**مقاله علمی -پژوهشی:**

# شناسایی و اعتبارسنجی نشانگرهای توالی ساده تکراری (SSR) برای ماهی گطان (*Luciobarbus xanthopterus*) بر پایه داده‌های RNA-Seq

غزال محمدی اهوازی[۱]، محمدتقی بیگی نصیری[۱]، محمود نظری*[۱]، آیه سادات صدر[۲]

*M.nazari@asnrukh.ac.ir

۱- گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

۲- پژوهشکده آبزی‌پروری جنوب کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: مهر ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۴۰۳

## چکیده

این پژوهش به منظور شناسایی و اعتبارسنجی نشانگرهای توالی ساده تکراری (SSR) مربوط به گونه ماهی گطان (*Luciobarbus xanthopterus*) با استفاده از داده‌های RNA-Seq انجام شد. پس از جداسازی بافت کبد، استخراج RNA از نمونه‌ها انجام گرفت. نمونه‌ها با استفاده از پلتفرم ایلومینا Novaseq 6000 توالی‌یابی شدند. برای بازسازی رونوشت‌ها، از نرم‌افزار Trinity (نسخه ۲.۱۵.۱) استفاده شد. شناسایی SSRs با استفاده از از پایگاه MISA انجام شد. پرایمرهای مورد نیاز در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ۵ نشانگر SSR با نرم افزار PRIMER 3 طراحی و بر ۴۵ ماهی گطان مورد ارزیابی قرار گرفت. سرهم‌بندی رونوشت‌ها با برنامه Trinity، ۹۴۱،۸۹۴ یونی ژن و ۱،۷۶۸،۶۶۲ ترانسکریپت ایجاد کرد. در این مطالعه، بررسی ۱،۲۷۶،۸۲۵ توالی به‌وسیله نرم‌افزار MISA، منجر به شناسایی تعداد ۳۴۹،۸۷۱ نشانگر SSR شد. در میان SSRs ، تکرارهای دو و سه نوکلئوتیدی به‌ترتیب با ۸۹/۳۷ درصد و ۸/۰۵ درصد، بیشترین تعداد تکرار را به‌خود اختصاص دادند. ۵ پرایمر مورد استفاده، ۲ جایگاه چندشکلی را نشان دادند. هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده برای جایگاه MN1359 به‌ترتیب ۰/۷۸۵ و ۰/۱۴۷ و برای جایگاه GM1371 به‌ترتیب ۰/۷۷۰ و ۰/۰۹۳ محاسبه شد. به‌علاوه، آزمون کای مربع نشان داد که جمعیت برای هر دو جایگاه در تعادل هاردی-وینبرگ قرار ندارد. نتایج ارزیابی معیارهای مختلف تنوع ژنتیکی همگی گویای کاهش تنوع در بین جمعیت مورد مطالعه بود. به طور کلی، نتایج این تحقیق نشان داد که SSRs جدید می‌توانند برای اصلاح نژاد، مطالعات ژنومیک عملکردی و بررسی تنوع ژنتیکی ماهی گطان مفید باشند.

**لغات کلیدی:** گطان، RNA-Seq، ترانسکریپتوم، توالی‌های ساده تکراری

*نویسنده مسئول

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-01-29 ]

**مقدمه**

اگرچه کشور ایران در یک منطقه خشک و نیمه خشک قرار دارد، اما تنوع ماهیان آبهای داخلی ایران بسیار بالاست و حوضه‌های آبریز خزر و دجله دارای بیشترین تنوع گونه‌ای هستند که در این میان برخی از گونه‌های ماهیان آبهای داخلی ایران مانند جنس باربوس‌ها دارای ارزش صید اقتصادی هستند. اما با وجود اهمیت خاص این مناطق به عنوان متنوع‌ترین زیستگاه‌های ماهیان آبهای داخلی ایران، متاسفانه تهدیدهای زیادی نیز این تنوع ارزشمند را تهدید می‌کند که از جمله عوامل تهدید کننده تنوع زیستی ماهیان آبهای داخلی ایران می‌توان به خشک شدن آب رودخانه‌ها، ساخت سدها، بهره‌برداری بیش از حد از برخی گونه‌ها و عدم شناخت کافی از وضعیت دقیق گونه‌ها اشاره کرد (Abdoli, 2016).

ماهی گطان (*Luciobarbus xanthopterus* Heckel, 1843) از جمله ماهیان با ارزش و اقتصادی در مناطق جنوب غربی ایران است که در بخش‌هایی از منابع آبی استان خوزستان و مرزی آن زیست می‌کند (Hosseinzadeh sahafi, 2017). این ماهی در طبیعت از رشد بسیار خوبی برخوردار است و به خانواده کپور ماهیان (Cyprinidae) و جنس *Luciobarbus* (Fricke *et al*., 2007) تعلق دارد. علاوه‌براین، به دلیل کوتاهی میزان طول نسبی روده و محتویات آن، می‌توان استنباط کرد که گطان یک ماهی همه‌چیزخوار است که به طور عمده از گیاهان و بی‌مهرگان تغذیه می‌کند (Eskandari *et al*., 2003). گونه گطان گستره وسیعی دارد و از گونه‌های ارزشمند در میان باربوس ماهیان منطقه به‌شمار می‌رود، ولی متاسفانه برخی از گزارش‌ها حاکی از آن است که جمعیت این گونه در آبهای ایران و عراق کاهش یافته است (Mortezavi Zadeh *et al*., 2011). همچنین این گونه تحت تاثیر سدها و برداشت آب و صید بی‌رویه، در معرض خطر انقراض قرار دارد (Freyhof, 2014).

کاهش تنوع ژنتیکی به‌ویژه برای جمعیت‌هایی که با شرایط محیطی استرس‌زا مواجه هستند، ممکن است منجر به کاهش زنده‌مانی جمعیت و افزایش احتمال انقراض شود (Vandewoestijne *et al*., 2008; Markert *et al*., 2010).

نشانگرهای ژنتیکی مولکولی از ابزارهای قدرتمند برای تشخیص منحصربه‌فرد بودن ژنتیکی افراد، جمعیت‌ها یا گونه ها هستند (Doveri *et al*., 2008; Chenani *et al*., 2021). ریزماهواره‌ها به عنوان نشانگرهای ژنتیکی در سرتاسر ژنوم یوکاریوتی توزیع شده‌اند و برای تجزیه‌وتحلیل تنوع در بسیاری از گونه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (Wolfus *et al*., 1997; Ellis and Burke, 2007). توالی های ساده تکراری (SSRs)[1] که به عنوان ریزماهواره‌ها نیز شناخته می‌شوند، تکرارهای کوتاه پشت سر هم هستند که معمولاً در ژنوم‌ها یا رونوشت‌های موجودات مختلف یافت می شوند (Xia *et al*., 2016). نشانگرهای مولکولی SSR در مناطق کد کننده و غیر کد کننده ژنوم توزیع شده‌اند که امکان تمایز ژنوتیپ‌ها را فراهم می‌کنند. جایگاه‌های ریزماهواره چند شکلی، به طور گسترده برای تجزیه‌وتحلیل ساختار ژنتیکی جمعیت استفاده می‌شوند (Romero *et al*., 2019). به طور کلی، این نشانگرها به دلیل تکرارپذیری، فراوانی، ماهیت چند آللی، غلبه، پوشش ژنومی بالا و تنوع در کل ژنوم، بسیار مفید هستند (Jabeen *et al*., 2023). از دیگر مزایای این منابع مولکولی می‌توان به سهولت استفاده نسبی آنها برای مقایسه بین همتایان ژنومی و کیفیت بالا اشاره کرد. همچنین مشخص شده است که تغییرات SSRs ممکن است موجب تغییر فعالیت ژن یا تنظیم بیان ژن شود. از این‌رو، فرآیندهای بیولوژیک و سلولی، از جمله ساختار پروتئین و رونویسی ژن را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Dang *et al*., 2020).

