

Feasibility of embryo sex determination for Iranian native chicks using Raman spectroscopy

S. Rostami¹, M. T. Beigi Nassiri², M. Nazari^{3*}, M. Cheraghizadeh⁴

1. Ph.D. Student of Animal and Poultry Breeding and Genetics, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

2. Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

3. Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

4. Assistant Professor, Advanced Surface Engineering and Nano Materials Research Center, Department of Electrical Engineering, Ahvaz Branch, IAU, Ahvaz, Iran

(Received: 24-04-2024 – Revised: 28-08-2024 – Accepted: 15-09-2024)

Introduction: The sex of chickens considerably impacts production performance and economic benefits in poultry farming. Male birds cannot lay eggs and usually have a lower ratio of meat to feed than broilers. Male chicks are typically killed immediately after hatching since they are redundant in the industry and male chicks will neither be suitable for egg production nor meat production. Day-old male chicks in the laying hen industry are usually culled immediately after hatching. As a result, this issue has caused moral concerns in societies. Efforts are underway to develop technology for automatically determining the sex of chick embryos, aimed at establishing a stable and efficient poultry farming system. In large commercial hatcheries, the sexing of newly born chicks is generally accomplished by three different methods according to new hatching lines' vent, color, or feathers. However, these methods are still time- and labor-consuming. If sex can be identified at an early embryonic stage or even before incubation, male eggs could be used as feed components. Moreover, fewer eggs would need to be incubated, which would reduce feed space requirements, CO₂ emissions, and energy consumption, which are all economically beneficial to farmers and the environment. In recent decades, researchers have used various *in ovo* sexing strategies in chicken eggs before hatching or incubation. Some invasive and noninvasive studies that have been conducted for *in ovo* sexing of chicken eggs can be divided into five major categories: (i) molecular-based techniques, (ii) spectral-based techniques (Raman spectroscopy, fluorescent, 3D X-ray), (iii) acoustic-based techniques, (iv) morphology-based techniques, and (v) volatile organic compound (VOC)-based techniques. Commercially applicable methods must be noninvasive, rapid enough for real-time applications, economically feasible, and ethically acceptable. An alternative method, to prevent the removal of day-old chicks, is a non-invasive method to determine the sex of the egg in the early stages of hatching before the development of the nervous system. Recently, Raman spectroscopy was reported to determine the sex of eggs at the incubation stage. Raman spectroscopy is based on the Raman effect, whereby when incident light (wavelength 750–850 nm) excites molecules in a tissue, the molecules reflect light at a different wavelength. The reflected light's wavelength is characteristic of various chemical components and allows the detection of the atheromatous plaque chemical synthesis. Raman spectroscopy is a powerful tool expected to revolutionize chick sex determination because it can provide information about biological molecules. Thus, Raman spectroscopy is suitable for analyzing living organisms, leading to its widespread adoption across various biological and medical applications. Therefore, resonance Raman spectroscopies have found application in blood analysis, with some studies exploring its utility in chick sexing. For this purpose, the present study was carried out to investigate the feasibility of determining the sex of Iranian native chicken embryos using the Raman spectroscopy.

* Corresponding author: m.nazari@asnrukh.ac.ir



Materials and methods: To carry out this research, 100 fertilized eggs of Iranian native chickens were used. The sex of the embryos was determined using Raman spectroscopy with a wavelength of 785 nm during the fourth day of incubation. Validation of this method was investigated using the polymerase chain reaction (PCR) technique. Sequence alignment of CHD-Z and CHD-W allele sequences amplified by PCR technique. The amplified DNA fragments were single and double DNA bands in the size of 461 bp for the CHD-Z and 322 bp for the CHD-W genes. The PCR was carried out using a PCR master kit with specific primers (the forward primer: 5'- TATCGTCAGTTTCCTTTTCAGGT -3', the reverse primer: 5'- CCTTTTATTGATCCATCAAGCCT -3'). Thermal cycling conditions for DNA amplification were: 1 cycle of initial denaturation at 94°C for 5 minutes; 35 cycles comprising 30s at 94°C for the denaturation, 30s at 59°C for annealing, 30s at 72°C for the elongation; and a final extension cycle at 72°C for 5 minutes. The PCR products were analyzed by electrophoresis on 2.5% agarose gel against a DNA Ladder 100bp, and visualized using the safe staining on UV transilluminator. The data obtained from the Raman spectrometer was analyzed using the Origin software. The main indices used to study the data were the intensity of the Raman peaks and the ratio of the dominant peak intensity. Additionally, principal component analysis (PCA) was employed to identify any patterns in the data. To calculate PC1 and PC2, the ratios of I_{769}/I_{838} and I_{1141}/I_{1251} peaks were considered, respectively. PCA analysis can choose features that have a greater impact on the final result, depending on the data and the scope of their changes.

Results and discussion: The result of PCR showed that one fragment with a length of 461 bp was amplified for male embryos (ZZ) and two fragments with lengths of 461 and 322 bp were amplified for female embryos (ZW). The study found that there are differences in the intensity of Raman bands between genders. Males have higher intensity while females have lower intensity. Therefore, changes in Raman spectra intensity can be used to identify gender. Additionally, the candlestick chart of the data showed that median and average values for males were larger than for females. Furthermore, the results obtained from PCA analysis showed that the variance percentages for PC₁ and PC₂ were 53.69% and 46.31%, respectively. PC₂ is more reliable as it has less deviation.

Conclusions: Based on the results obtained from the study, it can be concluded that Raman spectroscopy is a reliable method for determining the gender of chicken embryos during incubation. This test is quick, accurate, and can be easily incorporated into the industry to determine the gender of embryos without resorting to the practice of killing day-old chicks. Not only is this method more ethical, but it also offers a high level of accuracy, making it an attractive alternative for the industry. In general, these results demonstrate the potential application of hematological traits in developing an automatic *in ovo* embryo sexing method through spectroscopic analysis.

Keywords: Sex determination, Chicken embryo, Raman spectroscopy, Polymerase chain reaction

Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.

Funding: This project was carried out with the financial support of Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan.

Acknowledgment: We would like to thank the officials of the Native Chicken Breeding and Breeding Station belonging to the Genetic Material Production Center of Jahed Company of Khuzestan Province, especially Mr. Mohammadi for his assistance in providing fertilized eggs, as well as the Islamic Azad University, Ahvaz Branch, for the use of equipment and Raman microscope.

How to cite this article:

Rostami, S., Beigi Nassiri, M. T., Nazari, M., & Cheraghizadeh, M. (2024). Feasibility of embryo sex determination for Iranian native chicks using Raman spectroscopy. *Animal Production Research*, 13(3), 19-31. doi: 10.22124/ar.2024.26163.1805



امکان‌سنجی تعیین جنسیت جنین مرغ بومی ایران با استفاده از طیف‌سنجی رامان

سپیده رستمی^۱، محمدتقی بیگی نصیری^۲، محمود نظری^{۳*}، محسن چراغی زاده^۴

- ۱- دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح دام و طیور، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان
 ۲- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان
 ۳- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان
 ۴- استادیار، مرکز تحقیقات مهندسی سطح پیشرفته و نانو مواد، گروه مهندسی برق، دانشگاه آزاد واحد اهواز

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۰۵ - تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۶/۰۷ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۲۵)

