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

- **مائده قنبریان‌بروجنی***: دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۱۵۷۳۹-۴۹۱۳۸
- **مجتبی آهنی‌آذری**: دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۱۵۷۳۹-۴۹۱۳۸
- **سعید حسنی**: دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۱۵۷۳۹-۴۹۱۳۸
- **محمدرضا عبادی**: بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات علوم کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، صندوق پستی: ۱۹۹-۸۱۷۸۵

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۵

چکیده

اووالبومین ازجمله پروتئین‌های فعال ماتریکس پوسته تخم مرغ است که بر روی کلسیفیکاسیون پوسته تخم‌مرغ مؤثر می‌باشد. تحقیق حاضر با هدف مطالعه ارتباط چندشکلی دو ناحیه از اگزون ۸ ژن اووالبومین واقع بر روی کروموزوم شماره ۲ با برخی از صفات کیفیت خارجی تخم‌مرغ به‌کمک تکنیک‌های RFLP و SSCP در مرغان بومی اصفهان انجام شد. در این پژوهش DNA ژنومی از خون به‌کمک کیت استاندارد استخراج و نواحی مورد نظر به‌روش PCR تکثیر شدند. چندشکلی یک ناحیه با طول ۱۹۹ جفت باز به‌کمک تکنیک‌های Mnl1-RFLP و SSCP و در ناحیه‌ای دیگر با طول ۴۰۷ جفت باز توسط تکنیک SSCP مورد بررسی قرارگرفتند. به‌منظور تعیین ژنوتیپ مرغان، الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید و رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده شد. برای قطعه اول ۲ ژنوتیپ (A1A1 و A1A2) با روش RFLP و ۳ ژنوتیپ (B1B1، B1B2 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 به‌ترتیب ۰/۳۳، ۰/۵۱ و ۰/۳۳ به‌دست آمد. در تجزیه و تحلیل داده‌ها هیچ‌کدام از صفات ارتباط معنی‌داری با قطعه ۱۹۹ جفت بازی نشان ندادند (P>۰/۰۵). وزن تخم‌مرغ دارای ارتباط معنی‌داری با قطعه ۴۰۷ جفت بازی بود (P<۰/۰۵) که ژنوتیپ C1C2 وزن سبک‌تری نسبت به دو ژنوتیپ دیگر داشت، اما ارتباط سایر صفات با این قطعه بی‌معنی بود (P>۰/۰۵). نتایج به‌دست 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 تخم‌مرغ، مرغ بومی اصفهان

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: ghanbariuanm@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

