

بررسی چند شکلی نواحی اینترون ۱ و ۴ ژن هورمون رشد در

مرغ‌های بومی اصفهان و مازندران

اعظم جعفری^۱، عباس پاکدل^{۲*}، سعید اسمائیل خانیان^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و

منابع طبیعی دانشگاه تهران - کرج

۲- عضو هیات علمی گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی

دانشگاه تهران - کرج

۳- عضو هیات علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی - اصفهان

*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: abpakdel@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: - تاریخ پذیرش:)

چکیده

واژه‌های کلیدی

هورمون رشد،
چند شکلی،
مرغ بومی،
PCR-RFLP

هورمون رشد طیور، یک هورمون پلی پپتیدی است که در بسیاری از فعالیت‌های متابولیکی و فیزیولوژیکی نقش دارد. برای بررسی چند شکلی ژن هورمون رشد در جایگاه اینترون ۱ از ۲۱۷ نمونه (۱۲۹ نمونه از اصفهان و ۸۸ نمونه از مازندران) و در جایگاه اینترون ۴ از ۱۳۴ نمونه (۹۱ نمونه از اصفهان و ۴۳ نمونه از مازندران) استفاده گردید. استخراج DNA به روش نمکی بهینه یافته انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به روش اسپکتروفتومتری و ژل آگارز ۰/۸ درصد کنترل شد. با استفاده از دو جفت پرایمر اختصاصی و واکنش زنجیره‌ای پلی مرز قطعه ۷۷۶ جفت بازی در ناحیه اینترون ۱ و قطعه ۱۱۷۰ جفت بازی در ناحیه اینترون ۴ ژن هورمون رشد تکثیر گردید. قطعات تکثیر شده بوسیله آنزیم برشی MspI هضم و محصول هضم بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد الکتروفورز شد. فراوانی آللی در ناحیه اینترون ۱ برای آلل‌های M، N و O در جمعیت اصفهان به ترتیب ۰/۶۰، ۰/۲۱ و ۰/۱۹ و در جمعیت مازندران به ترتیب ۰/۲۸، ۰/۰۵ و ۰/۶۷ تعیین شد. فراوانی آللی در ناحیه اینترون ۴ نیز برای آلل‌های A، B و C در جمعیت اصفهان به ترتیب ۰/۲۸، ۰/۳۱ و ۰/۴۱ و در جمعیت مازندران به ترتیب ۰/۳۷، ۰/۲۴ و ۰/۳۷ مشاهده شد. علاوه بر آلل‌های مذکور، آلل‌های D و E، هر یک با فراوانی ۰/۰۱ فقط در جمعیت مازندران شناسایی شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که نواحی اینترون ۱ و ۴ ژن هورمون رشد در مرغ‌های بومی اصفهان و مازندران از چند شکلی نسبتاً بالایی برخوردار هستند.

مقدمه

طیور بومی هر کشور از منابع ژنتیکی با ارزش آن کشور محسوب می‌شوند. با توجه به مقاومت این پرندگان به تنش‌های محیطی زنده و غیر زنده و استفاده از مواد غذایی مازاد خانگی و زراعی در پرورش آنها، نقش مهمی در اقتصاد خانواده‌های روستایی دارند (۱). به منظور انجام برنامه‌های اصلاح نژادی و نیز بهره‌گیری مناسب از توان تولیدی مرغ‌های بومی، بررسی تنوع ژنتیکی و چگونگی حفظ این تنوع از ضروریات است.

هورمون رشد طیور (cGH^1)، یک هورمون پلی پپتیدی است که در غده هیپوفیز تولید و ترشح می‌شود و در اعمال فیزیولوژیکی متعددی از جمله رشد، ترکیب لاشه، تولید تخم، تولید مثل و پاسخ ایمنی موثر است (۲، ۵). این هورمون عموماً توسط تک ژنی که بر روی کروموزوم شماره ۱۹ گاو، ۱۷ انسان، ۱۱ گوسفند و موش خانگی، ۱۰ موش صحرایی، ۱۲ خوک و ۱ مرغ قرار دارد، کد می‌شود (۱۱، ۱۴).