چکیده

مطالعه حاضر به منظور بررسی امکان‌سنجی تعیین جنسیت جنین مرغ بومی ایران با استفاده از طیف‌سنجی رامان انجام شد. تعیین جنسیت جنین‌ها با استفاده از طیف‌سنجی رامان با طول موج ۷۸۵ nm در روز ۳/۵ انکوباسیون انجام گرفت. صحت‌سنجی این روش با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مورد بررسی قرار گرفت. طیف‌های به‌دست‌آمده از طیف‌سنج رامان با استفاده از نرم‌افزار Origin رسم شده و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. شاخص‌های اصلی مورد استفاده جهت تجزیه و تحلیل طیف رامان، شدت اوج‌های رامانی و نسبت شدت اوج‌های غالب بودند. در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، یک قطعه به طول ۴۶۱ جفت باز برای جنین‌های با جنسیت نر (ZZ) و دو قطعه با طول‌های ۴۶۱ و ۳۲۲ جفت باز برای جنین‌هایی با جنسیت ماده (ZW) تکثیر شد. نتایج طیف‌سنجی نشان داد شدت باندهای رامانی در جنسیت‌های مختلف متفاوت است، به طوری که شدت باندهای رامانی در جنس نر، بیشتر و در جنس ماده، کمتر بود. بنابراین، تغییرات شدت طیف‌های رامان را می‌توان ملاک تشخیص جنسیت قرار داد. همچنین، نتایج حاصل از رسم نمودار شمعی داده‌ها به صورت تجمعی نشان داد که مقادیر میانه و میانگین در هر دو نسبت برای جنسیت نر دارای مقدار بزرگتری در مقایسه با جنسیت ماده بود. با توجه به نتایج به‌دست آمده، این گونه استنباط می‌شود که طیف‌سنجی رامان می‌تواند به‌عنوان روشی مناسب جهت تعیین جنسیت جنین مرغ طی مراحل جوجه‌کشی مورد استفاده قرار گیرد و به دلیل کوتاه بودن زمان انجام آزمایش می‌تواند بهترین شرایط را برای استقرار در صنعت فراهم کرده و جنسیت را با دقت بالا مشخص نماید.

واژه‌های کلیدی: تعیین جنسیت، جنین مرغ، طیف‌سنجی رامان، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

* نویسنده مسئول: m.nazari@asnrukh.ac.ir

مقدمه

بر اساس شکل تخم‌مرغ (Yilmaz-Dikmen and Dikmen, 2013) یا بر اساس بو (Webster *et al.*, 2015) هنوز به‌طور عملی استفاده نشده است. اندازه‌گیری هورمون‌ها در مایعات تخم‌مرغ نیز یک روش قوی و ثابت است، اما بعد از روز نهم انکوباسیون می‌توان آن‌را اعمال کرد (Phelps *et al.*, 2003). در میان روش‌های تهاجمی که به استخراج نمونه نیاز دارد، تعیین جنسیت با روش مولکولی در شرایط آزمایشگاهی، ساده و قوی است (Clinton *et al.*, 2016).

روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در حال حاضر در ترکیب با الکتروفورز ژل استفاده می‌شود (Salabi *et al.*, 2014). این روش، یک روش پرکاربرد برای تشخیص جنسیت پرندگان بوده که بر اساس تمایز ناحیه اینترون در ژن‌های پروتئین اتصال CHD است که در پرندگان، برخلاف انسان و پستانداران، نرها با دو کروموزوم جنسی Z، هموگامتیک هستند، در حالی که ماده‌ها با کروموزوم جنسی Z و W، هتروگامتیک هستند (Smith, 2008). در کروموزوم‌های جنسی پرند، هر دو کروموزوم Z و W قرار دارند. ژن‌های CHD-W و CHD-Z حاوی اینترون‌هایی با طول‌های مختلف هستند و با روش PCR تقویت می‌شوند. محصولات کروموزوم Z و W بر اساس اندازه قابل تشخیص هستند. هنگامی که این محصولات با الکتروفورز ژل از هم جدا می‌شوند، برای ماده‌ها (دارای کروموزوم Z و W) دو باند در اندازه‌های مختلف و برای نرها (دارای دو کروموزوم Z)، یک باند نشان داده می‌شود (Fridolfsson and Ellegren, 1999).

امکان تعیین جنسیت پرندگان "در تخم‌مرغ" به‌عنوان روشی بالقوه برای غلبه بر حذف جوجه‌های یک‌روزه، توجه فزاینده-ای را در صنعت طیور جلب می‌کند و روش‌های فعلی به-گونه‌ای تطبیق داده می‌شوند که طی جوجه‌کشی، جنسیت جنین شناسایی شده و سپس، تخم‌های با جنسیت ناخواسته حذف شوند. اخیراً طیف‌سنجی رامان (Raman spectroscopy) برای تعیین جنسیت تخم‌مرغ در روز چهارم جوجه‌کشی (یعنی 4 ± 84 ساعت) گزارش شده است که تعیین جنسیت جنین را بدون ممانعت از رشد آن، بر اساس تفاوت در ترکیب خون جنینی تا صحت ۹۰ درصد فراهم می‌کند (Galli *et al.*, 2017). اندازه‌گیری رامان را می‌توان مستقیماً روی خونی که در گردش خون عروق خارج جنینی در ویتلین جریان دارد، انجام داده و از آسیب جنین جلوگیری کرد (Galli *et al.*, 2016). طیف‌سنج رامان با

حذف میلیون‌ها جوجه نر یک‌روزه در صنعت مرغ تخم‌گذار به‌دلیل نگرانی‌های اخلاقی به‌شدت زیر فشار است. از آنجایی که نرهای تخم‌گذار از نظر ژنتیکی برای تولید گوشت ناکارآمد هستند، آنها را از جوجه‌های ماده جدا و با روش‌هایی از جمله گاز دادن از بین می‌برند. در سال ۲۰۲۰، در مجموع، ۳۷۲ میلیون مرغ تخم‌گذار در مزارع اروپایی نگهداری شد که نشان می‌دهد حداقل تعداد مساوی جوجه نر معدوم شدند (Comission, 2021). انتظار می‌رود این حذف‌ها همراه با افزایش مصرف تخم‌مرغ افزایش یابد. در سال ۲۰۱۸، ۶/۹ میلیون تن تخم‌مرغ مصرفی در اتحادیه اروپا تولید شد و پیش‌بینی می‌شود این میزان تا سال ۲۰۳۰ به ۷/۷ میلیون تن افزایش یابد (Comission, 2018). یک روش احتمالی برای حل این مشکل، تعیین جنسیت جوجه در مرحله رشد جنینی بوده که امکان حذف جنین با جنسیت ناخواسته را قبل از تکمیل سیستم عصبی فراهم می‌کند. بنابراین، نیاز فوری به روش‌های تعیین جنسیت وجود دارد که از قبل طی جوجه‌کشی تخم‌مرغ قابل اجرا باشد (Bruijn *et al.*, 2015). با در نظر گرفتن مرگ بدون درد در تخم‌مرغ، این عمل باید در اولین فرصت ممکن و ترجیحاً قبل از تجربه درد به‌وسیله جنین، انجام شود. با این حال، اتفاق نظری وجود ندارد که جنین در چندمین روز انکوباسیون می‌تواند درد را احساس کند. یک منطقه خاکستری از روز ۷ تا ۱۵ مرحله جنینی تعریف شده است که در آن، جنین ممکن است درد را احساس کند یا احساس نکند. مطمئناً پذیرفته شده است که جنین‌ها قبل از هفت روزگی نمی‌توانند درد را احساس کنند زیرا هنوز اتصال سیناپسی به نخاع وجود ندارد و حرکت به‌سمت محرک‌های خارجی مانند تحریک مکانیکی پوست، گرما و سرما هنوز مشاهده نشده است (Rosenbruch, 1997).

