

ĐA HÌNH 24-bp INSERTION-DELETETION VÀ C2402T CỦA GEN PROLACTIN Ở HAI GIỐNG GÀ BẢN ĐỊA VIỆT NAM: GÀ RI VÀ GÀ MÍA

Nguyễn Hoàng Thịnh*, Nguyễn Thị Châu Giang

Khoa Chăn nuôi, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Email: nhthinh@vnua.edu.vn

Ngày gửi bài: 01.03.2018

Ngày chấp nhận: 20.06.2018

TÓM TẮT

Các giống gà bản địa Việt Nam thích nghi tốt với điều kiện nhiệt đới, chất lượng thịt, trứng thơm ngon nhưng có tốc độ sinh trưởng và năng suất trứng thấp nên khó cạnh tranh được với các giống gà công nghiệp năng suất cao dẫn đến số lượng giảm sút. Đa hình 24-bp Insertion-Deletion và C2402T của gen prolactin được xem là gen ứng cử để cải tiến năng suất trứng ở gia cầm (Cui *et al.*, 2006; Rashidi *et al.*, 2012). Nghiên cứu được tiến hành để xác định hai đa hình 24-bp Insertion-Deletion và C2402T ở gà Ri và gà Mía. Kết quả cho thấy ở hai quần thể nghiên cứu đa hình 24-bp Insertion-Deletion xuất hiện 3 kiểu gen là: DD, ID và II. Trong đó kiểu gen II ở gà Ri và gà Mía có tần số xuất hiện thấp, tương đối như nhau (0,07) trong khi đó đối với kiểu gen DD ở gà Ri và Mía xuất hiện với tần số cao, lần lượt tương ứng 0,68 và 0,82. Đối với đa hình C2402T ở cả 2 quần thể đều xuất hiện 3 kiểu gen là: CC, CT và TT. Tần số kiểu gen TT ở cả hai giống xuất hiện với tần số cao lần lượt tương ứng là 0,64 và 0,84; kiểu gen CC ở cả hai giống gà Ri và gà Mía xuất hiện với tần số thấp tương ứng là 0,08 và 0,07.

Từ khóa: đa hình, gà bản địa, gen prolactin.

Evaluation of 24-bp Insertion-Deletion and C2402T Polymorphisms of the Prolactin Gene in Two Vietnamese Native Chickens: Ri and Mia Chicken

ABSTRACT

The Vietnamese native chickens have good adaptability to tropical condition and high meat and egg quality. However, these breeds have low growth rates and reproduction so they can not compete with high-yield industrial breeds and their population is declining. Polymorphisms (24-bp Insertion-Deletion và C2402T) of Prolactin gene was popularly considered as candidate genes in the genetic analysis for the improved performance traits in poultry. The study was conducted to determine two SNPs (24-bp Insertion-Deletion and C2402T) of Prolactin gene in two Vietnamese native breeds Ri and Mia chicken. For 24-bp Insertion-Deletion polymorphism, the II genotype in Ri chicken and Mia chicken occurred at low frequencies, (0.07) whereas for DD genotypes in Ri and Mia chickens occurred at high frequencies, 0.68 and 0.82, respectively. For C2402T polymorphism, the study showed that two breeds (Ri and Mia) had the highest TT genotypic frequency with 0.64 and 0.84, respectively. The CC genotype in both Ri and Mia chickens appeared at low frequencies of 0.08 and 0.07, respectively.

Keywords: Polymorphisms, native chickens, Prolactin gene.

1. MỞ ĐẦU

Trong cơ cấu chăn nuôi gia cầm ở nước ta, tỉ lệ gà bản địa chiếm 50 - 70% trên tổng đàn gà (Hanh *et al.*, 2007; Desvaux *et al.*, 2008; Berthouly *et al.*, 2010). Trứng của các giống gà nội với phương thức chăn nuôi truyền thống chỉ

nặng khoảng 45 g nhưng luôn được người tiêu dùng ưa thích và sẵn sàng trả giá cao hơn để mua thay vì mua trứng gà công nghiệp nặng đến 60 g. Trứng gà nội, mặc dù rất được ưa chuộng và có giá cao nhưng vẫn không đáp ứng đủ nhu cầu của thị trường bởi do các giống gà nội có tập tính ấp cao, thành thực sinh dục muộn nên sản lượng

