

چندشکلی ژن تیروزیناز در ماهیان قزل آلالی رنگین کمان طلایی پرورشی (Golden Rainbow Trout: *Oncorhynchus mykiss*)

بهاره اکبرنژاد^۱، سیامک یوسفی سیاه کلرودی^{۲*}، شهره زارع کاریزی^۱

۱ - گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران، صندوق پستی: ۷۴۸۹-۳۳۸۱۷
۲ - گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران، صندوق پستی: ۷۴۸۹-۳۳۸۱۷

تاریخ پذیرش: ۳ اسفند ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: ۱۲ مهر ۱۳۹۵

چکیده

به منظور بررسی چندشکلی ژن تیروزیناز در ماهیان قزل آلالی رنگین کمان طلایی، استخراج DNA از باله دمی ۱۰۰ قطعه بچه ماهی انجام گرفت. تکثیر ناحیه پلی مورفیک ۴۲۳bp ژن تیروزیناز با استفاده از تکنیک PCR و پرایمرهای اختصاصی Tyr1.2f و Tyr1.2r انجام شد. سپس به منظور هضم آنزیمی از آنزیم برشگر *HinfI* استفاده شد. بر این اساس سه الگوی برشی مشاهده شدند که در حالت اول افراد دارای دو قطعه ۲۲۲bp و ۲۰۱bp، دارای ژنوتیپ هموزیگوت NN بودند که عمل هضم آنزیمی روی آن انجام گرفته بود. از بین ۱۰۰ نمونه ۲۶ نمونه دارای این ژنوتیپ بودند. افراد دارای ۴۲۳bp دارای ژنوتیپ هموزیگوت MM بوده که مورد هضم قرار نگرفت و تعداد ۳۶ نمونه را شامل شد. در ژنوتیپ MN هر سه اندازه ۴۲۳bp، ۲۰۱bp و ۲۲۲bp مشاهده شد که بیانگر ژنوتیپ هتروزیگوت بود و از کل ۱۰۰ نمونه ۳۸ مورد دارای این ژنوتیپ بودند. تعداد آلل N و M به ترتیب ۹۰ و ۱۱۰ و مقدار فراوانی ژنی برای آلل N و M به ترتیب ۰/۴۵ و ۰/۵۵ حاصل شد. تعداد فراوانی ژنوتیپی NN، MN و MM به ترتیب ۰/۲۶، ۰/۳۸ و ۰/۳۶ به دست آمد. نتایج حاصل از کای اسکور و جی اسکور خروج جمعیت از تعادل هاردی-واینبرگ را نشان داد که علت خروج جمعیت قزل آلالی رنگین کمان از تعادل، احتمالاً تکثیر مصنوعی می باشد.

کلمات کلیدی: چندشکلی، قزل آلالی رنگین کمان طلایی، تیروزیناز، PCR-RFLP.