در سال‌های اخیر، هر دو روش تعیین جنسیت غیرتهاجمی و تهاجمی مورد بررسی قرار گرفته است. در بین روش‌های غیرتهاجمی، استفاده از طیف‌سنجی در اواسط دوره جوجه-کشی نتایج خوبی فراهم می‌کند (Rozenboim and Ben Dor, 2001)، در حالی که تصویربرداری طیفی، امکان تعیین جنسیت را با تفاوت رنگ پر دو جنس در اواسط دوره‌های جوجه‌کشی فراهم می‌کند (Göhler *et al.*, 2017). روش‌های تعیین جنسیت کاملاً غیرتهاجمی دیگر

مولکول هستند و اطلاعات مستقیمی در مورد ترکیب بیوشیمیایی ارائه می‌دهند. این نوارهای نسبتاً باریک، به راحتی قابل تفکیک و حساس به ساختار مولکولی، ساختار و محیط هستند (Michael *et al.*, 2006). روش‌های نوری برای تعیین جنسیت در تخم‌مرغ بدون تماس و به‌طور مستقیم در محل قابل استفاده هستند. آنها ممکن است بدون خطر آلودگی و نیاز به انتظار برای نتایج تجزیه و تحلیل‌های شیمیایی یا ژنتیکی روی بافت یا مایعات تخمک، تعیین جنسیت را در زمان واقعی انجام دهند. بنابراین، در مقایسه با رویکردهای استاندارد برای تعیین جنسیت در تخم‌مرغ بر اساس تجزیه هورمونی یا DNA نمونه‌های استخراج شده از مواد تخم‌مرغ، مزایای واضحی دارند. با توجه به اینکه طیف‌سنجی رامان قبل از روز هفت انکوباسیون انجام می‌شود، می‌تواند رفاه حیوانات را بهبود بخشد. علاوه بر این، تعیین جنسیت در مراحل اولیه جوجه-کشی، انرژی لازم برای جوجه‌کشی "تخم‌های نر" ناخواسته را کاهش می‌دهد. بنابراین، طیف‌سنجی رامان این پتانسیل را دارد که به روشی برای تعیین جنسیت تخم‌مرغ در دوران جوجه‌کشی تبدیل شود (Aleksandrowicz and Herr, 2015). اکنون، تحقیقات با هدف توسعه راهبردهای سازگار با رفاه حیوانات در حال انجام است که باعث می‌شود از کشتن جوجه‌های یک روزه جلوگیری شود، یا حداقل به روشی قابل قبول، از نظر اخلاقی و اقتصادی انجام شود. با توجه به اینکه تاکنون در ایران روشی جهت غلبه بر این مشکل ابداع نشده است، پژوهش حاضر به‌منظور بررسی اثر طیف‌سنجی رامان بر تعیین جنسیت جنین مرغ بومی مدنظر قرار گرفته است.

تشخیص تفاوت در ترکیب خون جنینی (Galli *et al.*, 2018)، درجه اشباع شدن گلبول‌های قرمز (Matsumoto *et al.*, 2024)، تصویربرداری از عروق خونی جنین و همچنین، ناهمگنی لکه‌های خونی در دو جنس مختلف (Sikirzhyskaya *et al.*, 2017)، ابزار ارزشمندی برای تعیین جنسیت با دقت بسیار بالا است.

در دستگاه طیف‌سنج رامان، یک پرتو نور لیزر به نمونه تابیده می‌شود و یک آشکارساز، طول موج و شدت پرتو خروجی از نمونه را ثبت می‌کند (شکل ۱). تفاوت بین طول موج برخورد کرده به نمونه و طول موج خارج شده از آن اندکی با هم تفاوت دارد. این تفاوت بر اثر تاثیر پیوند بر انرژی نور ساطع شده است. از این رو، با اندازه‌گیری تفاوت طول موج ورودی به نمونه و خروجی از آن می‌توان نوع پیوندهای موجود در ترکیب شیمیایی نمونه و ساختار آن را تجزیه و تحلیل کرد (Fioranelli *et al.*, 2019).

طبقه‌بندی خواص سلولی به‌وسیله طیف‌سنج رامان بر اساس ترکیب بیوشیمیایی امکان‌پذیر است و جنسیت ممکن است به‌صورت طیف‌سنجی از تفاوت‌های ژنتیکی و متابولیکی بازایی شود. مشخصات طیف‌سنجی ناشی از ترکیب منحصر به فرد گروه‌های عاملی فعال رامان از اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها، لیپیدها و کربوهیدرات‌هایی که هر نمونه دارد، امکان ارزیابی، شناسایی و تمایز نوع بافت را فراهم می‌کند (Auner *et al.*, 2018). علاوه بر این، این روش‌ها اطلاعات سطح مولکولی را فراهم می‌کنند و امکان بررسی گروه‌های عاملی، انواع پیوند و ترکیب‌های مولکولی را فراهم می‌کنند. همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، باندهای طیفی در طیف‌های ارتعاشی، مختص

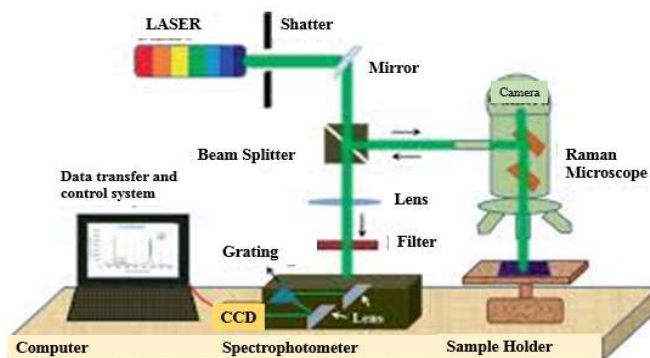


Fig. 1. View of Raman spectrometer components
شکل ۱- نمایی از اجزای تشکیل‌دهنده طیف‌سنج رامان

جدول ۱- موقیعت و منشاء باندهای رامانی مشاهده شده از رگ‌های خونی در تخم‌مرغ‌های ۳/۵ روزه مورد مطالعه در

این پژوهش

Table 1. Location and origin of Raman bands observed from blood vessels in 3.5 days old eggs

| Peak no. | Position (cm-1) | Origin | Ref. |
|----------|-----------------|--|-------------------------------------|
| 1 | 538 | Fe—O ₂ (Hemoglobin) | (Galli <i>et al.</i> , 2016) |
| 2 | 638 | C—S (Protein) | (Galli <i>et al.</i> , 2016) |
| 3 | 769 | Porphyrin | (Galli <i>et al.</i> , 2018) |
| 4 | 838 | Antisymmetric stretch vibration of choline group N+(CH ₃) ₃ | (Galli <i>et al.</i> , 2018) |
| 5 | 1032 | Phenylalanine | (Galli <i>et al.</i> , 2018) |
| 6 | 1141 | Phosphodioxy stretching vibrations in nucleic acids | (Galli, Koch, <i>et al.</i> , 2017) |
| 7 | 1251 | Amide III | (Galli <i>et al.</i> , 2018) |
| 8 | 1344 | CHx deformation modes of lipids and proteins | (Galli, Koch, <i>et al.</i> , 2017) |
| 9 | 1416 | | |
| 10 | 1504 | C = C stretching vibrations | (Galli <i>et al.</i> , 2018) |
| 11 | 1587 | Porphyrin | (Galli <i>et al.</i> , 2018) |
| 12 | 1639 | Amide I of alpha helix secondary structure and/or C = C stretching vibrations | (Galli <i>et al.</i> , 2018) |
| 13 | 1690 | Amide I | (Galli <i>et al.</i> , 2018) |
| 14 | 1746 | C = O stretching vibration | (Galli <i>et al.</i> , 2018) |

عمودی با قطب صاف به سمت بالا درون دستگاه قرار گرفتند تا اینکه یک سیستم عروقی خارج جنینی ایجاد شود. پس از طی این مدت، جهت تعیین جنسیت جنین‌ها، نمونه‌ها در معرض اشعه رامان با طول موج تحریک ۷۸۵ قرار گرفتند. پس از ایجاد منفذ در انتهای نوک پهن تخم‌مرغ، ناحیه عروقی جنین در بالای زرده شناور شده و روی سطح باقی می‌ماند.