trứng thấp (gà Ri khoảng 110 quả/mái/năm, gà Mía 80 quả/mái/năm, gà Đông Tảo 60 quả/mái/năm) so với các giống gà ngoại nhập cao sản hướng trứng (gà Leghor 270 quả/mái/năm, Gà ISA Brown 300 trứng/mái/năm) để đạt được sản lượng trứng cao các giống gà siêu trứng đã phải trải qua chọn lọc kỹ lưỡng và qua nhiều thế hệ và điểm nổi bật của các giống gà này hầu như không còn tính ấp bóng.

Để khắc phục nhược điểm đẻ kém ở các giống gà bản địa, đã có nhiều công trình nghiên cứu về cải tiến giống cũng như về dinh dưỡng đã được tiến hành. Nhưng do chọn lọc chủ yếu vẫn dựa vào các đặc điểm ngoại hình, quản lý đàn gà giống không tốt và bên cạnh đó phương thức chăn thả quảng canh dẫn đến gà bị pha tạp, sức đẻ kém, sản lượng trứng thấp, tăng trọng chậm và các giống gà bản địa vẫn trên đà bị suy giảm nghiêm trọng.

Những năm gần đây, việc ứng dụng di truyền phân tử trong chọn lọc giống cải thiện một số tính năng sản xuất một số giống gà bản địa trên thế giới đã có những thành tựu nhất định. Việc chọn tạo giống dựa vào các gen đặc hiệu sẽ mang lại hiệu quả lớn không chỉ chọn được những cá thể có vốn gen tốt mà còn rút ngắn được đáng kể thời gian chọn lọc. Trong công tác giống gia cầm đã có nhiều nghiên cứu để cập đến đa hình và chọn lọc dựa vào các gen sinh sản nhằm cải thiện khả năng cho trứng của một số giống gà bản địa (Romanov *et al.*, 2002; Rashidi *et al.*, 2012; Goto *et al.*, 2014). Hiện nay, có nhiều marker phân tử liên quan đến các tính trạng sản xuất đã được sử dụng nhằm trợ giúp nâng cao kết quả chọn lọc tính trạng sản lượng trứng, giảm thời gian và số lần ấp của một giống gia cầm bản địa, trong đó có chỉ thị phân tử SNPs (Jiang *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2006; Bhattacharya *et al.*, 2011).

Khả năng đẻ trứng, thời gian và số lần ấp ở gia cầm được điều khiển bởi các gen trong trục sinh sản, trong đó có gen tổng hợp Prolactin là ảnh hưởng lớn nhất đến tính trạng này. Gen prolactin (định khu trên nhiễm sắc thể số 2, dài khoảng 8 kbp, có 5 exon) mã hóa tổng hợp hormon Prolactin (hormone polypeptit) và được

tiết ra bởi tuyến yên, từ đó tác động đến thụ thể của hormon này để điều khiển khả năng đẻ trứng và tập tính ấp của gia cầm (Shimada *et al.*, 1991; Wong *et al.*, 1991; Ohkubo *et al.*, 1998).

Việc giảm hoặc loại bỏ tập tính ấp của gia cầm có thể đạt được bằng cách ức chế sự biểu hiện của gen prolactin hoặc ngăn cản sự tương tác của Prolactin với thụ thể của nó (Youngren *et al.*, 1991; Kurima *et al.*, 1995). Quá trình phiên mã của gen prolactin được hoạt hóa bởi nhân tố Pit-1 (Nelson *et al.*, 1988; Bradford *et al.*, 2000). Nhân tố Pit-1 bám vào vùng 5' untranslated của gen prolactin, từ đó khởi động cho quá trình phiên mã tạo ra mRNA thông tin để tổng hợp hormon Prolactin (Kurima *et al.*, 1995; Ohkubo *et al.*, 2000). Các nghiên cứu đều cho thấy vị trí bám của nhân tố Pit-1 thay đổi sẽ dẫn đến ảnh hưởng đến sự biểu hiện của mRNA, từ đó sẽ ảnh hưởng đến tập tính ấp và khả năng sản xuất trứng của gia cầm.

