ۴۳ گونه دارد که از این میان، دهان‌گرد دریای خزر با نام علمی *Caspiomyzon wagneri* تنها گونه موجود در ایران است (Coad, 2016). این گونه دهان‌گرد یک گونه اروپایی-آسیایی است (Coad, 2016) که بومی دریای خزر، رودکوچ و غیرانگلی است (Imanpoor and Abdollahi, 2011). این گونه در حوزه شمالی دریای خزر به رودخانه‌های ولگا، اورال، ترک و کورا (Holcik and Olah, 1992; Coad, 2016) و در حوزه جنوبی دریای خزر به رودخانه‌های شیروود، تالار، بابلرود، کرگانرود، تجن، هراز، سردآبرود، ارس، چشمه کیله، پلرود، سفیدرود، کرگانرود، شفارود و تالاب انزلی مهاجرت می‌کند (Imanpoor and Abdollahi, 2011). این مهاجرین پس از تخم‌ریزی می‌میرند (Nazari and Abdoli, 2010).

دهان‌گرد دریای خزری یک گونه با ارزش اقتصادی و اکولوژیکی به دلیل شرایط موجود در فهرست IUCN به عنوان گونه در معرض تهدید قرار گرفته است (Kiabi et al., 1999). تاکنون هیچ مطالعه‌ای در زمینه تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی این گونه در دریای خزر صورت نگرفته است، بنابراین نبود اطلاعات کافی درباره وضعیت ژنتیکی جمعیت‌های موجود و همچنین با توجه به لزوم شناخت دقیق ذخایر دهان‌گرد دریای خزر سعی شد با استفاده از تکنیک ملکولی ریزماهواره به کمک ژن‌های مستقر بروی ژنوم دهان‌گرد دریای خزر با هدف بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های این دهان‌گرد در حوزه جنوبی دریای خزر اطلاعات بیشتری در مورد ساختار ژنتیکی، تعیین تنوع ژنتیکی و همچنین شناسایی اختلافات ژنتیکی احتمالی بین دو جمعیت بهاره و پاییزه کسب شود.

#### مواد و روش‌ها

در این بررسی، پس از مطالعات اولیه و تعیین محل نمونه‌برداری، رودخانه شیروود به عنوان یکی از زیستگاه‌های مهم دهان‌گرد دریای خزر (*Caspiomyzon wagneri*) انتخاب شد این رودخانه در عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۴۵ دقیقه و طول جغرافیایی ۵۵ درجه و ۴۴ دقیقه

ماهیان و ماهیانی که به طور طبیعی تولیدمثل می‌کنند، می‌تواند پیامدهای معکوسی برای ماهیان با تولیدمثل طبیعی به همراه آورده، در نهایت برنامه‌های بازسازی ذخایر را مختل کند و استفاده پایدار از منابع مذکور را در بلند مدت با مشکل رو به‌رو سازد (Reisenbichler and Rubin, 1999).

مطالعات گوناگونی در زمینه بررسی ساختار ژنتیکی گونه‌های مرتبط با دریای خزر مانند ماهی آزاد، ماهیان خاویاری، ماهی سفید و غیره صورت گرفته است. در حالی که تاکنون درباره دهان‌گرد دریای خزر در زمینه ساختار ژنتیکی پژوهشی صورت نگرفته است. دهان‌گرد دریای خزر که یک گونه با ارزش اقتصادی و اکولوژیکی است نیز مانند دهان‌گردان دیگر در بیشتر اکوسیستم‌های دنیا، به ویژه در حوزه شمالی این دریاچه به علت صید بی‌رویه و غیرقانونی به دلیل استفاده آن در صنعت روغن‌گیری و مصارف خوراکی به شدت کاهش یافته (Holcik, 1986; Coad, 2016) و ذخایر باقیمانده آن هم به دلیل تخریب بستر زیستگاه‌های طبیعی (برای تخم‌ریزی)، احداث سد در مسیر مهاجرت، فشار صید غیرقانونی و آلودگی‌های زیست‌محیطی با مشکلاتی روبه‌رو هستند (Kiabi et al., 1999).

شد و سپس به منظور رسوب دادن DNA، به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد (McQuown et al., 2000). کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با روش اسپکتروفتومتری (Eppendorf, Basic، آلمان) بررسی شد. به این ترتیب که مقدار ۵ میکرولیتر DNA ژنومی با آب مقطر مخلوط شد و با قرار دادن سل در دستگاه غلظت DNA و میزان آلودگی با جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر محاسبه شد. بررسی و مشاهده تیزی، شدت و وضوح باندهای DNA بر روی ژل آگارز (۱ درصد) و رنگ آمیزی نیترات نقره نشان داد که DNAهای استخراج شده به روش استات آمونیوم از کیفیت مناسبی برای استفاده در آزمایش‌های PCR برخوردار بودند (Takeshima et al., 2005). در این مطالعه با توجه به منابع، طراحی آغازگرهای ریزماهورهای بر اساس ترادف DNA ژنومی ماهی دهان‌گرد رودخانه‌ای (*Lampetra fluviatilis*) صورت گرفت (Gaigher et al., 2013).

برای انجام PCR و تکثیر ژن هدف، ۱۰۰ نانوگرم DNA استخراجی، ۱۰ پیکومول آغازگر به همراه ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، آنزیم Taq پلیمرز (۱U/μL؛ یکتا تجهیز آزما، ایران)، بافر PCR (۱X) و ۱/۶ میلی‌مولار MgCl<sub>2</sub> استفاده

واقع شده است (از غرب به حوزه آبریز چالکروود و از شرق به حوزه آبریز تنکابن محدود شده است). طی نمونه‌برداری، ۶۷ قطعه ماهی دهان‌گرد توسط تور سالیک و به طور دستی بر روی پایه پل در فصل‌های پاییز (مهر ماه ۹۵) به تعداد ۳۰ قطعه و بهار (اردیبهشت ۹۶) به تعداد ۳۷ قطعه صید شد. سپس ۳ تا ۵ گرم از بافت نرم باله پشتی و دمی آن توسط قیچی جدا شد و بعد از تثبیت در اتانول ۹۶ درصد به آزمایشگاه ژنتیک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری منتقل شد.