توالی‌یابی RNA (RNA-Seq)[2] یک فن‌آوری مولکولی کارآمد برای مطالعه تکامل گونه‌ها، تعیین بیان ژن‌ها و نقشه‌برداری ژنتیکی و ... است (Rai *et al*., 2016). در واقع، این فناوری با فراهم کردن امکان کمی‌سازی سطح بیان همه ژن‌ها به طور همزمان، رویکرد جامعه تحقیقاتی را برای مطالعه بیان ژن متحول کرده است (Geraci *et al*., 2020). همچنین توالی‌یابی RNA برای انجام مطالعات ژنتیکی و

[1] Simple sequence repeats (SSRs)
[2] RNA sequencing



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-01-29 ]

مولکولی به‌ویژه در موجودات غیر مدل که اطلاعات ژنتیکی بسیار اندکی از آنها موجود است، کاربرد زیادی دارد (Ghorbani *et al.*, 2020). مطالعات متعددی در ارتباط با شناسایی مارکرهای SSR بر پایه داده‌های RNA-Seq در گونه‌های مختلف ماهی مانند *Brachymystax lenok* (Wen *et al.*, 2020)، *Patagonian toothfish* (Touma *et al.*, 2019)، *Betta splendens* (Chen *et al.*, 2021)، *Coilia nasus* (Fang *et al.*, 2015) و *Amphiprion ocellaris* (Yang *et al.*, 2018) مورد بررسی قرار گرفته است.

پژوهش‌های متعددی در کشور ایران جهت بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت آبزیان در گونه‌های مختلف مانند سیاه کولی (Mohamadian *et al.*, 2010)، مارماهی دهان گرد خزری (Bahmaninejad *et al.*, 2018)، سگ ماهی آنگورا (Kashiri *et al.*, 2015)، صبیتی (Ghasemi *et al.*, 2019)، خیاطه (Hosseini *et al.*, 2015) و شیربت (Karami Nasab *et al.*, 2014) صورت گرفته است. اما به رغم این‌که ماهی گطان از ماهی‌های مرغوب منطقه به‌شمار می‌آید (Mortezavi Zadeh *et al.*, 2011)، تاکنون هیچ‌گونه اطلاعات ژنتیکی برای این گونه گزارش نشده است. از این‌رو، با توجه به اهمیت ماهی گطان در منطقه جنوب غرب ایران و فقدان هر گونه اطلاعات در رابطه با ساختار ژنتیکی آن و اهمیت و نقش موثر تنوع ژنتیکی برای حفظ ذخایر تنوع گونه، مطالعه حاضر به منظور شناسایی و اعتبار سنجی نشانگرهای SSR مربوط به این گونه ماهی با استفاده از داده‌های RNA-Seq برای نخستین بار اجرا شد.

## مواد و روش‌ها

در این پژوهش به منظور شناسایی نشانگرهای SSR در ماهی گطان (*Luciobarbus xanthopterus*) ابتدا دو نمونه ماهی گطان از رودخانه کارون صید و به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از جداسازی بافت کبد، استخراج RNA از نمونه‌ها، با استفاده از کیت ستونی استخراج RNA (شرکت دنازی است آسیا) انجام گرفت. در نهایت به منظور بررسی RNA استخراجی و تعیین کیفیت و کمیت آن، از روش الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific Nanodrop. 2000. USA) استفاده شد. پس از استخراج RNA و اطمینان از کمیت و کیفیت نمونه‌های مورد نظر، شرکت توپازژن کاوش، نمونه‌ها را برای توالی‌یابی به خارج از کشور شرکت Novogene ارسال کردند. توالی‌یابی نمونه‌ها با استفاده از فناوری ایلومینا Novaseq 6000 صورت پذیرفت.

پس از دریافت داده‌های توالی‌یابی، قبل از تجزیه‌وتحلیل داده‌ها، به منظور بررسی و کنترل کیفیت داده‌های حاصل از توالی‌یابی از نرم‌افزار FastQC (نسخه 0.11.5) استفاده شد. سپس برای بازسازی رونوشت‌ها بر مبنای خوانش‌های توالی، از نرم‌افزار Trinity (نسخه 2.15.1) در حالت پیش‌فرض (K-mer ۲۵) استفاده شد. همچنین به منظور حذف توالی‌های تکراری و خوشه‌بندی خوانش‌ها از نرم‌افزار CD-HIT (نسخه 4.7) استفاده گردید. پس از کلاستربندی خوانش‌ها برای شناسایی جایگاه‌های ریزماهواره موجود در رونوشت‌های مونتاژ شده حاصل از داده‌های RNA-seq گونه گطان از وب سرور MISA به آدرس https://webblast.ipk-gatersleben.de/misa با پارامترهای پیش‌فرض استفاده شد (Beier *et al.*, 2017). در ادامه به منظور اعتبارسنجی نشانگرهای SSR شناسایی شده جدید، ۴۵ نمونه از باله دمی ماهی گطان صید شده از رودخانه کارون تهیه شد. پس از استخراج DNA (طبق پروتکل کیت ستونی استخراج DNA ژنومیک شرکت دنا زیست آسیا)، کیفیت DNA های استخراجی به‌وسیله ژل آگارز ۱ درصد تعیین شد. در نهایت ۵ آغازگر، برای نشانگرهای SSR شناسایی شده جدید، با نرم‌افزار PRIMER 3 از پایگاه داده NCBI طراحی شد (جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و ۳۵ چرخه بر نمونه‌های DNA استخراجی از باله دمی ماهی گطان با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Bio Rad و روش Touchdown صورت گرفت. برنامه حرارتی مورد استفاده به شرح ذیل است. دمای واسرشته‌سازی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه و به دنبال آن ۳۵ چرخه هر کدام شامل ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۵۹-۶۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و ۱۰ دقیقه برای تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-01-29 ]