مهم‌ترین هدف در اصلاح نژادمرغان تخم‌گذار تولید تخم‌مرغ‌های با کیفیت است (Mahrous و همکاران، ۲۰۱۳). بهبود صفات کیفیتی تخم‌مرغ با انتخاب سنتی مشکل است، به‌دلیل این‌که اندازه‌گیری فنوتیپی آن‌ها دشوار یا وقت‌گیر 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 تخم‌مرغ را بالا ببرد(Vilkki، ۲۰۰۷). کیفیت پوسته تخم‌مرغ در صنعت طیور مهم و یکی از مشکلات عمده تولید تخم‌مرغ است (Fan و همکاران، ۲۰۱۳؛ Radwan و همکاران، ۲۰۱۰). خسارت ناشی از پوسته‌های آسیب‌دیده تخم‌مرغ‌ها، علت زیان اقتصادی قابل توجهی (حدود ۸ تا ۱۱ درصد از کل تولید) در صنعت تخم‌مرغ و یک تهدید برای سلامت انسان (با نفوذ آلودگی و پاتوژن‌ها به محتویات تخم مرغ) است (Fan و همکاران، ۲۰۱۳؛ Dunn و همکاران، ۲۰۱۲؛ Sun و همکاران، ۲۰۱۲). پوسته تخم‌مرغ یک ساختار بسیار منظم و متخلخل متشکل از مواد معدنی (۹۵ درصد کربنات کلسیم) مرتبط با ماتریکس آلی (شامل؛ پروتئین‌ها، گلیکوپروتئین‌ها و پروتئوگلیکان‌ها) است (Zhang و همکاران، ۲۰۱۵؛ Radwan و همکاران، ۲۰۱۰؛ Gautron و همکاران، ۲۰۰۹). پوسته تخم‌مرغ یک مانع محافظتی در برابر آسیب-های فیزیکی و نفوذ پاتوژن‌ها از محیط خارجی است، و از نظر بیولوژیکی تنظیم‌کننده مبادله آب و گازها به‌عنوان یک عضو تنفسی و هم‌چنین یک منبع کلسیم برای رسوب در استخوان برای جنین‌در حال رشدمی‌باشد(Sun و همکاران، ۲۰۱۵؛ Fan و همکاران، ۲۰۱۳؛ Gautron و Nys، ۲۰۰۶). ماتریکس آلی اگرچه مقدارش (به‌خصوص پروتئین‌های آن)، در لایه‌های کلسیفیه تنها۲تا ۳/۵ درصد است، از اهمیت زیادی برای رسوب یون‌های بی‌کربنات و کلسیم، و تأثیر در بافت، خواص بیومکانیکی و مقاومت پوسته تخم‌مرغ با کنترل بر روند رشد، شکل، اندازه و جهت‌گیری کریستال کلسیت برخوردار است (Liu و همکاران، ۲۰۱۳؛ Mine، ۲۰۰۸). در بخش محلول اسیدی ماتریکس، ۵۲۰ پروتئین (از جمله اووالبومین) شناخته شده‌اند (Liu و همکاران، ۲۰۱۳). اووالبومین یک گلیکوپروتئین با یک زنجیره منفرد کربوهیدرات متصل شده به آسپارژین ۲۹۳ است و متشکل از ۳۸۶ اسیدآمینه(Mine، ۲۰۰۸)و ازجمله پروتئین‌های فعال ماتریکس (بدون مراحل رسوب) است (Miksik و همکاران،۲۰۱۰) که ممکن است در تنظیم رشد کلسیت در طول کلسیفیکاسیون پوسته تخم‌مرغ درگیر باشد (Mine، ۲۰۰۸). به‌علاوه، کیفیت پوسته تخم‌مرغ با پیری مرغان تخم‌گذار کاهش می‌یابد (Sun و همکاران، ۲۰۱۵؛ پیرانی و همکاران، ۱۳۸۸). یک رابطه بین تغییرات در خواص مکانیکی پوسته تخم‌مرغ ناشی از پیری مرغ و سطح اجزای ماتریکس وجود دارد. این رابطه با مطالعات ارتباط ژنتیکی بین چندشکلی در ژن‌های کد کننده پروتئین‌های ماتریکس پوسته تخم‌مرغ و اندازه‌گیری کیفیت پوسته تخم‌مرغ تأیید شده است (Gautron و Nys، ۲۰۰۶). نتایج تحقیق Hincke(۱۹۹۵)نشان‌داد که اووالبومین در طول فاز اولیه شکل‌گیری پوسته حاضر است که در پروتئین‌های ماتریکس بدنه مامیلاری گنجانیده شده است. Hincke و همکاران (۱۹۹۵) بیان کردند که از پروتئین‌های موجود در لایه مامیلاری درونی پوسته، اووالبومین نشانگری در ارتباط با اندازه کریستال می‌باشد. Zhang و همکاران (۲۰۱۵) آزمایشی با هدف مطالعه چندشکلی‌های نوکلئوتیدی صفات سازمان فراساختاری پوسته تخم‌مرغ بر روی مرغ‌های لاین خالص سفیدرود آیلند انجام دادند که اووالبومین به‌طور قابل توجهی با ضخامت مؤثر و اندازه مخروط‌های مامیلاری مرتبط بود. هدف از انجام این تحقیق شناسایی چندشکلی موجود در دو ناحیه از اگزون ۸ ژن اووالبومین واقع بر کروموزوم شماره ۲ و ارتباط آن‌ها با صفات کیفیت پوسته تخم‌مرغ و نیز تعیین فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی برای این جایگاه‌های ژنی در مرغان بومی اصفهان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در سال ۱۳۹۴ بر روی مرغان مرکز تکثیر و اصلاح نژاد اصفهان انجام شد. این مرغان در شرایط کنترل شده سالن در قفس‌های انفرادی نگه‌داری می‌شدند. ابتد ۱۵۰ قطعه از این مرغان به‌طور تصادفی انتخاب و از هر مرغ دو نمونه تخم‌مرغ (Dunn و همکاران، ۲۰۰۸) در سن‌های ۶۰ و ۶۴ هفتگی به‌منظور 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 تخم‌مرغ‌ها اندازه‌گیری (Sun و همکاران، ۲۰۱۵) و میانگین آن‌ها برای بیان نمودن کیفیت پوسته تخم‌مرغ درنظر گرفته شد (Zhang و همکاران، ۲۰۱۵). هم‌چنین‌نمونه‌خون از ورید بال هر مرغ گرفته‌وداخل‌لوله‌های حاوی ماده ضدانعقاد خون EDTA (Ethylene diamine tetra acetic acid) جمع‌آوری (قره‌ویسی، ۱۳۹۱) و سپس در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا قبل از استخراج DNA ذخیره شد (Zhang و همکاران، ۲۰۱۵؛ قره‌ویسی، ۱۳۹۱).

