نشریه آموزشی- پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور
فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی
شماره ۲۰، پاییز ۱۳۹۵
ص‌ص: ۷۱~۷۶

بررسی چند شکلی ژن IGFI و ارتباط آن با صفات تولیدی در مرغ بومی آذربایجان غربی

- **حمید رضا سیدآبادی** (نویسنده مسئول)
  موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی. کرج. ایران
- **مهدی سید بابایی**
  استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر، آذربایجان شرقی
- **ابوالفضل قربانی**
  استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر، آذربایجان شرقی
- **نصرت الله ضرغامی**
  دانشکده علوم نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی بهداشتی تبریز

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۹۶۴۳۵۷۸۵
Email: h_seyedabadi@yahoo.com

چکیده

هرچند انتخاب مرسوم بر اساس ارزش‌های ژنتیکی در جوجه‌های گوشتی موجب بهبود درسرعت رشد و بازده تولید گوشت در طی چند دهه گذشته شده است، ولی بدلیل همبستگی منفی بین صفات تولیدی و شایستگی، امروزه اصلاح نژاد در طیور با مشکل مواجه شده است. لذا انتخاب چند صفتی برای بهبود همزمان در این صفات تنها بر اساس انتخاب فنوتیپی مشکل می‌باشد. بنابراین انتخاب بر اساس نشانگرهای مولکولی می‌تواند برای افزایش بازده انتخاب و بهبود عملکرد تولیدی مناسب باشد. فاکتور رشد شبه انسولینی I (IGFI)، ژن کاندید با عملکرد فیزیولوژیکی وسیع در فرآیند رشد و تولید مثلی می‌باشند. هدف این پژوهش، تعیین چند شکلی ژن IGF-I و بررسی ارتباط آن با صفات تولیدی در مرغ بومی آذربایجان غربی بود. بدین منظور، از تعداد ۱۰۰ قطعه مرغ بومی از مرغان مولد ایستگاه اصلاح نژاد مرغ بومی استان آذربایجان‌غربی، نمونه خون تهیه و استخراج DNA از نمونه‌ها صورت گرفت. سپس ژنوتیپ حیوانات با استفاده از روش PCR-RFLP و آنزیم برشی *HinfI* تعیین گردید. برای ژن IGF-I دو آلل A و C با فراوانی ۰/۵۸ و ۰/۴۲ شناسایی شد. نتایج این تحقیق نشان داد که چند شکلی‌های مشاهده شده، با هیچ‌کدام از صفات تولیدی مورد مطالعه در این تحقیق ارتباط معنی‌داری ندارند. بر این اساس می‌توان نتیجه گرفت که جایگاه‌های مورد مطالعه نمی‌توانند به عنوان ژن کاندید برای صفات تولیدی در برنامه‌های اصلاح نژادی مرغ بومی آذربایجان غربی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: ژن IGF-I ، صفات رشد، چندشکلی،PCR-RFLP.

Applied Animal Science Research Journal No 20 pp: 71-76

Association of IGF1 gene with production traits in West Azerbaijan native chicken

By: Hamid Reza Seyedabadi[1]*, Mehdi Seyyed Babayi [2], Abolfazl Gorbani [2], Nosratollah Zarghami [3]
1.Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
2. Department of Animal Science, Shabestar Branch, Islamic Azad University, Shabestar, Iran
3.The Umbilical Cord Stem Cell Research Center (UCSRC), Tabriz University of Medical Science, Tabriz, Iran

Insulin like Growth Factor is a candidate gene with a wide variety of physiological functions in growth and reproduction processes**.** The current study was designed to investigate the associations of IGF1 gene polymorphism with production traits in West Azerbaijan native chicken. Genomic DNAs were extracted from 100 chickens. Genotyping for the IGF1gene was determined by using PCR-RFLP method. The PCR products from IGF1 loci was digested with *HinfI* restriction endonuclease. Two alleles were found (A and C alleles) for IGF1, with frequencies of 0.58 and 0.42. The association analysis between the polymorphism IGF1 gene and production traits were carried out. Significant relationship was not found between genotypes with production traits. The results of current study showed that using information of genes related to production traits couldn't be used to improve the performance of native chicken of East Azerbaijan province.

