Sari Agriculture Sciences and Natural Resources University

Research on Animal Production, Vol. 17, Issue 2, 2026 p: 158-166

OPEN ACCESS

Research Paper

Determining the Most Appropriate Time to Determine the Sex of Iranian Native Chicken Embryos Using Micro-Raman Spectroscopy

Sepideh Rostami[1], Mohammad Taghi Beigi Nassiri[2], Mahmood Nazari[3] and Mohsen Cheraghizadeh[4]

1- Ph.D. Graduate of Animal Genetics and Breeding, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Iran
2- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran, (Corresponding author: mt_nassiri@yahoo.com)
3- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran
4- Assistant Professor, Advanced Surface Engineering and Nano Materials Research Center, Department of Electrical Engineering, Ahvaz Branch, IAU, Ahvaz, Iran

Received: 11 November, 2025 Revised: 28 January, 2026 Accepted: 09 February, 2026

Extended Abstract

Background: Currently, the sex of poultry based on physical differences between males and females is determined by skilled technicians. This requires skilled labor and is time-consuming. Raman spectroscopy is an analytical technique that relies on light scattering and the vibrational effects of molecules. It is recognized as a non-destructive tool for analyzing chemical structures and identifying various substances. This method was first discovered by the Indian physicist Chandra Sekhar Venkata Raman in 1930, for which he was awarded the Nobel Prize. In this technique, samples are excited using a laser, and the light that is scattered from them provides valuable information about their structures and biochemical properties. One significant application of Raman spectroscopy is in determining the sex of chicks in eggs. Due to biochemical differences between the cells of male and female birds, this technique can help identify the gender of eggs through blood cell analysis. This is particularly important in the poultry industry because chicks of the unwanted sex are usually killed after hatching, and employing Raman spectroscopy can help reduce this economic and ethical waste. As chick embryos develop, their blood composition undergoes significant changes, starting from the initial production of red blood cells to the full development of their circulatory system. Consequently, this study was conducted to determine the optimal time for identifying the sex of Iranian native chicken embryos through blood analysis using micro-Raman spectroscopy.

Methods: Fertilized eggs were incubated at a temperature of 37.8 °C and 53% humidity to facilitate embryonic development. Embryos at different ages—3.5, 5, 8, and 13 days—were evaluated separately using a UniRAM Microraman spectrometer with a wavelength of 785 nm. To visualize the embryonic vessels, a specialized camera system was developed that automatically identified the relevant vessel and focused the laser beam on it. The spectra obtained from the Raman spectrometer were plotted and analyzed using Origin software, with key indicators (such as the intensity of Raman peaks and the intensity ratio of dominant peaks) being utilized for analysis. Among the main indicators used to analyze the Raman spectrum were the intensity of Raman peaks and the intensity ratio of dominant peaks. To confirm the gender of the embryos after completing the analysis process, they were removed from the eggs, and the DNA extraction process was carried out using the Animal Tissue DNA Isolation kit manufactured by Denazist. The quantity and quality of the extracted DNA were assessed using a NanoDrop device (Thermo Scientific NanoDroP 2000C, USA) and gel electrophoresis. The CHD gene was employed as a sex-determining marker, for which specific primers were designed. The polymerase chain reaction (PCR) was conducted to determine the sex of the samples using these primers, and the results were observed on a 2.5% agarose gel.

Results: The results of this study revealed significant differences in the average fluorescence intensity between male and female eggs, although there was considerable overlap. One of the charts examined in this research was the candlestick chart, which shows how the dominant peaks are distributed on different days of incubation for the tested eggs. In addition, this chart shows the statistical distribution of the data, which includes information about the central indicators.