اندازه‌گیری خصوصیات کیفیت پوسته تخم‌مرغ: اندازه‌گیری خصوصیات کیفیت پوسته تخم‌مرغ در بخش علوم دامی مرکز تحقیقات علوم کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان انجام شد. برای ارزیابی پارامترهای کیفیت پوسته تخم‌مرغ وزن تخم‌مرغ توسط

Archive of SID
www.SID.ir

ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد. برای محاسبه شاخص شکل ابعاد تخم‌مرغ (طول و عرض) توسط کولیس (Radwan و همکاران، ۲۰۱۰) با دقت میلی‌متر و سپس مقاومت پوسته به‌وسیله 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) به‌مدت ۴۸ ساعت خشک شد (Panheleux و همکاران، ۲۰۰۰)، سپس وزن آن‌ها توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم و ضخامت کل پوسته تخم‌مرغ در سه نقطه‌مختلف در قسمت وسط تخم‌مرغ (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.

$$\text{شاخص شکل تخم مرغ} = \frac{\text{عرض تخم مرغ}}{\text{طول تخم مرغ}} \qquad \text{درصد پوسته} = \frac{\text{وزن پوسته}}{\text{وزن تخم مرغ}} * ۱۰۰$$

استخراج DNA و واکنش زنجیره پلیمراز (PCR):

آزمایشات 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) به‌کمک کیت (شرکت سیناژن) استخراج و بعد از شست و شو با اتانول ۷۰ درصد (Huang و همکاران، ۲۰۱۳؛ قره‌ویسی 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 درصدکه با DNA Safe Stain رنگ‌آمیزی شده بود، با ولتاژ ۹۵ ولت به‌مدت ۱ ساعت انجام‌شد و بعد به‌وسیله لامپ UV رؤیت و عکس‌برداری شد (Huang و همکاران، ۲۰۱۳؛ قره ویسی و همکاران، ۱۳۹۱).

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	GAGTCATCACACTGAAAAATGC	۱۹۹
		برگشت	CAGGAACACAGAGAACAAGCA	
اووالبومین (اگزون ۸)	قطعه دوم از باز ۶۷۹۴۸۳۹۲ تا ۶۷۹۴۸۷۹۹	رفت	CAAACACATCGCAACCAACG	۴۰۷
		برگشت	CTGGAGCACCTTGGTCATACA	

جدول ۲: برنامه دمایی و زمانی به‌کار رفته شده در واکنش PCR برای هریک از نواحی ژنی

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

Archive of SID
www.SID.ir

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 ۱/۵-۰/۰ میکروگرم)، آب مقطر استریل ۱۸ میکرولیتر، بافر یونیورسال ۲ میکرولیتر و آنزیم Mnl1 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 به‌مدت ۴ ساعت انجام گرفت و سپس ژل برای مشاهده باندهای حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR به‌کمک نیترات نقره رنگ‌آمیزی شد. برای تجزیه محصولات PCR، به‌کمک روش (SSCP) ۳ میکرولیتر از هر یک از محصولات PCR (Huang و همکاران، ۲۰۱۳) به‌همراه ۱۳میکرولیتر بافر دناتوره کننده مخلوط گردید و تحت دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه قرار گرفته و سپس نمونه‌ها سریعاً برای ممانعت از اتصال مجدد رشته‌های مکمل به‌داخل یخ منتقل شدند. به‌منظور 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 به‌کمک رویه GLM نرم‌افزار SAS انجام شد.

