

## مطالعه چندشکلی ژن اووالبومین و نقش آن در کیفیت خارجی تخم مرغان بومی اصفهان

- **مائده قنبریان بروجنی\***: دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۹۱۳۸-۱۵۷۳۹
- **مجتبی آهنی آذری**: دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۹۱۳۸-۱۵۷۳۹
- **سعید حسنی**: دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۹۱۳۸-۱۵۷۳۹
- **محمدرضا عبادی**: بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات علوم کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، صندوق پستی:

۸۱۷۸۵-۱۹۹

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۵

### چکیده

اووالبومین از جمله پروتئین‌های فعال ماتریکس پوسته تخم مرغ است که بر روی کلسیفیکاسیون پوسته تخم مرغ مؤثر می‌باشد. تحقیق حاضر با هدف مطالعه ارتباط چندشکلی دو ناحیه از آگزون ۸ ژن اووالبومین واقع بر روی کروموزوم شماره ۲ با برخی از صفات کیفیت خارجی تخم مرغ به کمک تکنیک‌های RFLP و SSCP در مرغان بومی اصفهان انجام شد. در این پژوهش DNA ژنومی از خون به کمک کیت استاندارد استخراج و نواحی مورد نظر به روش PCR تکثیر شدند. چندشکلی یک ناحیه با طول ۱۹۹ جفت باز به کمک تکنیک‌های MnlI-RFLP و SSCP در ناحیه‌ای دیگر با طول ۴۰۷ جفت باز توسط تکنیک SSCP مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور تعیین ژنوتیپ مرغان، الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌امید و رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده شد. برای قطعه اول ۲ ژنوتیپ (A1A1 و A1A2) با روش RFLP و ۳ ژنوتیپ (B1B2، B1B1 و B3B3) با روش SSCP شناسایی شدند. برای قطعه دوم ۳ ژنوتیپ (C1C1، C1C2 و C2C2) مشاهده شد. بیشترین فراوانی‌های ژنوتیپی متعلق به الگوهای A1A1، B1B2 و C2C2 بود و میانگین‌های هتروزیگوسیتی به ترتیب ۰/۳۳، ۰/۵۱ و ۰/۳۳ به دست آمد. در تجزیه و تحلیل داده‌ها هیچ کدام از صفات ارتباط معنی‌داری با قطعه ۱۹۹ جفت بازی نشان ندادند ( $P > 0/05$ ). وزن تخم مرغ دارای ارتباط معنی‌داری با قطعه ۴۰۷ جفت بازی بود ( $P < 0/05$ ) که ژنوتیپ C1C2 وزن سبک‌تری نسبت به دو ژنوتیپ دیگر داشت، اما ارتباط سایر صفات با این قطعه بی‌معنی بود ( $P > 0/05$ ). نتایج به دست آمده نشان دادند که در مرغ بومی اصفهان ژن اووالبومین دارای چندشکلی نسبتاً بالایی است و می‌تواند در برنامه‌های اصلاح نژادی آینده مورد توجه قرار گیرد.

**کلمات کلیدی:** چندشکلی، ژن اووالبومین، صفات کیفیت خارجی تخم مرغ، مرغ بومی اصفهان



## مقدمه

تخم مرغ ناشی از پیری مرغ و سطح اجزای ماتریکس وجود دارد. این رابطه با مطالعات ارتباط ژنتیکی بین چندشکلی در ژن های کد کننده پروتئین های ماتریکس پوسته تخم مرغ و اندازه گیری کیفیت پوسته تخم مرغ تأیید شده است (Nys و Gautron، ۲۰۰۶). نتایج تحقیق Hincke (۱۹۹۵) نشان داد که اووالبومین در طول فاز اولیه شکل گیری پوسته حاضر است که در پروتئین های ماتریکس بدنه مامیلاری گنجانیده شده است. Hincke و همکاران (۱۹۹۵) بیان کردند که از پروتئین های موجود در لایه مامیلاری درونی پوسته، اووالبومین نشانگری در ارتباط با اندازه کریستال می باشد. Zhang و همکاران (۲۰۱۵) آزمایشی با هدف مطالعه چندشکلی های نوکلئوتیدی صفات سازمان فراساختاری پوسته تخم مرغ بر روی مرغ های لاین خالص سفیدرود آیلند انجام دادند که اووالبومین به طور قابل توجهی با ضخامت مؤثر و اندازه مخروط های مامیلاری مرتبط بود. هدف از انجام این تحقیق شناسایی چندشکلی موجود در دو ناحیه از آگزون ۸ ژن اووالبومین واقع بر کروموزوم شماره ۲ و ارتباط آن ها با صفات کیفیت پوسته تخم مرغ و نیز تعیین فراوانی های آللی و ژنوتیپی برای این جایگاه های ژنی در مرغان بومی اصفهان می باشد.

## مواد و روش ها

تحقیق حاضر در سال ۱۳۹۴ بر روی مرغان مرکز تکثیر و اصلاح نژاد اصفهان انجام شد. این مرغان در شرایط کنترل شده سالن در قفس های انفرادی نگهداری می شدند. ابتدا ۱۵۰ قطعه از این مرغان به طور تصادفی انتخاب و از هر مرغ دو نمونه تخم مرغ (Dunn و همکاران، ۲۰۰۸) در سن های ۶۰ و ۶۴ هفتگی به منظور بررسی اثر ژن اووالبومین در سنین بالاتر بر روی خصوصیات کیفیت پوسته با در نظر گرفتن پایین بودن مقاومت و درصد پوسته در این سنین در مرغان مورد تحقیق، گرفته شد. خصوصیات مورد نظر در تخم مرغ ها اندازه گیری (Sun و همکاران، ۲۰۱۵) و میانگین آن ها برای بیان نمودن کیفیت پوسته تخم مرغ در نظر گرفته شد (Zhang و همکاران، ۲۰۱۵). هم چنین نمونه خون از ورید بال هر مرغ گرفته و داخل لوله های حاوی ماده ضد انعقاد خون EDTA (Ethylene diamine tetra acetic acid) جمع آوری (قره ویسی، ۱۳۹۱) و سپس در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد تا قبل از استخراج DNA ذخیره شد (Zhang و همکاران، ۲۰۱۵؛ قره ویسی، ۱۳۹۱).