* عهده دار مکاتبات (✉). siamak.yousefi1@gmail.com

مقدمه

رنگدانه‌سازی و الگوهای متنوع آن در پوست و گوشت ماهیان در بین پرورش‌دهندگان که به دنبال بهبود کیفیت در محصولات خود هستند از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است (Buyukcapar *et al.*, 2007). تنوع رنگ تقریباً در بین همه گونه‌های جانوران مشاهده می‌شود، یکی از زیباترین الگوهای رنگدانه‌سازی در طبیعت را می‌توان در ماهیان مشاهده کرد (O'Quin *et al.*, 2013). از ژن‌های مؤثر بر رنگدانه‌سازی می‌توان به ژن‌های خانواده تیروزیناز اشاره نمود، ژن‌های خانواده تیروزیناز در مهره‌داران شامل سه عضو است: تیروزیناز (TYR)، پروتئین مرتبط با تیروزیناز-۱ (TRP-1) و پروتئین مرتبط با تیروزیناز-۲ (TRP-2) که این پروتئین‌ها بیوستتز ملانین در سلول‌های رنگی را کاتالیز می‌کنند و نقش مهمی در تنوع رنگ در مهره‌داران بر عهده دارند (Jiaqing *et al.*, 2007). ملانین رنگدانه اصلی موجود در مو، پوست و چشم است و در سلول‌هایی به نام ملانوسیت تولید می‌شود (Jiaqing *et al.*, 2007) و علاوه بر این به عنوان یک محافظ نوری عمل کرده و مسئول کاهش ابتلا به سرطان پوست در افراد دارای رنگ مو و پوست تیره است (Liu *et al.*, 1998; Wrobel *et al.*, 2005). جهش در ژن تیروزیناز مسئول بروز فنوتیپ آلبینیسم است. برای مثال جهشی نقطه‌ای در ژن تیروزیناز فنوتیپ آلبینو را در موش ایجاد می‌کند. هم‌چنین درج یک نوکلئوتید که به صورت برگشت ناپذیر به این ژن اضافه می‌شود، موجب بروز فنوتیپ آلبینو در ماهی مداکا (medaka) بوده است (Boonanuntanasarn *et al.*, 2004). از میان ماهیان آزاد، جهش یافته‌های آلبینو در ماهی آزاد آماگو (*Oncorhynchus masou ishikawai*),

قزل‌آلای رودخانه‌ای (*Salvelinus fontinalis*)، قزل‌آلای دریاچه‌ای (*S. namaycush*)، ماهی چینوک (*O. tshawytscha*) و قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) گزارش شده است. در بیش‌تر موارد فنوتیپ آلبینو به صورت مغلوب به ارث می‌رسد (Boonanuntanasarn *et al.*, 2004). اما در ژاپن سویه‌ای جهش یافته از فنوتیپ آلبینو (Golden rainbow trout) غالب نیز در قزل‌آلای رنگین‌کمان شناسایی شده است که با جهش در ژن تیروزیناز در ارتباط نیست (Nakamura *et al.*, 2001). در ماهی گورخری (Zebra fish) جهش در ژن sdy که تیروزیناز را کددهی می‌کند عادت دهی به نور را به تاخیر می‌اندازد (Page-McCaw *et al.*, 2004). اکثر فنوتیپ‌های مشاهده شده آلبینو در ماهیان به دلیل جهش در ژن تیروزیناز گزارش شده است و از آن‌جا که تاکنون تحقیقی در ایران به مطالعه بررسی چندشکلی ژنتیکی و فراوانی انواع آلل‌های موجود در این ژن نپرداخته است، این پژوهش سعی دارد اطلاعات مناسبی از وجود یا عدم وجود چندشکلی، فراوانی آللی و ژنوتیپی و نیز ارتباط بین جهش در این ژن و بروز فنوتیپ آلبینو در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان طلایی ایران در اختیار قرار دهد که این اطلاعات می‌تواند در مطالعات ژنتیکی و در بهبود نژادی قزل‌آلای رنگین‌کمان مفید واقع شود.

مواد و روش‌ها

جهت اجرای این پژوهش در سال ۱۳۹۵، تعداد ۱۰۰ قطعه بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان طلایی (*Oncorhynchus mykiss*) از مجتمع پرورش ماهی ارجمند واقع در ۵ کیلومتری شهرستان فیروزکوه در