ژن cGH با ۴۱۰۱ جفت باز شامل ۵ اگزون و ۴ اینترون، کد کننده پروتئینی با ۱۹۱ اسید آمینه و ۲۵ اسید آمینه در پپتید انتهایی، می‌باشد (۸، ۱۲). ناحیه اینترون این ژن بطور معنی‌داری از ناحیه مشابه خود در پستانداران بزرگتر است (۱۱).

تعیین توالی ژن cGH نخستین بار توسط لمب و همکاران (۱۹۸۸) انجام گرفت (۶). نتایج حاصل از تحقیق بر روی ژن cGH در ۴ نژاد متفاوت مرغ نیز دال بر وجود ۴۶ مورد چند شکلی تک نوکلئوتیدی (SNPs) در این ژن می‌باشد که ۱۰ جهش در نواحی غیر کد کننده (نواحی اگزون) و ۳۶ جهش در نواحی کد کننده (اینترون) قرار داشته است و این در حالی است که برخی از این جهش‌ها با صفات لاشه و رشد همبستگی داشته‌اند (۱۰).

مطالعه چند شکلی ژن هورمون رشد و تاثیر آن بر روی صفات لاشه و رشد طیور گوشتی نیز نشان داده است که آل‌های مختلف این ژن ارتباط قابل توجهی با برخی از صفات نظیر وزن ماهیچه سینه، نسبت ماهیچه سینه و نسبت چربی بطنی دارند (۳). لذا بنظر می‌رسد که ژن هورمون رشد یا بطور مستقیم بر روی صفات مذکور موثر است و یا غیر مستقیم و از طریق ژن بزرگ اثر

دیگری که با ژن GH مرتبط است، با این صفات ارتباط دارد (۳). از طرفی نتایج حاصل از برخی تحقیقات دیگر نشان داده است که نواحی اینترون ژن هورمون رشد نقش موثری بر تنظیم بیان ژن GH دارند (۹).

هدف از انجام این تحقیق شناسایی چند شکلی موجود در نواحی اینترون ۱ و ۴ ژن هورمون رشد و نیز تعیین فراوانی‌های آلی و ژنوتیپی برای این جایگاه‌های ژنی، در مرغان بومی اصفهان و مازندران می‌باشد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این تحقیق، در سطح جوامع مرغ بومی مازندران و نیز مرکز اصلاح نژاد مرغ بومی در اصفهان، نمونه‌گیری به طور تصادفی انجام گرفت. پس از خونگیری از ورید بال به داخل سرنگ‌های حاوی EDTA، نمونه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان انتقال داده شد. سپس با استفاده از روش بهینه یافته نمکی^۲ میلر و همکاران (۱۹۸۸)، DNA ژنومی هر نمونه استخراج شد (۷). در این تحقیق برای بررسی جایگاه اینترون ۱ از ۲۱۷ نمونه (۱۲۹ نمونه از اصفهان و ۸۸ نمونه از مازندران) و برای بررسی جایگاه اینترون ۴ از ۱۳۴ نمونه (۹۱ نمونه از اصفهان و ۴۳ نمونه از مازندران) استفاده شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده بوسیله اسپکتروفتومتر مورد بررسی و غلظت DNA در محلول استخراج نیز با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید تعیین گردید.

برای تکثیر نواحی اینترون ۱ و ۴ به ترتیب از آغازگرهای پیشنهاد شده توسط ایپ و همکاران (۲۰۰۱) و نی و همکاران (۲۰۰۲) که توالی آنها در جدول شماره ۱ ارائه شده است استفاده شد (۴، ۹). لازم بذکر است که صحت توالی آغازگرهای مورد استفاده، با برنامه BLAST در بانک اطلاعاتی NCBI مورد تایید قرار گرفت.