Copyright ©2026. Rostami et al. Published by Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License, which allows users to read, copy, distribute, and make derivative works for non-commercial purposes from the material, as long as the author of the original work is cited properly.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-17]

[DOI: 10.61882/rap.2026.1527]

Finally, this chart also provided a statistical distribution of the data, highlighting central indices. The most pronounced difference in fluorescence intensity was observed on day 3.5 of incubation, where the fluorescence spectra of male and female blood exhibited distinct shapes. After day 4, the fluorescence intensity remained higher in male chicks; however, the spectral shape diminished rapidly and was completely lost by day 5. These variations can be attributed to differences in the production of red blood cells and hemoglobin between the sexes, as well as the influence of sex chromosomes on the gonadal structure. The difference in hemoglobin levels is related to the difference in the oxygen saturation of the blood of males and females, so that male blood is likely to have a higher oxygen affinity than female blood. Male chickens possess ZZ chromosomes, while female chickens have ZW chromosomes. This genetic distinction leads to differences in physiological and biochemical characteristics, as well as variations in the gonadal structure. Male chickens have ZZ chromosomes and female chickens have ZW chromosomes. This difference in the genetic structure leads to differences in physiological and biochemical characteristics and differentiation in the structure of the gonads. PCR was used to confirm the Raman spectroscopy results. The results of agarose gel electrophoresis showed two bands with lengths of 461 and 322 base pairs for female embryos (ZW) and one fragment with a length of 461 base pairs for male embryos (ZZ).

Conclusion: According to the findings of this study, day 3.5 of incubation was identified as the optimal time for determining the gender of native chicken embryos using micro-Raman spectroscopy. This method boasts several advantages, including high accuracy and a short analysis time, which are essential for developing industrial systems aimed at sexing eggs. By combining advanced techniques from Raman spectroscopy with genetic analysis, this approach allows for effective gender determination of chickens in the early stages of hatching, making it particularly beneficial for the poultry industry.

Keywords: Sex determination, Chicken embryo, Raman spectroscopy

How to Cite This Article: Rostami, S., Beigi Nassiri, M T., Nazari, M., & Cheraghizadeh, M. (2026) Determining the Most Appropriate Time to Determine the Sex of Iranian Native Chicken Embryos Using Micro-Raman Spectroscopy. *Res Anim Prod,* 17(2), 158-166. DOI: 10.61882/rap.2026.1527

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-17]

[DOI: 10.61882/rap.2026.1527]

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

مقاله پژوهشی

تعیین مناسب‌ترین زمان برای تعیین جنسیت جنین مرغ بومی ایران با استفاده از طیف‌سنجی میکرو-رامان

سپیده رستمی[۱]، محمدتقی بیگی نصیری[۲]، محمود نظری[۳] و محسن چراغی‌زاده[۴]

۱- دانش‌آموخته دکتری ژنتیک و اصلاح دام و طیور، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران
۲- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران، (نویسنده مسوول: mt_nassiri@yahoo.com)
۳- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران
۴- استادیار، مرکز تحقیقات مهندسی سطح پیشرفته و نانو مواد، گروه مهندسی برق، دانشگاه آزاد واحد اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۸/۲۰ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۴/۱۱/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۲۰
صفحه: ۱۵۸تا ۱۶۶

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: در حال حاضر، تعیین جنسیت طیور بر اساس تفاوت‌های ظاهری نر و ماده توسط تکنسین‌های ماهر انجام می‌شود. این موضوع نیازمند نیروی ماهر است که سبب اتلاف وقت نیز می‌شود. طیف‌سنجی رامان یک تکنیک تحلیلی است که بر اساس پراکندگی نور و اثرات ارتعاشی مولکول‌ها عمل می‌کند و به‌عنوان ابزاری غیر مخرب برای تحلیل ساختار شیمیایی و شناسایی مواد مختلف شناخته شده است. این روش برای اولین بار توسط فیزیکدان هندی، چاندرا سخار ونکتا رامان، در سال ۱۹۳۰ کشف شد و به‌خاطر این دستاورد جایزه نوبل را دریافت کرد. در این روش، نمونه‌ها با استفاده از لیزر تحریک می‌شوند و نور پراکنده شده از آن‌ها اطلاعاتی را در باره ساختار و ویژگی‌های بیوشیمیایی آن‌ها ارائه می‌دهد. یکی از کاربردهای مهم طیف‌سنجی رامان، تعیین جنسیت جنین جوجه‌ها در تخم‌مرغ است. با توجه به تفاوت‌های بیوشیمیایی میان سلول‌های پرندگان نر و ماده، این تکنیک می‌تواند به شناسایی جنسیت تخم‌مرغ‌ها بر اساس تجزیه و تحلیل سلول‌های خون کمک کند. این موضوع به‌ویژه در صنعت طیور اهمیت دارد، زیرا جوجه‌های با جنسیت ناخواسته معمولاً پس از جوجه‌ریزی کشته می‌شوند و استفاده از طیف‌سنجی رامان می‌تواند به کاهش این ضایعات اقتصادی و اخلاقی کمک کند. ترکیبات خون جنین جوجه با گذشت زمان، از تولید اولیه گلبول‌های قرمز تا توسعه کامل سیستم خونی تغییرات قابل توجهی را تجربه می‌کند. لذا، این مطالعه برای تعیین مناسب‌ترین زمان برای تعیین جنسیت جنین مرغ بومی ایران از طریق آنالیز خون با استفاده از طیف‌سنجی میکرو رامان UniRAM اجرا شد.