صورت پذیرفت. مرحله اتصال آغازگرها طبق این روش به دو چرخه دمایی ۱۰ و ۲۵ تایی تقسیم شد که به ازاء هر چرخه ۰/۵ درجه سانتی‌گراد از دمای اتصال اولیه در ۱۰ چرخه اولیه کاهش یافت. پس از آن کیفیت محصولات حاصل از تکثیر به‌وسیله تکنیک PCR، با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۳ درصد سنجیده شد. پس از تهیه تصویر ژل‌ها به‌وسیله دستگاه ژل‌داک، برای سنجش وزن مولکولی محصولات PCR بر حسب جفت باز (bp) و تعیین ژنوتیپ‌ها از نرم‌افزار GelAnalyzer (نسخه 19.1) استفاده گردید. در ادامه به منظور تجزیه‌وتحلیل‌های آماری برای جایگاه‌هایی که چندشکلی در آنها مشاهده شده از جمله، تعداد آلل‌های واقعی (Na)، تعداد آلل‌های موثر درهر لوکوس (Ne)، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He) و شاخص تنوع شانن، از نرم‌افزار GenAlex (نسخه 6.3) استفاده شد. توالی SSR چندشکل شناسایی شده با سایر توالی‌های موجود در پایگاه داده NCBI هم‌ردیف شد و در نهایت درخت فیلوژنتیک با استفاده از روش پیوند همجواری (Neighbor Joining)، به‌وسیله Blast Tree View Widget از پایگاه داده NCBI ترسیم گردید.

**جدول ۱: خصوصیات آغازگرهای استفاده شده برای اعتبار سنجی SSR ها در این مطالعه**

**Table 2: Characterization of primers used for validation of SSRs in this study.**

| Number | SSR sequence | Primer sequence | Amplicon size (bp) | Temperature (ºC) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | (ATGAGC)13 | F: CCAGCAGCCACCCTATATCC<br>R: CTTGTGCGAGTTTGACGCTC | 258 | 60 |
| 2 | (GA)34 | F: TCACCATCGCCATAATCCGC<br>R: CGTATCGCCGGCATTAGCA | 174 | 58 |
| 3 | (AC)35 | F: TTCTTTCGTCCGGTGCCTTA<br>R: CAAAGTCTCCTGTGAGGGCT | 283 | 59 |
| 4 | (AGAT)23 | F: CTTGGTTGCAAGCAGCGTC<br>R: GCAACCAGGGTCCAAAATGAA | 225 | 60 |
| 5 | (GA)34 | F: TCGAGATCTTTGTCACCAGCTT<br>R: GTGGCGGATATGGAGGTTCG | 363 | 60 |

## نتایج

rRNAs تقریباً ۷۰ درصد از کل RNAs سلول را تشکیل می‌دهند، به همین دلیل مشاهده باندهای آن (۲۸S و ۱۸S) بر ژل آگارز به صورت شارپ می‌تواند بیانگر یک استخراج مطلوب و باندهای تخریب شده دال بر تخریب RNA و پایین بودن کیفیت باشد. استخراج RNA از بافت کبد، با موفقیت صورت پذیرفت و نتایج استخراج RNA بر الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد گویای فقدان هر گونه باند کاذب یا اسمیر و عدم تجزیه RNA طی فرایند استخراج است (شکل ۱).

توالی‌یابی RNA از نمونه‌های بافت کبد ماهی گطان، به‌ترتیب ۲۴۲۵۶۳۵۵ و ۴۸۳۰۹۸۲۱ خوانش خام برای نمونه‌های G-L-R و G-L-F تولید کرد. پس از دریافت داده‌های حاصل از توالی‌یابی در فرمت FastQ، بررسی کیفیت داده‌ها به‌وسیله آزمون‌های کنترل کیفیت نرم‌افزار FastQC نشان‌دهنده کیفیت بالای خوانش‌ها جهت آنالیزهای بعدی در ادامه روند کار بود (شکل ۲).

بازسازی رونوشت‌ها به روش *De novo* با استفاده از نرم‌افزار Trinity در مجموع ۹۴۱۸۹۴ یونی ژن و ۱۷۶۸۶۶۲ ترانسکریپت ایجاد کرد. همچنین متوسط طول کانتیگ (contig) ۳۴۵ محاسبه شد. نتایج حاصل از نرم‌افزار Trinity در جدول ۲ ارائه شده است.

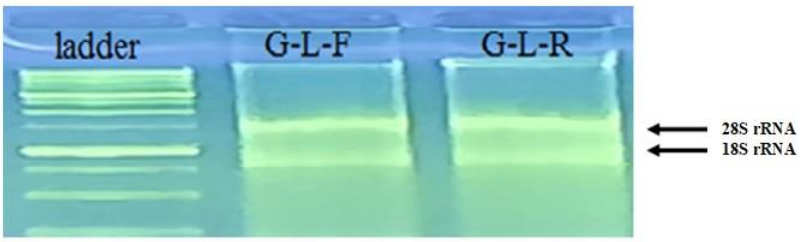
در ادامه به منظور شناسایی نشانگرهای SSR جدید، ترانسکریپتوم[1] گطان با استفاده از وب سرور MISA مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت و در نهایت با بررسی تعداد ۱۲۷۶۸۲۵ توالی با اندازه کل ۷۱۳۱۷۶۹۸۵ جفت باز، در

[1] Transcriptome



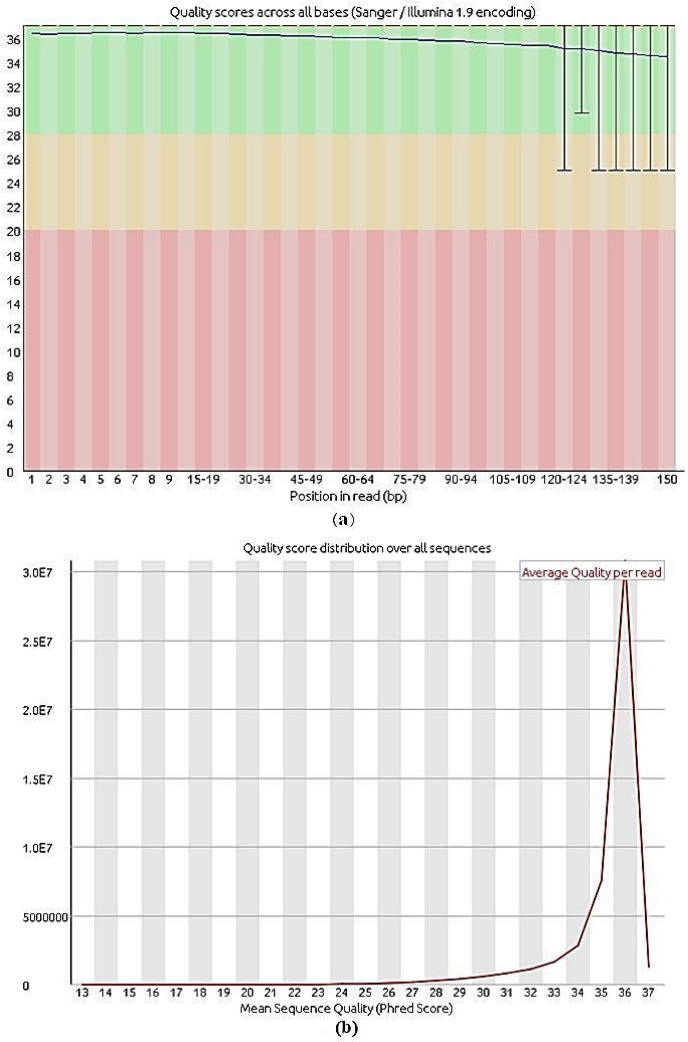
[ Downloaded from isfj.ir on 2026-01-29 ]

نهایت منجر به شناسایی تعداد ۳۴۹۸۷۱ نشانگر SSR جدید گردید که از این میان ۲۲۹۹۹۳ توالی، حاوی SSR بودند. همچنین تعداد ۷۴۱۷۳ توالی‌های حاوی بیش از یک SSR شناسایی شدند (جدول ۳).




