Iranian Journal of Animal Science
Vol 49, No 3, Autumn 2018 (453-458)
DOI: 10.22059/ijas.2018.262962.653652

علوم دامی ایران
دورۀ ۴۹، شمارۀ ۳، پاییز ۱۳۹۷ (ص ۴۵۸-۴۵۳)

واکاوی بیوانفورماتیکی و فیلوژنی ناحیه 5`UTR ژن نوروپپتید وای (Neuropeptide Y) و ارتباط آن با صفات تولیدی در مرغ بومی فارس

مهرنسا جمال‌پور[۱]، محمد دادپسند[۲*]، هادی آتشی[۲]، علی نیازی[۳]، حامد خراتی کوپایی[٤] و سید محمدرضا هاشمی[٥]
۱ و ۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد اصلاح نژاد و دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
۳ و ٤. استاد و دانشجوی دکتری، پژوهشکده زیست‌فناوری، دانشگاه شیراز
۵. مربی، بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات، آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۵/۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۹/۲۱)

چکیده

این پژوهش به‌منظور بررسی فیلوژنی و بیوانفورماتیکی جهش تک‌نوکلئوتیدی در ناحیه 5`UTR ژن نوروپپتید وای (Neuropeptide Y=*NPY*) و ارتباط آن با صفات تولید تخم‌مرغ و وزن بدن در مرغان بومی استان فارس، انجام گرفت. از ۲۰۰ قطعه مرغ بومی ایستگاه پرورش و اصلاح‌نژاد مرغ بومی استان فارس خون‌گیری انجام شد. استخراج DNA با روش نمکی انجام شد. جهش تک‌نوکلئوتیدی ژن *NPY* با تکنیک PCR-RFLP شناسایی شد. فراوانی آلل‌های A و B به‌ترتیب ۰/٤٦ و ۰/٥٤ برآورد شد و جمعیت مورد مطالعه در تعادل هاردی-واینبرگ نبود. واکاوی آماری نشان داد که، بین چندریختی نوروپپتید وای و صفات مورد مطالعه (شمار تخم‌مرغ، اولین سن تخم‌گذاری، وزن تخم‌مرغ در ۸٤ هفتگی و وزن بدن در ۱۲ هفتگی) ارتباط معنی‌داری وجود ندارد. همچنین، واکاوی فیلوژنی نشان داد که ناحیه توالی‌یابی‌شده ژن *NPY* مرغ بومی فارس با اطلاعات توالی‌های EU447658.1 و EU447659.1 دارای بیشترین شباهت است. نکته قابل توجه در واکاوی فیلوژنی، وجود ژن *NPY* از گونه بلدرچین بود که می‌تواند نشان دهنده نقش کلیدی این ژن در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیک محسوب گردد.

واژه‌های کلیدی: جهش نقطه‌ای، نوروپپتید وای، ناحیه 5`UTR.

Bioinformatics and phylogenetic analysis for 5′ UTR region of neuropeptide Y gene and its association with body weight and egg production traits in Fars native chickens

Mehrnesa Jamalpour[1], Mohammad Dadpasand[2], Hadi Atashi[2], Ali Niazi[3], Hamed Kharrati-Koopaee[4] and Seyed Mohammad reza Hashemi[5]
1, 2. Former M.Sc. Student in Animal Breeding and Associate Professor, Department of Animal Science, School of Agriculture, Shiraz University, Iran
3, 4. Professor and Ph.D. Candidate, Institute of Biotechnology, Shiraz University, Iran
5. Instructor, Animal Science Department, Fars Agriculture and Natural Resource Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran
(Received: Jul. 29, 2018 - Accepted: Dec. 12, 2018)

ABSTRACT

The aim of this study was bioinformatics and phylogenetic analysis for 5′UTR region of neuropeptideY (*NPY*) gene and its association with body weight and egg production traits in Fars native chickens. For this porpuse 200 blood samples were collected from Fars Native chickens Breeding Center (Shamsabad station). The whole genome DNA was extracted using salting out protocol. The promotor region was amplified by PCR and SNP genotyping was performed by RFLP method. The frequencies of alleles A and B were estimated as 0.46 and 0.54, respectively. The population was deviated from H-W equilibrium. Statistical analysis indicated that there is no significant association between *NPY* genotypes and studied traits (egg number, age at first laying, egg weight at 84 weeks and body weight at 12 weeks). The results of phylogenetic analysis showed that the sequences of the *NPY* gene of Fars native chickens has the most simalirity with EU447658.1 and EU447659.1 sequence information. Interstingly, there is *NPY* gene of quail in phylogenetic analysis which can show the key role of *NPY* gene for regulating the physiological process.