هنگامی که تخم‌مرغ به حالت عمودی قرار داده می‌شود، ناحیه عروقی شده در بالا حرکت می‌کند و پس از باز شدن پنجره پوسته، روی سطح باقی می‌ماند، به طوری که از رگ‌ها می‌توان از مسیر پنجره پوسته نمونه برداری نوری کرد (شکل ۲). موقعیت اندازه‌گیری همیشه روی یک رگ بزرگ (قطر بزرگتر از ۱۰۰ میکرومتر) ترجیحاً در رگ‌های اصلی جانبی یا قدامی/خلفی انتخاب می‌شود.

به منظور نمایش رگ‌های جنینی، یک سیستم دوربین ایجاد شده که به طور خودکار، یک رگ مناسب را در دیافراگم انتخاب کرده و تمرکز پرتو لیزر را روی آن قرار می‌دهد. لیزر با استفاده از یک میکروسکوپ هم‌کانون (Confocal) روی نمونه‌ها متمرکز شده و از هر نمونه، چندین طیف رامان در نقاط مختلف (رگ‌های خونی) اندازه‌گیری شد.

پرورش مرغ بومی با توجه به خصوصیات منحصر به فرد آن از جمله مقاومت در برابر شرایط سخت محیطی، خصوصاً آب و هوای گرم و خشک، هزینه پایین نگهداری و پرورش، بازاری‌پسندی و کیفیت مطلوب تولیدات از دیر باز مورد توجه بوده است. حفظ این ذخائر به علت مزایایی که مرغ‌های بومی کشور در سازگاری با شرایط محیطی، مدیریتی، بهداشتی و تغذیه‌ای دارند امر مهمی است (Nazari *et al.*, 2020). بنابراین، در این تحقیق از تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار مرغ بومی استفاده شده است تا آزمایش با شرایط ایران انطباق داشته باشد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش از ۱۰۰ تخم‌مرغ نطفه‌دار از ایستگاه تکثیر و اصلاح نژاد مرغ بومی متعلق به مرکز تولید مواد ژنتیکی شرکت جاهد در استان خوزستان استفاده شد. یکی از مراکز مهم تامین تخم‌مرغ نطفه‌دار مرغ بومی در کشور، ایستگاه تکثیر و اصلاح نژاد مرغ بومی متعلق به مرکز تولید مواد ژنتیکی شرکت جاهد در استان خوزستان است (Nazari *et al.*, 2020). تخم‌ها به مدت ۳/۵ روز در دستگاه جوجه‌کشی در دمای ۳۷/۸ °C و رطوبت ۵۳ درصد در حالت

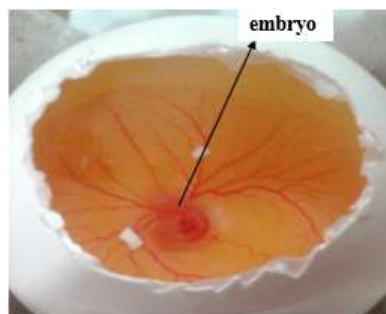


Fig. 2. View of the chick embryo: Embryonic and extraembryonic vessels are accessible by opening the eggshell at the broad pole

شکل ۲- نمایی از جنین جوجه: رگ‌های جنینی و خارج جنینی با باز کردن پوسته تخم‌مرغ در قطب پهن قابل دسترسی هستند

انجام گرفت. ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش طیف‌سنجی با دستگاه نانودراپ و همچنین، الکتروفورز افقی روی ژل آگارز یک درصد صورت گرفت (Chenani *et al.*, 2021). پرایمرهای اختصاصی برای ژن CHD طراحی شده بود. ژن CHD به‌عنوان ژن تعیین جنسیت، با توالی رفت و برگشت $5'-TATCGTCAGTTTCCTTTTCAGGT-3'$ و $3'-CCTTTTATTGATCCATCAAGCCT$ تکثیر شد (Lee *et al.*, 2010). به‌منظور تعیین جنسیت نمونه‌ها با استفاده از پرایمرهای طراحی شده، ابتدا واکنش PCR در دستگاه ترمال سایکلر (مدل Thermalcycler Mini، کشور آلمان) انجام گرفت و در نهایت، نتیجه آزمایش روی ژل آگارز دو و نیم درصد مشاهده شد.

نتایج و بحث

تعیین جنسیت با استفاده از PCR: تصویر به‌دست آمده از ژل الکتروفورز، قطعات تکثیر شده حاصل از PCR نمونه‌های مختلف را نشان می‌دهد. با استفاده از آغازگر اختصاصی در شکل ۳، نتیجه قابل قبول این روش برای تعیین جنسیت جنین با دقت بالا نشان داده شده است. نتایج نشان داد که قطعه‌ای به‌طول ۴۶۱ جفت باز برای جنین‌های با جنسیت نر (ZZ) و دو قطعه با طول‌های ۴۶۱ و ۳۲۲ جفت باز برای جنین‌هایی با جنسیت ماده (ZW) تکثیر شد. جنسیت همه نمونه‌ها به‌درستی مشخص شدند، به گونه‌ای که در نرها، یک باند و در ماده‌ها، دو باند مشاهده شد.

تجزیه و تحلیل طیف‌سنجی رامان: طیف رامان دو نمونه از تخم‌مرغ ۳/۵ روزه مورد مطالعه در شکل ۴ نشان داده شده است. همان‌گونه که روش PCR نشان داده است از میان ۱۰ تخم‌مرغ مورد آزمایش، ۵۰ درصد دارای جنسیت نر و

استفاده از طیف‌سنجی رامان با میکروسکوپ هم‌کانون این امکان را فراهم می‌سازد تا با حذف کردن نورهای خارج از محل تمرکز که از نقاط بالا و پایین میدان دید میکروسکوپ ساطع می‌شوند، واریانس به‌طرز چشم‌گیری افزایش یابد. در میکروسکوپ‌های هم‌کانون در هر لحظه فقط یک نقطه از نمونه قابل مشاهده است و تصویر حاصل، مجموع تجزیه تمام نقاط است. این دقت در میکروسکوپ‌های هم‌کانون با کمک دیافراگم پین هول (Pinhole diaphragm) صورت می‌گیرد که به‌عنوان فیلتر، دیافراگم‌هایی با قطر فضایی را در مقابل آشکارساز قرار می‌دهد که در میکروسکوپ‌های نوری معمولی وجود ندارد (Xu *et al.*, 2018). این ویژگی باعث تمرکز دقیق لیزر تحریک روی رگ خونی می‌شود که برای دقت بالای طیف‌سنجی در مطالعه روی تخم‌مرغ، ضروری است. طیف‌سنجی رامان در پژوهش حاضر با کمک سیستم طیف‌سنج رامان UniRAM مستقر در مرکز تحقیقات مهندسی سطح پیشرفته و نانومواد دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز صورت گرفت. این سیستم مجهز به لیزر حالت جامد (Solid-state laser) جهت تحریک نمونه با طول موج ۷۸۵ nm و میکروسکوپ هم‌کانون Olympus با لنز ۵۰x است که سطح نمونه با کمک آن، روبش شده و نقطه/ نقاط مناسب جهت تجزیه انتخاب می‌شوند. همچنین، این سیستم دارای طیف‌سنج از نوع CCD (InGaAs, iDus, Andor, Oxford Instruments) جهت ثبت طیف رامان است. طیف‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار Origin رسم شده و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