**اندازه گیری خصوصیات کیفیت پوسته تخم مرغ:** اندازه گیری خصوصیات کیفیت پوسته تخم مرغ در بخش علوم دامی مرکز تحقیقات علوم کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان انجام شد. برای ارزیابی پارامترهای کیفیت پوسته تخم مرغ وزن تخم مرغ توسط

مهم ترین هدف در اصلاح نژاد مرغان تخم گذار تولید تخم مرغ های با کیفیت است (Mahrous و همکاران، ۲۰۱۳). بهبود صفات کیفیتی تخم مرغ با انتخاب سنتی مشکل است، به دلیل این که اندازه گیری فنوتیپی آن ها دشوار یا وقت گیر و در برخی موارد همبستگی ژنتیکی نامطلوب با دیگر صفات تولیدی مهم وجود دارد. انتخاب مستقیم بر اساس نشانگرهای ژنتیکی تا حد زیادی ممکن است اصلاح صفات کیفیتی تخم مرغ را بالا ببرد (Vilkki، ۲۰۰۷). کیفیت پوسته تخم مرغ در صنعت طیور مهم و یکی از مشکلات عمده تولید تخم مرغ است (Fan و همکاران، ۲۰۱۳؛ Radwan و همکاران، ۲۰۱۰). خسارت ناشی از پوسته های آسیب دیده تخم مرغ ها، علت زیان اقتصادی قابل توجهی (حدود ۸ تا ۱۱ درصد از کل تولید) در صنعت تخم مرغ و یک تهدید برای سلامت انسان (با نفوذ آلودگی و پاتوژن ها به محتویات تخم مرغ) است (Fan و همکاران، ۲۰۱۳؛ Dunn و همکاران، ۲۰۱۲؛ Sun و همکاران، ۲۰۱۲). پوسته تخم مرغ یک ساختار بسیار منظم و متخلخل متشکل از مواد معدنی (۹۵ درصد کربنات کلسیم) مرتبط با ماتریکس آلی (شامل؛ پروتئین ها، گلیکوپروتئین ها و پروتئوگلیکان ها) است (Zhang و همکاران، ۲۰۱۵؛ Radwan و همکاران، ۲۰۱۰؛ Gautron و همکاران، ۲۰۰۹). پوسته تخم مرغ یک مانع محافظتی در برابر آسیب های فیزیکی و نفوذ پاتوژن ها از محیط خارجی است، و از نظر بیولوژیکی تنظیم کننده مبادله آب و گازها به عنوان یک عضو تنفسی و همچنین یک منبع کلسیم برای رسوب در استخوان برای جنین در حال رشد می باشد (Sun و همکاران، ۲۰۱۵؛ Fan و همکاران، ۲۰۱۳؛ Nys و Gautron، ۲۰۰۶). ماتریکس آلی اگرچه مقدارش (به خصوص پروتئین های آن)، در لایه های کلسیفیه تنها تا ۳/۵ درصد است، از اهمیت زیادی برای رسوب یون های بی کربنات و کلسیم، و تأثیر در بافت، خواص بیومکانیکی و مقاومت پوسته تخم مرغ با کنترل بر روند رشد، شکل، اندازه و جهت گیری کریستال کلسیت برخوردار است (Liu و همکاران، ۲۰۱۳؛ Mine، ۲۰۰۸). در بخش محلول اسیدی ماتریکس، ۵۲۰ پروتئین (از جمله اووالبومین) شناخته شده اند (Liu و همکاران، ۲۰۱۳). اووالبومین یک گلیکوپروتئین با یک زنجیره منفرد کربوهیدرات متصل شده به آسپارژین ۲۹۳ است و متشکل از ۳۸۶ اسید آمینه (Mine، ۲۰۰۸) و از جمله پروتئین های فعال ماتریکس (بدون مراحل رسوب) است (Miksik و همکاران، ۲۰۱۰) که ممکن است در تنظیم رشد کلسیت در طول کلسیفیکاسیون پوسته تخم مرغ درگیر باشد (Mine، ۲۰۰۸). به علاوه، کیفیت پوسته تخم مرغ با پیری مرغان تخم گذار کاهش می یابد (Sun و همکاران، ۲۰۱۵؛ پیرانی و همکاران، ۱۳۸۸). یک رابطه بین تغییرات در خواص مکانیکی پوسته

مولکولی این تحقیق در آزمایشگاه ژنتیک دانشکده علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. DNA ژنومی از ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه خون (Goto و همکاران، ۲۰۱۴) به کمک کیت (شرکت سیناژن) استخراج و بعد از شست و شو با اتانول ۷۰ درصد (Huang و همکاران، ۲۰۱۳؛ قره ویسی و همکاران، ۱۳۹۱) در میکروتیوپ در بافر TE (PH=۷/۵) حل و جهت انجام PCR در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Hou و همکاران، ۲۰۱۰). کمیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و کیفیت آن با الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد تعیین شد (پیرانی و همکاران، ۱۳۸۸). واکنش‌های PCR در حجم‌های ۲۵ میکرولیتر شامل؛ ۲۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۰/۱ میکرومول از هر آغازگر (جدول ۱)، ۱۲/۵ میکرولیتر کیت PCR (شرکت سیناژن)، آب مقطر استریل تا حجم ۲۵ میکرولیتر و روغن معدنی طبق برنامه جدول ۲ انجام شد. برای مشاهده محصولات PCR، الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد که با DNA Safe Stain رنگ‌آمیزی شده بود، با ولتاژ ۹۵ ولت به مدت ۱ ساعت انجام شد و بعد به وسیله لامپ UV رویت و عکس‌برداری شد (Huang و همکاران، ۲۰۱۳؛ قره ویسی و همکاران، ۱۳۹۱).

ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد. برای محاسبه شاخص شکل ابعاد تخم مرغ (طول و عرض) توسط کولیس (Radwan و همکاران، ۲۰۱۰) با دقت میلی‌متر و سپس مقاومت پوسته به وسیله مقاومت سنج (Sun و همکاران، ۲۰۱۲؛ Sun و همکاران، ۲۰۱۵) با مقیاس سانتی‌متر مربع بر کیلوگرم اندازه‌گیری شد. پس از آن، تخم مرغ‌ها شکسته شده و محتویات داخلی حذف و پوسته‌ها با آب شسته و در دمای اتاق (Sun و همکاران، ۲۰۱۵) به مدت ۴۸ ساعت خشک شد (Panheleux و همکاران، ۲۰۰۰)، سپس وزن آن‌ها توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم و ضخامت کل پوسته تخم مرغ در سه نقطه مختلف در قسمت وسط تخم مرغ (Radwan و همکاران، ۲۰۱۰) با استفاده از ضخامت سنج (Sun و همکاران، ۲۰۱۲؛ Sun و همکاران، ۲۰۱۵) با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. از روابط زیر درصد پوسته (Radwan و همکاران، ۲۰۱۰؛ Mahrous و همکاران، ۲۰۱۳) و شاخص شکل تخم مرغ (Dunn و همکاران، ۲۰۰۸) محاسبه شد.