DNA ژنومی به روش استات آمونیوم استخراج شد. در این روش به میکروتیوب‌های حاوی نمونه، ۵۰ میکرولیتر SDS ۲۰ درصد، ۵۰۰ میکرولیتر STE به همراه ۵ میکرولیتر پروتئاز K افزوده شد. پس از آن، نمونه‌ها به مدت ۱۶ ساعت در بن‌ماری در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس ۱۶۰ میکرولیتر استات آمونیوم ۱۰ درصد به آن‌ها اضافه شد و پس از قرار دادن روی شیکر (Vortex Rs، اختریان، ایران) به مدت ۱ ساعت (با سرعت ۹۰ دور در دقیقه) به مدت ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ (5810 R، Eppendorf، آلمان) شد. به ۵۰۰ میکرولیتر از فاز بالایی ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه

شد که در نهایت حجم آن با آب مقطر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. نمونه‌ها پس از ۱۰ ثانیه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند تا محتویات لوله‌ها ته نشین شود، سپس در ترمال سایکلر (BIO-RAD، T100، آمریکا) قرار گرفتند. برنامه‌های داده شده به PCR به منظور تکثیر ژن به این شرح بود: چرخه ابتدایی شامل واسرشت‌سازی اولیه DNA در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، چرخه دوم سه مرحله‌ای و با ۳۰ بار تکرار شامل واسرشت‌سازی DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر به رشته الگو در محدوده دمایی ۵۲ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد و مرحله بسط پلیمرازی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و مرحله پایانی شامل بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه.

محصول PCR به روش الکتروفورز با ژل آگاروز ۱ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت (Sambrook and Russell, 2006). اندازه قطعات به دست آمده از PCR با مقایسه با نشانگر Thermo Scientific GeneRuler 50bs DNA Ladder به روی ژل پلی‌آکریل آمید ۸ درصد (Sambrook and Russell, 2006) و با روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره به دست آمد (Bassam et al., 1991). برای سنجش وزن ملکولی محصول PCR و امتیازدهی باندهای تصاویر ژل پلی‌آکریل آمید از نرم‌افزار GelAnalyzer 2010 (Lazar and Lazar, 2017) و تجزیه و تحلیل آماری که شامل محاسبه تعداد آلل واقعی (تعداد آلل‌های واقعی مشاهده شده در هر جایگاه ژنی) و آلل موثر (تعداد آلل‌های ایجاد کننده هتروزیگوسیتی یکسان)، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (نسبت افراد هتروزیگوت در یک جایگاه ژنی به کل نمونه) و هتروزیگوسیتی مورد انتظار (تعداد افرادی که باید بر اساس فراوانی آللی هتروزیگوت باشند)، تعادل هاردی-واینبرگ (H-W) به کمک آزمون مربع کای، فاصله ژنتیکی و شباهت ژنتیکی (طرحی برای بیان تفاوت بین جمعیت‌ها بر اساس معیار Nei (1978))، شاخص‌های تمایزهای ژنتیکی شامل Rst و Fst (برآورد تمایز و تنوع ژنتیکی در یک زیرجمعیت و مقایسه آن نسبت به اختلاف ژنتیکی کل بر اساس آزمون AMOVA با احتمال ۹۹ درصد) از نرم‌افزار Gene Alex version 6.51b2 (Peakall and Smouse, 2006) استفاده شد.

## نتایج

استفاده از آغازگر LUN5 متعلق به ۵ نمونه از جمعیت بهاره شیروود بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد با وزن مولکولی ۱۹۳-۱۲۷ جفت باز که با نرم افزار Gel Analyzer محاسبه شد، نشان می دهد.

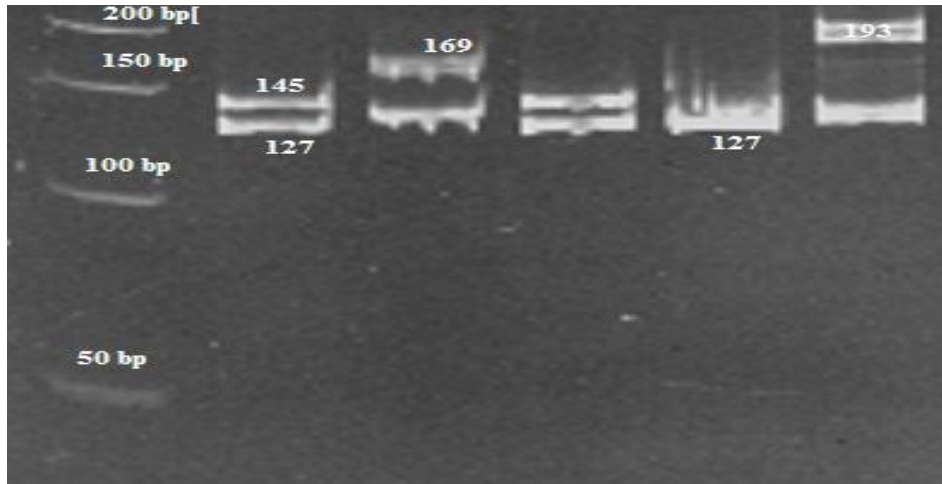
بیشترین تعداد آلی در ماهیان مولد مهاجر بهاره مشاهده شد و کمترین تعداد آلی در ماهیان مولد مهاجر پاییزه که به ترتیب در جایگاه های ژنی LUN5 و LP028 به تعداد ۴ و ۲ آلی بود.