مواد و روش‌ها: تخم مرغ‌های بارور به‌منظور طی‌کردن مراحل جنینی به دستگاه جوجه‌کشی در دمای ۳۷/۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۵۳ درصد درون دستگاه جوجه‌کشی قرار داده شدند. جنین‌ها در سنین ۳/۵، ۵، ۸ و ۱۳ روزگی به‌طور جداگانه با استفاده از دستگاه طیف‌سنجی میکرو-رامان UniRAM با طول موج ۷۸۵ نانومتر تحت ارزیابی قرار گرفتند. به‌منظور نمایش رگ‌های جنینی، یک سیستم دوربین توسعه یافته است که به‌طور خودکار رگ مناسب را شناسایی و تمرکز پرتو لیزر را روی آن متمرکز می‌کند. طیف‌های به‌دست‌آمده از طیف‌سنج رامان با استفاده از نرم‌افزار Origin رسم شدند و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. از جمله شاخص‌های اصلی مورد استفاده برای تجزیه و تحلیل طیف رامان، شدت پیک‌های رامانی و نسبت شدت پیک‌های غالب بودند. پس از اتمام مراحل آنالیز، به‌منظور تأیید جنسیت جنین‌ها، آن‌ها از تخم‌مرغ خارج شدند و فرآیند استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج Animal Tissue DNA Isolation ساخت شرکت دنازیست انجام شد. سپس کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ (مدل Thermo Scientific NanoDROP. 2000C، کشور آمریکا) و الکتروفورز ژل مورد بررسی قرار گرفتند. ژن اتصال DNA، کروموبوکس هلیکاز 1 (CHD) به‌عنوان ژن تعیین جنسیت استفاده شد و آغازگرهای اختصاصی برای آن طراحی شدند. به‌منظور تعیین جنسیت نمونه‌ها با استفاده از آغازگرهای طراحی‌شده، ابتدا واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) انجام گرفت و در نهایت نتیجه آزمایش روی ژل آگارز دو و نیم درصد مشاهده شد.