Key words: IGF1 gene, production traits, Polymorphism, PCR-RFLP

مقدمه

هرچند انتخاب مرسوم بر اساس ارزش‌های ژنتیکی در جوجه‌های گوشتی موجب بهبود در سرعت رشد و راندمان تولید مثلی در طی چند دهه گذشته شده است، ولی بدلیل همبستگی منفی بین صفات تولیدی و تولیدمثلی، امروزه اصلاح نژاد در طیور با مشکل مواجه شده است(۲،۳). لذا انتخاب چند صفتی برای بهبود همزمان در این صفات تنها بر اساس انتخاب ژنتیکی مشکل می‌باشد. بنابراین انتخاب بر اساس نشانگرهای مولکولی می‌تواند برای افزایش بازده انتخاب و بهبود عملکرد تولیدی مناسب باشد(۴). فاکتورهای رشد شبه انسولین(IGF) یک خانواده از هورمون‌های پپتیدی هستند که عملکردهای متابولیکی و آنابولیکی آن از نظر ساختار با هورمون انسولین ارتباط دارد(۸). اثرات متابولیکی هورمون IGF-I در طیور باعث افزایش مصرف اسیدهای آمینه و گلوکز و تنظیم سنتز پروتئین و DNA می شود(۸). فاکتور رشد شبه انسولین (IGF-I) ساختار مشابهی با هورمون انسولین دارد. این هورمون نقش مهمی در رشد و نمو بافت‌های مختلف بدن دارد و بوسیله ژن IGF-I رونویسی می شود. ژن IGF-I طیور در روی کروموزوم ۱ قرار دارد(۱۴). ژن IGF-I در رشد بافت‌های مختلف شامل: بافت عضله(تکثیر و تمایز سلولهای عضلانی)، بافت غضروفی (تشکیل مجموعه کندروسیت و فعالیت الکالین فسفاتاز) و بافت استخوانی(تکثیر و تقسیم سلولهای استخوان) نقش مهمی بازی می کند(۱۳). Promwateeو همکاران (۲۰۱۳)، ارتباط چند شکلی ژن IGF-I با خصوصیات لاشه و رشد در ۴ دسته از مرغان بومی تایلند را مورد مطالعه قرار دادند. در این تحقیق ارتباط معنی دار برخی صفات رشد با چند شکلی IGF-I مورد تأیید قرار گرفت.

این محققین بیان داشتند که ژن IGF-I به عنوان ژن نشانگر برای انتخاب صفات لاشه و رشد در برنامه های اصلاحی می تواند مورد استفاده قرار گیرد. Alia و همکاران (۲۰۱۳)، چند شکلی ژن IGF-I در مرغان اصیل پاکستان را با استفاده از تکنیک PCR-RFLP مطالعه نمودند. ناحیه پروموتور و 5'-UTR به طول ۶۲۱ جفت باز از این ژن تکثیر و هضم باآنزیم *HinfI* دو آلل A و B را در این جمعیت با سه ژنوتیپ ممکن نشان داد. Shahو همکاران (۲۰۱۲)، فراوانی های ژنوتیپی و آللی ژن‌های IGF-I و IGF-II را در طیور گوشتی با استفاده از تکنیک PCR-RFLP مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند. قطعه ۷۹۳ جفت بازی از ژن IGF-I تکثیر و توسط آنزیم *HinfI* هضم صورت گرفت. دو آلل A و B و سه ژنوتیپ AA، BB و AB مشاهده گردید. نتایج نشان داد در این جمعیت از طیور گوشتی فراوانی آلل B غالب بیشتر از آلل A می باشد.

با توجه به فرض وجود ارتباط معنی دار بین ژن IGF-I ، با صفات رشد در طیور و از آنجا که تاکنون تحقیقی بر روی بررسی ارتباط چندشکلی این ژن‌ها با صفات رشد در مرغ بومی آذربایجان غربی انجام نگرفته است، انجام این تحقیق و استفاده از نتایج آن در برنامه‌های اصلاح نژادی ضروری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جامعه آماری مورد مطالعه

برای مطالعه چندشکلی ژن IGF-I ، از پرندگان نسل ۱۲ گله تحقیقاتی مربوط به مجتمع پرورش و اصلاح نژاد مرغ بومی آذربایجان‌غربی واقع در منطقه طلاتپه ارومیه نمونه‌گیری به عمل آمد. در این تحقیق از تعداد ۱۰۰ پرنده (۴۵ قطعه خروس و ۵۵ قطعه مرغ) با شرایط پرورشی یکسان به طور تصادفی انتخاب و نمونه‌گیری شدند. همچنین از ارزش های اصلاحی مربوط به صفات وزن بدن در پایان ۱۲ هفتگی، سن بلوغ‌جنسی، تعداد تخم-مرغ و میانگین وزن تخم‌مرغ، در این مطالعه استفاده شد.