از ۱۰ جفت آغازگر ریزماهورهای بررسی شده ۶ جفت پلی مورف (چند شکلی) و ۴ جفت آن مونومورف (تک شکلی) بود. جدول ۱ داده های فراوانی آلی جایگاه های مختلف پلی مورفیک را نشان می دهد. تعداد آلی مشاهده شده برای این جایگاه ژنی در ۶۷ نمونه مورد مطالعه ۸ آلی و دامنه اندازه آلی ۱۹۳-۱۲۷ جفت باز بود. شکل ۱ محصول PCR و آرایش باندهای DNA ماهی دهان گرد دریای خزر را با

جدول ۱: مشخصات آغازگرها و میانگین شاخص های ژنتیکی برای جایگاه های ژنی پلی مورفیک در ماهی دهان گرد دریای خزر

ردیف	لوکوس	توالی آغازگر	توالی تکرار	TA (°C)	تعداد چرخه آلی (bp)	محدوده	Ho	He	No	Ne
۱	Lun3	F: M13-CTTCCACACCAGTCAG R: GGCAGAATCCTGTATTGATG	(GTT) <sub>11</sub>	۵۲	۳۰	۲۱۰-۱۵۰	۰/۷۷۶	۰/۶۳۴	۳/۵	۲/۸۵۰
۲	Lun5	F: M13-TTGCGATTGGTTCTCAGTC R: CGATGTTGTTGACGAGTGTG	(CCA) <sub>8</sub>	۵۳	۳۰	۱۹۳-۱۲۷	۰/۲۷۸	۰/۶۶۸	۴	۶/۰۲۰
۳	LP028	F: M13-AGAAGCTCTGTGGACGTTCCG R: TCTCAAATGAGTTCTCAAAA	(ATC) <sub>5</sub>	۵۷	۳۰	۲۶۹-۲۳۳	۰/۱۳۵	۰/۱۵۳	۱/۵	۱/۲۲۱
۴	LP039	F: M13-CACTTCCAACAAGCCAGT R: TATTCAGCCACTTGGGCAT	(AC) <sub>6</sub>	۵۶	۳۰	۱۷۹-۱۶۱	۰/۰۸۷	۰/۱۱۴	۲/۵	۲/۲۵۸
۵	LP045	F: M13-GAGGTGTTTCGCGTGCTAT R: AAGGAGAGAGGAGGTTTCGG	(GTT) <sub>6</sub>	۵۶	۳۰	۱۹۱-۱۸۵	۰/۳۰۶	۰/۳۴۳	۲	۳/۱۶۷
۶	LP09	F: M13-ACTCCACGTGCAAAAATTC R: AGGCATCACTCCTAACGACG	(TG) <sub>7</sub>	۶۰	۳۰	۲۱۶-۱۷۰	۰/۲۶۶	۰/۴۸۰	۳	۲/۰۴۲

TA: دمای اتصال؛ Ho: میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده؛ He: میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار؛ No: تعداد آلی های مشاهده شده؛ Ne: تعداد آلی های موثر.



شکل ۱: محصول PCR و آرایش باندهای DNA ماهی دهان‌گرد دریای خزر با استفاده از آغازگر LUN5 متعلق به ۵ نمونه از جمعیت بهاره شیروود بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸ درصد با وزن مولکولی ۱۹۳-۱۲۷ جفت باز که با نرم‌افزار Gel Analyzer محاسبه شده است و وزن مولکولی باندها را نشان می‌دهد. نشانگر مولکولی مورد استفاده Thermo Scientific GeneRuler 50bs DNA Ladder است.

در این پژوهش مقدار متوسط آلل مشاهده شده  $۲/۹۱۷ \pm ۰/۲۶۰$  بود که میانگین آلل مشاهده شده مربوط به نمونه‌های مولد مهاجر بهاره  $۳/۱۶۷ \pm ۰/۳۰۷$  و میانگین آلل مشاهده شده مربوط به نمونه‌های مهاجر پاییزه رودخانه شیروود  $۲/۶۶۷ \pm ۰/۴۲۲$  بود.

میانگین آلل واقعی و موثر در ماهیان مولد مهاجر بهاره به ترتیب  $۳/۱۶$  و  $۲/۰۶$  و در ماهیان مهاجر پاییزه به ترتیب  $۲/۶۶$  و  $۱/۸۸$  بود. در بررسی انجام شده میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در بین شش جایگاه ژنی پلی‌مورف در ماهیان مولد مهاجر بهاره و پاییزه به ترتیب  $۰/۳۷۴ \pm ۰/۱۱۰$  و  $۰/۲۳۹ \pm ۰/۱۰۱$  و میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار در ماهیان مولد مهاجر بهاره و پاییزه به ترتیب  $۰/۴۳۴ \pm ۰/۰۹۳$  و  $۰/۳۶۳ \pm ۰/۱۱۶$  و میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده  $۰/۳۰۶$  محاسبه شد.

در بررسی تعادل هاردی-واینبرگ (H-W) که به کمک آزمون مربع کای نشان داده شد جایگاه‌های ژنی LP039، LUN5 و LP09 در ماهیان مولد مهاجر پاییزه و جایگاه‌های ژنی LP045، LUN5 و LUN3 در ماهیان مولد مهاجر بهاره خارج از تعادل بودند ( $P < ۰/۰۵$ )؛ جدول ۲).