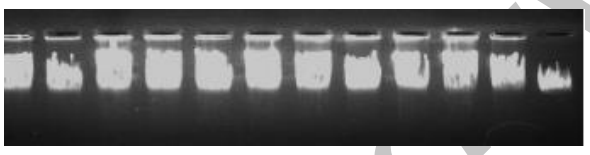
$$Y_{ijk} = \mu + h_i + G_j + e_{ijk}$$

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

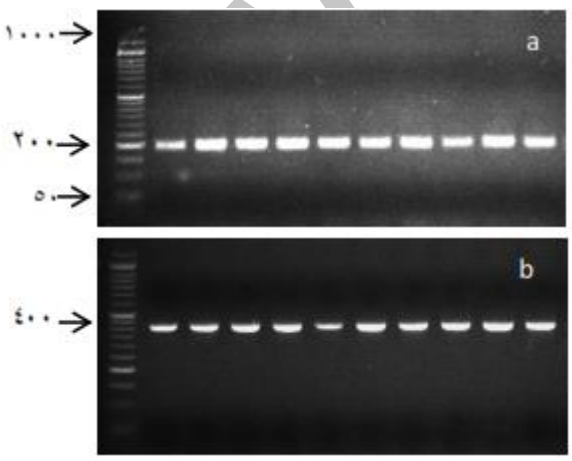
نتایج

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 به‌ترتیب ۱۹۹ و ۴۰۷ جفت باز بود (شکل ۲). هضم ناحیه ۱۹۹ جفت بازی توسط آنزیم محدودالاثر Mnl1، 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، به‌ترتیب ۳ الگوی ژنوتیپی (B_1B_1، B_1B_2، B_3B_3) و ۳ الگوی ژنوتیپی (C_1C_1، C_1C_2، C_2C_2) مشاهده شد (شکل ۳). فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی حاصل از RFLP و SSCP در جدول ۳ آورده شده که بیش‌ترین فراوانی‌های آللی به‌ترتیب متعلق به آلل‌های A_1، B_1، C_2 و بیش‌ترین فراوانی‌های ژنوتیپی به‌ترتیب 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 الل A و B با فراوانی‌های اللی ۰/۴۵ و ۰/۵۵، ۳ ژنوتیپ AA، AB و BB را با میانگین هتروزیگوسیته ۰/۴۹ مشاهده شد (Akinyemi و همکاران، ۲۰۱۴) و برای اردک‌های مگلانگ (Maglang)، تگال (Tegal) و موجوساری (Mojosari) ۲ الل A و B مشاهده شد که در هر سه نژاد فراوانی الل A بیش‌تر از B بود و میانگین هتروزیگوسیته به‌ترتیب ۰/۳۶، ۰/۴ و ۰/۴۹ گزارش شد (Johariوهمکاران، 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 هنده فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی قرار گرفته‌اند که ظاهراً انتخابی در مرغ‌های این جمعیت در جهت افزایش یا کاهش صفات فنوتیپی مورد نظر صورت گرفته است.

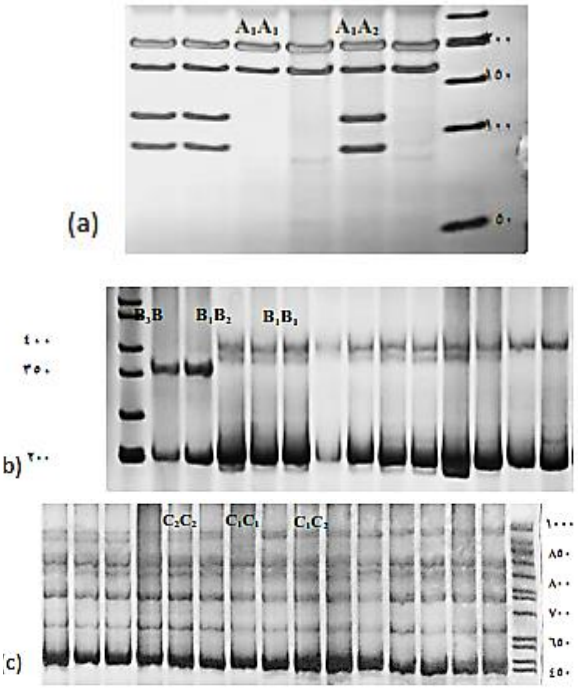


شکل ۱: کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از نمونه‌های خون



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

www.SID.ir



شکل ۳: الگوهای RFLP حاصل از هضم با آنزیم Mnl1 (a) و SSCP (b) محصولات PCR ناحیه ۱۹۹ جفت بازی و الگوهای SSCP محصولات PCR ناحیه ۴۰۷ جفت بازی (c)