Gen prolactin có tính đa hình cao và có nhiều SNP đã được phát hiện (Wong *et al.*, 1991; Liang *et al.*, 2006; Cui *et al.*, 2006 & 2011). Trong các đa hình SNP đã được phát hiện, có hai đa hình 24-bp Insertion-Deletion và C2402T là đa hình có ảnh hưởng đến sản lượng trứng và tập tính ấp của gia cầm. Theo dõi trên hai giống gà bản địa Nongdahe và Taihe Silkies của Trung Quốc từ giai đoạn 17 - 72 tuần tuổi cho thấy cá thể mang kiểu gen ID cho sản lượng trứng 257,4 quả trong khi đó các cá thể mang kiểu gen DD cho sản lượng trứng thấp hơn (225,4 quả) (Jiang *et al.*, 2005, Cui *et al.*, 2006). Theo nghiên cứu của Cui *et al.* (2006), Rashidi *et al.* (2012) cũng cho thấy mối tương quan của đa hình C2402T đến khả năng sản xuất ở gia cầm. Điều này cho thấy những đa hình trên có triển vọng như là một chỉ thị phân tử trong trợ giúp chọn lọc những cá thể có khả năng đẻ trứng cao ở gia cầm. Tuy nhiên, các nghiên cứu về đa hình và ảnh hưởng của gen prolactin đến khả năng cho trứng của các giống gà bản địa của Việt Nam chưa được nghiên cứu. Để có cơ sở và là tiền đề ứng dụng chỉ thị phân tử của gen prolactin trong công tác chọn giống gà, chúng tôi tiến hành nghiên cứu phân tích đa

dạng di truyền của đa hình 24-bp Insertion-Deletion và C2402T của gen prolactin ở hai quần thể gà bản địa là gà Ri và gà Mía. Từ đó làm cơ sở cho các nghiên cứu cải tiến năng suất cho trứng của gà Mía, gà Ri sau này.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu máu của hai quần thể gà Ri (n = 54), gà Mía (n= 45) được thu thập ở các nông hộ chăn nuôi tại Sơn Tây; Trung tâm Nghiên cứu và Huấn luyện chăn nuôi - Viện Chăn nuôi để đánh giá đa hình 24-bp Insertion-Deletion và C2402T của gen prolactin.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Các cá thể gà được chọn đại diện cho từng giống để đảm bảo cá thể lấy mẫu không có họ hàng thân thuộc với nhau. Các mẫu máu được lấy từ tĩnh mạch cánh của gà và máu được chuyển ngay vào ống có chứa dung dịch chống đông máu. Mẫu được bảo quản ở 4°C và chuyển về phòng thí nghiệm để tiến hành tách chiết ADN hệ gen.

Các mẫu máu sau xử lý được tách chiết ADN theo phương pháp của Sambrook *et al.* (1998) có cải tiến để phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm. Nồng độ và độ tinh sạch của ADN được kiểm tra trên gel agarose 1% và đo OD_{A260/A280}. ADN sau đó được pha loãng bằng dung dịch đệm TE ở nồng độ ADN trong mỗi microlit là 50 ng/μl.

Nghiên cứu sử dụng hai cặp mồi (Cui *et al.*, 2006) để khuếch đại hai đoạn ADN đặc trưng của hai đa hình 24-bp Insertion-Deletion và C2402T tương ứng (Bảng 1).

Phản ứng khuếch đại hai đoạn ADN prolactin có chứa đột biến 24-bp Insertion-Deletion và C2402T được thực hiện như sau: 5 phút ở 94°C, tiếp theo là 35 chu kỳ (30 giây ở 94°C, 30 giây ở nhiệt độ bắt cặp mồi và 30 giây ở 72°C) và giai đoạn kết thúc 5 phút ở 72°C. Phản ứng thực hiện có thể tích 25 μl thành phần của phản ứng: PCR buffer 1x, 1 μM cho mỗi loại mồi, 0,2 mM dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 1,25 UI Taq DNA polymerase và 50 ng ADN hệ gen.