جدول ۲: تعادل هاردی-واینبرگ در ۶ جایگاه ژنی ریزماهورهای پلی مورفیک در ماهی دهان گرد دریای خزر

معنی داری	احتمال (P)	آزمون مربع کای	درجه آزادی	لوکوس	جمعیت
ns	۰/۳۷۵	۳/۱۰۷	۳	LUN3	شیرود پاییزه
***	۰/۰۰۰	۲۴/۳۰۵	۶	LUN5	
***	۰/۰۰۰	۴۷/۷۳۶	۳	LP09	
ns	۰/۴۶۹	۰/۵۲۴	۱	LP028	
*	۰/۰۱۱	۶/۴۶۸	۱	LP039	
ns	۰/۹۱۴	۰/۵۲۳	۳	LP045	
***	۰/۰۰۰	۵۲/۸۴۴	۶	LUN3	شیرود بهاره
***	۰/۰۰۰	۵۵/۷۱۳	۶	LUN5	
ns	۰/۴۲۱	۲/۸۱۶	۳	LP09	
ns	۰/۴۶۹	۰/۵۲۴	۱	LP028	
ns	۰/۹۸۹	۰/۱۲۱	۳	LP039	
***	۰/۰۰۰	۲۳/۰۱۱	۳	LP045	

\*: معنی داری با احتمال خطای ۵ درصد ( $P < 0.05$ ); \*\*\*: معنی داری با احتمال خطای ۰/۰۰۱ درصد ( $P < 0.001$ ).  
 ns: اختلاف با احتمال خطای بیشتر از ۵ درصد معنی دار نیست ( $P > 0.05$ ).

نتایج به دست آمده از Fst نشان داد که شیرود با نمونه‌های مولد مهاجر بهاره اختلاف میزان Fst بین نمونه‌های مولد مهاجر بهاره و پاییزه ۰/۱۵۳ با میزان جریان ژنی ۱/۵۰۱ بود. بر اساس معیار Nei (۱۹۷۸) فاصله ژنتیکی و شباهت ژنتیکی بین نمونه‌های بهاره و پاییزه رودخانه شیرود به ترتیب ۰/۱۳۰ و ۰/۸۷۸ بود. میزان Rst به دست آمده ۰/۲۰۰ بود که بر اساس آزمون AMOVA با احتمال ۹۹ درصد بین نمونه‌های مولد مهاجر پاییزه رودخانه



جدول ۳: میزان Fst و Rst به دست آمده از دو جمعیت بهاره و پاییزه ماهی دهان‌گرد دریای خزر در رودخانه شیروود بر اساس جایگاه‌های ژنی

جمعیت	شیروود بهاره	شیروود پاییزه
شیروود بهاره	۰/۰۰۰	۰/۱۵۳ (۱/۵۰۱)
شیروود پاییزه	۰/۲۰۰	۰/۰۰۰

عدد بالای ماتریکس میزان Fst و عدد داخل پرانتز جریان ژنی و اعداد زیر ماتریکس مقدار Rst را بر اساس آزمون AMOVA نشان می‌دهد.

### بحث

جویباری *Lampetra planeri* (۳۵ قطعه) که

در لوویر فرانسه انجام گرفت (Gaigher et al., 2013)، قابل قبول نیست و به نظر می‌رسد که نمونه جمع‌آوری شده متناسب با تعداد پیشنهادی برای پژوهش‌های ژنتیکی است. در این پژوهش مقدار متوسط آلل مشاهده شده  $۲/۹۱۷ \pm ۰/۲۶۰$  بود که میانگین آلل مشاهده شده مربوط به نمونه‌های مولد مهاجر بهاره  $۳/۱۶۷ \pm ۰/۳۰۷$  و میانگین آلل مشاهده شده مربوط به نمونه‌های مهاجر پاییزه رودخانه شیروود  $۲/۶۶۷ \pm ۰/۴۲۲$  بود.

متوسط تعداد آلل مشاهده شده در این پژوهش (۲/۹۱۷) کمتر از مقدار اعلام شده توسط Dewoody و Avise (۲۰۰۰) برای ماهیان رودکوک (۱۱/۳) بود که این اختلاف می‌تواند مرتبط با عوامل مختلف محیطی مانند تفاوت درجه حرارت، دبی (آب‌دهی)، شدت جریان آب و جریانات دریایی متفاوت در بین

در این پژوهش به منظور جداسازی و تکثیر ژن مورد نظر دهان‌گرد دریای خزر از ۱۰ جفت آغازگر ریزماهواره طراحی شده برای دهان‌گرد رودخانه‌ای استفاده شد و از آنجایی که نشانگرهای ریزماهواره می‌توانند مناطق مشابهی را در سایر گونه‌های همان جنس تکثیر کنند از این آغازگرها استفاده شد.

با توجه به جمعیت اندک دهان‌گرد دریای خزر و محدود بودن زیستگاه‌های مرتبط با آن و دشواری‌های موجود به منظور دسترسی به نمونه‌های بیشتر در کل تعداد ۶۷ قطعه نمونه ماهی دهان‌گرد دریای خزر از رودخانه شیروود استان مازندران جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به نتایج آماری و معنی‌دار بودن آن در مقایسه با مطالعات دیگر مانند بررسی ساختار ژنتیکی دهان‌گرد رودخانه‌ای *Lampetra fluviatilis* (۳۲ قطعه) و دهان‌گرد