Keywords: Native fowl, Neuropeptide Y, 5`UTR.

* Corresponding author E-mail: Dadpasand@shirazu.ac.ir

مقدمه

هورمون نوروپپتید برای نخستین بار به‌عنوان محرک اشتها در موش‌های صحرایی شناسایی شد، که یکی از فراوان‌ترین هورمون‌ها در سیستم عصبی مرکزی و محیطی پستانداران به‌شمار می‌آید. همچنین، این هورمون نقش مهمی در ایجاد هوموستازی انرژی در پستانداران و پرندگان دارد، که می‌تواند انرژی مورد نیاز را از تجزیه سریع کربوهیدرات‌ها تأمین کند (Wang *et al*., 2001; Pedrazzini *et al*., 2003). نوروپپتید وای در انسان می‌تواند تغییرات وسیعی را در عملکرد فیزیولوژیکی بدن مانند تنظیم فشارخون، تغذیه، اضطراب، افسردگی، آرامش، تراوش *GnRH*[1]، مهار *TSH*[2]، سیستم قلبی عروقی و تنظیم تولیدمثل ایجاد کند.

نوروپپتید وای، یک نوروپپتید بسیار مهم در ماکیان است که نقش مهمی در اشتها و صفات تولیدی مانند تولید تخم‌مرغ ایفا می‌کند. (Holmberg *et al*., 2002; Pedrazzini *et al*., 2003). نوروپپتید وای، پروتینی با ۳۶ آمینواسید است که در پرندگان، در هسته‌های اینفاندیبولار[3] بیان شده و سبب افزایش اشتها و سبب تراوش *GnRH* در ماکیان می‌شود. ژن نوروپپتید وای (*NPY*) در طیور روی کروموزوم ۲ قرار دارد و دارای چهار اگزون و سه اینترون است (Xu *et al*., 2011; Holmberg *et al*., 2002). در ماکیان بیان ژن *NPY* در دستگاه عصبی مرکزی شامل، هیپوتالاموس از جمله هسته‌های اینفاندیبولار، پاراونتریکولار[4]، LHA[5]، آرکوات، غده آدرنال، هیپوفیز پیشین و گزارش شده است (Tatemoto, 2004; Larhammar, 1996; Crowley, 2004; Gray & Morley, 1986; Zhang *et al*., 2014b).

پژوهش‌ها نشان داده‌اند که چندریختی ژن نوروپپتید وای با وزن لاشه، افزایش وزن بدن، نرخ تخم‌گذاری و استحکام پوسته تخم‌مرغ، شمار تخم مرغ در ۳۰۰ روزگی و سن اولین تخم‌گذاری در نژادهای نختلف مرغ مرتبط است (Li *et al*., 2009; Vu & Ngu, 2016; Rahman *et al*., 2014; Liao *et al*., 2015; Wang *et al*., 2001). چندریختی تک‌نوکلئوتیدی ژن *NPY* با وزن بدن در توده مرغ بومی مازندران ارتباط معنی‌داری داشت؛ ولی در رابطه با تولید تخم‌مرغ ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد (Fatemi *et al*., 2012). همچنین، در مرغان بومی آذربایجان‌غربی، چندریختی تک نوکلئوتیدی در ناحیه اینترون نوروپپتید وای، با شمار تخم‌مرغ و تولید تخم‌مرغ دوزرده ارتباط نداشت (Abdi *et al*., 2014). پژوهشی دیگر نشان داد که نوروپپتید وای با برخی از صفات تولیدی تخم‌مرغ، شامل وزن تخم‌مرغ در اولین دوره‌ی تخم‌گذاری ارتباط دارد (Zhang *et al*., 2007a). در پژوهشی دیگر، چندشکلی‌هایی از ژن *NPY* در مرغ‌های چینی سیلکی شناسایی و ارتباط معنی‌داری بین آن‌ها و کیفیت پوسته تخم‌مرغ مشاهده شد (Rahman *et al*., 2014). هدف این پژوهش، بررسی ارتباط چندریختی ناحیه غیرقابل ترجمه ژن *NPY* با صفات تولید تخم‌مرغ، وزن بدن در مرغ بومی فارس و همچنین توالی‌یابی، بررسی بیوانفورماتیکی و فیلوژنی این ناحیه از ژن *NPY* بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و استخراج DNA