² Salting-out

¹ Chicken Growth Hormone (cGH)

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده

جایگاه	آغازگر	توالی
اینترون ۱	رفت	5'-ATCCCCAGGCAAACATCCTC-3'
	برگشت	5'-CCTCGACATCCAGCTCACAT-3'
اینترون ۴	رفت	5'-CTAAAGGACCTGGAAGAAGGG-3'
	برگشت	5'-AACTTGTCGTAGGTGGGTCTG-3'

تنوع آلی بر اساس حضور یا فقدان یک یا تعداد بیشتری از جایگاه‌های برشی تعیین و با ترکیب آل‌های مختلف فراوانی‌های ژنوتیپی تعیین شدند. سپس از طریق فراوانی‌های ژنوتیپی فراوانی‌های آلی برآورد گردیدند. از تست کای مربع نیز برای تعیین تفاوت میان ژنوتیپ‌های مختلف و آزمون تعادل هاردی-واینبرگ استفاده شد.

نتایج و بحث

استخراج DNA با استفاده از روش نمکی بهینه یافته مقادیر زیادی DNA ژنومی (حدود ۱۰۰ ng) را حاصل کرد که با اسپکتروفتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت. الکتروفورز DNA استخراجی بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد نیز نشان داد که نمونه‌ها بدون کشیدگی بوده و از کیفیت مطلوبی برخوردار هستند. تکثیر قطعات ۷۷۶ و ۱۱۷۰ جفت بازی نیز توسط واکنش زنجیره‌ای پلی مرز (PCR) صورت گرفت که با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد به تایید رسید (شکل ۱ و ۲). این نتایج با گزارش تحقیقات انجام شده بر روی مرغ‌های بومی چین، توسط ایپ و همکاران (۲۰۰۱) برای اینترون ۱ و نی و همکاران (۲۰۰۲) برای اینترون ۴ مطابقت دارد (۴، ۹).

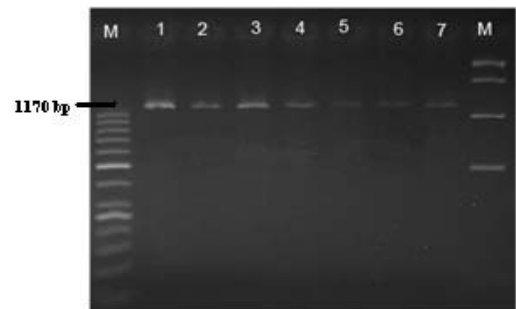


شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR (قطعه ۷۷۶ جفت بازی) بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد (M: 500 bp)

جهت انجام واکنش PCR از ترکیب مواد با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۰/۵ میکرولیتر DNA الگو، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR 10X، ۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۰/۲ میکرولیتر از هر یک از آغازگرها و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq پلی مرز استفاده شد. برنامه دستگاه ترموسایکلر به صورت واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد برای مدت ۴ دقیقه و ۳۰ چرخه شامل ۳ مرحله‌ی واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۶۳ درجه سانتیگراد برای مدت ۱۲۰ ثانیه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۹۰ ثانیه تنظیم شد و در نهایت مرحله تکثیر نهایی نیز برای مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد صورت گرفت.

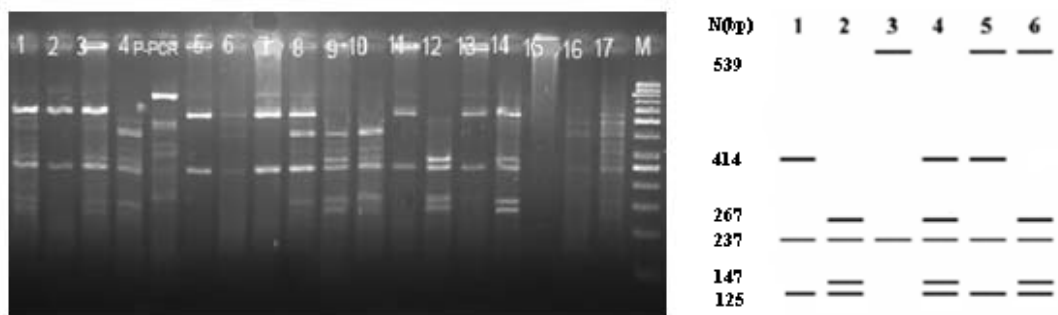
برای هضم آنزیمی ۸ میکرولیتر از محصول PCR توسط ۰/۵ میکرولیتر آنزیم *MspI* و ۲ میکرولیتر بافر آنزیم 10X با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳ ساعت نگهداری شدند. آنزیم محدودالایر *MspI* ترتیب نوکلئوتیدی 5' CCGG 3' را شناسایی کرده محصول را در این ناحیه برش می‌دهد. محصول هضم آنزیمی به همراه ۲ میکرولیتر بافر بارگیری در چاهک ژل آگارز ۲/۵ درصد بارگذاری شد. ۲ میکرولیتر لدر نیز در کنار نمونه‌ها جهت بررسی استاندارد بودن طول قطعات بارگیری شدند. سپس الکتروفورز با ولتاژ ۸۰ و به مدت ۲ ساعت با استفاده از بافر TBE 1X انجام شد. رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید صورت گرفت و با استفاده از دستگاه GelDoc از آن عکسبرداری صورت گرفت.