زیستگاه در فصل‌های مختلف سال و کاهش شدید جمعیت به ویژه به حداقل رسیدن مولدینی که برای تخم‌ریزی به رودخانه‌ها مهاجرت می‌کنند، باشد که باعث محدود شدن جریان ژنی و کاهش تنوع آلی شده است. تعداد آلل بیشتر و میزان هتروزیگوسیتی بالاتر نشانه مناسب بودن ساختار ژنتیکی است. می‌توان به ازون‌برون‌های (*Acipenser stellatus*) مهاجر در رودخانه ولگا که شرایط مناسب‌تری را نسبت به زیستگاه‌های دیگر دارد، اشاره کرد (Ivanov and Velasenko, 2001) و به دنبال آن بهبود شرایط زیستگاهی، تداوم تکثیر طبیعی را به همراه خواهد داشت. Gaigher و همکاران (۲۰۱۳) با بررسی دهان‌گرد رودخانه‌ای (*Lampetra fluviatilis*) و دهان‌گرد جویباری (*Lampetra planeri*) در رودخانه‌های لوویر و ایر فرانسه با استفاده از ۱۰ جفت آغازگر به روش ریزماهوره، متوسط تعداد آلل مشاهده شده را به ترتیب ۳/۴ و ۳/۲ به دست آوردند که کمتر از مقدار محاسبه شده برای ماهیان رودکوچ (۱۱/۳) بود. هتروزیگوسیتی شاخصی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی است. مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۰/۳۷۴) در نمونه‌های مولد مهاجر بهاره رودخانه شیروود نسبت به نمونه‌های مولد مهاجر

پاییزه (۰/۲۳۹) را باید نشانه بالا بودن تنوع و مناسب بودن ساختار این جمعیت نسبت به جمعیت مهاجر پاییزه دانست که علت آن را می‌توان به بالا بودن اندازه جمعیت موثر آن نسبت به جمعیت مهاجر پاییزه، فرصت مناسب و کافی (بازه زمانی ۳ ماهه یا کمی بیشتر) برای تکثیر طبیعی مولدین مهاجر، وضعیت بهتر این زیستگاه به لحاظ عوامل محیطی مانند دبی رودخانه نسبت به فصل پاییز و حفاظت از این زیستگاه در زمان مهاجرت مولدین (زمستان و بهار) مرتبط دانست و میزان پایین هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۰/۲۳۹) در نمونه‌های مهاجر پاییز رودخانه شیروود نسبت به نمونه‌های مهاجر بهاره (۰/۳۷۴) را به عواملی مانند عدم حفاظت از این زیستگاه در زمان مهاجرت مولدین، عدم بهره‌برداری بهینه از منابع شیلاتی، فرصت محدود و ناکافی (بازه زمانی ۲۰ روزه) برای تکثیر طبیعی مولدین مهاجر، انجام فعالیت‌های انسانی (برداشت شن و ماسه از دهانه مصب) در زمان مهاجرت مولدین، استرس‌های ناشی از این فعالیت‌ها در زمان تخم‌ریزی و صید غیرقانونی صیادان محلی می‌توان مرتبط دانست (Coad, 2016; Nazari et al., 2017).

۲۰۰۰ در *Avisé* و *Dewoody* میانگین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده را در ماهیان دریایی ۰/۷۹، ماهیان آب شیرین ۰/۴۶ و ماهیان رودکوک رقمی بینابین ماهیان دریایی و آب شیرین (۰/۶۸) گزارش کردند. در پژوهش حاضر میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۰/۳۰۶ کمتر از مقدار اعلام شده برای ماهیان رود کوک (۰/۶۸) بود که علل آن را به تنگناهای ژنتیکی به واسطه افزایش فشار صید، اندازه کوچک جمعیت، نمونه‌برداری از افراد خویشاوند یک گله، تخریب زیستگاه‌های طبیعی تخم‌ریزی، احداث پل، ایجاد سدها و آب بندها، عدم ساخت مسیر مهاجرت ماهیان (*Fish Way*) بر روی سدها، تغییرات شدید اقلیمی همچون خشکسالی (و ترسالی در یک سال اخیر)، آلودگی رودخانه‌ها، لایروبی و برداشت شن و ماسه از زیستگاه‌ها مرتبط دانست (Nazari and Abdoli, 2010).

قانون هاردی-واینبرگ ثبات فراوانی آلل‌ها را در بین نسل‌های مختلف پیش‌بینی می‌کند. وجود جمعیت بزرگ با آمیزش تصادفی، عدم مهاجرت، عدم انتخاب، فقدان فشار جهش و میوز معمولی در بر قراری تعادل موثر است (Hallerman, 2003). مشاهده انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ در سطح ۹۵ درصد (P<۰/۰۵) در این پژوهش را می‌توان احتمالاً به فراوانی افراد هموزیگوت نسبت داد. درون‌آمیزی، جمعیت موثر کوچک و نامساوی بودن مولدین نر و ماده (Garcia De Leon et al., 1997)، پایین بودن میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده به میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار در جایگاه‌های ژنی که انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ دیده می‌شود ناشی از وجود آلل‌های نول است (McFarlane and Docker, 2009) که پدیده‌ای معمول در ماهیان است (Schedina et al., 2014). ناکافی بودن نمونه‌ها، رانش ژنتیکی، و جهش محلی در جایگاه‌های ریز ماهواره‌ای را می‌توان از دلایل دیگر عدم تعادل هاردی-واینبرگ اعلام کرد.