استان تهران به صورت تصادفی تهیه گردید (اطمینان حاصل شد تا نمونه بچه ماهی‌ها از کارگاه‌های مختلف باشند) و به آزمایشگاه تحقیقاتی بیولوژی و مولکولی پژوهشگاه علوم پزشکی بقیه الله منتقل گردیدند و تا شروع ادامه مراحل پژوهش در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. در ادامه قبل از انجام مراحل استخراج DNA، نمونه‌های گرفته شده ابتدا یخ‌زدایی شدند و از هر نمونه (باله دمی) به میزان ۲۰ میلی گرم با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ میلی گرم وزن گردید و به میکروتیوب‌هایی با حجم ۱/۵ میلی‌لیتر منتقل گردید. استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت Gene All کشور کره جنوبی انجام پذیرفت. برای تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراج شده، از روش متداول الکتروفورز ژل آگارز (Moore et al., 1991) و نانودراپ (Nano-Drop) استفاده شد. در این تحقیق جهت تکثیر ناحیه پلی مورفیک ژن ماهی قزل‌آلای رنگین کمان به طول ۴۲۳ جفت باز از آغازگرهای اختصاصی Tyr1.2f و Tyr1.2r (Lori et al., 1999) و با توالی زیر استفاده گردید:

Tyr1.2r 5' CCTCCCTACTCTGACATCGT3'
Tyr1.2f 5' CAGCTCAGACTATGTATC3'

به منظور انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

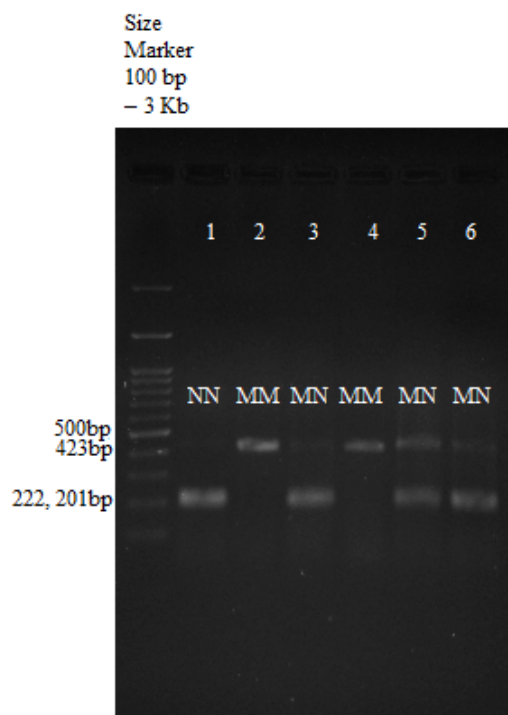
ژن تیروزیناز از حجم ۲۰ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر کلرید منیزیم، یک میکرولیتر بافر PCR، ۰/۸ میکرولیتر نوکلئوتیدها، ۰/۲ میکرولیتر پرایمر، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Tag و آب دیونیزه استفاده شد. شرایط چرخه دمایی و مشخصات داده شده به دستگاه ترموسایکلر برای واکنش زنجیره‌ای پلی مرز به ترتیب مرحله اول واسرشته‌سازی کلی ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله دوم واسرشته‌سازی ۹۴ درجه

سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله سوم اتصال پرایمرها به مدت ۵۸/۶ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله چهارم بسط اولیه پرایمر ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه و مرحله پنجم بسط نهایی پرایمر ۷۲ درجه سانتی گراد ۷ دقیقه برای تعداد چرخه ۳۰ برای مراحل ۲ تا ۴ تنظیم گردید. سپس برای اطمینان یافتن از انجام صحیح واکنش زنجیره‌ای پلیمرز محصولات PCR بر روی ژل آگارز یک درصد انتقال یافتند. در ادامه جهت هضم آنزیمی از آنزیم برشگر *HinfI* استفاده گردید. بدین منظور ۱۰ میکرولیتر محصول PCR با ۱ میکرولیتر آنزیم برشی *HinfI* مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد ترموبلاک قرار داده شد. در آخر به منظور متوقف شدن فعالیت آنزیم برشگر به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد ترموبلاک قرار داده شد. محصول به دست آمده از عمل هضم آنزیمی روی ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز شد و با کمک ساینز مارکر ۱۰۰bp اندازه باندها مشخص شدند، سپس جهت تعیین ژنوتیپ در جایگاه ژنی تیروزیناز از تکنیک PCR-RFLP استفاده گردید. تعیین ژنوتیپ با توجه به حضور و یا عدم حضور باندها مشخص شد. تخمین فراوانی آللی و ژنوتیپی احتمال برقراری تعادل هاردی-واینبرگ با استفاده از هر دو معیار کای اسکور و نسبت درست نمایی جی اسکور با استفاده از نرم افزار Pop Gene ۳۲ مورد آنالیز قرار گرفت (Yeh et al., 1999).