مرغان مرکز تکثیر و اصلاح نژاد اصفهان در جهت بهبود صفات تولیدی و عملکردی به‌خصوص تعداد تخم‌مرغ، وزن تخم‌مرغ، سن بلوغ جنسی و وزن بدن (در ۱ روزگی، ۸ هفتگی، ۱۲ هفتگی و هنگام بلوغ جنسی) تحت انتخاب و جفت‌گیری غیرتصادفی بوده‌اند. انتخاب وجفت‌گیری غیرتصادفی از عوامل تغییردهنده‌تعادل‌هاردی- واینبرگ در جمعیت می‌باشند. با توجه به تحقیق امام‌قلی‌بگلی و همکاران (۱۳۸۹) بر روی مرغان بومی یزد، صفات تخم‌مرغ با صفات عملکردی و تولیدی مذکور دارای ارتباط می‌باشند که در نهایت می‌توان چنین بیان کرد که انتخاب برای بهبود صفات مذکور در مرغان بومی اصفهان تغییر در فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی در رابطه با سایر صفات (صفات کیفیت تخم‌مرغ) را به‌همراه داشته که در تحقیق حاضر شاهد عدم تعادل هاردی- واینبرگ برای ناحیه ۱۹۹ جفت بازی بودیم.

همان‌طور که نتایج مقایسه میانگین‌های صفات کیفیت خارجی تخم‌مرغ در جدول ۴ نشان می‌دهد، اثر ژنوتیپ‌های حاصل از دو روش RFLP و SSSP ناحیه ۱۹۹ جفت بازی بر تمام صفات مورد بررسی بی‌معنی بود. اثر ژنوتیپ‌های SSCP ناحیه ۴۰۷ جفت بازی تنها بر صفت وزن تخم‌مرغ معنی‌دار بود که ژنوتیپ C_1C_2 با میانگین ۵۹/۵۴±۰/۶۷ گرم به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) از ژنوتیپ‌های C_1C_1 و C_2C_2 سبک‌تر بود.

جدول ۳: فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی دو روش RFLP و SSCP

ژن	ژنوتیپ	فراوانی ژنوتیپ	آلل	فراوانی آللی	X^2	میانگین هتروزیگوسیته
Mnl1-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		
SSSP 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		
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				

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

میانگین صفات خارجی تخم‌مرغ به‌همراه اثر نوبت جوجه‌کشی در جدول ۵ آورده شده است. در مقایسه با تحقیق صورت گرفته توسط صالحی‌نسب (۱۳۹۱) بر روی مرغان بومی اصفهان در سن ۲۸ تا ۳۲ هفتگی میانگین وزن تخم‌مرغ و پوسته آن (به‌ترتیب ۵۴/۶ و ۵/۰۰ گرم)، طول و عرض تخم‌مرغ (به‌ترتیب ۵/۴۲ و ۴/۲۲سانتی‌متر)، شاخص‌شکل‌تخم‌مرغ (۰/۷۷)، مقاومت پوسته‌تخم‌مرغ(۳/۴۴کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع) و ضخامت آن (۰/۳۸ میلی‌متر) گزارش شد که در این تحقیق وزن تخم‌مرغ سنگین‌تر و مقاومت پوسته کم‌تر بود. از دلایل عمده آن می‌تواند سن بالاتر مرغان در تحقیق حاضر باشد. باید درنظر گرفت شود که با افزایش سن مرغ، اندازه (طول و عرض) و وزن تخم‌مرغ آن افزایش و ضخامت پوسته بدون تغییر باقی خواهد ماند اما مقاومت آن کاهش می‌یابد که دلیل آن می‌تواند 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 (۹۴±۵۷۷ در مقابل ۲۸±۲۹۳ میلی‌گرم/گرم پروتئین، $P=0/012$) در پوسته تخم‌مرغ‌های مرغان