Sản phẩm của khuếch đại vùng ADN chứa đột biến 24-bp Insertion-Deletion được chạy trên gel agarose 3% để xác định kiểu gen của cá thể.

Sản phẩm của khuếch đại vùng ADN chứa điểm đa hình C2402T được cắt bằng enzyme *Alu I* ở 37°C trong thời gian 8 giờ. Thành phần của phản ứng cắt enzyme bao gồm: 8 μl sản phẩm PCR, 1x đệm cắt và 3 đơn vị enzyme giới hạn. Để xác định kiểu gen SNP của các cá thể sản phẩm ủ enzyme giới hạn được chạy trên gel agarose 3%.

2.3. Phân tích số liệu

Sau khi xác định kiểu gen prolactin, tần suất kiểu gen đa hình 24-bp Insertion-Deletion và C2404T của gen prolactin được phân tích bằng phương pháp kiểm định Chi-Square (χ^2) bằng phần mềm SAS 9.1. Sự cân bằng của quần thể gà được kiểm tra bằng định luật cân bằng Hardy-Weinberg.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả xác định đa hình 24-bp Insertion-Deletion của gen prolactin

Kết quả xác định kiểu gen ở đa hình 24-bp Insertion-Deletion của gen prolactin được thể hiện ở hình 1. Tần số kiểu gen, tần số alen của đa hình 24-bp Insertion-Deletion của gen prolactin ở hai quần thể gà được trình bày ở bảng 2.

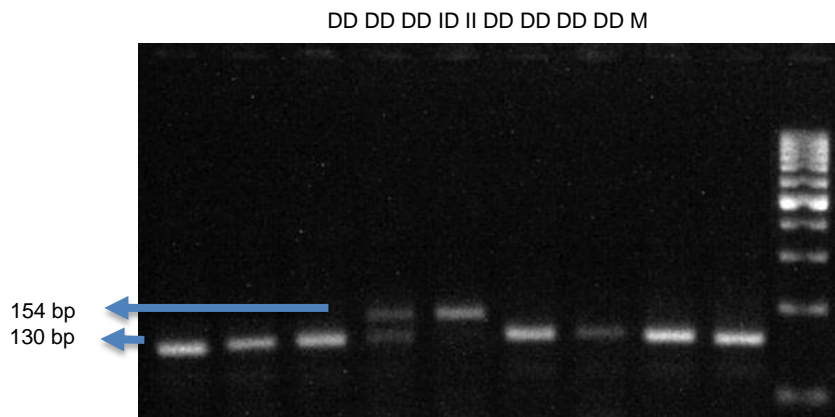
Kết quả nghiên cứu cho thấy, tần số kiểu gen II của đa hình 24-bp Insertion-Deletion ở quần thể gà Ri xuất hiện với tần số thấp (0,07) nhưng vẫn phù hợp với tuân theo luật mong đợi theo lý thuyết. Như vậy, kết quả nghiên cứu không có sự sai khác so với quần thể mong đợi theo định luật Hardy-Weinberg. Còn ở gà Mía, kiểu gen II và ID cũng xuất hiện với tần số thấp lần lượt tương ứng là 0,07 và 0,11, còn kiểu gen DD xuất hiện với tần số cao (0,88). Sự phân bố kiểu gen ở quần thể gà Mía cho thấy có sự sai khác có ý nghĩa thống kê so với quần thể mong đợi theo định luật Hardy-Weinberg ($P < 0,01$). Kết quả này cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của Jiang *et al.* (2005); Cui *et al.*,

(2006) trên một số giống gà bản địa Trung Quốc. Điều này cho thấy sự phân bố tần số kiểu gen của đa hình 24-bp Insertion-Deletion gen

prolactin ở một số giống gà bản địa có năng suất trứng thấp là tương đối giống nhau (Jiang *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2006).