RFLP در این تحقیق بوسیله ۳ آلل متفاوت *M*، *N* و *O* مشخص شدند. آلل *M* دارای دو جایگاه برش با آنزیم *MspI* است که تولید کننده‌ی ۳ قطعه به طول‌های ۴۱۴، ۲۳۷ و ۱۲۵ جفت بازی می‌باشد. آلل *N* واجد سه جایگاه برشی است و قطعاتی به طول‌های ۲۶۷، ۲۳۷، ۱۴۷ و ۱۲۵ جفت بازی تولید می‌نماید. آلل *O* نیز تنها واجد یک جایگاه برش بوده و قطعات ۵۳۹ و ۲۳۷ جفت بازی را تولید می‌نماید. نتایج مشابهی در خصوص وجود این آلل‌ها بر روی مرغ‌های بومی چین گزارش شده است (۴). محققین با بررسی چند شکلی ناحیه اینترون ۱ توسط آنزیم *MspI* یک جایگاه برش در قطعه ۴۱۴ جفت بازی ملاحظه نمودند که در اثر جانشینی نوکلئوتید "ccTgg" T بجای نوکلئوتید "ccGgg" G ایجاد شده است و منجر به تولید آلل *N* می‌شود (۸).

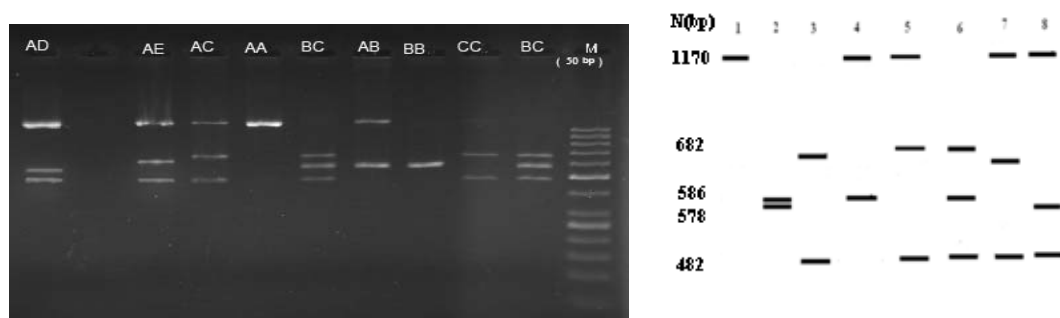


شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR (قطعه ۱۱۷۰ جفت بازی) بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد (M:500, 100 bp)

هضم قطعه ۷۷۶ جفت بازی ناحیه اینترون ۱ توسط آنزیم محدودالایر *MspI*، ۶ الگوی متفاوت RFLP با قطعات برشی به طول‌های ۵۳۹، ۴۱۴، ۲۶۷، ۲۳۷، ۱۴۷ و ۱۲۵ جفت بازی را تولید نمود که نشان دهنده‌ی برش محصول توسط آنزیم محدودالایر *MspI* در ۳ جایگاه مختلف می‌باشد (شکل ۳). ۶ شکل متفاوت