در این پژوهش، ۲۰۰ قطعه مرغ بومی از ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد مرغ بومی استان فارس (شمس آباد)، به‌صورت تصادفی انتخاب شدند. از هر پرنده، پنج سی‌سی خون از سیاهرگ بال گرفته شد. برای جلوگیری از لخته‌شدن خون، نمونه‌ها تا زمان استخراج DNA در لوله‌های حاوی EDTA در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. استخراج DNA از نمونه‌های خون با روش نمکی انجام شد. سپس کمیت و کیفیت DNA استخراج شده، با دستگاه نانودراپ و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد.

طراحی آغازگرها، واکنش PCR و هضم آنزیمی

طراحی و سنتز آغازگرها با نرم‌افزار Vector NTI (11) و شرکت متابیون کشور آلمان انجام شد. از توالی آغازگرهای زیر برای انجام واکنش PCR استفاده شد:

1. Gonadotropin-releasing hormone
2. Thyroid-stimulating hormone
3. Infandibular nucleus
4. Paraventricular
5. Lateral hypothalamic area

F: 5'-TCTCAGAGCTCCAACGTATGA-3'
R: 5'-ATATTTCTGTGCCTGAACAACA-3'

واکنش PCR با استفاده از کیت شرکت آمپلیکون و مواد زیر انجام شد: آب مقطر اتوکلاو شده (۱۱ میکرولیتر)، Master Mix (۷ میکرولیتر، شامل dNTP ۰/۴ میلی مولار، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، یک واحد آنزیم Taq پلی‌مراز) و غلطت هر آغازگر ۰/۶ پیکومول، DNA رقیق شده (۲ میکرولیتر، ۱۰۰ نانوگرم). Tm آغازگر رفت ۶۰ و آغازگر برگشت ۵۷ درجه سانتیگراد بود. چرخه‌های گرمایی PCR به صورت Touchdown و طبق برنامه زیر انجام شد. مرحله ابتدایی واسرشته‌سازی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۳۰ چرخه دمایی شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۱۰ چرخه دمای اتصال اولیه در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه و ۲۰ چرخه دمای اتصال ثانویه در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه (طی ۱۰ چرخه، در هر چرخه نیم درجه از دمای اتصال اولیه کم شد)، دمای گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه انجام شد. در پایان دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷ دقیقه برای گسترش نهایی استفاده شد. به‌منظور تأیید واکنش PCR و تکثیر قطعه ۲۴۰ جفت بازی ناحیه غیرقابل ترجمه ژن *NPY* از ژل آگارز یک درصد و نشانگر ۱۰۰ جفت بازی (DM 2300) استفاده شد. واکنش هضم آنزیمی در حجم ۲۰ میکرولیتر با یک واحد از آنزیم *DraI*، آب مقطر اتوکلاو شده (۵ میکرولیتر)، بافر (۱ میکرولیتر)، فرآورده PCR (۱۴میکرولیتر) به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در نهایت از تکنیک الکتروفورز و ژل‌گذاری یک درصد برای تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها استفاده شد.

واکاوی آماری

فراوانی‌های آللی، ژنوتیپی، تعادل هاردی- واینبرگ و شاخص هموزیگوتی با نرم‌افزار Popgene (3.2) برآورد شدند. ارتباط چندریختی ژن *NPY* با صفات شمار تخم‌مرغ، سن اولین تخم‌گذاری، وزن تخم‌مرغ در ۸۴ هفتگی و وزن بدن در ۱۲ هفتگی بررسی شد. داده‌های مربوطه از ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد مرغ بومی استان فارس (شمس آباد) دریافت شد. مدل آماری زیر برای واکاوی داده‌ها به‌کار برده شد:

$$y_{ijkl} = \mu + G_i + S_j + D_K + H_l + e_{ijkl}$$

که y_{ijk} صفات مورد بررسی، μ میانگین داده‌ها، S_j اثر پدر، D_K اثر مادر، H_1 اثر هچ، G_i اثر ژنوتیپ و e_{ijkl} اثر باقیمانده هستند. واکاوی آماری ارتباط چندریختی ژن *NPY* و صفات مورد مطالعه با رویه‌ی GLM نرم‌افزار SPSS انجام شد.