جمع‌آوری نمونه‌ها

از تمام پرندگان به مقدار ۲ میلی‌لیتر خون از سیاهرگ ناحیه مثلثی زیر بال، در تیوب‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA خونگیری به عمل آمد و نمونه‌های خون اخذ شده بلافاصله به یخ منتقل و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر انتقال و تا زمان استخراج DNA در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگه‌داری شدند. استخراج DNA از نمونه‌های خون کامل به روش بهینه شده و تغییر یافتهٔ استخراج نمکی انجام گردید (۵). کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA استخراج شده به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر-نانودراپ (Nano-Drop2000) بررسی گردید. بر اساس اطلاعات ژنومی از توالی ژن IGF-I آغازگرهای مورد نظر برای ناحیه پروموتور طراحی شدند. توالی آغازگر مورد استفاده در این تحقیق به صورت زیر می‌باشد:

آغازگر IGF-I :

Forward:5'- CA TT GC GC AG GC TC TA TC TG -3'
Reverse:5'-C AA GA GA AG CC CT TC AA GC-3'

پس از آزمایش غلظت‌های مختلف اجزا PCR، شرایط بهینه PCR با حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر به صورت بافر PCR ۱x، $MgCl_2$ ۲ میلی مولار، آغازگرها ۰/۲۵ میکرو مولار، dNTPs ۲۰۰ میکرو مولار، یک واحد آنزیم Taq پلیمراز و DNA الگو به میزان ۱۵۰ ng در هر واکنش PCR بدست آمد. برنامه حرارتی مناسب برای آغازگرها به صورت: واسرشته سازی اولیه در ۹۴ درجه سیلسیوس به مدت ۴ دقیقه و ۳۵ سیکل شامل: واسرشته سازی اولیه در ۹۴ درجه سیلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۹ درجه سیلسیوس به مدت ۱ دقیقه برای آغازگر IGF-I و مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سیلسیوس به مدت ۱ دقیقه انتخاب و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سیلسیوس به مدت ۸ دقیقه در نظر گرفته شد. پس از تکثیر جایگاه IGF-I ، یک قطعه ۸۱۳ جفت بازی حاصل شد. عمل هضم آنزیمی با حجم ۱۰ میکرولیتر با استفاده از آنزیم برشی *HinfI* (۱۰ واحد آنزیمی در هر واکنش) در دمای ۳۷

درجه سیلسیوس و در طول شب بر روی محصول PCR انجام شد. برای مشاهده قطعات هضم شده از ژل آگارز ۳ درصد و ولتاژ ۱۵۰ به مدت ۵ ساعت استفاده شد. رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید صورت گرفت و قطعات تکثیر شده زیر لامپ UV مشاهده گردیدند.

اطلاعات بدست آمده با استفاده از مدل آماری زیر و با روش GLM در نرم افزار آماری SAS (۱۱) آنالیز و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت:

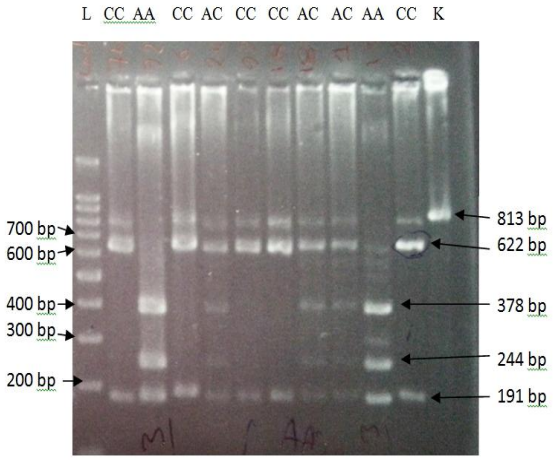
$$y_{ijk} = \mu + Genotype_i + Sex_j + e_{ijk}$$

y_{ijk}: ارزش اصلاحی صفات مورد مطالعه ، μ : میانگین ارزش-های اصلاحی صفات و e: اثر باقیمانده می‌باشد. عوامل ژنوتیپ (Genotype) و جنس (Sex) به عنوان اثرات ثابت در مدل وارد گردیدند.