Archive of SID
www.SID.ir

پیرتر نسبت به جوان‌ها بوده است (Panheleux و همکاران، ۲۰۰۰) هم‌چنین غلظت اووالبومین در عصاره پوسته جمع‌آوری شده در مرغان جوان زمانی‌که مقاومت پوسته‌بالاتر می‌باشد، پایین‌تر است (Gautron و Nys، ۲۰۰۶). اثر نوبت جوجه‌کشی در تحقیق صورت گرفته توسط صالحی‌نسب (۱۳۹۱) در مورد صفات وزن، طول، عرض، شاخص شکل تخم‌مرغ و وزن پوسته تخم‌مرغ معنی‌دار گزارش شد. ولی در تحقیق حاضر تنها در مورد صفات طول تخم‌مرغ، وزن و ضخامت پوسته تخم مرغ معنی‌دار بود.

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

صفات کیفیت خارجی تخم‌مرغ	ژنوتیپ ها							
	Mnl1-RFLP اووالبومین (۱۹۹ جفت بازی)		SSSP اووالبومین (۱۹۹ جفت بازی)			SSCP اووالبومین (۴۰۷ جفت بازی)		
	A_1A_1	A_1A_2	B_1B_1	B_1B_2	B_2B_2	C_1C_1	C_1C_2	C_2C_2
وزن تخم مرغ (گرم)	۶۰/۹۳±۰/۴۹	۶۱/۳۹±۰/۵۶	۵۹/۹۶±۱/۲۸	۶۱/۲۳±۰/۳۸	۶۰/۹±۳/۱۴	۶۳/۳۹±۱/۳۸	۵۹/۵۴±۰/۶۷	۶۱/۵۹±۰/۴۴
طول تخم مرغ (سانتی‌متر)	۵/۷۱±۰/۰۲	۵/۶۹±۰/۰۳	۵/۶۴±۰/۰۶	۵/۷۱±۰/۰۲	۵/۵۷±۰/۱۶	۵/۷۵±۰/۰۷	۵/۶۵±۰/۰۳	۵/۷۲±۰/۰۲
عرض تخم مرغ (سانتی‌متر)	۴/۳۷±۰/۰۱	۴/۳۹±۰/۰۲	۴/۳۸±۰/۰۴	۴/۳۸±۰/۰۱	۴/۴۸±۰/۰۹	۴/۴۲±۰/۰۴	۴/۳۵±۰/۰۲	۴/۳۹±۰/۰۱
شاخص شکل تخم‌مرغ	۰/۷۷±۰/۰۰۳	۰/۷۷±۰/۰۰۴	۰/۷۸±۰/۰۱	۰/۷۷±۰/۰۰۳	۰/۸۱±۰/۰۲	۰/۷۷±۰/۰۱	۰/۷۷±۰/۰۰۴	۰/۷۷±۰/۰۰۳
مقاومت پوسته (کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع)	۲/۲۱±۰/۰۸	۲/۲±۰/۰۹	۲/۱۷±۰/۲۱	۲/۲۱±۰/۰۶	۱/۶۳±۰/۵۱	۲/۲±۰/۲۳	۲/۱۴±۰/۱۱	۲/۲۲±۰/۰۷
وزن پوسته (گرم)	۵/۲۷±۰/۰۵	۵/۲۹±۰/۰۶	۵/۰۴±۰/۱۴	۵/۴±۰/۰۴	۴/۷۹±۰/۳۵	۵/۳۶±۰/۱۶	۵/۱۴±۰/۰۸	۵/۳۲±۰/۰۵
ضخامت پوسته (میلی‌متر)	۰/۳۷±۰/۰۰۲	۰/۳۹±۰/۰۰۳	۰/۳۸±۰/۰۱	۰/۳۹±۰/۰۰۲	۰/۳۵±۰/۰۹	۰/۳۹±۰/۰۱	۰/۳۸±۰/۰۰۴	۰/۳۹±۰/۰۰۲
درصد پوسته	۸/۸۵±۰/۰۸	۸/۵۷±۰/۰۹	۸/۴۹±۰/۲۱	۸/۵۹±۰/۰۶	۷/۵±۰/۱۵	۸/۵۵±۰/۲۳	۸/۴۶±۰/۱۱	۸/۶۱±۰/۰۷

- مقایسه میانگن‌ها به‌روش توکی با دقت ۵ درصد انجام شد.