تعیین توالی ناحیه غیرقابل ترجمه ژن *NPY*

پس از تعیین ژنوتیپ جمعیت مورد مطالعه دو نمونه هموزیگوت غالب و مغلوب انتخاب شدند. برای هر دو نمونه مجددا واکنش PCR انجام شد؛ به‌منظور تخلیص قطعه مورد نظر، از کیت ژل ریکاوری GFI شرکت Vivantis استفاده شد. تعیین توالی به وسیله‌ی شرکت بایونیر کره جنوبی انجام گرفت. واکاوی‌های خوانش‌های به دست آمده با نرم‌افزار Vector NTI (11) انجام شد.

واکاوی بیوانفورماتیکی و واکاوی فیلوژنی

به‌منظور تعیین میزان مشابهت قطعه توالی‌یابی شده با سایر توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی NCBI از Blastn بر اساس الگوریتم HSPs[1] استفاده شد (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/tutorial/Altschul-1.html).

معیار انتخاب توالی‌ها براساس میزان شباهت توالی‌ها[2] بود که مقادیر بالای ۹۰ درصد انتخاب شدند. نتایج به‌دست‌آمده با فرمت Fasta در نرم‌افزار مگا برای رسم درخت فیلوژنی به‌روش حداکثر درست‌نمایی استفاده شد.

نتایج و بحث

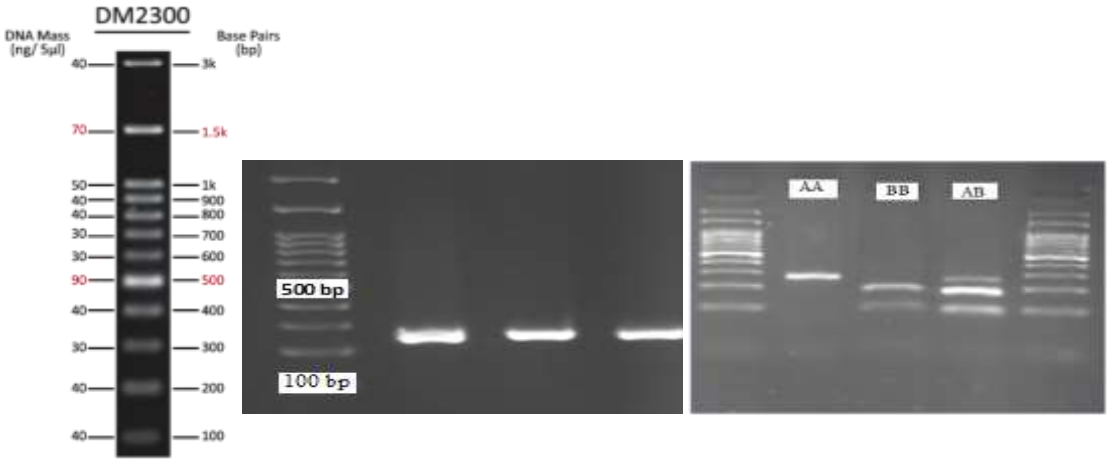
کیفیت و کمیت DNA ژنومی استخراج شده با الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد و دستگاه نانودراپ بررسی شد. غلظت DNA استخراج‌شده بین ۴۰-۵۰ نانوگرم در هر میکرولیتر تعیین شد. تکثیر

1. High-scoring segment pairs (HSPs)
2. Identity

قطعه‌ی ۲۴۰ جفت بازی از ناحیه غیرقابل ترجمه ژن نوروپپتید وای با تکنیک الکتروفورز و ژل‌گذاری یک درصد مورد تأیید قرار گرفت. فرآورده‌های PCR با آنزیم *DraI* هضم شدند. نتایج هضم وجود سه ژنوتیپ (AA، AB و BB) را نشان داد (شکل۱). با توجه به ناحیه برشی، آنزیم برشی *DraI*، ژنوتیپ AA دارای قطعه ۲۴۰ جفت بازی و برش نخورده، ژنوتیپ BB دارای قطعه‌های ۱۶۱ و ۷۹ جفت بازی و هتروزیگوت‌های AB دارای قطعه‌های ۲۴۰، ۱۶۱ و ۷۹ جفت بازی هستند. نتیجه الکتروفورز فرآورده‌ی PCR در شکل ۱ بیان شده است. نتایج مربوط به فراوانی‌های آللی، ژنوتیپی و آزمون هاردی- وینبرگ در جدول ۱ خلاصه شده است.