ارزش‌های اصلاحی صفات مورد نظر در سطوح مختلف ژنوتیپ-های جایگاه‌های مورد مطالعه با استفاده از میانگین حداقل مربّعات داده‌ها (LSM) محاسبه شده، مورد بررسی قرارگرفت. برای برآورد فراوانی آلل‌ها و آزمون کای مربع(χ۲) از نرم افزار Pop Gene 3.1 استفاده گردید(۱۵).

نتایج و بحث

جهش ترانزیشن A→C در موقعیّت باز ۵۷۰ واقع در ناحیه ۵′ مجاور (پروموتور) از ژن IGF-I دو جایگاه برش برای آنزیم *HinfI* ایجاد می‌کند. هضم محصول ۸۱۳ جفت‌باز تکثیر شده با آنزیم *HinfI* باعث ایجاد سه قطعه برش خورده سه قطعه ۳۷۸، ۲۴۴ و ۱۹۱ جفت باز برای ژنوتیپ هموزیگوت AA، دو قطعه ۶۲۲ و ۱۹۱ جفت باز برای ژنوتیپ هتروزیگوت CC و چهار قطعه ۶۲۲، ۳۷۸، ۲۴۴ و ۱۹۱ جفت‌باز برای ژنوتیپ هموزیگوت AC می‌شود (شکل ۱).



شکل ۱: محصولات حاصل از هضم قطعه ۸۱۳ جفت باز ژن IGF-I با آنزیم *HinfI* بر روی ژل آگارز ۳ درصد.

Zhou و همکاران (۲۰۰۵)، با استفاده از تکنیک PCR-RFLP، ناحیه پروموتور ژن IGF-I را در مرغان لگهورن و فایومی مورد بررسی و جهش تک نوکلئوتیدی (A→C) در موقعیت باز ۵۷۰ (با شماره دسترسی M74176) را گزارش نمودند که با نتایج تحقیق حاضر کاملا مشابه می باشد. در تحقیق مشابه دیگر، Kadlec و همکاران (۲۰۱۱)، در سویه‌های Ross 300 و Cobb 500 مرغان گوشتی، قطعه ۸۱۳ جفت بازی ژن IGF-I را تکثیر نموده و بعد از هضم، ژنوتیپ AA با قطعات ۳۷۸، ۲۴۴ و ۱۹۱ جفت باز وCC با دو قطعه ۶۲۲ و ۱۹۱ جفت باز را مشاهده نمودند. در این تحقیق ژنوتیپ CC مشاهده نگردید.

فراوانی ژنی و ژنوتیپی محاسبه شده برای جمعیّت مورد مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است. در جمعیّت مورد مطالعه، فراوانی آلل A بیشتر از آلل C مشاهده شد. در تحقیقی که Kadlec و همکاران (۲۰۱۱)، بر روی سویه Ross 300 انجام دادند فراوانی آلل A را بیشتر از آلل C گزارش نمودند (به ترتیب۰/۹۱۵ و۰/۰۸۵). مقایسه تعداد افراد مشاهده شده و مورد انتظار برای هر ژنوتیپ با استفاده از آزمون کای مربع(χ۲) نشان داد که مقدار آماره محاسبه شده در جمعیّت حاضر بزرگتر از ارزش بحرانی جدول کای مربع (۳/۸۴۱) بوده و نشان داد که توزیع ژنوتیپ ها در این خطوط از تعادل خارج می باشد(جدول ۲). این عدم تعادل با توجّه به انتخابی که برای صفات مورد مطالعه در این جمعیّت‌ها صورت می گیرد قابل توجیه می‌باشد.