$$\text{عرض تخم مرغ} = \frac{\text{شاخص شکل تخم مرغ}}{\text{طول تخم مرغ}} \times 100$$

$$\text{وزن پوسته} = \frac{\text{وزن تخم مرغ}}{\text{وزن تخم مرغ}} \times 100$$

#### استخراج DNA و واکنش زنجیره پلیمرز (PCR):

آزمایشات

جدول ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده برای هر یک از نواحی ژنی

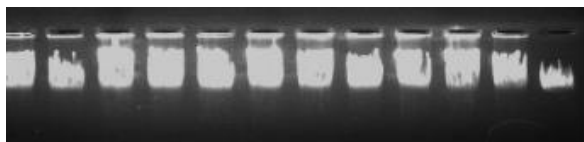
ناحیه ژنی	قطعه	آغازگر	توالی (۳.....۵)	طول رشته (جفت باز)
اووالبومین (اگزون ۸)	قطعه اول از باز ۶۷۹۴۸۶۹۲ تا ۶۷۹۴۸۸۹۱	رفت	GAGTCATCACAAGAAAATGC	۱۹۹
		برگشت	CAGGAACACAGAGAACAAGCA	
اووالبومین (اگزون ۸)	قطعه دوم از باز ۶۷۹۴۸۳۹۲ تا ۶۷۹۴۸۷۹۹	رفت	CAAACACATCGCAACCAACG	۴۰۷
		برگشت	CTGGAGCACCTTGGTCATACA	

جدول ۲: برنامه دمایی و زمانی به کار رفته شده در واکنش PCR برای هر یک از نواحی ژنی

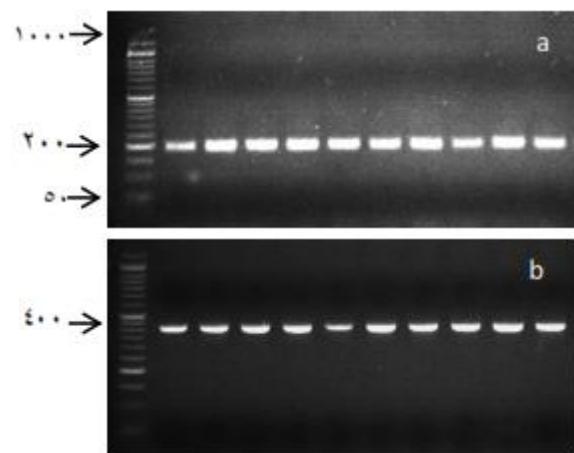
تعداد سیکل‌ها	زمان (ثانیه)	دما (سانتی‌گراد)	مراحل	ژن
۳۵	۱۲۰	۹۵	واسرشت‌سازی اولیه	اووالبومین (۱۹۹ جفت باز)
	۴۰	۹۵	واسرشت‌سازی	
	۴۵	۵۱/۶	اتصال	
	۴۵	۷۲	بسط	
	۳۶۰	۷۲	بسط نهایی	
۳۵	۱۲۰	۹۵	واسرشت‌سازی اولیه	اووالبومین (۴۰۷ جفت باز)
	۴۵	۹۴	واسرشت‌سازی	
	۵۰	۵۵	اتصال	
	۵۵	۷۲	بسط	
	۴۲۰	۷۲	بسط نهایی	



۳ آورده شده که بیشترین فراوانی‌های آلی به ترتیب متعلق به آلل‌های  $A_1$ ,  $B_1$ ,  $C_2$  و بیشترین فراوانی‌های ژنوتیپی به ترتیب متعلق به ژنوتیپ‌های  $A_1A_1$ ,  $B_1B_2$ ,  $C_2C_2$  می‌باشد. در بررسی چندشکلی پروتئین اووالبومین در سفیده تخم اردک موسکوی (Muscovy) و مالارد (Mallard) ۲ آلل  $A$  و  $B$  با فراوانی‌های آلی ۰/۴۵ و ۰/۵۵، ۳ ژنوتیپ  $AA$ ،  $AB$  و  $BB$  را با میانگین هتروزایگوسیتته ۰/۴۹ مشاهده شد (Akinyemi و همکاران، ۲۰۱۴) و برای اردک‌های مگلانگ (Maglang)، تگال (Tegal) و موجوساری (Mojosari) ۲ آلل  $A$  و  $B$  مشاهده شد که در هر سه نژاد فراوانی آلل  $A$  بیش‌تر از  $B$  بود و میانگین هتروزایگوسیتته به ترتیب ۰/۳۶، ۰/۴ و ۰/۴۹ گزارش شد (Johari و همکاران، ۲۰۱۳) که این نتایج نزدیک به نتایج تحقیق حاضر می‌باشد ولی Obeidah و همکاران (۱۹۷۷) در بررسی مشابه بر روی مرغ فایومی (Fayoumi) تنها ژنوتیپ هموزیگوت  $AA$  را مشاهده کردند. تعادل هاردی-واینبرگ با استفاده از آزمون کای اسکور در جمعیت مرغان بومی اصفهان بررسی شد (جدول ۳). برای ناحیه ۱۹۹ جفت بازی جمعیت در حالت تعادل هاردی-واینبرگ قرار نداشت که می‌توان نتیجه گرفت که آلل‌های موجود در این جایگاه تحت تاثیر عوامل تغییر دهنده فراوانی‌های آلی و ژنوتیپی قرار گرفته‌اند که ظاهراً انتخابی در مرغ‌های این جمعیت در جهت افزایش یا کاهش صفات فنوتیپی مورد نظر صورت گرفته است.