پس از انجام این مراحل و به‌منظور صحت‌سنجی تعیین جنسیت با استفاده از طیف‌سنجی رامان، جنین‌ها از تخم خارج شده و استخراج DNA از هر نمونه به‌طور جداگانه

همان‌گونه که مشاهده می‌شود باندهای رامانی مشابهی به- لحاظ موقعیت تقریباً در همه طیف‌ها و نمونه‌ها مشاهده می‌شود. بنابراین، از روی بود یا نبود اوج‌های رامانی نمی- توان در مورد جنسیت صحبت کرد. این مشاهده تقریباً در مورد تمام مولکول‌های زیستی صادق است، اما همان‌گونه که مشاهده می‌شود شدت باندهای رامانی در جنسیت‌های مختلف متفاوت است. شدت باندهای رامانی در جنس نر، بیشتر و در جنس ماده، کمتر است. بنابراین، تغییرات شدت طیف‌های رامان را می‌توان ملاک تشخیص جنسیت قرار داد. البته یک محدوده اشتراک یا تداخل در آنها نیز مشاهده می‌شود که می‌توان آن‌را محدوده خطا یا تشخیص با خطا نامید.

۵۰ درصد دارای جنسیت ماده بودند. بنابراین، طیف رامان یک نمونه با جنسیت نر و یک نمونه با جنسیت ماده نشان داده شده است. از هر نمونه، از هشت نقطه مختلف از رگ- های خونی، طیف رامان اخذ شد. موقعیت اوج‌های (باندهای) مشاهده شده روی شکل برای یکی از طیف‌ها مشخص است (شکل ۴).

منشا این اوج‌ها نیز با کمک مراجع معتبر و مرتبط شناسایی و در جدول ۱ ارائه شده است. این اوج‌ها در توافق با گزارش- های قبلی در این خصوص با گروه‌های عاملی مختلف اسیدی، پروتئینی و ... مرتبط هستند (Galli, Koch, et al., 2017; Galli et al., 2018; Galli et al., 2016).

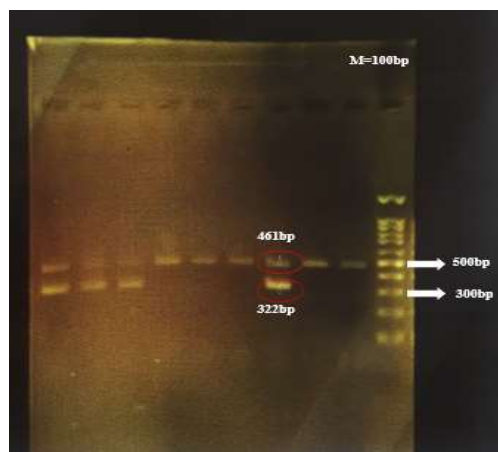


Fig. 3 . Agarose gel results of PCR products obtained from DNA extracted from broiler embryos. M: Molecular marker 100 bp

شکل ۳- نتایج ژل آگارز محصولات PCR به‌دست آمده از DNA استخراج‌شده از جنین جوجه گوشتی. M: مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی

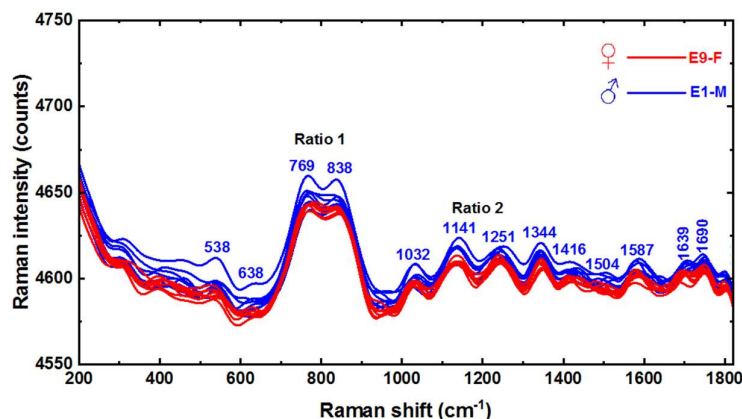


Fig. 4. Raman spectrum of two samples of 3.5 days old eggs studied in this research
شکل ۴- طیف رامان دو نمونه از تخم‌مرغ های ۳/۵ روزه مورد مطالعه در این پژوهش

مرکزی همچون مد، میانه، میانگین، میانگین وزن دار و همچنین، شاخص‌های پراکندگی همچون دامنه تغییرات است. ملاحظه می‌شود که در این وضعیت، از روی شکل ۵ نمی‌توان تمایز خاصی را جهت تفکیک جنسیت مشاهده نمود.

در شکل ۶ که نمودار شمعی داده‌ها به صورت تجمعی را نشان می‌دهد، نظم بیشتری مشاهده می‌شود. نظم مشاهده شده در شکل ۶ که علائم آن بیانگر فراسنجه‌های آماری داده‌های مورد مطالعه هستند در هماهنگی با روند مشاهده شده در شکل ۴ است. به طور مثال، مقادیر میانه و میانگین در هر دو نسبت برای جنسیت نر دارای مقدار بزرگتری در مقایسه با جنسیت ماده است.

یکی دیگر از روش‌های مورد استفاده جهت تجزیه و تحلیل، نسبت شدت اوج‌های غالب است که در این مطالعه نیز مدنظر قرار داده شده است. در مطالعات قبلی برای تشخیص جنسیت جوجه از این روش استفاده نشده است. بنابراین، قابلیت این روش در این مطالعه بررسی شد. برای این منظور، چهار اوج غالب در این مطالعه مدنظر قرار گرفت که عبارتند از: 1141 ، 838 ، 769 و 1251 cm^{-1} . بنابراین، دو نسبت به صورت I_{1141}/I_{1251} و I_{769}/I_{838} برای هر طیف تعریف شده است. شکل‌های ۵ و ۶، نمودار شمعی (Candlestick plot) داده‌های به دست آمده از محاسبه نسبت اوج‌های غالب مورد اشاره را برای حالت‌های مجزا و تجمعی نشان می‌دهند. نمودار شمعی، توزیع آماری داده‌های به دست آمده را نشان می‌دهد که حاوی اطلاعاتی از نوع شاخص‌های

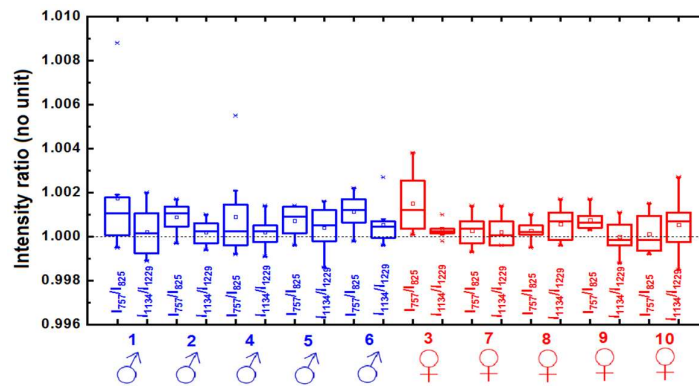


Fig. 5. Candlestick plot of two ratios associated with the intensity of dominant Raman bands for 3.5-day-old eggs examined in this research