جدول ۱: فراوانی مشاهده شده ژنوتیپی و آللی در جایگاه IGF-I

ژن	فراوانی ژنوتیپی						فراوانی آللی	
IGF1	CC		AC		AA		C	A
	تعداد	فراوانی	تعداد	فراوانی	تعداد	فراوانی	فراوانی	فراوانی
	۲۷	۰/۲۷	۱۵	۰/۱۵	۵۱	۰/۵۱	۰/۴۲	۰/۵۸

جدول۲: آزمون کای مربّع برای بررسی توزیع ژنوتیپ‌ها در ژن IGF-I

جمعیت	آماره X^2	$P_r>X^2$
مرغ بومی استان آذربایجان غربی	۴۷/۷۷	۰/۰۰۰

ارتباط چندشکلی ژن IGF-Iبا صفات تولیدی

جدول ۳: میانگین حداقل مربّعات ژنوتیپ‌های IGF-I برای صفات تولیدی

صفت	P-value	CC	AC	AA
وزن در ۱۲ هفتگی	۰/۸۱	۱۷۸/۱۱±۴/۹۲	۱۷۳/۷۷ ±۵/۹۴	۱۷۳/۱۶ ±۹/۱۲
سن بلوغ جنسی	۰/۳۱	۱۲/۱۴ ±۰/۳۰	۱۳/۷۳±۰/۹۳	۱۲/۲۷±۰/۶۰
تعداد تخم‌مرغ	۰/۷۷	۱/۶۳±۰/۱۱	۱/۴۸±۰/۲۰	۱/۵۴±۰/۱۳
میانگین وزن تخم‌مرغ	۰/۲۷	۰/۱۲±۰/۰۶	۰/۰۲±۰/۰۷	۰/۰۵±۰/۱۱

چندشکلی در ناحیه پروموتور ژن IGF-I و اثر جنس با هیچ یک از صفات تولیدی ارتباط معنی‌داری نشان نداد (P>۰/۰۵). نتایج نشان داد پرندگان با ژنوتیپ CC نسبت به دیگر ژنوتیپ‌ها، برای اکثر صفات تولیدی به جزء صفت سن بلوغ جنسی دارای میانگین حداقل مربّعات بیشتری می‌باشد(جدول۳). بر خلاف تحقیق حاضر، Lei و همکاران (۲۰۰۸)، ارتباط معنی دار (P<0.05) بین چند شکلی IGF-I و صفات تولید تخم مرغ و متوسط روزهای تخم گذاری پیوسته[1] گزارش کردند. در تحقیق دیگری که توسط Rashidi و همکاران(۲۰۱۲)، در مرغ بومی مازندران بر روی همین ناحیه انجام گرفت مشابه با تحقیق حاضر ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی‌های موجود در این ناحیه باصفات تولید ی مشاهده نشد(P>۰/۰۵).

نتیجه‌گیری کلّی

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که فراوانی آللی جایگاه‌های مورد مطالعه در جمعیّت‌های مختلف متفاوت هستندکه این تفاوت می‌تواند ناشی از تفاوت بین جمعیّت‌ها و اندازه نمونه‌های جمعیّتی و تفاوت در استراتژی‌های انتخابی در هرجامعه باشد. همچنین با توجّه به اینکه جمعیّت‌های مورد بررسی در این تحقیق برای چندین نسل تحت انتخاب بوده‌اند پس انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ امری منطقی خواهد بود. نتایج این تحقیق نشان داد که جایگاه IGF-I ، با هیچ‌کدام از صفات مورد مطالعه در این تحقیق ارتباط معنی‌داری ندارند که با نتایج برخی از پژوهش‌ها در جمعیّت‌های متفاوت هم-خوانی دارد. مشاهده ارتباط معنی‌دار بین چندشکلی موجود در ژن-های کاندید مورد مطالعه با برخی صفات تولیدی در بعضی از تحقیقات پیشین، می‌تواند ناشی از عدم تعادل پیوستگی بین SNP و دیگر جهش‌های رخ داده در این جایگاه‌ها و یا دیگر ژن‌هایی باشد که به طور مستقیم در تنظیم فنوتیپی این صفات نقش دارند. این اثر بستگی به نژاد، ساختار جامعه و فشار انتخاب بر جامعه دارد. بنابراین می‌توان انتظار داشت این اثر در برخی از جمعیّت‌ها مشاهده و در

1-Average Days of Continual Egg-laying

برخی دیگر مشاهده نشود. لذا، با توجه به اینکه در این تحقیق ، فقط چندشکلی یک جهش مورد مطالعه قرار گرفت و با توجّه به شناسایی جهش‌های دیگر در این ژن، پیشنهاد می‌شود تحقیقات بیشتری با تأکید بر تمام چندشکلی‌ها در یک ژن صورت گیرد تا درک درستی از وظایف ژن مورد نظرحاصل شود. همچنین، اگر چه اطّلاعات حاصل از چندشکلی‌های یک جایگاه ژنی به منظور مطالعه تأثیرآن با صفات مورد نظر حائزاهمیت است ولی نمی‌تواند به تنهایی به عنوان یک معیار انتخاب در شرایط عملی مورد استفاده قرار گیرد و لازم است اطلاعات حاصل از نتایج تحقیق در جایگاه‌های فوق در کنار اطّلاعات حاصل از سایر جایگاه‌ها، تجزیه و تحلیل شود و انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه در آینده ضروری به نظر می‌رسد.