**شکل ۱: کیفیت RNA استخراجی از بافت کبد ماهی گطان (*Luciobarbus Xanthopterus*) بر ژل آگارز ۱ درصد**

**Figure 1: The qualification of RNA extraction from liver tissue of yellowfin barbel (*Luciobarbus Xanthopterus*) on 1% agarose gel**




**شکل ۲: نمودار کیفیت توالی‌یابی به ازاMI هر باز (a) و امتیاز کیفیت به ازای توالی (b)**

**Figure 2. Quality assessment tests. (a) per base and (b) per sequence quality scores**



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-01-29 ]

**جدول ۲: نتایج حاصل از رونوشت‌های اسمبل شده در نرم‌افزار Trinity**

**Table 4: Results of assembled transcripts in Trinity software**

| Trinity | Statistics |
|---|---|
| 941894 | Total trinity genes |
| 1768662 | Total trinity transcripts |
| 35.97 | % GC |
| 821 | Contig N50 |
| 609.24 | Average contig |
| 345 | Median contig length |
| 1077536230 | Total assembled bases |

با توجه به نتایج گزارش شده از بررسی ۱۲۷۶۸۲۵ توالی، تکرارهای دو و سه نوکلئوتیدی به‌ترتیب با ۸۹/۳۷ درصد و ۸/۰۵ درصد، بیشترین تعداد تکرار را به‌خود اختصاص دادند و توالی‌های ۶ نوکلئوتیدی دارای کمترین تعداد بودند (جدول ۴).

شایان ذکر است، برای تشخیص جایگاه SSR ترانسکریپتوم در توالی‌های مونتاژ شده حداقل از ۶، ۵، ۵، ۵ و ۵ واحد تکرار پیوسته به‌ترتیب برای شناسایی موتیف‌های SSR کامل دی، تری، تترا، پنتا و هگزا نوکلئوتیدی استفاده شد. از مجموع SSRs دی نوکلئوتید شناسایی شده (AC/GT، AG/CT، AT/AT و CG/CG)، موتیف AG/CT با فراوانی ۶۵/۲۱ درصد، بیشترین فراوانی را به‌خود اختصاص داد درحالی‌که موتیف CG/CG با درصد فراوانی ۰/۰۷ بسیار نادر است (شکل ۳).

**جدول ۳: نشانگرهای SSR شناسایی شده با استفاده از وب سرور MISA**

**Table 3: SSR markers detected using the MISA web server**

| Number | SSR markers |
|---|---|
| 1276825 | Total number of sequences examined |
| 713176985 | Total size of examined sequences (bp) |
| 349871 | Total number of identified SSRs |
| 229993 | Number of SSR containing sequences |
| 74173 | Number of sequences containing more than 1 SSR |
| 61192 | Number of SSRs present in compound formation |

**جدول ۴: خلاصه ای از نوع و تعداد موتیف های تکراری**

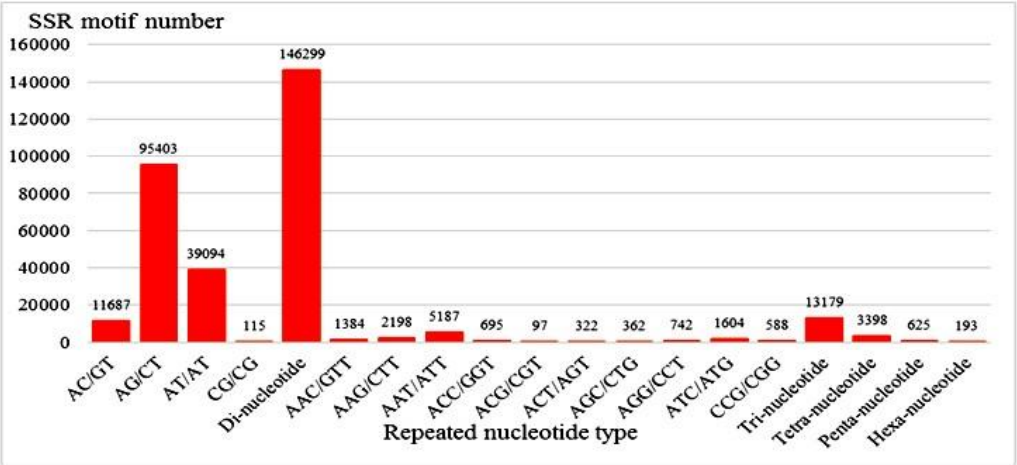
**Table 4: Summary of the type and number of repetitive motifs**

| Unit size | Number of SSRs | Frequency (%) |
|---|---|---|
| Di-nucleotide | 146299 | 89.37 |
| Tri- nucleotide | 13179 | 8.05 |
| Tetra- nucleotide | 3398 | 2.07 |
| Penta- nucleotide | 625 | 0.38 |
| Hexa- nucleotide | 193 | 0.13 |

به دلیل فقدان هر گونه اطلاعات در ارتباط با ژنوم گونه ماهی گطان، ابتدا SSRs شناسایی و سپس به منظور اعتبارسنجی نشانگرهای SSR شناسایی شده جدید، ۵ جفت پرایمر طراحی و با کمک روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر شدند. استخراج DNA از نمونه‌های بافت باله دمی، با موفقیت صورت گرفت. تک باند مشاهده شده در مورد تک تک نمونه‌ها بیانگر صحت انجام آزمایش استخراج DNA از نمونه‌های مورد نظر بود. پس از اطمینان از کیفیت باندها بر ژل آگارز، نسبت طول موج‌های ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر جهت بررسی میزان خلوص، اندازه‌گیری شد. این نسبت در نمونه‌های استخراجی در این پژوهش ۲-۱/۸ بود. پس از بررسی کمیت و کیفیت DNAs استخراجی، واکنش PCR بر نمونه‌های استخراجی اجرا شد و محصولات حاصل آن با استفاده از ژل آگارز ۳ درصد، مورد بررسی قرار گرفتند. از ۵ پرایمر مورد استفاده در این تحقیق، ۲ جایگاه (پرایمر شماره ۳ و ۴) چندشکلی بوده و سایر جایگاه‌ها تک باند بودند. در این تحقیق، این جایگاه به صورت MN1359 و GM1371 نامگذاری شد. دامنه آللی مشاهده شده برای جایگاه MN1359، ۱۵۷-۲۲۵ جفت نوکلئوتید و برای جایگاه GM1371، ۲۶۰-۳۰۰ جفت نوکلئوتید بود. در جدول ۵ پارامترهای آماری برآورد شده برای محاسبه تنوع ژنتیکی از جمله مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده، میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار و تعداد آلل‌های واقعی، اندازه آلل‌های موثر و تعداد نمونه برای جایگاه MN1359 و GM1371 جمعیت گونه گطان استان خوزستان ارائه شده است.