جدول ۵: میانگین صفات خارجی تخم‌مرغ به‌همراه اثر ثابت نوبت جوجه‌کشی بر آن‌ها

صفات کیفیت خارجی تخم‌مرغ	وزن تخم‌مرغ (گرم)	طول تخم‌مرغ (سانتی‌متر)	عرض تخم‌مرغ (سانتی‌متر)	شاخص شکل تخم‌مرغ	مقاومت پوسته (کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع)	وزن پوسته (گرم)	ضخامت پوسته (میلی‌متر)	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 تغیرات	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 معنی‌داری: ns (بی‌معنی)، * ($P<0/05$)، ** ($P<0/01$).

بحث

نتایج میانگین‌های حداقل مربعات ژنوتیپ‌های حاصل‌ازروش‌های RFLP و SSSP ناحیه ۱۹۹ جفت بازی برای تمام صفات کیفیت خارجی تخم‌مرغ تفاوت معنی‌داری 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 ژنوتیپ‌های هتروزیگوت مطلوبیت کم‌تر فنوتیپی شامل پوسته نازک‌تر، مقاومت کم‌تر و تغییر شکل بیش‌تر نشان دادند. Bing (۲۰۱۴) نیز ارتباطی بین ژن اووالبومین و ضخامت پوسته تخم‌مرغ یافت. Dunn و همکاران (۲۰۱۱) نشانگر اووالبومین را مرتبط با اندازه کریستال در پوسته تخم‌مرغ مرغان رود آیلند قرمز دانستند که در بررسی آن‌ها ۳ الگوی ژنوتیپی مشاهده شد که الگوی شماره ۲ دارای کریستال‌های کوچک‌تری نسبت به دو الگوی دیگر بود. در تحقیق حاضر، در بررسی صفات ضخامت و مقاومت هیچ ارتباط معنی‌داری 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) می‌باشد. دلیل عمده آن می‌تواند متفاوت بودن سطح بیان ژن اووالبومین در سنین مختلف باشد که می‌توان نتیجه گرفت این ژن بر روی کیفیت این صفات در سنین پایین‌تر مؤثرتر می‌باشد تادر سنین بالاتر. در این تحقیق، اثر ژنوتیپ‌های حاصل از SSCP ناحیه ۴۰۷ جفت بازی تنها بر صفت وزن تخم‌مرغ معنی‌دار بود که ژنوتیپ C_1C_2 با میانگین ۵۹/۵۴±۰/۶۷ گرم به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) از ژنوتیپ‌های C_1C_1 و C_2C_2 سبک‌تر بود. Bvanendranv (۱۹۶۷) گزارش کرد که ژن اووالبومین با ۳ ژنوتیپ AA، AB و BB دارای ارتباط با وزن تخم‌مرغ بود که ژنوتیپ AA تخم‌مرغ‌های سنگین‌تری نسبت به دیگر ژنوتیپ‌ها داشت که در موافقت با این تحقیق می‌باشد. ولی در تحقیق صورت گرفته توسط

www.SID.ir

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<۰/۰۵) 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 هینداری یک جهش نقطه‌ای آسپارژین با آسپارتیک اسید در موقعیت ۸۰۳۲ در منطقه اگزون ۸ بین الل‌های OV^A و OV^B 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)،وزن‌بدن‌ووزن تخم‌مرغ(Bvanendranv، ۱۹۶۷) می‌باشد. هم‌چنین ضخامت پوسته مؤثر بر جوجه‌درآوری شناخته شده و باتوجه 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 هتروزیگوت‌های چنین چندشکلی‌هایی باعث تضعیف عملکرد موجود زنده می‌شود که به‌آسانی می‌توان افراد هتروزیگوت 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 ژن کاندید مهمی است که می‌تواند به‌عنوان نشانگری برای انتخاب به کمک 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.

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 به‌خصوص 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 به‌عمل 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

Archive of SID
www.SID.ir

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. **Vilkki, 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. ۱۹th 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-Dlebshany, A.E., 2013.** Shell quality and ultrastructural characteristics of eggshell in the 15TH 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.

Archive of SID

www.SID.ir