شکل ۱: کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از نمونه‌های خون



شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR ناحیه با طول ۱۹۹ جفت باز (a) و ناحیه با طول ۴۰۷ جفت باز (b)

### واکنش هضم آنزیمی (Restriction fragment length

polymorphism یا RFLP) و روش چند شکلی فضایی رشته‌های منفرد (Single strand confirmation polymorphism یا SSCP): براساس دستور هضم آنزیمی؛ محصول PCR ۱۰ میکرولیتر (DNA ۰/۱-۰/۵ میکروگرم)، آب مقطر استریل ۱۸ میکرولیتر، بافر یونیورسال ۲ میکرولیتر و آنزیم MnlI ۱ میکرولیتر (این آنزیم در تحقیقی مشابه توسط Dunn و همکاران (۲۰۰۸) استفاده شده بود) ابتدا مخلوط و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۱۶ ساعت درون انکوباتور قرار داده شد. جهت رؤیت محصول برش یافته، الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید ۸ درصد با ولتاژ ۲۵۰ ولت به مدت ۴ ساعت انجام گرفت و سپس ژل برای مشاهده باندهای حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR به کمک نیترات نقره رنگ‌آمیزی شد. برای تجزیه محصولات PCR، به کمک روش (SSCP) ۳ میکرولیتر از هر یک از محصولات PCR (Huang و همکاران، ۲۰۱۳) به همراه ۱۳ میکرولیتر بافر دناتوره کننده مخلوط گردید و تحت دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار گرفته و سپس نمونه‌ها سریعاً برای ممانعت از اتصال مجدد رشته‌های مکمل به داخل یخ منتقل شدند. به منظور مشاهده ژنوتیپ‌ها، الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید و رنگ‌آمیزی نیترات نقره مشابه قبل انجام شد.

### تجزیه و تحلیل داده‌ها: محاسبه فراوانی ژنی و ژنوتیپی و

هم‌چنین آزمون  $X^2$  برای بررسی تعادل هاردی-واینبرگ این ژن با استفاده از نرم‌افزار POPGENES ۳۲ انجام شد. بررسی ارتباط بین ژنوتیپ‌های حاصل از ژن اووالبومین با داده‌های فنوتیپی از مدل زیر به کمک رویه GLM نرم‌افزار SAS انجام شد.

$$Y_{ijk} = \mu + h_i + G_j + e_{ijk}$$

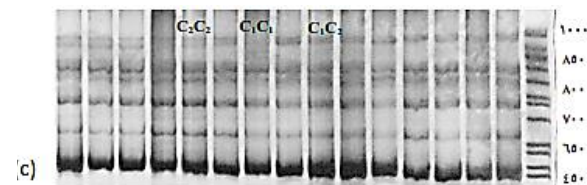
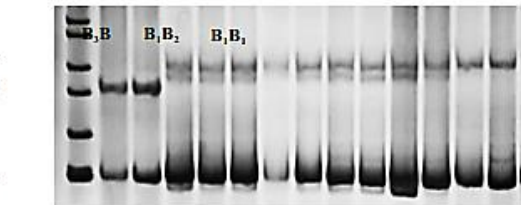
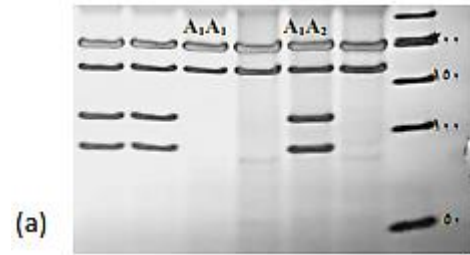
$Y_{ijk}$  مقدار فنوتیپ صفت مورد نظر،  $\mu$  میانگین کل،  $h_i$  اثر نوبت جوجه‌کشی،  $G_j$  اثر ژنوتیپ،  $e_{ijk}$  اثر تصادفی باقی مانده می‌باشند.

## نتایج

DNAهای استخراج شده دارای غلظت بالا و از کیفیت مطلوبی برخوردار بودند (شکل ۱). اندازه قطعات تکثیر شده بعد از انجام واکنش PCR برای دو ناحیه از اگزون ۸ ژن اووالبومین به ترتیب ۱۹۹ و ۴۰۷ جفت باز بود (شکل ۲). هضم ناحیه ۱۹۹ جفت بازی توسط آنزیم محدودالتر MnlI، ۲ الگوی ژنوتیپی  $A_1A_1$  و  $A_1A_2$  تولید نمود و منجر به تولید آلل‌های  $A_1$  و  $A_2$  شد. در تجزیه و تحلیل SSCP نواحی ۱۹۹ و ۴۰۷ جفت بازی، به ترتیب ۳ الگوی ژنوتیپی ( $B_1B_1$ ،  $B_1B_2$ ،  $B_2B_3$ ) و ۳ الگوی ژنوتیپی ( $C_1C_1$ ،  $C_1C_2$ ،  $C_2C_2$ ) مشاهده شد (شکل ۳). فراوانی‌های ژنوتیپی و آلی حاصل از RFLP و SSCP در جدول

مرغان مرکز تکثیر و اصلاح نژاد اصفهان در جهت بهبود صفات تولیدی و عملکردی به خصوص تعداد تخم مرغ، وزن تخم مرغ، سن بلوغ جنسی و وزن بدن (در ۱ روزگی، ۸ هفتگی، ۱۲ هفتگی و هنگام بلوغ جنسی) تحت انتخاب و جفت گیری غیر تصادفی بوده اند. انتخاب و جفت گیری غیر تصادفی از عوامل تغییر دهنده تعادل هاردی- واینبرگ در جمعیت می باشند. با توجه به تحقیق امام قلی بگلی و همکاران (۱۳۸۹) بر روی مرغان بومی یزد، صفات تخم مرغ با صفات عملکردی و تولیدی مذکور دارای ارتباط می باشند که در نهایت می توان چنین بیان کرد که انتخاب برای بهبود صفات مذکور در مرغان بومی اصفهان تغییر در فراوانی های آلی و ژنوتیپی در رابطه با سایر صفات (صفات کیفیت تخم مرغ) را به همراه داشته که در تحقیق حاضر شاهد عدم تعادل هاردی- واینبرگ برای ناحیه ۱۹۹ جفت بازی بودیم.

همان طور که نتایج مقایسه میانگین های صفات کیفیت خارجی تخم مرغ در جدول ۴ نشان می دهد، اثر ژنوتیپ های حاصل از دو روش RFLP و SSCP ناحیه ۱۹۹ جفت بازی بر تمام صفات مورد بررسی بی معنی بود. اثر ژنوتیپ های SSCP ناحیه ۴۰۷ جفت بازی تنها بر صفت وزن تخم مرغ معنی دار بود که ژنوتیپ  $C_1C_2$  با میانگین  $59/54 \pm 0/67$  گرم به طور معنی داری ( $P < 0/05$ ) از ژنوتیپ های  $C_1C_1$  و  $C_2C_2$  سبک تر بود.