منابع

Alia, A., Javeda, K., Alia, A., Akramb, M., Pashaa, H.M., Alib, A. and Ahmad, S. (2013). Detection of polymorphism of Insulin-like growth factor-I (IGF-I) gene in native Aseel chicken breed of Pakistan using PCR-RFLP. Agric Adv 2(6), 173,176.

Burt, D.W., Dey, B.R., Paton, I.R., Morrice, D.R. and Law, A.S. (1995). The chicken transforming growth factor-beta 3 gene: genomic structure, transcriptional analysis, and chromosomal location. DNA Cell Biology. 14, 111, 23.

Dunn, I. C., Miao Y. W., Morris,A., Romanov, M.N., Wilson, P.W. and Waddington, D. (2004). A study of association between genetic markers in candidate genes and reproductive traits in one generation of a commercial broiler breeder hen population. Heredity. 92, 128,134.

Emara, M.G. and Kim, H. (2003). Genetic markers and their application in poultry breeding. Poultry Science. 82, 952,957.

Javanrouh, A., Banabazi, M.H., Esmaeilkhanian, S., Amirinia, C., Seyedabadi, H.R. and Emrani, H. (2006). Optimization onsalting out method for DNA extraction from animal and poultry blood cells. The 57th Annual Meeting of the European Association for Animal Production. Antalya, Turkey.

Kadlec, J., Hosnedlova, B., Rehout, V., Citek, J., Vecerek, L. and Hanusova, L. (2011). Insulin like growth factor-I gene polymorphism and its association with growth and slaughter characteristics in broiler chickens. J. Agrobiol. 28(2), 157,163.

Lei, M., Peng, X., Zhou, M., Luo, C., Nie, Q. and Zhang, X. (2008). Polymorphisms of the IGF1R gene and their genetic effects on chicken early growth and carcass traits. BMC Genetics 9(70), 1, 9.

McMurtry J.P. 1998. Nutritional and developmental roles of insulin-like growth factors in poultry. J. Nutr. 128, 302S– 305S.

Promwatee, N., Laopaiboon, B., Vongpralub, T., Phasuk, Y., Kunhareang, S., Boonkum, W. and Duangjinda, M. (2013). Insulin-like growth factor I gene polymorphism associated with growth and carcass traits in Thai synthetic chickens. Genet Mol Res. 12,4332, 4341.

Rashidi, H., Rahimi-Mianji, G., Farhadi, A. and Gholizadeh, M. (2012). Association of prolactin and prolactin receptor gene polymorphisms with economic traits in breeder hens of indigenous chickens of Mazandaran province. IRAN. J. of Biotechnolojy. 10 (2), 129,135.

SAS, institute. (2003). SAS/STAT Users Guide (ver 9). SAS Institute, Inc., Cary, NC.

Shah, T., Deshpande, S., Dasgupta, U., Singh, K., et al. (2012). Genotypic and allelic frequencies of IGF1 and IGF2 genes in broilers analysed by using PCR-RFLP techniques. Iran. J. Appl. Anim. Sci 2, 357, 360.

Zapf, J. and E. R. Froesch. (1999). Insulin-like growth factor I actions on somatic growth. In Handbook of Physiology. J. L. Kostyo, ed. Oxford University Press, New York.

Zhou, H., Mitchell, A.D., McMurtry, J. P., Ashwell, C.M. and Lamont, S. J. (2005). Insulin-Like Growth Factor-I Gene Polymorphism Associations with Growth, Body Composition, Skeleton Integrity, and Metabolic Traits in Chickens. Poult. Sci. 84, 212,219.

Yeh, F.C., Yang, R. and Boyle, T. (1999). POPGENE. Version 1.31. Microsoft Window based Freeware for Population Genetic Analysis, University of Alberta. Edmonton, AB, Canada.