نتایج

کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت Gene All در حد مطلوبی قرار داشت و نمونه‌ها فاقد هر گونه آلودگی بودند

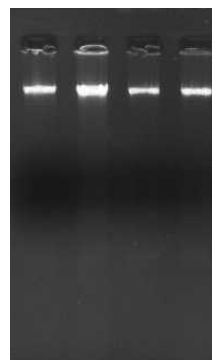
آنزیم برش دهنده *HinfI* قطعات تکثیر شده حاصل از واکنش PCR را که دارای اندازه باند ۴۲۳bp می باشند را در یک جایگاه برش می دهد و قطعات ۲۲۲bp و ۲۰۱bp ایجاد می کند که آلل N دارای هر دو قطعه است و در نمونه ها به صورت دو باند مجزا روی ژل مشاهده گردید و در برخی دیگر از نمونه ها هم عمل هضم صورت نگرفت. زیرا این آنزیم آلل N را مورد هضم قرار می دهد ولی بر آلل M تأثیری ندارد و تنها قطعه ای به صورت انفرادی به وزن ۴۲۳bp مشاهده شد که آلل نوع M بود.



شکل ۳: نتیجه آنزیمی برش دهنده *HinfI* قطعات تکثیر شده حاصل از واکنش PCR

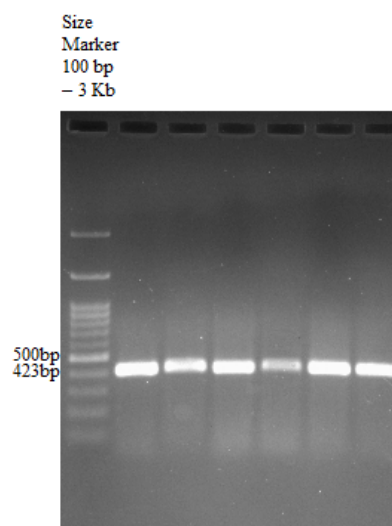
بر این اساس سه الگوی برشی مشاهده شدند که در حالت اول افراد دارای دو قطعه ۲۲۲bp و ۲۰۱bp، دارای ژنوتیپ هموزیگوت NN بودند که عمل هضم آنزیمی روی آن انجام گرفته بود. از بین ۱۰۰ نمونه ۲۶ نمونه دارای این ژنوتیپ بودند. افراد دارای ۴۲۳bp

(شکل ۱). غلظت اندازه گیری شده در تمام DNAهای استخراجی با استفاده از نانودراپ بین ۱۰۰ تا ۱۸۰ نانوگرم بود که بیان گر غلظت مناسب DNA استخراج شده است.



شکل ۱: الکتروفورز DNA ژنومیک تخلیص شده بر روی ژل آگارز ۱٪ رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید

براساس نتایج به دست آمده از واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن تیروزیناز، باند مورد نظر ۴۲۳bp حاصل گردید (شکل ۲).



شکل ۲: نتیجه واکنش PCR بر روی ژن تیروزیناز ماهی قزل آلائی رنگین کمان (پرایمرهای اختصاصی این ژن توانسته اند قطعات ۴۲۳ جفت باز را تکثیر دهند)

بر اساس اطلاعات فوق میزان فراوانی ژنی و ژنوتیپی محاسبه شده در جدول ۱ و میزان کای اسکور و جی اسکور جهت بررسی تعادل هاردی-واینبرگ در جدول ۲ آورده شده است.