شکل ۳: الگوهای RFLP حاصل از هضم با آنزیم MnlI (a) و

SSCP محصولات PCR ناحیه ۱۹۹ جفت بازی و الگوهای

SSCP محصولات PCR ناحیه ۴۰۷ جفت بازی (c)

جدول ۳: فراوانی های ژنوتیپی و آلی دو روش RFLP و SSCP

ژن	ژنوتیپ	فراوانی ژنوتیپ	آلی	فراوانی آلی	$X^2$	میانگین هتروزیگوسیت
ژن MnlI-RFLP اووالبومین (۱۹۹ جفت بازی)	$A_1A_1$	۰/۵۸	$A_1$	۰/۷۹	۱۰/۳۰***	۰/۳۳
	$A_1A_2$	۰/۴۲	$A_2$	۰/۲۱		
ژن SSCP اووالبومین (۱۹۹ جفت بازی)	$B_1B_1$	۰/۱۰	$B_1$	۰/۵۴	۲۹۸/۸۷***	۰/۵۱
	$B_1B_2$	۰/۸۹	$B_2$	۰/۴۵		
	$B_3B_3$	۰/۰۱	$B_3$	۰/۰۱		
ژن SSCP اووالبومین (۴۰۷ جفت بازی)	$C_1C_1$	۰/۰۷	$C_1$	۰/۲۱	۲/۸۵	۰/۳۳
	$C_1C_2$	۰/۲۸	$C_2$	۰/۷۹		
	$C_2C_2$	۰/۶۵				

\*\*\* ( $P < 0/01$ ).

دلایل عمده آن می تواند سن بالاتر مرغان در تحقیق حاضر باشد. باید در نظر گرفت شود که با افزایش سن مرغ، اندازه (طول و عرض) و وزن تخم مرغ آن افزایش و ضخامت پوسته بدون تغییر باقی خواهد ماند اما مقاومت آن کاهش می یابد که دلیل آن می تواند کاهش میزان رسوب کلسیم در واحد سطح پوسته باشد (Goto و همکاران، ۲۰۱۴؛ Sun و همکاران، ۲۰۱۲) و همچنین تغییر در بافت پوسته که نشان داده شده است غلظت اووالبومین بالاتر ( $577 \pm 94$ ) در مقابل  $293 \pm 28$  میلی گرم/گرم پروتئین، ( $P = 0/012$ ) در پوسته تخم مرغ های مرغان

میانگین صفات خارجی تخم مرغ به همراه اثر نوبت جوجه کشی در جدول ۵ آورده شده است. در مقایسه با تحقیق صورت گرفته توسط صالحی نسب (۱۳۹۱) بر روی مرغان بومی اصفهان در سن ۲۸ تا ۳۲ هفتگی میانگین وزن تخم مرغ و پوسته آن (به ترتیب ۵۴/۶ و ۵/۰۰ گرم)، طول و عرض تخم مرغ (به ترتیب ۵/۴۲ و ۴/۲۲ سانتی متر)، شاخص شکل تخم مرغ (۰/۷۷)، مقاومت پوسته تخم مرغ (۳/۴۴ کیلوگرم بر سانتی متر مربع) و ضخامت آن (۰/۳۸ میلی متر) گزارش شد که در این تحقیق وزن تخم مرغ سنگین تر و مقاومت پوسته کم تر بود. از



صالحی نسب (۱۳۹۱) در مورد صفات وزن، طول، عرض، شاخص شکل تخم مرغ و وزن پوسته تخم مرغ معنی دار گزارش شد. ولی در تحقیق حاضر تنها در مورد صفات طول تخم مرغ، وزن و ضخامت پوسته تخم مرغ معنی دار بود.

پیرتر نسبت به جوانها بوده است (Panheleux و همکاران، ۲۰۰۰) همچنین غلظت اووالبومین در عصاره پوسته جمع آوری شده در مرغان جوان زمانی که مقاومت پوسته بالاتر می باشد، پایین تر است (Gautron و Nys، ۲۰۰۶). اثر نوبت جوجه کشی در تحقیق صورت گرفته توسط

جدول ۴: میانگین حداقل مربعات (LSM±SE) اثرالگوهای ژنوتیپی مختلف اووالبومین بر صفات کیفیت خارجی تخم مرغ در مرغان بومی اصفهان

ژنوتیپ ها								صفات کیفیت خارجی تخم مرغ
SSCP اووالبومین (۴۰۷ جفت بازی)			SSSP اووالبومین (۱۹۹ جفت بازی)			Mn1-RFLP اووالبومین (۱۹۹ جفت بازی)		
C <sub>2</sub> C <sub>2</sub>	C <sub>1</sub> C <sub>2</sub>	C <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	B <sub>2</sub> B <sub>2</sub>	B <sub>1</sub> B <sub>2</sub>	B <sub>1</sub> B <sub>1</sub>	A <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	A <sub>1</sub> A <sub>1</sub>	
۶۱/۵۹±۰/۴۴*	۵۹/۵۴±۰/۶۷*	۶۳/۳۹±۱/۳۸*	۶۰/۹±۳/۱۴	۶۱/۲۲±۰/۳۸	۵۹/۹۶±۱/۲۸	۶۱/۳۹±۰/۵۶	۶۰/۹۳±۰/۴۹	وزن تخم مرغ (گرم)
۵/۷۲±۰/۰۲	۵/۶۵±۰/۰۳	۵/۷۵±۰/۰۷	۵/۵۷±۰/۱۶	۵/۷۱±۰/۰۲	۵/۶۴±۰/۰۶	۵/۶۹±۰/۰۳	۵/۷۱±۰/۰۲	طول تخم مرغ (سانتی متر)
۴/۳۹±۰/۰۱	۴/۳۵±۰/۰۲	۴/۴۲±۰/۰۴	۴/۴۸±۰/۰۹	۴/۳۸±۰/۰۱	۴/۳۸±۰/۰۴	۴/۳۹±۰/۰۲	۴/۳۷±۰/۰۱	عرض تخم مرغ (سانتی متر)
۰/۷۷±۰/۰۰۳	۰/۷۷±۰/۰۰۴	۰/۷۷±۰/۰۱	۰/۸۱±۰/۰۲	۰/۷۷±۰/۰۰۳	۰/۷۸±۰/۰۱	۰/۷۷±۰/۰۰۴	۰/۷۷±۰/۰۰۳	شاخص شکل تخم مرغ
۲/۲۲±۰/۰۷	۲/۱۴±۰/۱۱	۲/۲±۰/۲۳	۱/۶۳±۰/۵۱	۲/۲۱±۰/۰۶	۲/۱۷±۰/۲۱	۲/۲±۰/۰۹	۲/۲۱±۰/۰۸	مقاومت پوسته (کیلوگرم بر سانتی متر مربع)
۵/۳۲±۰/۰۵	۵/۱۴±۰/۰۸	۵/۳۶±۰/۱۶	۴/۷۹±۰/۳۵	۵/۳±۰/۰۴	۵/۰۴±۰/۱۴	۵/۲۹±۰/۰۶	۵/۲۷±۰/۰۵	وزن پوسته (گرم)
۰/۳۹±۰/۰۰۲	۰/۳۸±۰/۰۰۴	۰/۳۹±۰/۰۱	۰/۳۵±۰/۰۹	۰/۳۹±۰/۰۰۲	۰/۳۸±۰/۰۱	۰/۳۹±۰/۰۰۳	۰/۳۷±۰/۰۰۲	ضخامت پوسته (میلی متر)
۸/۶۱±۰/۰۷	۸/۴۶±۰/۱۱	۸/۵۵±۰/۲۳	۷/۵±۰/۵	۸/۵۹±۰/۰۶	۸/۴۹±۰/۲۱	۸/۵۷±۰/۰۹	۸/۸۵±۰/۰۸	درصد پوسته