از شاخص‌های *Fst* و *Rst* به طور معمول در توصیف تمایز ژنتیکی در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی استفاده می‌شود (Balloux and Lugon-Moulin, 2002). بر اساس آزمون AMOVA میزان *Fst* و *Rst* مربوط به نمونه‌های مهاجر پاییزه رودخانه شیروود با نمونه‌های مهاجر بهاره این رودخانه به ترتیب ۰/۱۵۳ و ۰/۲۰۰ بود که بر اساس نظریه جدایی جمعیتی Dork (۲۰۰۵) تمایز بین دو جمعیت بالا بود. Lin و همکارانش (۲۰۰۸) با بررسی ساختار ژنتیکی دهان‌گرد اقیانوس آرام

به حدود نصف می‌رسد (میزان جریان دبی رودخانه شیروود در ماه‌های مهر و آبان ۳/۵-۳/۸ متر بر ثانیه و در ماه‌های فروردین و اردیبهشت ۶/۶-۶/۸ متر بر ثانیه (Nazari et al., 2017)) و با دوره فتوپریودی متفاوت، شروع به مهاجرت می‌کنند. پیک مهاجرت دو ساعت بعد از غروب خورشید است و بیش از دوسوم مهاجرت پس از تاریکی هوا صورت می‌گیرد (Abdoli et al., 2017) که در مورد دهان‌گرد دریایی *Petromyzon marinus* (Kelso and Gardner, 2000) و دهان‌گرد اقیانوس آرام نیز به اثبات رسیده است (Moser et al., 2002). اثرات عوامل زیست‌محیطی بر روی زمان مهاجرت به طور کلی با محدودیت‌های فیزیولوژیکی آبی در ارتباط است. به طوری که جریان شدید آب باعث مصرف بالای انرژی می‌شود که در بسیاری از گونه‌های دهان‌گرد به اثبات رسیده است (Quintella et al., 2004). Ahmadi و همکاران (۲۰۱۱) وجود دو جمعیت تولیدمثلی بهاره و پاییزه را در دهان‌گرد دریای خزر در رودخانه شیروود گزارش کردند. در دو جمعیت بهاره و پاییزه قطر صفحه دهانی که برای مکش در مسیر مهاجرت مورد استفاده قرار می‌گیرد، اختلاف معنی‌دار دارد که با شدت جریان‌ات آبی در ارتباط است (Kuszewski

*Lampetra tridentata* میزان تمایز ژنتیکی (Fst) را ۰/۱۰۶ محاسبه کردند ( $P < 0/001$ ). تمایز بالا بین دو جمعیت این دهان‌گردان بیانگر جریان ژنی پایین در نمونه‌های مهاجر مولد بین دو زیستگاه است که منجر به تکامل مستقل از همدیگر می‌شود (Matthaeis et al., 2000). در این پژوهش میزان Rst و Fst به دست آمده در سطح ۱ درصد در جمعیت‌های مورد مطالعه دارای اختلاف معنی‌دار بود ( $P < 0/001$ ). بنابراین می‌توان پیشنهاد کرد که به احتمال زیاد دو جمعیت از نظر ژنتیکی متمایز از یکدیگر باشند. به طور کلی، واگرایی در پاسخ به یک دوره طولانی مدت شرایط زیست‌محیطی در مسیر مهاجرت، تولیدمثل و زیستگاه شکل می‌گیرد (Hilborn et al., 2006). جدایی ژنتیکی در جمعیت‌های مرتبط در بهترین زمان مهاجرت با منافع مناسب در طول زمان در ارتباط است (Waples et al., 2004). الگوی‌های زمان مهاجرت به سادگی پلاستیسیته فنوتیپ را منعکس می‌کند به طوری که تغییرات فصلی باعث تغییر در اندازه گونه‌های مهاجر می‌شود (Maitland et al., 1994). به طوری که گونه‌های مهاجر با اندازه‌های کوچک‌تر به دلیل شدت جریان پایین در فصل پاییز نسبت به بهار که میزان جریان آب

نتایج به دست آمده از شاخص‌های تمایز ژنتیکی (Fst و Rst) و جریانی ژنی پایین نشان می‌دهد که دو جمعیت متفاوت از نظر ژنتیکی در رودخانه مورد مطالعه وجود دارد. با وجود شرایط سخت و دشوار، این گونه توانسته تنوع ژنتیکی خود را حفظ کند که برای حفظ ذخایر ژنتیکی لازم است اقدامات ضروری صورت گیرد. از طرفی ریزماهواره ابزار مناسب و توانمندی در بررسی ساختار ژنتیکی این گونه محسوب می‌شود. با توجه به تشخیص دو جمعیت مجزا پیشنهاد می‌شود که اختلافات این گونه در زیستگاه‌های مهاجرتی دیگر از نظر شرایط زیست‌شناختی، تولیدمثل، زمان تخم‌ریزی، محل دقیق تخم‌ریزی و محل زیست آموسیت‌ها، تغذیه و عوامل اکولوژیکی مانند عوامل محیطی زیستگاه و غیره مورد بررسی و پژوهش قرار گیرد.

and Witkowski, 1995). اختلاف معنی‌داری ریخت‌شناسی (Beamish, 1980) و جدایی ژنتیکی (Beamish, 1986) در مورد جمعیت‌های گونه دهان‌گرد اقیانوس آرام نیز گزارش شده است که احتمالاً به واسطه وفاداری زادگاه است. ماتریس شباهت و فاصله ژنتیکی برای توصیف تمایز ژنتیکی ساختارهای جمعیتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. بر اساس نظریه Thorpe و همکاران (۱۹۹۴) و Shaklee و همکاران (۱۹۸۲) میزان فاصله ژنتیکی (Nei, 1978) برای جدایی جمعیت را به طور میانگین ۰/۳ (دامنه ۰/۶۱-۰/۰۳) مشخص کردند (Shaklee et al., 1982). از آنجای که فاصله ژنتیکی مشاهده شده در این بررسی در این دامنه جدایی جمعیتی قرار دارد نشان دهنده تمایز ژنتیکی است.