شکل ۵- نمودار شمعی دو نسبت مرتبط با شدت باندهای رامانی غالب برای تخم‌مرغ‌های ۳/۵ روزه مورد مطالعه در این پژوهش

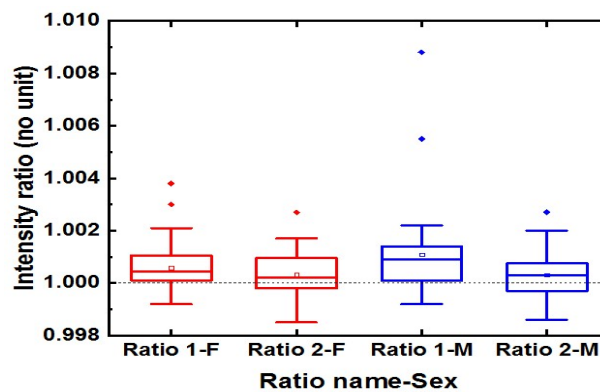


Fig. 6. Candlestick plot of two ratios associated with the intensity of dominant Raman bands for 3.5-day-old eggs, cumulative for male and female sex examined in this research

شکل ۶- نمودار شمعی دو نسبت مرتبط با شدت باندهای رامانی غالب برای تخم‌مرغ‌های ۳/۵ روزه به صورت تجمعی برای جنسیت‌های نر و ماده مورد مطالعه در این پژوهش

از تحلیل PCA نشان می‌دهد که نسبت دوم دارای پراکندگی کمتری حول میانگین خود است و استفاده از آن می‌تواند قابل اطمینان‌تر باشد. به لحاظ توزیع نقاط به‌دست آمده نیز نظم خاصی در تحلیل PCA مشاهده نمی‌شود. با توجه به تحلیل نتایج ۱۰۰ نمونه مورد آزمایش، تعیین جنسیت با دقت بالای ۹۰ درصد تایید شده است که با نتایج پژوهشگران دیگر همخوانی دارد (Galli *et al.*, 2016; 2018). در طیف‌سنجی رامان، فوتون‌های پراکنده شده از نمونه که دارای انرژی کمتر یا بیشتر از انرژی فوتون‌های فرودی بوده‌اند، حاوی اطلاعات طیفی در مورد سطوح انرژی ارتعاشی مواد در ناحیه مورد بررسی هستند (شکل ۱)، به‌طوری که هر نوع ماده دارای سیگنال طیفی مشخص، منحصر به فرد و متفاوت از سایر مواد است (Nadgaran and Kazempourfard, 2021). به بیان دیگر، هر ترکیب اتمی و مولکولی دارای یک الگوی (طیف) رامان متمایز و منحصر به خود است. آگاهی از مبانی بیوشیمیایی تمایز جنسیتی به‌وسیله طیف‌سنجی رامان از خون می‌تواند برای توسعه بیشتر این روش، مفید باشد. همان‌طور که از نتایج مشهود است، بیشتر اوج‌های رامان، که بیشترین کمک را در تمایز بین خون ماده و نر دارند، با پروتئین‌ها مرتبط هستند. اگرچه، سهمی از لیپیدها و DNA نیز ممکن است دخیل باشد. بنابراین، طیف‌سنجی رامان نشان می‌دهد که تفاوت بین جنسیت‌ها نه تنها ژنتیکی است، بلکه بر اساس محتوای DNA بالاتر در سلول‌های مردانه است و بیوشیمی کلی خون در مراحل اولیه رشد قبل از تمایز غدد درون‌ریز به جنسیت وابسته است (Galli *et al.*, 2018).

جهت مطالعه بیشتر و همچنین جستجوی نظم‌های موجود در داده‌های به‌دست آمده در نسبت اوج‌های غالب در طیف رامان، در این پژوهش از مطالعه تجزیه مولفه اصلی (Principal component analysis (PCA)) نیز استفاده شد. این تجزیه، یک ابزار قوی در علم داده‌کاوی است و مولفه‌های اصلی را شناسایی کرده و کمک می‌کند تا به‌جای تحلیل تمام ویژگی‌ها، ویژگی‌هایی که ارزش بیشتری دارند مورد تحلیل قرار گیرند. در واقع، تحلیل PCA، ویژگی‌هایی را که ارزش بیشتری دارند لحاظ کرده و خروجی را از آنها استخراج می‌کند. جهت انجام این تحلیل در پژوهش حاضر، سه ویژگی جنسیت، I_{769}/I_{838} و I_{1141}/I_{1251} برای هر طیف رامانی در نظر گرفته شد. تحلیل PCA می‌تواند با توجه به داده‌ها و دامنه تغییرات آنها، ویژگی‌هایی را انتخاب کند که تاثیر بیشتری در نتیجه نهایی داشته باشند. نمودار تحلیل PCA برای داده مورد اشاره در این پژوهش در شکل ۷ نشان داده شده است. در این نمودار، PC1 بیانگر I_{769}/I_{838} و PC2 بیانگر I_{1141}/I_{1251} است. جنسیت برای هر داده (نقطه قرمز رنگ) در کنار آن نوشته شده است. خط‌های آبی نیز نشان‌دهنده بردار ویژه برای هر نسبت هستند. بردار ویژه برای داده‌های آماری، معیاری از وجود بیشترین دامنه تغییر در آن امتداد است. درصد واریانس (وردایی) برای PC1 و PC2 به ترتیب ۵۳/۶۹ درصد و ۴۶/۳۱ درصد است. وردایی مقیاسی است که نشان می‌دهد داده‌ها حول میانگین چگونه پخش شده‌اند. وردایی کمتر بدین معنا است که انتظار می‌رود که اگر داده‌ای از توزیع مورد نظر انتخاب شود، مقدار آن به میانگین نزدیک‌تر باشد. بنابراین، نتایج به‌دست آمده

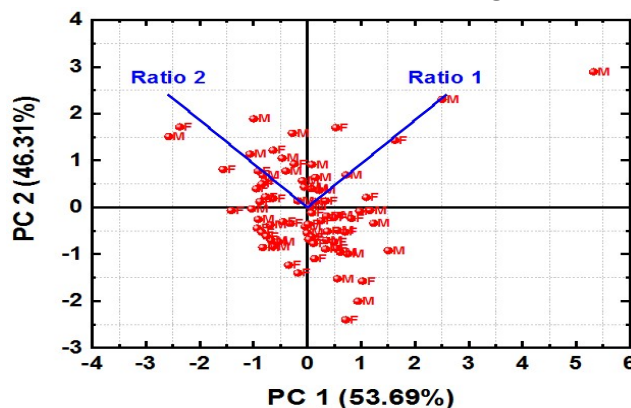


Fig. 7. Principal component analysis of two ratios associated with the intensity of dominant Raman bands for 3.5-day-old eggs studied in this research

شکل ۷- تجزیه مولفه اصلی دو نسبت مرتبط با شدت باندهای رامانی غالب برای تخم‌مرغ‌های ۳/۵ روزه مورد مطالعه در این پژوهش