آزمون‌های مربع کای (χ^2) نشان داد، که جمعیت در تعادل هاردی- واینبرگ نیست. با توجه به این‌که برنامه‌های اصلاح نژادی مانند انتخاب مصنوعی و آمیزش‌های هدفمند که خود برهم زننده تعادل هستند در جمعیت مورد مطالعه انجام می‌گیرد، انحراف از تعادل هاردی- وینبرگ منطقی به‌نظر می‌رسد. نتایج واکاوی واریانس نشان داد که ژنوتیپ‌های ناحیه غیرقابل ترجمه ژن *NPY*، با صفات تولید تخم‌مرغ و وزن بدن ارتباط معنی‌داری ندارند (جدول۲).

تاکنون نتایج گوناگونی در ارتباط با اثر ژن نوروپپتید وای روی وزن بدن و تولید تخم مرغ گزارش شده است. براساس نتایج Abdi *et al.* (2014) ارتباط معنادارای بین این ژن و وزن بدن در مرغان بومی آذربایجان غربی وجود نداشت که مشابه نتایج پژوهش حاضر است. از طرف دیگر، گزارش شد که در جمعیت مرغ بومی مازندران، ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی‌های تک‌نوکلیوتیدی ژن *NPY* با وزن بدن وجود دارد (Fatemi *et al.*, 2012). هم‌چنین، در پژوهشی دیگر که در مرغ Qingyuan کشور چین انجام گرفت نشان داده شد که چندشکلی ژن *NPY* با وزن بدن ارتباط معنی‌دار دارد و افراد دارای ژنوتیپ BB (مغلوب) نسبت به ژنوتیپ AA دارای وزن بدن بیش‌تری بودند (Ying *et al.*, 2010).



شکل۱. الکتروفورز فرآورده‌ی PCR و هضم آنزیمی برای ژن نوروپپتید وای
Figure 1. Electrophoresis of PCR product and enzyme digestion for *NPY* gene.

جدول ۱. فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی در ناحیه 5`-UTR ژن نوروپپتید وای
Table 1. The allelic and genotypc frequencies in 5`-UTR region of *NPY* gene

Genotype number			Allelic frequency%		Genotypic frequency%			χ^2
AA	AB	BB	A	B	AA	AB	BB	7.5
15	152	33	46	54	7	76	17	$P < 0.05$

جدول ۲. آماره‌های توصیفی داده‌های صفات تولید تخم‌مرغ و وزن بدن
Table 2. Descriptive statistics of egg production and body weight

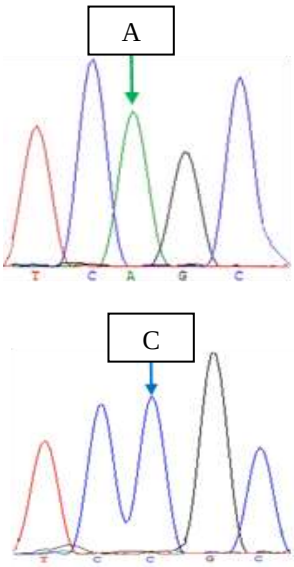
Egg number	Age at first egg (day)	Egg weight at 84 weeks (gr)	Body weight at 12 weeks (gr)	Statistics
11.40±47.30	147.68 ± 11.44	3.80±48.80	123.50 ± 1025.40	Average
0.16	0.35	0.82	0.28	P-value