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-01-29 ]




**شکل ۳: توزیع فراوانی توالی‌های کوتاه تکراری (SSR ها) بر پایه نوع موتیف**

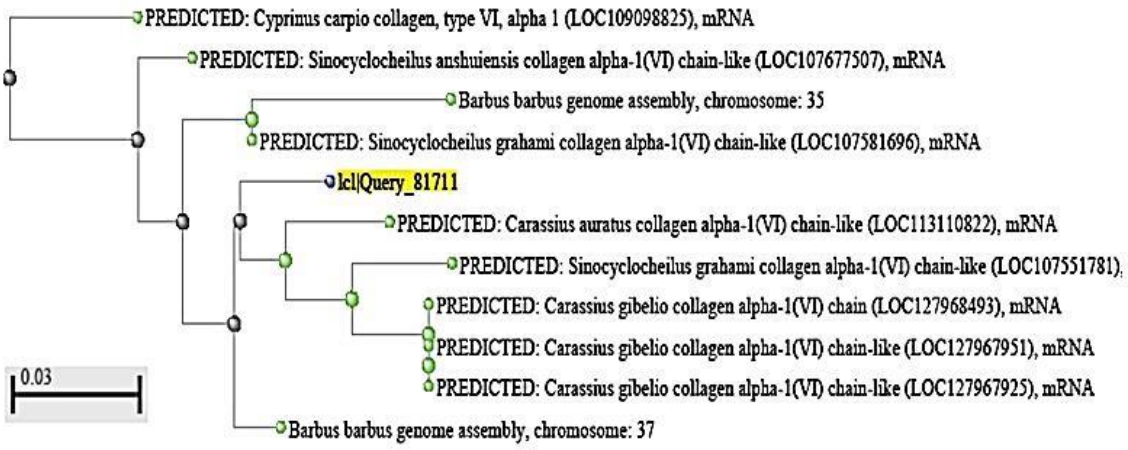
**Figure 3: Frequency distribution of simple sequence repeats (SSRs) based on motif type**

**جدول ۵: پارامترهای آماری برآورد شده برای محاسبه تنوع ژنتیکی جایگاه MN1359 و GM1371 در جمعیت گونه گطان**

**Table 5: Statistical parameters estimated to calculate the genetic diversity of the locus MN1359 and GM1371 in yellowfin barbel population**

| Locus | number of samples | Different Alleles (Na) | The number of effective alleles $N_e$ | Shannon index (I) | Observed heterozygosity $H_0$ | Expected heterozygosity $H_e$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| MN1359 | 45 | 5 | 4.651 | 1.568 | 0.147 | 0.785 |
| GM1371 | 45 | 5 | 4.342 | 1.532 | 0.093 | 0.770 |

تست کای اسکور انجام شده بر جمعیت ماهی گطان رودخانه کارون عدم برقراری تعادل هاردی-وینبرگ را برای هر دو جایگاه نشان داد. مقدار کای مربع برای جایگاه‌های MN1359 و GM1371 به‌ترتیب ۱۹۸/۸۱ و ۱۹۵/۷۲ به‌دست آمد که در سطح ۱ درصد، معنی‌دار بود. با استفاده از توالی SSR جدید شناسایی شده در این تحقیق (جایگاه MN1359)، درخت فیلوژنتیک برای این توالی و سایر توالی‌های موجود در پایگاه NCBI نیز رسم شد (شکل ۴).




**شکل ۴: رابطه فیلوژنتیک جایگاه MN1359 با سایر توالی‌های موجود در پایگاه داده NCBI**

**Figure 4: Phylogenetic relationship of the MN1359 locus with other sequences in the NCBI database**



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-01-29 ]

## بحث

با وجود اهمیت اقتصادی ماهی گطان، تعداد پژوهش‌های صورت گرفته در ارتباط با ارزیابی جنبه‌های مختلف این گونه، اندک است. بررسی ژنوم، ترانسکریپتوم و ساختار جمعیت ماهی گطان (*Luciobarbus xanthopterus*) به عنوان یک گونه در معرض انقراض (Freyhof, 2014) ضروری است. هیچ‌گونه اطلاعاتی در زمینه ژنوم ماهی گطان که در خطر انقراض است، در دسترس نیست. یک ابزار سریع و مقرون به‌صرفه برای شناسایی نشانگرهای مولکولی چندشکلی به‌ویژه SSRs، در مقایسه با روش‌های جداسازی سنتی، توالی‌یابی ترانسکریپتوم است (Zane *et al.*, 2002). لذا، در این تحقیق نشانگرهای SSR مربوط به گونه ماهی گطان با استفاده از داده‌های RNA-Seq شناسایی شدند و جهت صحت کار مورد ارزیابی قرار گرفتند. امروزه نشانگرهای SSR رویکردی موثر برای شناسایی ارتباطات فنوتیپی و منبع مناسبی برای ایجاد نقشه‌های ژنتیکی، تجزیه‌وتحلیل تنوع ژنتیکی و انتخاب به کمک نشانگر مولکولی است (Zhang *et al.*, 2014). این نشانگرها به دلیل سطوح بالای چندشکلی، پرکاربردترین نشانگرهای مولکولی در مطالعات ژنتیک جمعیت به‌شمار می‌روند (Li *et al.*, 2002). در پژوهش حاضر، تعداد ۳۴۹۸۷۱ نشانگر SSR بر اساس یونی ژن‌های اسمبل شده حاصل از توالی‌یابی ترانسکریپتوم گونه گطان شناسایی شد که حدود ۱۸/۰۱ درصد از کل توالی های مورد بررسی حاوی SSR بودند. این تعداد کمی بیشتر از موارد گزارش شده در مطالعات مربوط به گونه‌های مختلف ماهی بود (Yang *et al.*, 2018; Wen *et al.*, 2020). از مجموع SSRs شناسایی شده، ۷۴۱۷۳ توالی حاوی بیش از یک SSR، تعداد ۶۱۱۹۲ SSR در فرم های ترکیبی نیز وجود دارند. علاوه‌براین، فراوان ترین نوع SSR تکرار دی نوکلئوتید و به دنبال آن تری نوکلئوتید به‌دست آمد که با نتایج گزارش شده در رابطه با سایر گونه‌های ماهی از جمله *Brachymystax lenok* (Wen *et al.*, 2020)، *Patagonian toothfish* (Touma *et al.*, 2019) و *Amphiprion ocellaris* (Yang *et al.*, 2018) مطابقت دارد که این امر گویای صحت و دقت بالای یافته‌های این تحقیق است. همچنین از مجموع SSRs دی‌نوکلئوتید شناسایی شده موتیف AG/CT با فراوانی ۶۵/۲۱ درصد، بیشترین فراوانی را به‌خود اختصاص داد درحالی‌که موتیف CG/CG با درصد فراوانی ۰/۰۷ بسیار نادر است که با نتایج سایر محققین مطابقت دارد (Fang *et al.*, 2015). این مورد در مهره‌داران نیز به‌خوبی نشان داده شده است (Toth *et al.*, 2000). در پژوهش حاضر از بین SSRs شناسایی شده در گونه گطان، تنوع ژنتیکی در ۵ جایگاه مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. نتایج ژل الکتروفورز حضور ۵ SSR را تایید کرد و نشان داد که SSRs جدید شناسایی شده، مورد تایید است. از میان این ۵ جایگاه، ۳ جایگاه فاقد چند شکلی بوده و فقط ۲ جایگاه چندشکل بود. میزان هتروزیگوسیتی به عنوان یکی از معیارهای متداول بررسی تنوع درون یک جمعیت است (Frankham, 2008; Rohipoor *et al.*, 2021). با توجه به نتایج به‌دست آمده در جدول ۵، مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای جایگاه MN1359 و GM1371 به‌ترتیب برابر با ۰/۱۴۷ و ۰/۰۹۳ و هتروزیگوسیتی مورد انتظار برای جایگاه MN1359 و GM1371 به‌ترتیب برابر ۰/۷۸۵ و ۰/۷۷۰ محاسبه شد. پایین بودن میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده در این جایگاه‌ها را می‌توان بیانگر سطح پایین تنوع آن درون جمعیت دانست. کاهش هتروزیگوسیتی در ذخائر می‌تواند به دلیل ایجاد تنگناهای ژنتیکی از جمله صید بی‌رویه، آمیزش‌های خویشاوندی وتخریب زیستگاه‌ها باشد (Norris *et al.*, 1999; Rohipoor *et al.*, 2019). طبق نتایج حاصله در پژوهش حاضر، تعداد آلل‌های واقعی ۵ به‌دست آمد. تعداد آلل واقعی به عنوان معیاری برای بررسی تنوع، به‌شدت به اندازه نمونه بستگی دارد و در آزمایش‌های با تعداد نمونه‌های متفاوت، تعداد آلل‌های مختلفی ایجاد می‌شود (Mohamadi Ahwazi *et al.*, 2019). همچنین تعداد آلل موثر به عنوان معیاری برای بیان آلل‌هایی که هتروزیگوسیتی یکسان ایجاد می‌کنند، از تعداد آلل واقعی کمتر بود. باتوجه به این امر که تفاوت زیاد بین این دو عامل دلیلی بر فراوانی بالا در هر جایگاه است، پس نتایج حاصله در این تحقیق، بر پایین بودن میزان تنوع دلالت دارد. همچنین شاخص شانن، به عنوان معیار مفیدی برای اندازه‌گیری تنوع در جایگاه‌ها برای این جمعیت برای جایگاه