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi nhân đoạn gen có chứa đột biến 24-bp Insertion-Deletion và C2402T

Trình tự mồi	Đa hình	Chiều dài đoạn khuếch đại (bp)	Nhiệt độ bắt cặp mồi (°C)
F: 5'-TTTAATATTGGTGGGTGAAGAGACA-3' R: 5'-ATGCCACTGATCCTCGAAAACCTC-3'	24-bp Insertion-Deletion	154 và 130	54
F: 5'-TGCAAACCATAAAAAGAAAAGA-3' R: 5'-CAATGAAAAGTGGCAAAGCA-3'	C2402T	439	52



Hình 1. Kiểu gen 24-bp Insertion-Deletion của gen prolactin (M = thang ADN 100 bp)

Bảng 2. Tần số kiểu gen và tần số alen của đa hình 24-bp Insertion-Deletion của gen prolactin của gà Ri và gà Mía

Giống	Gen	Kiểu gen/ Alen	n	Tần số quan sát	Tần số lý thuyết	Cân bằng Hardy - Weinberg	
						χ^2 (5.99)	P value
Gà Ri	Prolactin (24-bp Insertion-Deletion)	II	4	0,07	0,04	1,8025	0,406
		ID	15	0,25	0,31		
		DD	40	0,68	0,65		
		I		0,19			
		D		0,81			
Gà Mía	Prolactin (24-bp Insertion-Deletion)	II	3	0,07	0,01	16,8464	0,0002
		ID	5	0,11	0,21		
		DD	37	0,82	0,78		
		I		0,12			
		D		0,88			

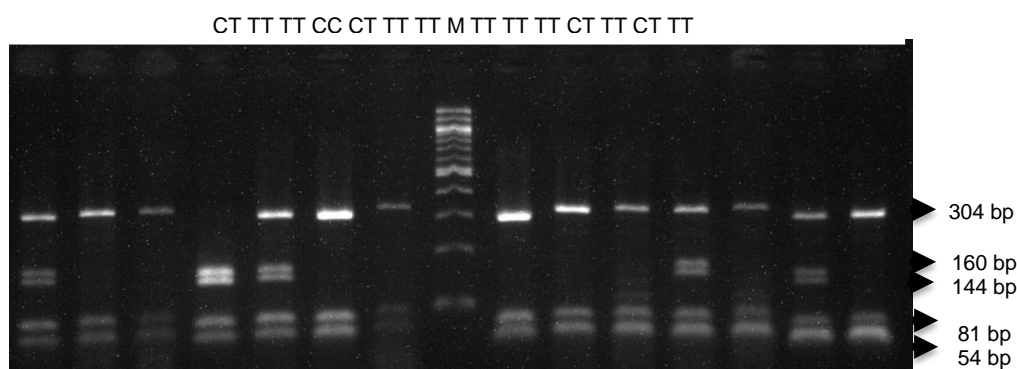
Ghi chú: Giá trị χ^2 : với $\chi^2 > 15,09$; $P < 0,01$

3.2. Kết quả xác định đa hình C2402T của gen prolactin

Kết quả xác định kiểu gen của đa hình C2402T gen prolactin được thể hiện ở hình 2. Tần số kiểu gen, tần số alen của đa hình C2402T của gen prolactin ở hai quần thể gà được trình bày trong bảng 3.

Đối với đa hình C2402T, kết quả nghiên cứu trên giống gà Ri cho thấy không có sự sai khác về tần số kiểu gen giữa quần thể nghiên cứu và quần thể lý thuyết theo định luật Hardy - Weinberg, nhưng tần số xuất hiện của kiểu gen CC quan tâm cũng ở mức thấp (0,08).

Bên cạnh đó, kết quả cho thấy sự phân bố kiểu gen ở quần thể gà Mía có sự sai khác về tần số kiểu gen giữa quần thể nghiên cứu và quần thể mong đợi (quần thể theo định luật Hardy - Weinberg) ($P < 0,01$) với tần số của hai kiểu gen lại CC và CT rất thấp lần lượt là 0,07 và 0,09. Kết quả này cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của Jiang *et al.* (2005); Cui *et al.*, (2006) trên một số giống gà bản địa Trung Quốc nhưng lại có khác so với nghiên cứu của Rashidi *et al.* (2012) khi nghiên cứu về sự xuất hiện của đa hình này trên giống gà bản địa đẻ trứng xanh của Iran. Như vậy, nghiên cứu của chúng tôi cho thấy sự mất cân bằng về tần số kiểu gen