در مورد ارتباط ناحیه غیرقابل ترجمه ژن *NPY* با صفات تولید تخم‌مرغ نیز نتایج گوناگونی منتشر شده است. اثر این ژن در جمعیت مرغ بومی چین روی صفات تخم مرغ معنی‌دار بود (Li *et al*., 2010; Liao *et al*., 2015). همچنین، مشخص شد که افراد دارای ژنوتیپ AA نسبت به دو ژنوتیپ دیگر BB و AB، شمار تخم‌مرغ بیشتری در ۳۰۰ روزگی دارند. همچنین اثر این ژن با تولید تخم‌مرغ در ۷۲ هفتگی ارتباط مثبتی داشت (Li *et al*., 2010). اما ارتباط معنی داری بین ژن *NPY* با تولید تخم مرغ در مرغ بومی آذربایجان گزارش نشد. به‌نظر می‌رسد نتایج پژوهش حاضر با نتایج پژوهش‌های انجام‌شده در ایران همخوانی بیشتری دارد که با توجه به پتانسیل ژنتیکی مشابه مرغ بومی ایران منطقی به نظر می‌رسد. به‌طورکلی، تفاوت در نتایج پژوهش‌های مختلف را می‌توان به متفاوت بودن فراوانی آللی و ژنوتیپی در پژوهش‌ها، روش واکاوی آماری و زمینه ژنتیکی متفاوت جمعیت‌های مورد مطالعه نسبت داد.

به‌منظور تأیید جهش نقطه‌ایی در ناحیه غیرقابل ترجمه ژن نوروپپتید وای نتایج تعیین توالی دو فرد هموزیگوت غالب و مغلوب در باز ۱۶۱ که نقطه بروز جهش بود، مورد بررسی قرار گرفت. هموزیگوت غالب در باز ۱۶۱ دارای باز آدنین است که در مرحله هضم توسط آنزیم برشی شناسایی نمی‌گردد؛ اما بروز جهش در این نقطه سبب می‌شود که، هموزیگوت مغلوب در جایگاه ۲۴۰ جفت بازی دارای باز سیتوزین شود؛ بنابراین، آنزیم برشی *DraI* این سایت برشی را شناسایی کند و این قسمت را برش می‌دهد و قطعات ۱۶۱ و ۷۹ جفت بازی روی ژل مشاهده گردد. در شکل ۲ وجود جهش به نمایش گذاشته شده است.

نتایج Blastn نشان داد که قطعه توالی‌یابی‌شده از ناحیه غیرقابل ترجمه ژن *NPY* با چهار توالی DNA ثبت‌شده در بانک اطلاعاتی NCBI دارای مشابهت است (جدول ۳). با توجه به مقادیر ارزش E می‌توان دریافت که میزان مشابهت توالی‌های DNA بایکدیگر تصادفی نبوده و نتایج واقعی هستند.

نتایج واکاوی فیلوژنی نشان داد که درخت حاصل دارای دو گروه ژنی مجزا است. ناحیه توالی‌یابی‌شده مرغ بومی فارس با توالی‌های EU447658.1 و EU447659.1 با درصد تشابه ۱۰۰ و ۹۸ دارای بیشترین شباهت است. همچنین توالی AH002464.2 با درصد تشابه ۹۷ در رتبه بعدی قرار دارد. کمترین میزان تشابه با ژن *NPY* از گونه بلدرچین گزارش گردید که در یک گروه جداگانه قرار گرفته است. نمای کلی درخت فیلوژنی در شکل ۳ نشان داده شده است.



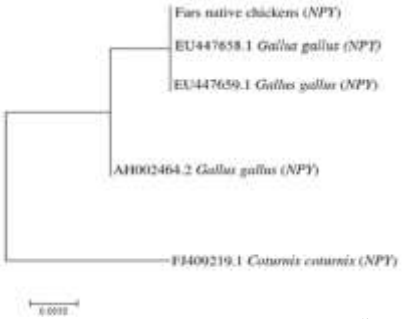
شکل ۲. تأیید جهش تک نوکلئوتیدی (A/C) در ناحیه ′۵ غیرقابل ترجمه ژن *NPY* در مرغ بومی فارس

Figure 2. Approving the point mutatin (A/C) in 5`-UTR region of NPY gene chickens in Fars native chicken.

جدول ۳. نتایج آنالیز Blastn توالی ناحیه غیرقابل ترجمه ژن *NPY* مرغ بومی فارس با بانک اطلاعاتی NCBI

Table 3. The results of Blastn analysis for 5`-UTR region sequence of NPY gene in Fars native chickens using NCBI database

Acession number	Identity %	-value E
EU447658.1	100	2×10^{125}
EU447659.1	98	8×10^{-12}
AH002464.2	97	8×10^{115}
FJ409219.1	94	2×10^{100}



شکل ۳. آنالیز درخت فیلوژنی توالی ناحیه غیرقابل ترجمه ژن *NPY* مرغ بومی فارس در مقایسه با توالی‌های مشابه دیتابیس NCBI

Figure 3. The phylogenic tree analysis of 5`-UTR region of *NPY* gene of Fars native chicken in compared to similar sequence of NCBI database.