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-01-29 ]

MN1359 و GM1371 به‌ترتیب برابر ۱/۵۶۸ و ۱/۵۲۳ محاسبه شد که هرچه مقدار عددی این شاخص به صفر نزدیک‌تر باشد، دلالت بر پایین بودن تنوع دارد (Nazari and Mohamadi Ahwazi, 2022). با توجه به مقدار عددی محاسبه شده بر جمعیت مورد مطالعه، می‌توان استنباط کرد که تنوع گونه‌ای درون جمعیت این ماهی نسبتاً کم است. از دلایل این پدیده می‌توان به ورود آلودگی‌های شهری، صنعتی، کشاورزی و برداشت شن و ماسه بی‌رویه از بستر رودخانه اشاره کرد که باید از لحاظ زیست محیطی بیشتر به آن توجه شود. این گزارش نشان داد که می‌توان از نشانگرهای ریزماهواره (SSR) جهت بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت ماهی گطان استفاده کرد. این موضوع در ماهیانی همچون سیاه‌کولی (Mohamadian *et al.*, 2010)، مارماهی دهان گرد خزری (Bahmaninejad *et al.*, 2018)، سگ ماهی آنگورا (Kashiri *et al.*, 2015)، صبیتی (Ghasemi *et al.*, 2019) و خیاطه (Hosseini *et al.*, 2015) به‌اثبات رسیده است. تنوع ژنتیکی ماهی شیربت (گونه دیگری از باربوس ماهیان در رودخانه کارون استان خوزستان)، با استفاده از ریزماهواره‌ها نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی در این گونه وجود دارد (Karami Nasab *et al.*, 2014). این محققین از ۷ ریزماهواره برای بررسی ساختار جمعیت ماهی شیربت استفاده کردند که ۷ ریزماهواره مورد استفاده همگی چندشکلی را نشان دادند. فیلوژنتیک[1]، علمی است که با در نظر داشتن شباهت‌ها و تفاوت‌های بین گونه‌ها و نژادها، به توضیح روابط تکاملی موجودات می‌پردازد (Nazari and Mohamadi Ahwazi, 2022). علم طبقه‌بندی[2]، انواع موجودات زنده را به گروه‌های بسیار زیادی تقسیم می‌نماید به‌نحوی‌که اعضاء هر یک از این گروه‌ها، ویژگی‌های یکسان یا مشابهی دارند. بدین ترتیب، امکان طبقه‌بندی گونه‌ها فراهم می‌شود. در مطالعات تکامل، طبقه‌بندی شامل تشکیل فیلوژنی نیز می‌گردد. به دلیل نشان دادن مسیرهای تکاملی، از درختان فیلوژنتیک برای درک روابط تکاملی می‌توان استفاده کرد. در واقع، شاخه‌ها، فاصله تکاملی بین یک نژاد با نژاد دیگر را اندازه‌گیری می‌نماید. معمولاً برای نشان دادن میزان انشقاق گروه‌ها، طول شاخه‌هایی که آنها را به‌هم متصل می‌کنند، مورد قیاس قرار می‌گیرد. تجزیه‌وتحلیل فیلوژنتیک بر مبنای رسم درخت فیلوژنی[3]، ابزاری برای جدا کردن جمعیت‌های خاص و مشخص کردن گونه‌های نیازمند به حفاظت است (Zhang and Hewitt, 2003). نتایج درخت فیلوژنتیک تأیید کرد که ماهی گطان به خانواده کپور ماهیان (Cyprinidae) و جنس Luciobarbus تعلق دارد که با نتایج گزارش‌های قبلی، همخوانی دارد (Fricke *et al.*, 2007).

## نتیجه‌گیری

این پژوهش اولین تحقیقی است که بر پایه داده‌های RNA-Seq، نشانگرهای SSR گونه گطان را شناسایی، معرفی و ارزیابی کرده است. نتایج ارزیابی معیارهای مختلف تنوع ژنتیکی همگی گویای کاهش تنوع در بین جمعیت مورد مطالعه بود. علاوه‌براین، نتایج حاصله ابزار قدرتمندی برای مطالعات ژنتیکی آینده برای این گونه به ویژه در مورد اساس ژنتیکی باربوس ماهیان و به طور کلی، ماهی گطان ارائه می دهد. همچنین می‌تواند برای مطالعات بیولوژیک، ساختار جمعیت و بررسی تنوع ژنتیکی مفید باشند.