- مقایسه میانگینها به روش توکی با دقت ۵ درصد انجام شد.

جدول ۵: میانگین صفات خارجی تخم مرغ به همراه اثر ثابت نوبت جوجه کشی بر آنها

صفات کیفیت خارجی تخم مرغ	وزن تخم مرغ (گرم)	طول تخم مرغ (سانتی متر)	عرض تخم مرغ (سانتی متر)	شاخص شکل تخم مرغ	مقاومت پوسته (کیلوگرم بر سانتی متر مربع)	وزن پوسته (گرم)	ضخامت پوسته (میلی متر)	درصد پوسته
میانگین	۶۱/۱۱	۵/۷۰	۴/۳۸	۰/۷۷	۲/۲۰	۵/۲۷	۰/۳۹	۸/۵۶
حداقل	۴۹/۹۶	۵/۱۶	۴/۰۳	۰/۶۷	۰/۳۵	۶/۸۲	۰/۳۲	۶/۶۱
حداکثر	۷۳/۹۸	۶/۵۲	۴/۶۹	۰/۸۶	۰/۳۸	۴/۰۰	۰/۴۵	۱۰/۲۱
انحراف استاندارد	۴/۳۱	۰/۲۲	۰/۱۲	۰/۰۳	۰/۷۲	۰/۴۹	۰/۰۳	۰/۷۲
ضریب تغییرات	۷/۰۶	۳/۸۳	۲/۷۹	۴/۱۶	۳/۲۹	۹/۲۸	۶/۷۷	۸/۴۱
اثر نوبت جوجه کشی	ns	*	ns	ns	ns	**	*	ns

- سطح معنی داری: ns (بی معنی)، \* (P<۰/۰۵)، \*\* (P<۰/۰۱).

## بحث

الگوی دیگر بود. در تحقیق حاضر، در بررسی صفات ضخامت و مقاومت هیچ ارتباط معنی داری با دو ناحیه مورد نظر از ژن اووالبومین مشاهده نشد که در مخالفت با تحقیقات صورت گرفته توسط Dunn و همکاران (۲۰۰۸) و Bing (۲۰۱۴) می باشد. دلیل عمده آن می تواند متفاوت بودن سطح بیان ژن اووالبومین در سنین مختلف باشد که می توان نتیجه گرفت این ژن بر روی کیفیت این صفات در سنین پایین تر مؤثرتر می باشد تا در سنین بالاتر. در این تحقیق، اثر ژنوتیپ های حاصل از SSCP ناحیه ۴۰۷ جفت بازی تنها بر صفت وزن تخم مرغ معنی دار بود که ژنوتیپ C<sub>1</sub>C<sub>2</sub> با میانگین ۵۹/۵۴±۰/۶۷ گرم به طور معنی داری (P<۰/۰۵) از ژنوتیپ های C<sub>1</sub>C<sub>1</sub> و C<sub>2</sub>C<sub>2</sub> سبک تر بود. Bvanendranv (۱۹۶۷) گزارش کرد که ژن اووالبومین با ۳ ژنوتیپ AA، AB و BB دارای ارتباط با وزن تخم مرغ بود که ژنوتیپ AA تخم مرغ های سنگین تری نسبت به دیگر ژنوتیپ ها داشت که در موافقت با این تحقیق می باشد. ولی در تحقیق صورت گرفته توسط

نتایج میانگین های حداقل مربعات ژنوتیپ های حاصل از روش های RFLP و SSCP ناحیه ۱۹۹ جفت بازی برای تمام صفات کیفیت خارجی تخم مرغ تفاوت معنی داری نداشتند اما، در بررسی مشابهی بر روی این ناحیه، Dunn و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که اووالبومین بر ضخامت کل، ضخامت مؤثر، تغییر شکل و مقاومت پوسته بسیار مؤثر است و همچنین ژنوتیپ های هتروزایگوت مطلوبیت کم تر فنوتیپی شامل پوسته نازک تر، مقاومت کم تر و تغییر شکل بیش تر نشان دادند. Bing (۲۰۱۴) نیز ارتباطی بین ژن اووالبومین و ضخامت پوسته تخم مرغ یافت. Dunn و همکاران (۲۰۱۱) نشانگر اووالبومین را مرتبط با اندازه کریستال در پوسته تخم مرغ مرغان رود آیلند قرمز دانستند که در بررسی آن ها ۳ الگوی ژنوتیپی مشاهده شد که الگوی شماره ۲ دارای کریستال های کوچک تری نسبت به دو



## تشکر و قدردانی

از کلیه کارکنان مرکز اصلاح نژاد مرغ بومی استان اصفهان به خصوص مهندس فقیه، مهندس جهانبخش و مهندس عمو هادی و مهندس یقینی و مرکز تحقیقات علوم کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان به خصوص مهندس صفا که در جمع‌آوری داده‌های این تحقیق همکاری لازم را داشتند، و نیز حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان که اعتبار لازم جهت انجام این تحقیق را فراهم نمودند کمال تشکر به عمل می‌آید.