REFERENCES

1. Abdi, M., Seyedabadi, H. & Gorbani, A. (2014). Prolactin and *NPY* gene polymorphism and its associations with production and reproductive traits in West-Azarbaijan native chicken. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, 3, 39-45.
2. Crowley, W. R. (2004). Neuroendocrine actions of neuropeptide Y (Ed). *Neuropeptide Y and Related Peptides*. (pp. 185-220.) Springer press.
3. Fatemi, S. A., Mehrabani-Yeganeh, H., Nejati-Javaremi, A. & Niknafs, S. (2012). Association of neuropeptide Y and gonadotrophin-releasing hormone receptor gene SNPs with breeding value for growth and egg production traits in Mazandaran native chickens. *Genetics and Molecular Research*, 11, 2539-2547.
4. Gray, T. S. & Morley, J. E. (1986). Neuropeptide Y: anatomical distribution and possible function in mammalian nervous system. *Life Sciences*, 38, 389-401.
5. Holmberg, S. K., Mikko, S., Boswell, T., Zoorob, R. & Larhammar, D. (2002). Pharmacological characterization of cloned chicken neuropeptide Y receptors Y_1 and Y_5. *Journal of Neurochemistry*, 81, 462-471.
6. Larhammar, D. (1996). Evolution of neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regulatory Peptides*, 62, 1-11.
7. Li, G. H., Zhang, X. Y., Han, W., T. U. Y. J. & Su, Y. J (2010) Effect of single and pyramiding genotypes of prl and npy genes on baier chicken egg production. *Hubei Agricultural Sciences*, 5, 1-6.
8. Liao, Y., Sun, J., Wen, X., Huang, Y., Zhang, B. & Wei, F. (2015). Effects of npy gene on total number of eggs at 300 days of age in Donglan black-bone chicken. *Agricultural Biotechnology*, 4, 2-8.
9. Pedrazzini, T., Pralong, F. & Grouzmann, E. (2003) Neuropeptide Y: the universal soldier. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60, 350-377.
10. Rahman, M. M., Matsuda, R., Matsuda, T., Nishiyama, Y., Jozaki, K., Anann, K. & Wada, Y. (2014). Relationship between the production traits and three candidate genes in the prolactins In/Del× In/Del population of Silkie fowl. *The Journal of Poultry Science*, 51, 138-143.
11. Tatemoto, K. (2004). Neuropeptide Y: history and overview (Ed). In: *Neuropeptide Y and Related Peptides.* (pp.1-21.). Springer press.
12. Vu, C. T. & Ngu, N. T. (2016). Research article single nucleotide polymorphisms in candidate genes associatid with egg production traits in native noi chicken of Vietnam. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 6, 62-169.
13. Wang, X., Day, J. R. & Vasilatos-Younken, R. (2001). The distribution of neuropeptide Y gene expression in the chicken brain. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 174, 129-136.
14. Xu, H. P., Zeng, H., Zhang, D. X., Jia, X. L., Luo, C. L., Fang, M. X. & Zhang, X. Q. (2011a). Polymorphisms associated with egg number at 300 days of age in chickens. *Genetics and Molecular Research*, 10, 2279-2289.
15. Xu, W., Zhu, W., Chen, W., Han, W., Song, W., Shu, J. & Li, H. (2011b). Effects of dietary energy level and *NPY* gene on production performance of Wenchang chickens. *China Poultry*, 2, 1-10.
16. Ying, Z., Jingting, S., Wei, H., Weitao, S., Kuanwei, C. & Huifang, L. (2010). A study on the relativity between *NPY* gene polymorphism and reproductive traits of Qingyuanpartridge chicken based on ligase detection reaction. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 17, 1-4.
17. Zhang, W., Cline, M. A. & Gilbert, E. R. (2014). Hypothalamus-adipose tissue crosstalk: neuropeptide Y and the regulation of energy metabolism. *Nutrition and Metabolism*, 11, 1-27.
18. Zhang, X. Y., Lu, L., Chen, G. H. & Han, W. (2007). The effect of comprehensive selection on egg production traits in Suqin silky chicken. *Journal of Gansu Agricultural University*, 6, 1-10.