## تشکر و قدردانی

نگارندگان از مسئولین پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان برای حمایت مالی و از پژوهشکده آبزی‌پروری جنوب کشور به دلیل فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی و همکاری صمیمانه برای اجرای تحقیق، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

## منابع

**Abdoli, A., 2016.** Field guide of fishes of inland waters of Iran. Iranshenasi Publications, Tehran, Iran. pp. 16-41. (in Persian)

[1] Phylogenetics
[2] Taxonomy
[3] Phylogenetic tree



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-01-29 ]

**Bahmaninejad, A., Farahmand, H., Eagderi, S., Elmdoust, A., 2018.** Study of separation between fall and spring run populations of Caspian lamprey, *Caspiomyzon wagneri*, in the southern Caspian Sea (Shirud River) due to different migration time using microsatellite markers. *Journal of Aquaculture Sciences*, 6:73-81. (in Persian)

**Beier, S., Thiel, T., Münch, T., Schols, U. and Mascher, M., 2017.** MISA-web: a web server for microsatellite prediction. *Bioinformatics*, 33, 2583-2585. DOI:10.1093/bioinformatics/btx198

**Chen, H., Li, X., Wang, Y., Zhu, Ch., Huang, H., Yang, W. and Li, G., 2021.** De Novo Transcriptomic Characterization Enables Novel Microsatellite Identification and Marker Development in *Betta splendens*. *Life*, 11:803. DOI:10.3390/life11080803

**Chenani, H., Nazari, M., Beigi Nassiri, M. T., Roshanfekr, H. Aghaie, A., 2021.** Exonic SNP in MHC-DMB2 is associated with gene expression and humoral immunity in Japanese quails. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 239:110302. DOI:10.1016/j.vetimm.2021.110302

**Dang, Z., Huang, L., Jia, Y., Peter J. Lockhart, P.J., Fong, Y. and Tian, Y., 2020.** Identification of genic SSRs provide a perspective for studying environmental adaptation in the endemic shrub *Tetraena mongolica*. *Genes*, 11:322. DOI:10.3390/genes11030322

**Doveri, S., Lee, D., Maheswaran, M. and Powell, W., 2008.** Molecular markers: History, features and applications. In: Kole, C. and Abbott, A.G. (Eds). Principles and Practices of Plant Genomics. *The Science Publishers*, USA. pp. 23-68.

**Ellis, J.R. and Burke, J.M., 2007.** EST-SSRs as a resource for population genetic analyses. *Heredity*, 99(2):125-132. DOI:10.1038/sj.hdy.6801001

**Eskandari, G., Safi Khani, H., Dehghan, S. and Esmaili, F., 2003.** Gathering and feeding of Gattan fish (*barbus xanthopterus*) in Karkheh and Horulazim rivers. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 21-42. DOI:10.22092/ISFJ.2003.113604 (in Persian)

**Fang, D.A., Zhou, Y.F., Duan, J.R., Zhang, M.Y., Xu, D.P., Liu, K., Xu, P. and Wei, Q., 2015.** Screening potential SSR markers of the anadromous fish *Coilia nasus* by de novo transcriptome analysis using Illumina sequencing. *Genetics and Molecular Research*, 14(4):14181-14188. DOI:10.4238/2015.November.13.1

**Frankham, R., 2008.** Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. *Molecular Ecology*, 17:325-333. DOI:10.1111/j.1365-294X.2007. 03399. x

**Freyhof, J., 2014.** *Luciobarbus xanthopterus*. *The IUCN Red List of Threatened Species*, DOI:10.2305/IUCN.UK.2014-1.RLTS.T19383627A19849886.en

**Fricke, R., Bilecenoğlu, M. and Sari, H.M., 2007.** Annotated checklist of fish and lamprey species (*Gnathostoma* and *Petromyzontomorphi*) of Turkey, including a Red List of threatened and declining species. *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde*, 706:1-172.



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-01-29 ]

**Geraci, F., Saha, I. and Bianchini, M., 2020.** RNA-Seq Analysis: Methods, Applications and Challenges. *Frontiers in Genetics*, 11:1-3. DOI:10.3389/fgene.2020.00220

**Ghasemi, S.A., Faghih, A. and Fakhri, A., 2019.** Genetic diversity Investigation of Silver Seabream *Sparidentex hasta* (Day, 1878) in Persian Gulf and Oman Sea using Microsatellite marker. *Journal of Animal Researches*, 32:3. (in Persian)

**Ghorbani, A., Rostami, M., Afshari Far, A. and Azarbaijani, R., 2020.** RNA sequencing (RNA Seq) and its data analysis. Marja Alam Publications. Shiraz, IRAN. 12 P. (in Persian)

**Hosseini, S.M., Shabani, A., Kalangi Miandre, H. and Safari, R., 2015.** Genetic structure of *Alburnoides eichwladi* (De Filippi, 1863) in Gilan (Roodsar Paulrood River) using microsatellite markers. *Journal of Applied Ichthyological Research*, 3(4):49-60. (in Persian)

**Hosseinzadeh sahafi, H., 2017.** Strategic roadmap for development of warmwater fish culture, Iranian fisheries science research institute, Tehran, IRAN. 11 P. (in Persian)

**Jabeen, S., Saif, R., Distefano, G., Haq, R., Haider, W., Hayat, A. and Naz, Sh., 2023.** *De novo* Genome Assembly, Functional Annotation and SSR Mining of *Citrus reticulata* "Kinnow" from Pakistan. *BioRxiv*, DOI:10.1101/2023.03.27.534305

**Karami Nasab, M., Shabani, A., Kalangi Miandreh, H. and Sharbati, S., 2014.** Genetic diversity of Shirbut (*Barbus grypus* Heckel, 1843) fish in Karun and Dez rivers of Khuzestan province using microsatellite markers. *Journal of Applied Ichthyological Research*, 2(1):63-74. (in Persian)

**Kashiri, H., Shabani, A. and Qudsi, V., 2015.** Population Structure of *Oxynoemacheilu sangorae* (Steindachner, 1897) in Gheshlagh (Kurdistan Province), Sefidbarg and Gamasiab (Kermanshah Province) rivers using microsatellite markers. *Journal of Aquatic Ecology*, 5(3):1-11. (in Persian)

**Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T., Beiles, A. and Nevo, E., 2002.** Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11:2453–2465. DOI:10.1046/j.1365-294x.2002.01643.x

**Markert, J.A., Champlin, D.M., Gutjahr-Gobell, R., Grear, J.S. and Kuhn, A., McGreevy Jr, T.J., Roth, A., Bagley, M.J. and Nacci, D.E., 2010.** Population genetic diversity and fitness in multiple environments. *BMC Ecology and Evolution*, 10:205:1-13. DOI:10.1186/1471-2148-10-205

**Mohamadi ahwazi, Gh., Nazari, M., Mohamadabadi, M.R. and Heidari, R. 2019.** Genetic and phylogenetic analysis of mitochondrial HVR1 region in three breeds of Iranian sheep. *Modern genetics journal*, 14(3):209-217. (in Persian)