## منابع

- Abdoli A., Farokhnejad M.R., Nazari H. and Kiabi B. 2017.** The role of temperature and daytime as indicators for the spawning migration of the Caspian lamprey *Caspiomyzon wagneri* Kessler, 1870. *Journal of Applied Ichthyology*, 33(3): 553–557.
- Adams B. and Hutchings J.A. 2003.** Microgeographic population structure of brook charr: A comparison of microsatellite and mark-recapture data. *Journal of Fish Biology*, 62(3): 517–533.
- Ahmadi M., Amiri B.M., Abdoli A., Fakharzade S.M.E. and Hoseinifar S.H. 2011.** Sex steroids, gonadal histology and biological indices of fall and spring Caspian lamprey (*Caspiomyzon wagneri*) spawning migrants in the Shirud River, Southern Caspian Sea. *Environmental Biology of Fishes*, 92(2): 229–235.
- Balloux F. and Lugon-Moulin N. 2002.** The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11(2): 155–165.
- Bassam B.J., Caetano-Anolles G. and Gressshoff P.M. 1991.** Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 196(1): 80–83.
- Beamish R.J. 1980.** Adult biology of the river lamprey (*Lampetra ayresi*) and the Pacific lamprey (*Lampetra tridentate*) from the Pacific coast of Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37(11): 1906–1923.
- Beamish R.J. and Withler R.E. 1986.** A polymorphic population of lampreys that may produce parasitic and a nonparasitic varieties. *Indo-Pacific Fish Biology: Proceedings of the Second International Conference on Indo-Pacific Fishes*. Ichthyological Society of Japan, Japan. P: 31–49.
- Coad B.W. 2016.** Review of the Lampreys of Iran (Family Petromyzontidae). *International Journal of Aquatic Biology*, 4(4): 256–268.
- Dewoody J. and Avise J. 2000.** Microsatellite variation in marine, freshwater, and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*, 56: 461–473.
- Dorak M.T. 2005.** Basic population genetics. Retrieved April 18, 2014, from <http://www.dorak.info/genetics/popgen.html>.
- Gaigher A., Launey S., Lasen E., Besnard A.L. and Evanno G. 2013.** Characterization of thirteen microsatellite markers in river and

- brook lampreys (*Lampetra fluviatilis* and *L. planeri*). Conservation Genetics Resources, 5(1): 141–143.
- Garcia De Leon F.J., Chikhi L. and Bonhomme F. 1997.** Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural populations of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). Molecular Ecology, 6(1): 51–62.
- Gess R.W., Coates M.I. and Rubidge B.S. 2006.** A lamprey from the Devonian period of South Africa. Nature, 443(7114): 981–984.
- Hallerman E.M. 2003.** Population Genetics: Principles and Applications for Fisheries Scientists. American Fisheries Society, USA. 475P.
- Hilborn R., Francis R.C. and Rogerson D.E. 2006.** Marine and freshwater climatic factors affecting interannual variation in the timing of return migration to fresh water of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). Fisheries Oceanography, 15(1): 1–24.
- Holcik J. 1986.** The Freshwater Fishes of Europe, Vol. 1, Part 1: Petromyzontiformes. AULA, Germany. 313P.
- Holcik J. and Olah J. 1992.** Fish, fisheries and water quality in Anzali Lagoon and its watershed. Food and Agriculture Organization. <http://www.fao.org/3/AD192E/AD192E00.htm>.
- <http://www.fao.org/3/AD192E/AD192E00.htm>
- Imanpoor M.R. and Abdollahi M. 2011.** Serum biochemical parameters of caspian lamprey (*Caspiomyzon wagneri*) during final spawning migration. World Applied Sciences Journal, 12(5): 600–606.
- Ivanov V.P. and Velasenko A.D. 2001.** The relict fish of Caspian Sea, The sturgeon. Fish Farming and Fishing, 1: 20–21.
- Kelso J. and Gardner W. 2000.** Emigration, upstream movement, and habitat use by sterile and fertile sea lampreys in three Lake Superior tributaries. North American Journal of Fisheries Management 20(1): 144–153.
- Kiabi B.H., Abdoli A. and Naderi M. 1999.** Status of the fish fauna in the South Caspian Basin of Iran. Zoology in the Middle East, 18(1): 57–65.
- Kuszevski J. and Witkowski A. 1995.** Morphometrics of the autumn spring run populations of the river lamprey, *Lampetra fluviatilis* [Linnaeus, 1758] from the Polish rivers. Acta Ichthyologica et Piscatoria 1(25): 57–70.
- Lazar I. and Lazar I. 2017.** Gel Analyzer 2010a: Freeware 1D gel