دارای ژنوتیپ هموزیگوت MM بوده که مورد هضم قرار نگرفت و تعداد ۳۶ نمونه را شامل شد. در ژنوتیپ MN هر سه اندازه ۴۲۳bp، ۲۰۱bp و ۲۲۲bp مشاهده شد که بیانگر ژنوتیپ هتروزیگوت بودند و از کل ۱۰۰ نمونه ۳۸ مورد دارای این ژنوتیپ بودند (شکل ۳).

جدول ۱: فراوانی ژنی و ژنوتیپی به دست آمده از هضم آنزیمی

ژنوتیپ		آلل			
M	N	MM	MN	NN	
۱۱۰	۹۰	۳۶	۳۸	۲۶	تعداد
۰/۵۵	۰/۴۵	۰/۳۶	۰/۳۸	۰/۲۶	فراوانی نسبی

جدول ۲: نتایج آزمون $(X_T)^2$ و $(G_T)^2$ جهت تعادل هاردی-واینبرگ

ژنوتیپ	افراد مشاهده شده O	افراد مورد انتظار E	$(O - E)^2 / E$	D _f	Probability X_T^2	Probability G_T^2
MM	۳۶	۳۰/۲۵	۱/۰۹	۱	۰/۳۶	۰/۰۲
MN	۳۸	۴۹/۵۰	۲/۶۷		۰/۲۰۱۶	۵
NN	۲۶	۲۰/۲۵	۱/۶۳		۵	

برداشت را به بیشترین مقدار معقول برساند (Thai et al., 2006). بررسی گوناگونی و تنوع ژنتیکی قزل‌آلای رنگین کمان، به منزله مهم‌ترین گونه پرورشی در ایران، ضروری است.

نتیجه حاصل از این تحقیق نشان داد که ژن تیروزیناز در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان طلایی دارای چندشکلی بوده و سه ژنوتیپ حاصل از دو آلل قابل مشاهده است. در این تحقیق فراوانی آلل M در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان ۰/۵۵ و آلل N ۰/۴۵ به دست آمد (جدول ۱). علاوه بر آن PCR-RFLP با آنزیم *HinfI* روش مناسبی جهت انتخاب ژنوتیپ‌های مختلف ماهی در راستای اصلاح نژاد براساس ژن تیروزیناز بوده و

با توجه به جدول ۲ چون مقدار احتمال برای آزمون $(X_T)^2$ برابر با ۰/۰۲ است و کمتر از سطح آزمون تعیین شده (۰/۰۵) می‌باشد، هم‌چنین برای آزمون $(G_T)^2$ نیز مقدار احتمال برابر ۰/۰۲ و کم‌تر از سطح آزمون می‌باشد، پس فرض صفر یعنی وجود تعادل پذیرفته نمی‌شود.

بحث

اولین مرحله تدوین استراتژی مدیریت ذخایر آبزیان در منابع آبی، مشخص شدن ساختار ژنتیکی جمعیت‌های در حال بهره‌برداری می‌باشد. این استراتژی در صورتی که بر پایه روش‌های قوی و دقیق مولکولی باشد، می‌تواند علاوه بر حفظ تنوع زیستی، میزان

آنزیم محدود گر *HinfI* آنزیم محدود گر کارآمدی جهت تشخیص واریانتهای این ناحیه از ژن تیروزیناز در ماهی قزل آلائی رنگین کمان می باشد.