شکل ۳- RFLP و نقشه چندشکلی *MspI* در ناحیه اینترون ۱ ژن هورمون رشد



شکل ۴- RFLP و نقشه چند شکلی *MspI* در ناحیه اینترون ۴ ژن هورمون رشد

هضم قطعه ۱۱۷۰ جفت بازی ناحیه اینترون ۴، توسط آنزیم محدودالایتر *MspI* نیز ۸ الگوی متفاوت RFLP تولید نمود (شکل ۴). محصولات حاصل از هضم حاکی از وجود سه جایگاه برش با آنزیم *MspI* می‌باشد. الگوی RFLP حاصل از اینترون ۴، تولید قطعات برشی با طول‌های ۱۱۷۰، ۶۸۲، ۵۸۶، ۵۷۸ و ۴۸۲ جفت بازی را نمود که معرف وجود سه جایگاه برش در قطعه ۱۱۷۰ جفت بازی است. ۸ الگوی متفاوت RFLP بوسیله آلل‌های A، B، C، D و E مشخص شدند. آلل A واجد هیچ جایگاه برشی در استفاده از آنزیم *MspI* نمی‌باشد. آلل B تنها دارای یک جایگاه برش a در استفاده از این آنزیم است که ۲ قطعه ۵۷۸ و ۵۸۶ جفت بازی را تولید می‌نماید که بدلیل نزدیک بودن طول آنها به یکدیگر به صورت یک باند به نظر می‌رسند. آلل C نیز در صورت استفاده از آنزیم *MspI* یک جایگاه برش b دارد که قطعات ۶۸۲ و ۴۸۲ جفت بازی را تولید می‌نماید. آلل D تواماً دارای دو جایگاه برش a و b و آلل E دارای دو جایگاه برش a و c می‌باشد.

بررسی چند شکلی ناحیه اینترون ۴ در ۲۰ جمعیت مرغ‌های بومی چین حاکی از وجود ۸ شکل هضمی با آنزیم محدودالایتر *MspI* بود که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد. این محققین با استفاده از آغازگر PMPS1 دو قطعه محصول PCR با اختلاف ۵۰ جفت بازی برای ایجاد ژنوتیپ هتروزیگوت AE را ملاحظه کردند (۹). از طرفی بررسی چند شکلی نواحی اینترون ۱ و ۴ ژن هورمون رشد در مرغان نژاد کاداکنات نیز نشان داد که الگوی RFLP ناحیه اینترون ۱ (۷۷۰ bp) قطعاتی با طول‌های ۵۲۹، ۳۷۳، ۲۴۱ و ۱۵۶ جفت بازی تولید می‌نماید که در اثر وجود دو جایگاه برش ایجاد شده است و با نتایج حاصل از تحقیق جاری مغایرت دارد. الگوی RFLP ناحیه اینترون ۴ (۱۲۱۶ bp) مرغان نژاد کاداکنات نیز قطعاتی با طول ۱۲۱۶ و ۶۰۸ جفت بازی را تولید نمود که در اثر وجود یک جایگاه برش ایجاد شده است (۱۳). لذا بنظر می‌رسد که ساختار ژنتیکی ژن هورمون رشد مرغان بومی ایران و چین در مقایسه با نژاد کاداکنات از شباهت بیشتری برخوردار می‌باشد.

با بررسی حضور انواع الگوی RFLP برای هر دو جایگاه اینترون ۱ و ۴ در جوامع مورد نظر فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی

جایگاه‌های ژنی مذکور محاسبه گردید که اطلاعات آن در جداول ۲ و ۳ ارائه شده است. همانطور که ملاحظه می‌شود، در ناحیه اینترون ۱ و در جمعیت اصفهان شش ژنوتیپ و در جمعیت مازندران پنج ژنوتیپ مختلف ملاحظه شد، بطوریکه ژنوتیپ MM با وفور (۰/۵۸۱) بیشترین فراوانی و ژنوتیپ NO با وفور (۰/۰۰۷) کمترین فراوانی را در این جمعیت به خود اختصاص دادند. این در حالی است که در جمعیت مازندران بالاترین فراوانی به ژنوتیپ OO (۰/۶۱۴) و پایین‌ترین فراوانی به ژنوتیپ MN (۰/۰۱۱) اختصاص داشت. ژنوتیپ هتروزیگوت NO نیز در جمعیت مازندران مشاهده نشد.