کم‌تری از گلبول‌های قرمز اکسیژنه را در مقایسه با ماده‌ها نشان می‌دهند که نشان‌دهنده میل ترکیبی بالاتر اکسیژن با هموگلوبین خون نرها در مقایسه با خون ماده‌ها است. مدلی برای تشخیص جنسیت جوجه با استفاده از نسبت‌های مشخصی از ویژگی‌های باند رامان اکسی- RBC و دئوکسی- RBC ساخته شد که به حساسیت ۱۰۰٪ دست یافت. در مجموع، این نتایج نشان می‌دهد که ساختار مولکولی گلبول‌های قرمز بین نرها و ماده‌ها تفاوتی ندارد، بلکه درجات اشباع اکسیژن آنها متفاوت است، به طوری که خون نر احتمالاً دارای میل اکسیژن بالاتری نسبت به خون ماده است. هیچ تفاوت جنسیتی قابل توجهی برای هیچ یک از اجزای خون مشاهده نشد. این نتایج تأیید می‌کند که تغییرات در اجزای خون جوجه بر اساس جنسیت، به جای تغییرات در غلظت هموگلوبین به تفاوت در پیوند هموگلوبین با اتم‌های اکسیژن نسبت داده می‌شود. از سوی دیگر، محققان دیگر روی ارتباطات بین ویروس‌های خارج از پوسته و DNAهای داخل پوسته کار کرده‌اند. نتایج آنها نشان داد، امواج الکترومغناطیسی تابیده شده به وسیله ویروس‌های خارج از پوسته می‌تواند به تعیین جنسیت جنین جوجه در داخل پوسته و در نظر گرفتن سرعت رشد آن کمک کند. نشان داده شده است که ویروس‌های خارج از پوسته تخم‌مرغ می‌توانند با مواد داخل آن ارتباط برقرار کنند و جنسیت جنین جوجه و تکامل آن را تعیین کنند (Fioranelli et al., 2019).

در تخم‌های جوجه‌کشی، تمام بافت‌های جنینی و خارج جنینی حاصل از نطفه حاوی اطلاعات جنسی هستند. به عنوان مثال، تجزیه و تحلیل طیف‌سنجی خون، پتانسیل بالایی جهت تعیین جنسیت فراهم می‌کند. گلبول‌های قرمز مرغ هسته‌دار هستند و اطلاعات جنسی ژنتیکی را حمل می‌کنند. سلول‌های مرغ‌های خانگی نر دارای کروموزوم‌های بزرگتری هستند و امکان تشخیص جنسیت را با طیف-سنجی نوری بر اساس مقدار متفاوت DNA فراهم می‌کنند. علاوه بر این، تجزیه و تحلیل خون می‌تواند تفاوت‌های متابولیکی را بازایی کند. همچنین، قبل از شروع تمایز جنسی غدد درون‌ریز، تفاوت رشد بین جنین‌های نر و ماده بر ترکیب خون تأثیر می‌گذارد. تعیین جنسیت خون در گردش جنین به وسیله طیف‌سنجی نوری بر اساس اطلاعاتی که به وسیله فلورسانس مادون قرمز و سیگنال‌های رامان انجام می‌شود، امکان‌پذیر است. شدت فلورسانس خون نرها

این مشاهدات کلی با تفاوت در ترکیب بیوشیمیایی خون نر و ماده که در مقدمه بر اساس داده‌های مقالات شرح داده شده بود، سازگار است. خون مخلوط پیچیده‌ای از ترکیبات بیوشیمیایی متنوع است. اجزای اصلی خون، گلبول‌های قرمز، سفید و ترومبوسیت‌ها هستند. گلبول‌های قرمز خون تقریباً از ۳۰ درصد حجمی هموگلوبین تشکیل شده‌اند. بیوشیمی پلاسما زیر سلطه پروتئین‌ها است و آلبومین‌ها، گلوبولین‌ها و فیبرینوژن، پروتئین‌های اصلی هستند. طیف رامان خونی که در تحریک ۷۸۵ nm به دست می‌آید تحت تأثیر سهم هموگلوبین است (Virkler and Lednev, 2010). با این حال، نقشه‌برداری میکروسپکتروسکوپی هم-کانون رامان از یک نقطه رگ خونی، ناهمگونی قابل توجهی را نشان می‌دهد، که نشان‌دهنده مشارکت سایر اجزای بیوشیمیایی است. در این تحقیق فرض شده است که تغییرات مشخصی در طیف رامان خون مربوط به جنسیت وجود دارد.

همان‌طور که در بخش نتایج اشاره شد، مطالعات زیادی انجام گرفته است که تعیین جنسیت جنین با استفاده از طیف‌سنج رامان را تأیید کرده‌اند. محققین تعیین جنسیت تخم‌مرغ با طیف‌سنجی رامان از راه غشای پوسته را مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش، تخم‌مرغ‌های حاوی جنین ۳/۵ روزه مورد تابش اشعه رامان قرار گرفتند (Galli et al., 2016; 2018). نتایج نشان داد، مقادیر شدت متوسط حاصل از نمونه‌های نر و ماده به‌طور قابل توجهی متفاوت است، به طوری که شدت فلورسانس تخم‌های ماده در مقایسه با شدت فلورسانس تخم‌های نر کمتر است و PCA نشان‌دهنده تفاوت در محتوای پروتئین خون در نر و ماده است. از این تفاوت طیف می‌توان در تعیین جنسیت جنین طی انکوباسیون با اطمینان بالای ۹۰ درصد استفاده کرد. در یک مطالعه (Matsumoto et al., 2024)، طیف رامان از خون کامل و اجزای تشکیل‌دهنده آن، مانند گلبول‌های قرمز و پلاسمای خون، از جوجه‌های یک تا دو روزه، در طول موج تحریک ۷۸۵ نانومتر، به دست آمد. تجزیه و تحلیل PCA تغییرات طیفی وابسته به جنسیت در خون کامل و گلبول‌های قرمز را نشان داد، در حالی که تفاوت کمتری در پلاسمای خون مشاهده شد. این تفاوت‌های طیفی بین جوجه‌های نر و ماده به تفاوت در نسبت اجزای طیفی از گلبول‌های قرمز اکسیژنه (اکسی) و فاقد اکسیژن (دی‌اکسی) نسبت داده می‌شود، در حالی که نرها سهم

رشد و گسترش سیستم عصبی رویان انجام می‌شود و از این روزه نظر اخلاقی قابل قبول‌تر از کشتن جوجه‌های یک‌روزه است.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مسئولین پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان برای تامین مالی این پروژه، و مسئولین ایستگاه تکثیر و اصلاح نژاد مرغ بومی متعلق به مرکز تولید مواد ژنتیکی شرکت جاهد استان خوزستان مخصوصاً آقای مهندس محمدی جهت مساعدت در تامین تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار و همچنین، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز جهت استفاده از تجهیزات و میکروسکوپ رامان تشکر می‌شود.