براساس آزمون مربع کای خروج از تعادل هاردی- واینبرگ در جایگاه ژن تیروزیناز مشاهده شد. عدم وجود تعادل هاردی واینبرگ در جمعیت مورد مطالعه بیانگر انتخاب ژنتیکی در راستای اصلاح نژاد برای ژن تیروزیناز در این جمعیت از ماهیان قزل آلائی رنگین کمان می باشد. همچنین تلاقی های غیرتصادفی، کوچک بودن جمعیت و افزایش هم خونی و افزایش هموزیگوت ها را در جامعه مورد مطالعه نشان می دهد که با نتایج کریم خانی و همکاران (۱۳۹۳) که به بررسی چندشکلی ژن SLC24A5 در ماهیان قزل آلائی رنگین کمان پرداخته است، هم خوانی دارد که در بررسی وجود یا عدم وجود آلل های اختصاصی ژن SLC24A5 مشخص کردند که نمونه ها دارای آلل های اختصاصی ژن SLC24A5 بوده و ژن SLC24A5 در ماهی قزل آلائی رنگین کمان دارای چندشکلی بوده است و بر اساس آزمون مربع کای خروج از تعادل هاردی واینبرگ در همه جایگاه ها مشخص نمودند.

از آنجا که در این مطالعه فقط به بررسی چندشکلی پرداخته شده است و ارتباط این چندشکلی با صفات تولیدی مورد بررسی قرار نگرفته، لذا هیچ نظری نمی توان در مورد مطلوب بودن آلل ها ابراز داشت. به طور کلی یک عامل به تنهایی نمی تواند علت انحراف از تعادل را در یک جمعیت توضیح دهد و مجموعه ای از عوامل سبب انحراف جمعیت از تعادل می شود که یکی از بیشترین عوامل تکثیر مصنوعی است، بنابراین می توان علت انحراف از تعادل در جمعیت قزل آلائی رنگین کمان را احتمالاً همین تکثیر مصنوعی اعلام نمود

که با نتایج کریم خانی و همکاران (۱۳۹۳) که علت انحراف از تعادل را در جمعیت قزل آلائی رنگین کمان تکثیر مصنوعی اعلام نمودند منطبق دانست.

Streisinger و همکاران (۱۹۸۱) موتاسیون مغلوب برای اولین بار در Zebrafish تشخیص دادند که نتیجه آن ایجاد فنوتیپ طلائی (gol+) می باشد که در آن رنگ ماهی ها در غیاب تولید ملانین طلائی می شود. بررسی فراوانی ژنوتیپ ها در این تحقیق با تحقیقات Streisinger و همکاران (۱۹۸۱) هم خوانی داشت.

طلا و همکاران (۱۳۹۰) با بررسی پلی مورفیسم ژنوم میتوکندریایی ماهی سوکلا *Rachycentron canadum* در آب های شمالی خلیج فارس و دریای عمان نشان دادند که در تمام نمونه ها هم شکل (مونومورف) بود و پلی مورفیسم (چندشکلی) مشاهده نگردید که با نتایج مطالعه اخیر مطابقت نداشت.

با توجه به آن که این پژوهش اولین گزارش کار با تکنیک PCR روی ژن تیروزیناز در ماهی قزل آلائی رنگین کمان می باشد که در ایران صورت گرفته است و چندشکلی در این ژن می تواند با استفاده از روش انتخاب به کمک نشان گر راه را برای سایر محققین و اصلاح نژاد کنندگان کشور هموار نماید و مسبب آن باشد که کیفیت رنگ پوست و گوشت در ماهی قزل- آلائی رنگین کمان دقیق تر مورد بررسی قرار گیرد و در مطالعات تنوع ژنتیکی مفید واقع شود. با در نظر گرفتن این موضوع که فعالیت تیروزیناز وراثت پذیری بالایی را از خود نشان می دهد (Boonanuntanasarn et al., 2004) و در نتیجه انتخاب تیروزیناز می تواند باعث بهبود رنگ پوست و گوشت گردد و از آنجایی که ماهی قزل آلائی رنگین کمان جزو ماهیان پرورشی مهم ایران محسوب شده و از نظر تعداد بیشترین تعداد را