یافته‌ها: طبق نتایج این مطالعه، تفاوت‌های معنی‌داری در میانگین شدت فلورسانس بین جنس‌های نر و ماده تخم‌مرغ‌ها مشاهده شدند، هر چند که همپوشانی زیادی وجود داشت. یکی از نمودارهای مورد بررسی در این پژوهش نمودار شمعی بود؛ این نمودار نشان می‌دهد که چگونه پیک‌های غالب در روزهای مختلف جوجه‌کشی برای تخم‌مرغ‌های مورد آزمایش توزیع شده‌اند. همچنین، این نمودار توزیع آماری داده‌ها را نشان می‌دهد که اطلاعاتی در مورد شاخص‌های مرکزی را در بر دارد. در نهایت، بیشترین تفاوت شدت فلورسانس در روز ۳/۵ جوجه‌کشی ثبت شد، جایی‌که طیف فلورسانس خون نر و ماده شکل‌های متمایزی را نشان داد. پس از روز ۴ جوجه‌کشی، شدت فلورسانس در جوجه‌های نر بیشتر باقی ماند، اما شکل طیفی به‌سرعت کاهش یافت و تا روز ۵ به‌طور کامل از بین رفت. این تفاوت‌ها به‌دلیل تفاوت در تولید گلبول‌های قرمز و هموگلوبین متفاوت بین دو جنس و تأثیر کروموزوم‌های جنسی بر ساختار گنادها هستند. تفاوت در مقدار هموگلوبین به تفاوت در اشباع اکسیژن خون نرها و ماده‌ها مرتبط است، به‌طوری که خون نر احتمالاً دارای میل اکسیژن بیشتری نسبت به خون ماده است. جوجه‌های نر دارای کروموزوم‌های ZZ و جوجه‌های ماده دارای کروموزوم‌های ZW هستند که این تفاوت در ساختار ژنتیکی منجربه تمایز در ویژگی‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی و تمایز در ساختار گنادها می‌شود. برای تایید نتایج تعیین جنسیت توسط طیف‌سنجی میکرورامان از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد. نتایج الکتروفورز ژل آگاروز، دو باند با طول‌های ۴۶۱ و ۳۲۲ جفت‌باز را برای جنین‌های با جنسیت ماده (ZW) و یک قطعه به طول ۴۶۱ جفت‌باز را برای جنین‌های با جنسیت نر (ZZ) نشان دادند.

نتیجه‌گیری: با توجه به بررسی‌های انجام شده در این مطالعه، روز ۳/۵ انکوباسیون به‌عنوان مناسب‌ترین زمان برای تعیین جنسیت جنین مرغ بومی با استفاده از طیف‌سنجی میکرو رامان شناخته شد. از جمله مزایای روش‌های طیف‌سنجی و فلورسانس شامل دقت زیاد و زمان تحلیل کوتاه هستند که می‌توانند به توسعه سیستم‌های صنعتی برای تعیین جنسیت تخم‌مرغ‌ها کمک کنند. این روش ترکیبی از تکنیک‌های پیشرفته طیف‌سنجی رامان و تجزیه و تحلیل ژنتیکی برای تعیین جنسیت جوجه‌ها در مراحل اولیه جوجه‌کشی را ارائه می‌دهد که می‌تواند به‌طور مؤثری در صنعت طیور مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: تعیین جنسیت، جنین مرغ، طیف‌سنجی رامان

مقدمه

سال‌های زیادی از ارائه و توسعه طیف‌سنجی رامان می‌گذرد که برای اولین‌بار با استفاده از اثرات ارتعاشی این روش روی مایعات با منشاء آلی انجام شد. رامان فیزیک‌دان هندی در سال ۱۹۳۰ مفتخر به برنده‌شدن جایزه نوبل برای این کشف مهم شد (Bogliolo *et al*., 2020).

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-17]

[DOI: 10.61882/rap.2026.1527]

در روش طیف‌سنجی رامان، تحریک نمونه توسط لیزر با طول موج‌های مختلف انجام می‌گیرد و توسط فیبر نوری به میکروسکوپ متصل می‌شود. از لیزر به‌عنوان منبع نور استفاده می‌شود و با استفاده از تجهیزات و عناصر نوری مناسب، نور لیزر روی ناحیه خاصی از نمونه متمرکز می‌شود و در نهایت فوتون‌های پراکنده از نمونه مورد بررسی قرار می‌گیرند. در واقع، فوتون‌های پراکنده‌شده از نمونه که انرژی کمتر یا بیشتر از انرژی فوتون‌های فرودی دارند، حاوی اطلاعات طیفی در مورد سطوح انرژی ارتعاشی مواد در ناحیه مورد بررسی هستند، به‌طوری که هر نوع ماده دارای سیگنال طیفی مشخص، منحصربه‌فرد و متفاوت از سایر مواد است (Nadgaran & Kazempourfard, 2021). به بیان دیگر، می‌توان گفت که هر ترکیب اتمی و مولکولی دارای یک الگوی (طیف) رامان متمایز و منحصربه‌خود است و اغلب به‌عنوان اثر انگشت مولکولی شناخته می‌شود. از آن‌جایی که ترکیب بیوشیمیایی سلول‌های پرندگان ماده و پرندگان نر اندکی اما به‌طور قابل توجهی متفاوت است، طیف‌سنجی رامان امکان شناسایی جنسیت در تخم‌مرغ را براساس طیف سلول‌های ژرمینال یا خون فراهم می‌کند (Galli *et al*., 2017).