**Mohamadian, S., Rezvani Gilkolaei, S., Kazemian, M., Kamali, A., Tagvi, M.J., Rooh Elhi, Sh. and Nirani, M., 2010.** The study of genetic diversity and population structure of *Vimba vimba persa* (Pallas, 1814) populations in the eastern and western



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-01-29 ]

**Rohipoor, M., Nazari, M. and Beigi nassiri, M.T., 2021.** Population structure, Genetic diversity and phylogenetic analysis of control region of mtDNA in Adani goat breed. *Modern genetics journal*, 15(4):297-304. (in Persian)

**Romero, M., Mujica, A., Pineda, E., Ccamapaza, Y. and Zavalla, N., 2019.** Genetic identity based on simple sequence repeat (SSR) markers for Quinoa (*Chenopodium quinoa willd.*). *Ciencia e Investigacion Agraria*, 46(2):166-178. DOI:10.7764/rcia.v45i2.2144

**Toth, G., Gaspari, Z. and Jurka, J., 2000.** Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*, 10:967–981. DOI:10.1101/gr.10.7.967

**Touma, J., García, K.K., Bravo, S., Leiva, F., Moya, J., Vargas-Chacoff, L., Reyes, A. and Vidal, R. 2019.** De novo Assembly and Characterization of *Patagonian toothfish* Transcriptome and Develop of EST-SSR Markers for Population Genetics. *Frontiers in Marine Science*, 6:1-13. DOI:10.3389/fmars.2019.00720

**Vandewoestijne, S., Schtickzelle, N. and Baguette, M., 2008.** Positive correlation between genetic diversity and fitness in a large, well-connected metapopulation. *BMC Biology*, 6:1-11. DOI:10.1186/1741-7007-6-46.

**Wen, S., Li, P., Wang, F., Li, J., Liu, H. and Li, N., 2020.** De novo assembly and microsatellite marker development of the transcriptome of the endangered coastline of the Caspian Sea (Havigh river and GorganRoud river) using microsatellite markers. *Taxonomy and Biosystematics*, 5:29-38. (in Persian)

**Mortezavi Zadeh, S., Moazedi, J., Yooneszadeh Feshalami, M. Jorfi, E., 2011.** Determination of artificial propagation biotechnic of *Barbus xanthopterus*. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 19:137-142. DOI:10.22092/ISFJ.2017.109967 (in Persian)

**Nazari, M. and Mohamadi Ahwazi, Gh., 2022.** Genetic and phylogenetic analysis of mitochondrial D-loop HVR I region in three breeds of native sheep Iran (Taleshi, Shal and Makui). *Veterinary Research & Biological Products*, 35(1):31-39. DOI:10.22092/VJ.2021.352317.178 (in Persian)

**Norris, A.T., Breadly, D.G. and Cuningham, E.D., 1999.** Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) population. *Aquaculture*, 247-264. DOI:10.1016/S0044-8486(99)00212-4

**Rai, R., Chauhan, S.K., Singh, V.V., Rai, M. and Rai, G., 2016.** RNA-seq analysis reveals unique transcriptome signatures in systemic lupus erythematosus patients with distinct autoantibody specificities. *PLoS One*, 11:1-35. DOI:10.1371/journal.pone.0166312

**Rohipoor, M., Nazari, M. and Beigi Nassiri, M.T., 2019.** Genetic and phylogenetic analysis of adani goat population based on cytochrome b gene. *Research on Animal Production*, 10(26):84-89. DOI:10.29252/rap.10.26.84 (in Persian)



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-01-29 ]

*Brachymystax lenok* tsinlingensis. *Genes and Genomics*, 42:727–734. DOI:10.1007/s13258-020-00939-3

**Wolfus, G.M., Garcia, D.K., Alcivar-Warren, A., 1997.** Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. *Aquaculture*, 152:35–47. DOI:10.1016/S0044-8486 (96)01527-X

**Xia, E.H., Yao, Q.Y., Zhang, H.B., Jiang, J.J, Zhang, L.P. and Gao, L.Z., 2016.** CandiSSR: An Efficient pipeline used for identifying candidate polymorphic SSRs based on multiple assembled sequences. *front Plant Science*, 6:1-9. DOI:10.3389/fpls.2015.01171

**Yang, W., Lin, B., Li, G., Chen, H. and Liu, M., 2018.** Sequencing and Transcriptome Analysis for Reproduction-Related Genes Identification and SSRs Discovery in Sequential Hermaphrodite *Amphiprion ocellaris*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 19:1049-1059. DOI:10.4194/1303-2712-v19_12_07

**Zane, L., Bargelloni, L. and Patarnello, T., 2002.** Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11:1–16. DOI:10.1046/j.0962-1083.2001. 01418.x

**Zhang, D.X. and Hewitt, G.M., 2003.** Nuclear DNA analyses in genetic studies of papulations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, 12:563-584. DOI:10.1046/j.1365-294X.2003. 01773.x

**Zhang, J., Ma, W., Song, X., Lin, Q., Gui, J.F. and Mei, J., 2014.** Characterization and development of EST SSR markers derived from transcriptome of yellow catfish. *Molecules*, 19(10):16402-16415. DOI:10.3390/molecules191016402



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-01-29 ]

# Identification and validation of simple sequence repeats (SSR) markers for yellowfin barbel (*Luciobarbus xanthopterus*) using RNA-Seq data

Mohamadi Ahvazi G.[1]; Beigh Nassiri M.T.[1]; Nazari M.[1*]; Sadr A.S.[2]

*M.nazari@asnrukh.ac.ir

1- Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
2- Aquaculture Research Center -South of Iran, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran

**Abstract**

This research was conducted to identify and validate the simple sequence repeats (SSR) markers related to yellowfin barbel (*Luciobarbus xanthopterus*) using RNA-Seq data. After collecting the liver tissue, RNA was extracted from the samples. The samples were sequenced using the Illumina Novaseq 6000 platform. Trinity software (version 2.15.1) was used to reconstruct transcripts. Identification of SSR was done using the MISA web server. The primers needed in the polymerase chain reaction for 5 SSR markers were designed by PRIMER 3 software and validated using 45 yellowfin barbel. Transcript assembly by the Trinity program generated 941,894 unigenes and 1,768,662 transcripts. In this study, the examination of 1,276,825 sequences by MISA software led to the identification of 349,871 potential SSR markers. Among the SSRs, di- and trinucleotide repeats had the highest number of repetitions with 89.37% and 8.05%, respectively. From the 5 primers used, only two of them showed polymorphism. The expected and observed heterozygosity for the MN1359 locus were calculated as 0.785 and 0.147, and for the GM1371 locus given 0.770 and 0.093, respectively. Moreover, the chi-square test showed that population was not in Hardy-Weinberg equilibrium. The results of different genetic diversity criteria showed a decrease in diversity in yellowfin barbel. Generally, this research showed that the new SSRs can be helpful for molecular breeding, functional genomics studies, and the genetic diversity analysis of yellowfin barbel.

**Keywords:** Yellowfin barbel, RNA-Seq, Transcriptome, Simple sequence repeats

*Corresponding author

[ Downloaded from isfj.ir on 2026-01-29 ]