5. Jiaqing, W., Lin, H., Ruifeng, Z., Xintao, Z., Lijuan, J., Wenjing, S., Jialu, A., Xiayon, L., 2007. The Tyrosinase gene family and albinism in fish. Chinese journal of oceanology and limnology, 25(2), 191-198.
6. Liu, Y., Hong, L., Wakamatsu, K., Ito, S., Adhyaru, B., Cheng, C., 2005. Photochem. Photobiol, 81, 135 p.
7. Lori, A., Passmore, B., Kaesmann-Kellner, B., Weber, H.F., 1999. Novel and recurrent mutations in the Tyrosinase gene and the P gene in the German albino population. Hum Genet, 105, 200-210.
8. Moore, G., Cheung, W., Schwarzacher, T., Flavell, R., 1991. BIS-I, a major component of the cereal genome and a tool for studying genomic organization. Genomics, 10, 469-476.
9. Nakamura, K., Ozaki, A., Akutsu, T., Iwai, K., Sakamoto, T., Yoshizaki, G., Okamoto, N., 2001. Genetic mapping of the dominant albino locus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Molecular Genetic Genomics, 265(4), 687-93.
10. O'Quin, C.T., Drilea, C.A., Conte, M.A., Kocher, T.D., 2013. Mapping of pigmentation QTL on an anchored genome assembly of the cichlid fish, *Metriacrima zebra*. BMC Genomics, 14, 287 p.
11. Page-McCaw, P.S., Chung, S.C., Muto, A., Roeser, T., Staub, W., Finger-Baier, K.C., Korenbrot, J.I., Baier, H., 2004. Retinal network adaptation to bright light requires Tyrosinase. Nature Neuroscience, 7, 1329-1336.
12. Streisinger, G., Walker, C., Dower, D., Knauber, D., Singer, F., 1981. The gol-1, gol-2, alb-1 and spa-1 mutations affect pigment pattern in the zebra fish. Nature, 291-293.
13. Thai, B.T., Pham, T.A., Austin, G.M., 2006. Genetic diversity of common carp in Vietnam using direct sequencing and SSCP analysis of the mitochondrial DNA control region. Aquaculture, 258, 228-240.
14. Wrobel, D., Hanys, I., Planner, A., Dudkowiak, A., Saran, T., 1998. J. Photochem. Photobiol. B., 47, 165 p.
15. Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T., 1999. Popgene. Version 1.31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, University of Alberta. Edmonton, AB, Canada.

در کشور دارا می‌باشد، مطالعه پلی‌مورفیسم ژن تیروزیناز در این گونه دارای اهمیت می‌باشد. در نهایت اطلاعات حاصل به عنوان ابزاری در اختیار اصلاح‌گران ماهی قرار گیرد و همچنین در مطالعات تنوع ژنتیکی به کار آید.

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم از زحمات کلیه کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نمایم.

منابع

۱. طلا، م.، کاظمی‌دمنه، ب.، لالویی، ف.، سلطانی، م.، آزاد، م.، کوچکی، ا.، ۱۳۹۰. بررسی پلی‌مورفیسم ژنوم میتوکندریایی ماهی سوکلا *Rachycentron canadum* در آب‌های شمالی خلیج فارس و دریای عمان. پژوهنده، ۱۶(۵)، ۲۴۶ - ۲۵۱.
۲. کریم‌خانی، م.، ۱۳۹۳. بررسی چندشکلی ژن SLC24a5 در ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. رشته ژنتیک و اصلاح نژاد دام. دانشکده کشاورزی. دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا، ۷۱ صفحه.
3. Boonanuntanasarn, S., Yoshizaki, G., Iwai, K., Takeuchi, T., 2004. Molecular cloning, gene expression in Albino mutants and gene knockdown studies of Tyrosinase mRNA in rainbow trout. Pigment cell research, 17, 413-421.
4. Buyukcapar, H.M., Yanar, M., Yanar, J., 2007. Pigmentation of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) with Carotenoids from Marigold Flower (*Tagetes erecta*) and Red Pepper (*Capsicum annum*). Turkish Journal of Veterinary Animal Science, 31, 7-12.