## منابع

۱. امامقلی‌بگلی، ح.؛ زره‌داران، س.؛ حسنی، س.؛ خان‌احمدی، ع. ر. و عباسی، م. ع.، ۱۳۸۹. برآورد همبستگی ژنتیکی و فنوتیپی صفات عملکرد و کیفیت تخم‌مرغ در مرغان بومی استان یزد. مجله پژوهش‌های علوم دامی. دوره ۴، شماره ۱، صفحات ۸۹ تا ۹۷.
۲. پیرانی، ن. ا.؛ محمدهاشمی، آ.؛ علیجانی، ص.؛ رضازاده‌گلی، ر. و قنبری، ص.، ۱۳۸۸. تجزیه و تحلیل مولکولی جمعیتی از مرغ بومی مازندران با استفاده از توالی ناحیه HVR-I ژنوم میتوکندری. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی. دوره ۱، شماره ۲، صفحات ۵۳ تا ۶۶.
۳. صالحی‌نسب، م.، ۱۳۹۱. برآورد پارامترهای ژنتیکی و ردیابی ژن‌های بزرگ اثر برای برخی صفات اقتصادی مرغ‌های بومی استان اصفهان با استفاده از روش‌های مختلف آماری. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
۴. قره‌ویسی، ش. ا.؛ ایرانی، م.؛ عبدالله‌پور، ع. ا. و عباسی، ح. ع.، ۱۳۹۱. بررسی چندشکلی اگزون ۹ و ۱۱ ژن گیرنده لپتین در مرغ بومی مازندران با روش PCR-RFLP. مجله ژنتیک نوین. دوره ۷، شماره ۲، صفحات ۱۷۵ تا ۱۷۸.
۵. Akinyemi, M.O.; Osaiyuwu, O.H. and Ajayi, A.Y., 2014. Biochemical characterisation of Muscovy and Mallard ducks in Nigeria. I.J.S.N. Vol. 5, No. 3, pp: 557-562.
۶. Bing, L., 2014. Influence of Eggshell Ultrastructural Organization on Hatchability and Candidate Genes Associated with Eggshell Quality Traits. (Doctoral dissertation), China Agricultural University. Dissertation URL:/showinfo-194-683665-0.html.
۷. Bvanendranv, U., 1967. Egg-white polymorphisms and economic characters in domestic fowl. British Poultry Science. Vol. 8, pp: 119-129.
۸. Dunn, I.C.; Joseph, N.T.; Bain, M.; Edmond, A.; Wilson, P.W.; Milona, P.; Nys, Y.; Gautron, J.; Schmutz, M.; Preisinger, R. and Waddington, D., 2008. Polymorphisms in eggshell organic matrix genes are associated with eggshell quality measurements in pedigree Rhode Island Red hens. Animal Genetics. Vol. 40, pp: 110-114.
۹. Dunn, I.C.; Rodriguez Navarro, A.B.; McDade, K.; Schmutz, M.; Preisinger, R.; Waddington, D.; Wilson, P. W. and Bain, M.M., 2012. Genetic variation in eggshell crystal size and orientation is large and these traits are

Huang و همکاران (۲۰۱۳)، این ناحیه در اردک برای صفت وزن تخم‌مرغ معنی‌دار نبود ولی با توجه به ۳ ژنوتیپ TT، TC و CC رؤیت شده، جوجه‌درآوری در تخم‌مرغ‌های بارور با ژنوتیپ TT و CC در مقایسه با ژنوتیپ TC به‌طور معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) بیشتر بود. اووالبومین می‌تواند تنظیم‌کننده توسعه جنین باشد و جهش در ژن اووالبومین مرگ و میر جنین را افزایش می‌دهد. در آنالیز توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی، جایگزینی اشتباه هیستیدین با تیروزین را در اووالبومین شناسایی کردند. هم‌چنین در بررسی ژن اووالبومین در جمعیت مرغ بومی هینادری یک جهش نقطه‌ای آسپارژین با آسپارتیک اسید در موقعیت ۸۰۳۲ در منطقه اگزون ۸ بین الل‌های OVA<sup>B</sup> و OVA<sup>A</sup> مشاهده شد (Kinoshita و همکاران، ۲۰۰۳).

با توجه به تحقیقات صورت گرفته بر روی ژن اووالبومین، این ژن به‌عنوان یک نشانگر مؤثر بر روی ضخامت کل، ضخامت مؤثر، تغییر شکل و مقاومت پوسته (Dunn و همکاران، ۲۰۰۸)، جوجه‌درآوری اردک (Huang و همکاران، ۲۰۱۳)، اندازه مخروط‌های مامیلاری (Ning و همکاران، ۲۰۱۴)، اندازه بلور (Dunn و همکاران، ۲۰۱۲)، ایمنی (Mine، ۲۰۰۸)، وزن بدن و وزن تخم‌مرغ (Bvanendranv، ۱۹۶۷) می‌باشد. هم‌چنین ضخامت پوسته مؤثر بر جوجه‌درآوری شناخته شده و با توجه به ارتباط ژن اووالبومین با ضخامت پوسته، می‌تواند به‌طور غیر مستقیم نیز بر جوجه‌درآوری تأثیر بگذارد (Bing، ۲۰۱۴). در تحقیق حاضر نیز وزن تخم‌مرغ دارای ارتباط معنی‌داری با این ژن بود. این صفت با اکثر صفات کیفیت خارجی تخم‌مرغ ارتباط مثبت معنی‌دار خوبی به‌طور مستقیم و غیرمستقیم دارد و برای تعیین کیفیت پوسته مناسب می‌باشد. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و سایر تحقیقات بر روی ژن اووالبومین، جهش‌های بدمعنی باعث تغییر در ساختار و عملکرد پروتئین شده که هتروزایگوت‌های چنین چندشکلی‌هایی باعث تضعیف عملکرد موجود زنده می‌شود که به‌آسانی می‌توان افراد هتروزایگوت را با استفاده از روش انتخاب به‌کمک مارکر شناسایی و از جامعه حذف نمود. در این تحقیق نتیجه گرفته شد که ژن اووالبومین در نواحی مورد مطالعه دارای چندشکلی بالایی بود و ژن‌کاندید مهمی است که می‌تواند به‌عنوان نشانگری برای انتخاب به‌کمک مارکر برای بهبود کیفیت پوسته تخم‌مرغ به‌خصوص وزن تخم‌مرغ در برنامه‌های اصلاح نژادی مرغان بومی اصفهان مفید باشد.

به‌علت حضور اووالبومین در تمامی اجزاء تخم‌مرغ و بیان شدن آن در سرتاسر لوله تخم بر و مؤثر بودن آن در تمامی مراحل تشکیل و رشد جنین پیشنهاد می‌گردد که این ژن در رابطه با کیفیت دیگر اجزاء تخم‌مرغ و جوجه‌درآوری و معرفی آن به‌عنوان نشانگری پر اهمیت در روند انتخاب و اصلاح نژاد طیور بومی مورد بررسی قرار گیرد.