در مقایسه با ماده‌ها به‌طور قابل توجهی بالاتر است. فلورسانس بالاتر خون نر در مراحل اولیه جوجه‌کشی به تفاوت در افزایش هماتوکریت مشاهده شده طی اریتروپوئیزس و افزایش هموگلوبین در طول بلوغ گلبول قرمز بین جنس‌ها مرتبط است (Galli *et al.*, 2018).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که طیف‌سنجی رامان می‌تواند به‌عنوان روشی کم‌تهاجمی و دقیق جهت تعیین جنسیت جنین مرغ طی مراحل جوجه‌کشی مورد استفاده قرار گیرد. این روش به‌دلیل کوتاه بودن زمان انجام آزمایش می‌تواند بهترین شرایط را برای استقرار در صنعت فراهم کرده و جنسیت را با دقت بالا مشخص نماید. در نهایت، این روش می‌تواند باعث بهبود رفاه حیوانات شود، زیرا قبل از

فهرست منابع

- Aleksandrowicz, E., & Herr, I. (2015). Ethical euthanasia and short-term anesthesia of the chick embryo. *ALTEX - Alternatives to Animal Experimentation*, 32(2), 143-147. doi: 10.14573/altex.1410031
- Auner, G. W., Koya, S. K., Huang, C., Broadbent, B., Trexler, M., Auner, Z., Elias, A., Mehne, K.C., & Brusatori, M. A. (2018). Applications of Raman spectroscopy in cancer diagnosis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 37(4), 691-717. doi: 10.1007/s10555-018-9770-9
- Bruijnjs, M. R. N., Blok, V., Stassen, E. N., & Gremmen, H. G. J. (2015). Moral "Lock-In" in responsible innovation: The ethical and social aspects of killing day-old chicks and its alternatives. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 28(5), 939-960. doi: 10.1007/s10806-015-9566-7
- Chenani, H., Nazari, M., Beigi Nassiri, M. T., Roshanfekar, H., & Aghaie, A. (2021). Exonic SNP in MHC-DMB2 is associated with gene expression and humoral immunity in Japanese quails. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 239, 110302. doi: 10.1016/j.vetimm.2021.110302
- Clinton, M., Nandi, S., Zhao, D., Olson, S., Peterson, P., Burdon, T., & McBride, D. (2016). Real-time sexing of chicken embryos and compatibility with in ovo protocols. *Sexual Development*, 10(4), 210-216. doi: 10.1159/000448502
- Comission, E. (2018). EU agricultural outlook for markets and income, 2018–2030. In: European Commission, DG Agriculture and Rural Development Brussels, Belgium.
- Comission, E. (2021). Eggs market situation. Eggs market situation. https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/animals-and-animal-products/animal-products/eggs_en
- Fioranelli, M., Sepehri, A., Rocca, M. G., Rossi, C., Vojvodic, P., Lotti, J., Barygina, V., Vojvodic, A., Wollina, U., Tirant, M., Thuong, N. V., Dimitrijevic, S., Sijan, G., Peric-Hajzler, Z., Matovic, D., Vlskovic-Jovicevic, T., & Lotti, T. (2019). In ovo sexing of chicken eggs by virus spectroscopy. *Macedonian Journal of Medical Science*, 7(18), 3106-3109. doi: 10.3889/oamjms.2019.768
- Fridolfsson, A.-K., & Ellegren, H. (1999). A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology*, 30(1), 116-121. doi: 10.2307/3677252
- Galli, R., Preusse, G., Schnabel, C., Bartels, T., Cramer, K., Krautwald-Junghanns, M. E., Koch, E., & Steiner, G. (2018). Sexing of chicken eggs by fluorescence and Raman spectroscopy through the shell membrane. *PLoS One*, 13(2), e0192554. doi: 10.1371/journal.pone.0192554
- Galli, R., Preusse, G., Uckermann, O., Bartels, T., Krautwald-Junghanns, M.-E., Koch, E., & Steiner, G. (2016). In ovo sexing of domestic chicken eggs by Raman spectroscopy. *Analytical chemistry*, 88(17), 8657-8663. doi: 10.1021/acs.analchem.6b01868
- Galli, R., Preusse, G., Uckermann, O., Bartels, T., Krautwald-Junghanns, M.-E., Koch, E., & Steiner, G. (2017). In ovo sexing of chicken eggs by fluorescence spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(5), 1185-1194. doi: 10.1007/s00216-016-0116-6

- Göhler, D., Fischer, B., & Meissner, S. (2017). In-ovo sexing of 14-day-old chicken embryos by pattern analysis in hyperspectral images (VIS/NIR spectra): A non-destructive method for layer lines with gender-specific down feather color. *Poultry Science*, *96*(1), 1-4. doi: 10.3382/ps/pew282
- Lee, J. C. I., Tsai, L. C., Hwa, P. Y., Chan, C. L., Huang, A., Chin, S. C., Wang, L. C., Lin, J.T., Linacre, A., Hsieh, H. M. (2010). A novel strategy for avian species and gender identification using the CHD gene. *Molecular and Cellular Probes*, *24*(1), 27-31. doi: 10.1016/j.mcp.2009.08.003
- Matsumoto, S., Ogino, A., Onoe, K., Ukon, J., & Ishigaki, M. (2024). Chick sexing based on the blood analysis using Raman spectroscopy. *Scientific Reports*, *14*(1), 15999. doi: 10.1038/s41598-024-65998-y
- Michael, A. S., Harvey Lui, M. D., David, I. M. M. D., Haishan, Z., Abdulmajeed Alajlan, M. D., & Xiao, K. C. (2006). Changes in nuclei and peritumoral collagen within nodular basal cell carcinomas via confocal micro-Raman spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, *11*(3), 034004. doi: 10.1117/1.2209549
- Nadgaran, H., & Kazempourfard, M. S. (2021). Ultrashort pulsed laser amplifier: simultaneous optimization of thermally induced diffraction loss and energy transfer upconversion. *Laser Physics*, *31*(7), 075001. doi: 10.1088/1555-6611/ac0047
- Nazari, M., Fatemeh, S., & Radpoor, S. (2020) Investigation of Heat shock protein 70 gene polymorphism in Khuzestan native chicken. *Agricultural Biotechnology Journal*, *12*(1), 81-100. doi: 10.22103/jab.2020.12806.1081
- Phelps, P., Bhutada, A., Bryan, S., Chalker, A., Ferrell, B., Neuman, S., & Butt, T. (2003). Automated identification of male layer chicks prior to hatch. *Worlds Poultry Science Journal*, *59*(1), 33-38.
- Rosenbruch, M. (1997). The sensitivity of chicken embryos in incubated eggs. *ALTEX - Alternatives to Animal Experimentation*, *14*(3), 111-113. Retrieved from <https://altex.org/index.php/altex/article/view/1591>
- Rozenboim, I., & Ben Dor, E. (2001). The use of reflectance spectroscopy for fertility detection in freshly laid egg and gender sorting in mid incubation period. *Poultry Science*, *90*(E-Suppl. 1), 98.
- Salabi, F., Nazari, M., & Cao, W.G. (2014). Cell culture, sex determination and single cell cloning of ovine transgenic satellite cells in vitro. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, *21*, 22. doi: 10.1186/s40709-014-0022-z
- Sikirzhytskaya, A., Sikirzhytski, V., & Lednev, I. K. (2017). Determining gender by Raman spectroscopy of a bloodstain. *Analytical Chemistry*, *89*(3), 1486-1492. doi: 10.1021/acs.analchem.6b02986
- Smith, C. A. (2008). Sex determination in birds: HINT s from the W sex chromosome? *Sexual Development*, *1*(5), 279-285. doi: 10.1159/000108934
- Virkler, K., & Lednev, I. K. (2010). Raman spectroscopic signature of blood and its potential application to forensic body fluid identification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *396*(1), 525-534. doi: 10.1007/s00216-009-3207-9
- Webster, B., Hayes, W., & Pike, T. W. (2015). Avian egg odour encodes information on embryo sex, fertility and development. *PloS One*, *10*(1), e0116345. doi: 10.1371/journal.pone.0116345
- Xu, Z., He, Z., Song, Y., Fu, X., Rommel, M., Luo, X., Hartmaier, A., Zhang, J., & Fang, F. (2018). Topic Review: Application of Raman Spectroscopy Characterization in Micro/Nano-Machining. *Micromachines*, *9*(7), 361. doi: 10.3390/mi9070361
- Yilmaz-Dikmen, B., & Dikmen, S. (2013). A morphometric method of sexing white layer eggs. *Brazilian Journal of Poultry Science*, *15*, 203-210. doi: 10.1590/S1516-635X2013000300006