بر اساس فراوانی‌های ژنوتیپی، فراوانی‌های آللی برآورد گردید که در جامعه اصفهان آلل M (۰/۶۰) و در جمعیت مازندران آلل O (۰/۶۷) بالاترین فراوانی آللی را به خود اختصاص دادند (جدول ۳).

در ناحیه اینترون ۴ و در جمعیت اصفهان شش ژنوتیپ مختلف مشاهده شد که ژنوتیپ BC با وفور ۰/۲۶ بالاترین فراوانی و ژنوتیپ‌های AA و BB هر یک با وفور ۰/۰۹ پایین‌ترین فراوانی‌ها را به خود اختصاص دادند (جدول ۲). ژنوتیپ‌های AE و AD نیز در این جمعیت مشاهده نشد. در جمعیت مازندران نیز در این ناحیه هفت ژنوتیپ مختلف مشاهده گردید که ژنوتیپ BC با وفور ۰/۳۷۳ بالاترین فراوانی و دو ژنوتیپ AE و AD هر یک با وفور ۰/۰۲۳ کمترین فراوانی را به خود اختصاص دادند و ژنوتیپ هموزیگوت BB در جمعیت مازندران مشاهده نشد.

در ناحیه اینترون ۴ نیز بر اساس فراوانی‌های ژنوتیپی فراوانی‌های آللی برآورد گردید که در جمعیت اصفهان آلل C با وفور ۰/۴۱ و در جمعیت مازندران آلل A با وفور ۰/۳۷ بالاترین فراوانی‌های آللی را به خود اختصاص دادند و آلل‌های D و E نیز هر یک با فراوانی ۰/۰۱ تنها در جمعیت مازندران مشاهده شدند (جدول ۳).

جدول ۲- فراوانی های ژنوتیپی نواحی اینترون ۱ و ۴ ژن هورمون رشد

وفور ژنوتیپ‌ها							مربع کای		
جایگاه	MM	NN	OO	MN	MO	NO			
اینترون ۱							X^2		
اصفهان	(۰/۵۸۱)۷۵	(۰/۱۹۴)۲۵	(۰/۱۷۰)۲۲	(۰/۰۱۶)۲	(۰/۰۳۲)۴	(۰/۰۰۷)۱	۲۰۹/۸		
مازندران	(۰/۲۱۶)۱۹	(۰/۰۴۶)۴	(۰/۶۱۴)۵۴	(۰/۰۱۱)۱	(۰/۱۱۳)۱۰	(۰)۰	۱۱۱/۶		
اینترون ۴	AA	BB	CC	AB	AC	BC	AE	AD	X^2
اصفهان	(۰/۰۹۹)۹	(۰/۰۹۹)۹	(۰/۱۷۶)۱۶	(۰/۱۵۴)۱۴	(۰/۲۰۸)۱۹	(۰/۲۶۴)۲۴	(۰)۰	(۰)۰	۰/۹۳
مازندران	(۰/۲۳۲)۱۰	(۰)۰	(۰/۱۱۶)۵	(۰/۰۹۴)۴	(۰/۱۳۹)۶	(۰/۳۷۳)۱۶	(۰/۰۲۳)۱	(۰/۰۲۳)۱	۲۲/۹

جدول ۳- فراوانی های آللی نواحی اینترون ۱ و ۴ ژن هورمون رشد

جایگاه	جمعیت	وفور آللی				
		M	N	O		
اینترون ۱	اصفهان	۰/۶۰	۰/۲۱	۰/۱۹	-	-
	مازندران	۰/۲۸	۰/۰۵	۰/۶۷	-	-
اینترون ۴	اصفهان	۰/۲۸	۰/۳۱	۰/۴۱	۰	۰
	مازندران	۰/۳۷	۰/۲۴	۰/۳۷	۰/۰۱	۰/۰۱

دو جامعه از نظر صفات تاثیر پذیر از این جایگاهها دارد که با توجه به عدم وجود اطلاعات فنوتیپی طیور مورد بررسی نمی توان در این زمینه اظهار نظری نمود. لذا پیشنهاد می شود که در تحقیقات آینده اینگونه تحقیقات بر روی طیوری صورت گیرد که از آنها اطلاعات فنوتیپی صفات اقتصادی نیز در دسترس می باشد تا بتوان ارتباط میان آلل های موجود در جایگاه های مورد بررسی را با صفات اقتصادی مورد بررسی قرار داد.