Hình 2. Sản phẩm cắt đoạn gen prolactin tại điểm C2402T bằng enzyme *AluI*.
(M = thang ADN 100 bp)

Bảng 3. Tần số kiểu gen và tần số alen của đa hình C2402T của gen prolactin

Giống	Gen	Kiểu gen/Alen	n	Tần số quan sát	Tần số lý thuyết	Cân bằng Hardy - Weinberg	
						χ^2 (5,99)	P value
Gà Ri	Prolactin (C2402T)	CC	5	0,08	0,04	2,3585	0,3075
		CT	16	0,27	0,31		
		TT	38	0,64	0,65		
		C		0,22			
		T		0,78			
Gà Mía	Prolactin (C2402T)	CC	3	0,07	0,01	17,3966	0,0002
		CT	4	0,09	0,20		
		TT	38	0,84	0,79		
		C		0,11			
		T		0,89			

Ghi chú: χ^2 value with $\chi^2 > 15,09$; $P < 0,01$

của đa hình C2402T ở quần thể gà Mía, điều này xảy ra có thể một phần do đàn gà lấy mẫu còn số lượng ít như gà Mía (n = 45), bên cạnh đó có thể con do phương thức chăn nuôi nông hộ việc chọn số gà trống làm giống hạn chế trong các làng, xã cũng góp phần làm mất đi đa dạng về đa hình chúng tôi quan tâm.

Nghiên cứu của Jiang *et al.*, (2005); Cui *et al.*, (2006) cho thấy đối với gen prolactin đã xác định được 6 đa hình đơn (SNP) (C-2402T, C-2161G, T-2101G, C-2062G, T-2054A, G-2040A) và một đoạn 24-bp Insertion-Deletion có thể có mối tương quan đến các tính trạng đẻ trứng ở gà, chính vì vậy gen prolactin được coi như là một gen ứng cử trong phân tích di truyền các tính trạng liên quan đến năng suất đẻ trứng.

Như vậy, nghiên cứu này đã xác định được hai đa hình của gen prolactin có ở hai giống gà Ri và gà Mía, những đa hình này có tiềm năng trong việc cải thiện khả năng cho trứng ở các giống gà này.

5. KẾT LUẬN

Tần số kiểu gen ở đa hình 24-bp Insertion-Deletion hai giống gà Ri, Mía đều có tần số kiểu gen DD cao tương ứng là 0,68; 0,82; kiểu gen II của đa hình 24 bp indel ở cả hai giống gà xuất hiện với tần số thấp 0,07.

Tần số kiểu gen ở đa hình C2402T của gen prolactin ở gà Ri và gà Mía có tần số kiểu gen TT cao lần lượt là 0,64 và 0,84 trong khi đó đối với kiểu gen CC thì cả hai giống gà trên đều xuất hiện với tần số thấp tương ứng là 0,08 và 0,07.

Tần số kiểu gen của đa hình 24-bp Insertion-Deletion và C2402T của gen prolactin trên quần thể gà Mía trong nghiên cứu này có sự sai có ý nghĩa thống kê so với quần thể mong đợi theo định luật Hardy - Weinberg.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bradford A.P., Kelley S.B., Scott E.D., Laura C.K., Liu Y. and Arthur G.H. (2000). The Pit-1 Homeodomain and b-Domain Interact with Ets-1 and Modulate Synergistic Activation of the Rat

Prolactin Promoter. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(5): 3100-3106.