۲۵. **Obeidah, A.; Merat, P. and Duradn, L., 1977.** Polymorphism of egg white proteins egg weight and components weight in the Fayoumi hen. *Ann. Genet. Sel. anim.* Vol. 9, No. 3, pp: 301-306.
۲۶. **Panheleux, M.; Nys, Y.; Williams, J.; Gautron, J.; Boldicke, T. and Hincke, M.T., 2000.** Extraction and quantification by ELISA of eggshell organic matrix proteins (Ovocleidin-17, Ovalbumin, Ovotransferrin) in shell from young and old hens. *J. Poult. Sci.* Vol. 79, pp: 580-588.
۲۷. **Radwan, L.M.; Fati, M.M.; Gala, A. and Zein El-Dein, A., 2010.** Mechanical and ultrastructural properties of eggshell in two Egyptian native breeds of chicken. *Int. J. Poult. Sci.* Vol. 9, No. 1, pp: 77-81.
۲۸. **Sun, C.J.; Chen, S.R.; Xu, G.Y.; Liu, X.M. and Yang, N., 2012.** Global variation and uniformity of eggshell thickness for chicken eggs. *J. Poult. Sci.* Vol. 91, pp: 2718-2721.
۲۹. **Sun, C.; Qu, L.; Yi, G.; Yuan, J.; Duan, Z.; Shen, M.; Qu, L.; Xu, G.; Wang, K. and Yang, N., 2015.** Genome-wide association study revealed a promising region and candidate genes for eggshell quality in an F2 resource population. *BMC Genomics.* Vol. 16, pp: 565-579.
۳۰. **Vilki, J., 2007.** Application of genomic approaches in egg quality research. 18th European symposium on the quality of poultry meat and 12th European symposium on the quality of eggs and egg products. Prague, Czech Republic.
۳۱. **Zhang, Q.; Zhu, F.; Liu, L.; Zheng, C.W.; Wang, D.H.; Hou, Z.C. and Ning, Z.H., 2015.** Integrating transcriptome and genome re-sequencing data to identify key genes and mutations affecting chicken eggshell qualities. *PLoS ONE.* Vol. 10, No. 5, pp: 1-16.
- correlated with shell thickness and are associated with eggshell matrix protein markers. *Animal Genetics.* Vol. 43, No. 4, pp: 410-418.
۱۰. **Fan, Y.F.; Hou, Z.C.; Yi, G.Q.; Xu, G.Y. and Yang, N., 2013.** The sodium channel gene family is specifically expressed in hen uterus and associated with eggshell quality traits. *BMC Genetics.* Vol. 14, pp: 90-100.
۱۱. **Gautron, J. and Nys, Y., 2006.** Eggshell matrix proteins and natural defenses of the egg. *Symposium COA/INRA Scientific Cooperation in Agriculture, Tainan (Taiwan, R.O.C.).* pp: 159-165.
۱۲. **Gautron, J.; Mann, K.; Righetti, P.G.; Rehault Godbert, S.; Jonchere, V.; Herve Grepinet, V. and Nys, Y., 2009.** Functional genomics reveals numerous novel egg proteins. ۱۱th European Symposium on the Quality of Poultry Meat and 13th European Symposium on the Quality of Eggs and Eggs Products, Turku, Finland.
۱۳. **Goto, T.; Ishikawa, A.; Yoshida, M.; Goto, N.; 5, Umino, T.; Nishibori, M. and Tsudzuki, M., 2014.** Quantitative trait loci mapping for external egg traits in F2 chickens. *J. Poult. Sci.* Vol. 51, pp: 118-129.
۱۴. **Hincke, M.T.; Tsang, C.P.; Courtney, M.; Hill, V. and Narbaitz, R., 1995.** Purification and immunochemistry of a soluble matrix protein of the chicken eggshell (Ovocleidin17). *Calcified Tissue International.* Vol. 56, pp: 578-583.
۱۵. **Hincke, M.T. 1995.** Ovalbumin is a component of the chicken eggshell matrix. *Connect Tissue Res Journal.* Vol. 31, No.3, pp: 227-33.
۱۶. **Hou, Q.R.; Wang, J.Y.; Wang, H.H.; Li, Y.; Zhang, G.X. and Wei, Y., 2010.** Analysis of polymorphisms in exons of the LYZ gene and effect on growth traits of Jinghai yellow chicken. *Int. J. Poult. Sci.* Vol. 9, No. 4, pp: 357-362.
۱۷. **Huang, H.L.; Huang, L.T. and Cheng, Y.S., 2013.** A novel SNP marker of ovalbumin gene in association with duck hatchability. *Theriogenology.* Vol. 79, pp: 1218-1223.
۱۸. **Johari, S.; Ekasari, S. and Kurniant, E., 2013.** Genetic variation in three breeds of Indonesian local ducks based on blood and egg white protein polymorphism. *J. Indonesian trop. Anim. agric.* Vol. 38, No. 1, pp: 20-26.
۱۹. **Kinoshita, K.; Shimogiri, T.; Okamoto, S.; Kawabe, K.; Ishizuka, J.; Ibrahim, H.R. and Maeda, Y., 2003.** Identification of ovalbumin phenotypes of the Asian indigenous chicken populations using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Animal Science Journal.* Vol. 74, pp: 355-362.
۲۰. **Liu, Z.; Zheng, Q.; Zhang, X. and Lu, L., 2013.** Microarray analysis of genes involved with shell strength in layer shell gland at the early stage of active calcification. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* Vol. 26, No. 5, pp: 609-624.
۲۱. **Mahrous, M.Y.; Radwan, L.M. and El-Dlebhany, A.E., 2013.** Shell quality and ultrastructural characteristics of eggshell in the 15<sup>TH</sup> generation of chickens selected for egg production traits. *Egyptian J. Anim. Prod.* Vol. 50, No. 1, pp: 13-18.
۲۲. **Miksik, I.; Sedlakova, P.; Lacinova, K.; Pataridis, S. and Eckhardt, A., 2010.** Determination of insoluble avian eggshell matrix proteins. *Anal Bioanal Chem.* Vol. 397, pp: 205-214.
۲۳. **Mine, Y., 2008.** *Egg Bioscience and Biotechnology.* New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken. pp: 19-24.
۲۴. **Ning, Z.; Wang, D.; Liao, B.; Zhang, Q. and Gao, Y., 2014.** Polymorphisms of genes are associated with eggshell ultrastructural organization in pedigree Rhode Island White. *APPC, Jeju Island, South Korea.*