بررسی چند شکلی ناحیه اینترون ۱ مرغ های سویه لگهورن که برای تولید تخم انتخاب شده اند نشان داده است که وفور آلل O در این جمعیت بیشترین مقدار (۰/۹۵) و وفور آلل N در آن صفر بوده است (۴). لذا بر همین اساس محققین احتمال داده اند که بالا بودن راندمان تولید تخم در سویه لگهورن ممکن است با فقدان آلل N یا بالا بودن وفور آلل O مرتبط باشد (۴).

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که نواحی اینترون ۱ و ۴ ژن هورمون رشد در مرغ های بومی اصفهان و مازندران از چند شکلی نسبتاً بالایی برخوردار هستند. تفاوت موجود در فراوانی های ژنی و ژنوتیپی یافت شده بین دو جمعیت اصفهان و مازندران در جایگاه های مورد بررسی در این تحقیق حکایت از تفاوت ژنتیکی

منابع

۱. ترکاشوند، ر. ۱۳۸۴. مروری بر تحولات مرغ بومی ایران. مجموعه مقالات اولین همایش مرغ بومی کشور
2. Apa R, Lanzone A and Micheli F (1994) Growth hormone induces invitro maturation of follicle and cumulus-enclosed rat oocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 106: 207-212.
3. Bingxue Y, Xuemel D, Jing F, Xiaoxiang H, Changxin W and Ning L (2003) Single nucleotide polymorphism analysis in chicken growth hormone gene and its associations with growth and carcass traits. *Chinese Science Bulletin*, 48:1561-1564.
4. Ip SCY, Zhang X and Leung FC (2001) Genomic growth hormone gene polymorphisms in native chinese chickens. *Experimental Biology and Medicine*, 226:458-462.
5. Kelley SM and Felton DL (1995) Experimental basis for neural immune interactions. *Physiological Research*, 75: 77-106.
6. Lamb LC, Galehouse DM and Foster DN (1988) Chicken growth hormone cDNA sequence. *Nucleic Acids Research*, 16:9339
7. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16:1215.
8. Mou L, Liu N, Zadworny D, Chalifour L and Kuhnlein U (1995) Presence of an additional PstI fragment in intron 1 of the chicken growth hormone-encoding gene. *Gene*, 160:313-314.
9. Nie Q, Ip SCY, Zhang X, Leung FC and Yang G (2002) New variations in intron 4 of growth hormone gene in chinese native chickens. *Journal of Heredity*, 93:277-279.
10. Nie Q, Sun B, Zhang D, Luo C, Ishag NA, Lei M, Yang G and Zhang X (2005) High diversity of the chicken growth hormone gene and effects on growth and carcass traits. *Journal of Heredity*, 96:698-703.
11. Shaw EM, Shoffner RN, Foster DN and Guise KS (1991) Mapping of the growth hormone gene by in situ hybridization to chicken chromosome 1. *Journal of Heredity*, 82:505-508.
12. Tanaka M, Hosokawa Y, Watahiki M and Nakashima K (1992) Structure of the chicken growth hormone-encoding gene and its promoter region. *Gene*, 112:235-239.
13. Thakur MS, Parmar SNS, Chaudhari MV and Bhardwaj JK (2009) Growth hormone gene polymorphism and its association with egg production in Kadaknath chicken. *Livestock Research for Rural Development*, 21 (8).
14. Yerle M, Lahbib-Mansais Y, Thomsen PD and Gellin J (1993) Localization of the porcine growth hormone gene to chromosome. *Animal Genetics*, 24:129-131.