- Bhattacharya T.K., Chatterjee R.N., Sharma R.P., Niranjana M. and Rajkumar U. (2011). Associations between novel polymorphisms at the 5'-UTR region of the Prolactin gene and egg production and quality in chickens. *Theriogenology*, 75: 655-661.
- Berthouly S.C., Rognon X., Nhu T.V., Gély M., Vu C.C., Tixier-Boichard M., Bed'Hom B., Bruneau N., Verrier E., Maillard J.C and Michaux J.R. (2010). Vietnamese chickens: a gate towards Asian genetic diversity. *BMC Genetics*, 11: 53.
- Cui J. W., Liang Z., Yu W., Feng Y., Peng X., Gong Y. and Li S. (2011). Polymorphism of the Prolactin gene and its association with egg production traits in native Chinese ducks. *South African Journal of Animal Science*, 41(1).
- Cui J. X., Du H. L., Liang Y., Deng X. M., Li N., và Zhang X. Q. (2006). Association of Polymorphisms in the Promoter Region of Chicken Prolactin with Egg Production. *Poultry Science*, 85: 26-31.
- Desvaux S., Vu D.T., Phan D.T and P.T.T., H. (2008). A general review and a description of the poultry production in Vietnam. Agricultural Publisher, Hanoi, Vietnam.
- Goto T., Ishikawa A., Yoshida M., Goto N., Umino T., Nishibori M. and Tsudzuki M. (2014). Quantitative Trait Loci Mapping for External Egg Traits in F2 Chickens. *J. Poult. Sci.*, 51: 118-129.
- Hanh P.T.H, Burgos S. and Roland-Holst D. (2007). The poultry sector in Vietnam: prospects for smallholder producers in the aftermath of the HPAI crisis. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Pro-Poor Livestock Policy Initiative (PPLPI) Research Report, August 2007.
- Jiang R. S., Xu G.Y., Zhang X. Q. and Yang N. (2005). Association of Polymorphisms for Prolactin and Prolactin Receptor Genes with Broody Traits in Chickens. *Poultry Science* 84: 839-845.
- Kurima K., John A. P., Mohamed E.E.H and Wong E.A. (1995). The turkey Prolactin-encoding gene and its regulatory region. *Gene*, 156: 309-310.
- Liang Y., Cui J.W, Yang G., Frederick. C. C. Leung, Zhang X. (2006). Polymorphisms of 5' flanking region of chicken Prolactin gene. *Domestic Animal Endocrinology* 30: 1-16
- Nelson C., Albert V.R., Elsholtz H.P., Lu L.I. and Rosenfeld M.G. (1988). Activation of cell-specific expression of rat growth hormone and Prolactin genes by a common transcription factor. *Science*, 239(4846): 1400-1405.

- Ohkubo T., Tanaka M., Nakashima K., Talbot R. T. and Sharp P. J. (1998). Prolactin Receptor Gene Expression in the Brain and Peripheral Tissues in Broody and Nonbroody Breeds of Domestic Hen. *General and Comparative Endocrinology*, 109: 60-68.
- Ohkubo T., Tanaka M. and Nakashima K. (2000). Molecular Cloning of the Chicken Prolactin Gene and Activation by Pit-1 and cAMP-Induced Factor in GH3 Cells. *General and Comparative Endocrinology*, 119: 208-216.
- Rashidi H., Ghodrati R.M., Ayoub F. and Mohsen G. (2012). Association of Prolactin and Prolactin receptor gene polymorphisms with economic traits in breeder hens of indigenous chickens of Mazandaran province. *Iranian Journal of Biotechnology*, 10(2): 129-135.
- Romanov M. N., Talbot R. T., Wilson P. W. and Sharp P. J. (2002). Genetic Control of Incubation Behavior in the Domestic Hen. *Poultry Science*, 81: 928-931.
- Sambrook. J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1998). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shimada K., Ishida H., Sato K., Seo H. and Matsui N. (1991). Expression of Prolactin gene in incubating hens. *J. Reprod. Fert.*, 91: 147-154.
- Wong E.A., Neal H.F., Janmet L. S. and Mohamed E. E.H. (1991). Cloning of a Turkey Prolactin cDNA: Expression of Prolactin mRNA throughout the Reproductive Cycle of the Domestic Turkey (*Meleagris gallopavo*). *General and comparative endocrinology*, 83: 18-26
- Youngren O.M., El Halawani M.E., Silsby J. L. and Phillips R. E. (1991). Intracranial Prolactin perfusion induces incubation behavior in turkey hens. *Biol. Reprod.*, 44: 425-443.