قابل توجه است که جوجه‌های نر در تخم‌گذاری نقشی ندارند و از نظر اقتصادی غیر قابل دوام هستند. در نتیجه، تقریباً هفت میلیارد جوجه نر سالانه در سرتاسر جهان مدت کوتاهی پس از جوجه‌ریزی کشته می‌شوند که هم ضررهای اقتصادی و هم نگرانی‌های قابل توجهی را برای رفاه حیوانات ایجاد می‌کند. تشدید این موضوع چالش تعیین جنسیت جوجه‌ها است، زیرا آن‌ها فاقد اندام تولیدمثلی خارجی هستند و شناسایی بصری آن‌ها را دشوار می‌کند. در حال حاضر، تعیین جنسیت آن‌ها به بازرسی دستی، ارزیابی شکل بال و وجود برجستگی‌های مقعدی بستگی دارد، که به نیروی‌کار ماهر و مستعد ناکارآمدی نیاز دارد. در عصری که با پیشرفت‌های سریع در هوش مصنوعی در سراسر صنایع مشخص شده است، برای صنعت طیور ضروری است که فرآیند جنسیت جنین‌های اولیه مرغ در تخم‌مرغ را خودکار کند. توسعه چنین فناوری بسیار مهمی است که با روند افزایش اتوماسیون و خودمختاری در صنایع مدرن هماهنگ است (Biederman & Shiffrar, 1987).

با این وجود، طیف‌سنج رامان ابزار قدرتمندی است که انتظار می‌رود تا تعیین جنسیت جوجه را متحول کند زیرا می‌تواند اطلاعاتی را در مورد مولکول‌های بیولوژیک مانند پروتئین‌ها، لیپیدها، ساکاریدها و DNA/RNA به روشی غیر مخرب و غیر تهاجمی ارائه دهد (Sato *et al*., 2023). بنابراین، طیف‌سنجی رامان برای تجزیه و تحلیل موجودات زنده مناسب است که منجر به پذیرش گسترده آن در کاربردهای مختلف بیولوژیکی و پزشکی می‌شود (Ishigaki *et al*., 2022). پژوهش‌های زیادی به‌منظور استفاده از طیف‌سنج رامان در تعیین جنسیت انجام شده‌اند. در این زمینه، سوزا و همکاران (Souza *et al*., 2022) به بررسی طیف‌سنج رامان به‌عنوان ابزاری برای تعیین جنسیت اثر انگشت مرد و زن و کاربرد آن در پزشکی قانونی پرداختند.

ماتسوما و همکاران (Matsumoto *et al*., 2024) نشان دادند که اساس تشخیص جنسیت جنین جوجه در تشخیص درجه اشباع اکسیژن نهفته است، به‌طوری که خون نر احتمالاً دارای میل اکسیژن بالاتری نسبت به خون ماده است. سیکیژیتسکایا و همکاران (Sikirzhytskaya *et al*., 2017) با تشخیص ناهمگنی لکه‌های خونی در دو جنس مختلف از طیف‌سنج رامان به‌عنوان ابزاری برای تعیین جنسیت استفاده کردند. در مطالعه‌ای که توسط گالی و همکاران (Galli *et al*., 2017) انجام شد، از مطالعات طیف‌سنجی رامان برای یافتن تفاوت در سلول‌های خونی هسته‌دار استفاده شد.