- electrophoresis image analysis software.
- Lin B., Zhang Z., Wang Y., Kenneth P., Yamazaki Y. and Close D. 2008.** Amplified fragment length polymorphism assessment of genetic diversity in Pacific lampreys. *North American Journal of Fisheries Management*, 28(4): 1182–1193.
- Lu C. 1998.** Diversity of Cephalopoda from the waters around Taiwan. *Phuket Marine Biological Center Special Publication*, 18(2): 331–340.
- Maitland P.S., Morris K.H. and Est K. 1994.** The ecology of lampreys (Petromyzonidae) in the Loch Lomond area. *Hydrobiologia*, 290(1-3): 105–120.
- Matthaeis E.D., Davolos D., Cobolli M. and Ketmaier V. 2000.** Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations of four talitrid species in the Mediterranean Sea. *Evolution*, 54(5): 1606–1613.
- McFarlane C.T. and Docker M.F. 2009.** Characterization of 14 microsatellite loci in the paired lamprey species *Ichthyomyzon unicuspis* and *I. fossor* and cross amplification in four other *Ichthyomyzon* species. *Conservation Genetics Resources*, 1(1): 377–380.
- McQuown E.C., Sloss B.L., Sheehan R.J., Rodzen J., Tranah G. and May B. 2000.** Microsatellite analysis of genetic variation in sturgeon: New primer sequences for *Scaphirhynchus* and *Acipenser*. *Transactions of the American Fisheries Society*, 129(6): 1380–1388.
- Moser M.L., Matter A.L., Stuehrenberg L.C. and Bjornn T.C. 2002.** Use of an extensive radio receiver network to document Pacific lamprey (*Lampetra tridentata*) entrance efficiency at fishways in the Lower Columbia River, USA. Pp 45–53 in *Aquatic Telemetry*, Springer.
- Nazari H. and Abdoli A. 2010.** Some reproductive characteristics of endangered Caspian lamprey (*Caspiomyzon wagneri* Kessler, 1870) in the Shirud River southern Caspian Sea, Iran. *Environmental Biology of Fishes*, 88(1): 87–96.
- Nazari H., Abdoli A., Kiabi B. and Coad B. 2017.** Biology and conservation status of Caspian lamprey of Iran: A review. *Bull Lampetra*, 8: 6–32.
- Nei M. 1978.** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583–590.
- Peakall R. and Smouse P.E. 2006.** GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6(1): 288–295.



- Quintella B., Andrade N., Koed A. and Almedia P.R. 2004.** Behavioural patterns of sea lampreys' spawning migration through difficult passage areas, studied by electromyogram telemetry. *Journal of Fish Biology*, 65(4): 961–972.
- Reisenbichler R. and Rubin S. 1999.** Genetic changes from artificial propagation of Pacific salmon affect the productivity and viability of supplemented populations. *ICES Journal of Marine Science*, 56(4): 459–466.
- Rezvani Gilkolaei S. 1997.** Molecular population genetic studies of sturgeon species in the South Caspian Sea. Ph.D. Thesis, University of Wales Swansea, UK. 196P.
- Ryman N. 1991.** Conservation genetics considerations in fishery management. *Journal of Fish Biology*, 39: 211–224.
- Sambrook J. and Russell D.W. 2006.** Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells using formamide. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1): pdb. prot3225.
- Schedina I.M., Pfautsch S., Hartmann S., Dolgener N., Polgar A., Bianco P., Tiedemann R. and Ketmairer V. 2014.** Isolation and characterization of eight microsatellite loci in the brook lamprey *Lampetra planeri* (Petromyzontiformes) using 454 sequence data. *Journal of Fish Biology*, 85(3): 960–964.
- Shaklee J.B., Tamaru C.S. and Waples R.S. 1982.** Speciation and evolution of marine fishes studied by the electrophoretic analysis of proteins. *Pacific Science*, 36(2): 141–157.
- Takeshima H., Yokoyama R., Nishida M. and Yamazaka Y. 2005.** Isolation and characterization of microsatellite loci in the threatened brook lamprey *Lethenteron* sp. N. *Molecular Ecology Notes*, 5(4): 812–814.
- Thorpe J.P. and Sol-Cave A.M. 1994.** The use of allozyme electrophoresis in vertebrate systematics. *Zoologica Scripta*, 23: 8–18.
- Waples R.S., Teel D.J., Myers J.M. and Marshall A.R. 2004.** Life-history divergence in Chinook salmon: Historic contingency and parallel evolution. *Evolution*, 58(2): 386–403.



Research Paper

**Investigation on population genetic structure of autumn and spring migratory Caspian lamprey (*Caspiomyzon wagneri* Kessler, 1870) in the Shiroud River by using microsatellite molecular technique**

Hamed Meftah<sup>1</sup>, Mohammad Ali Salari Aliabadi<sup>2\*</sup>, Rahim Abdi<sup>2</sup>,  
Mohammad Pourkazemi<sup>3</sup>, Ayoub Farhadi<sup>4</sup>

Received: September 2019

Accepted: October 2019

**Abstract**

The genetic diversity of Caspian lamprey, (*Caspiomyzon wagneri*) was studied using microsatellite technique in Shiroud River. 67 caudal and dorsal fin samples were collected from spawned *Caspiomyzon wagneri* caught from Shiroud River in autumn 2015 and spring 2016 seasons. Genomic DNA was extracted using ammonium acetate method and polymerase chain reactions (PCR) were conducted using 10 paired microsatellite primers. The quantity and quality of DNA were assessed using spectrophotometry and a horizontal electrophoresis in 1% agarose gel methods and were stained using silver nitrate method. The results showed that it was produced six polymorphic and four monomorphic loci. The average real and effective number of alleles in autumn migrant were 2.66 and 1.88 and 3.16 and 2.06 in spring migrant. The mean observed and expected heterozygosity in autumn migrant were calculated  $0.239 \pm 0.101$  and  $0.363 \pm 0.116$  and  $0.374 \pm 0.110$  and  $0.434 \pm 0.093$  in spring migrant, respectively. More loci were out of Hardy-Weinberg equilibrium ( $P < 0.05$ ). Based on the analysis of molecular variance,  $F_{st}$  and  $R_{st}$  were 0.153 and 0.200 that showed significant differences ( $P < 0.01$ ). This study gave evidence of the presence of two separated populations in studied river that should be considered in restructuring reserves.

**Key words:** *Caspiomyzon wagneri*, Genetic Structure, Microsatellite, Shiroud River.

1- Ph.D. in Marine Biology, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.

2- Associate Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.

3- Professor in Iranian Fisheries Science Research Institute, Tehran, Iran.

4- Associate Professor in Department of Animal Science and Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Science and Natural Resources University, Sari, Iran.

\*Corresponding Author: [salari@kmsu.ac.ir](mailto:salari@kmsu.ac.ir)