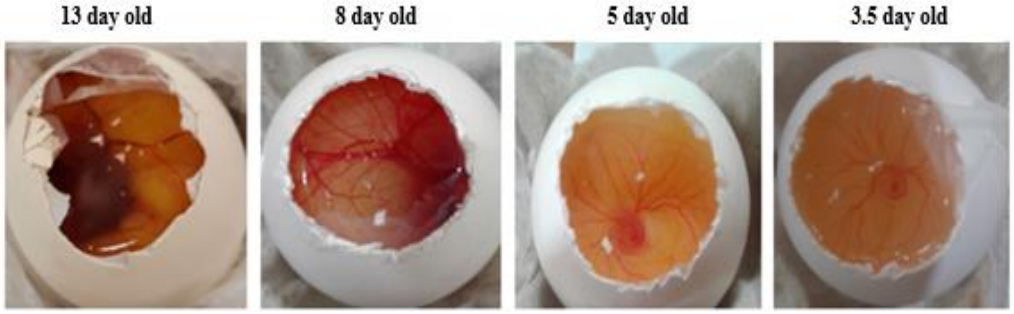
تشخیص رگ‌های خونی به‌منظور شناسایی جنسیت می‌تواند جنسیت تخم‌ها را در مرحله اولیه جوجه‌کشی تشخیص دهد. طبقه‌بندی خواص سلولی توسط طیف‌سنجی نوری بر اساس ترکیب بیوشیمیایی امکان‌پذیر است و جنسیت ممکن است به‌صورت طیف‌سنجی از تفاوت‌های ژنتیکی و متابولیکی بازیابی شود. در اکثر حیوانات از جمله پرندگان، اطلاعات جنسی به‌صورت ژنتیکی رمزگذاری شده است. به‌عنوان مثال، سلول‌های جوجه‌های نر دارای کروموزوم‌های بزرگ‌تر هستند، که امکان تعیین جنسیت توسط طیف‌سنجی نوری بر اساس مقادیر مختلف DNA را فراهم می‌کند (Göhler *et al*., 2017). در پرندگان، نمونه‌های شناخته شده ژن اتصال DNA، کروموبوکس هلیکاز (CHD) است که در انتهای بازوی کوتاه کروموزوم W قرار دارد. ژن‌های CHD-W و CHD-Z حاوی اینترون‌هایی با طول‌های مختلف هستند و با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تقویت می‌شوند. گزارش‌ها در مورد روش‌های تعیین جنسیت مبتنی‌بر PCR و نشانگرهای مرتبط با جنسیت در گونه‌های پرندگان به‌طور پیوسته در حال افزایش هستند. تلاش مستمر در تکنیک‌های تعیین جنسیت مبتنی‌بر PCR برای افزایش دقت، سرعت و قابلیت کارایی بالا از طریق گزارش‌های قبلی مشهود است (Morinha *et al*., 2012). محصولات کروموزوم‌های Z و W بر اساس اندازه قابل تشخیص هستند. به‌دنبال الکتروفورز ژل، چنین واکنشی برای ماده‌ها با یک کروموزوم Z و یک W دو باند در اندازه‌های مختلف و تنها یک باند برای مردان دارای دو کروموزوم Z تولید می‌کند (Fridolfsson & Ellegren, 1999). با توجه به این‌که ترکیبات خون جنین جوجه با گذشت زمان، از تولید اولیه گلبول‌های قرمز تا توسعه کامل سیستم خونی تغییرات قابل توجهی را تجربه می‌کند. این مطالعه، امکان تعیین جنسیت جوجه را از طریق آنالیز خون با استفاده از طیف‌سنجی رامان در روزهای مختلف جنینی جوجه مورد بررسی قرار داده است.

مواد و روش‌ها

تخم‌مرغ‌های بارور مرغ بومی ابتدا به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۱۴ °C نگهداری شدند. سپس، به‌منظور گذراندن مراحل جنینی، به دستگاه جوجه‌کشی منتقل شدند که در دمای ۳۷/۸ °C و رطوبت ۵۳ درصد تنظیم گردید. تخم‌ها به‌صورت عمودی و با قسمت پهن رو به بالا قرار داده شدند تا مرحله تشکیل سیستم عروقی خارج جنینی فراهم شود (شکل ۱).

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-17]
[DOI: 10.61882/rap.2026.1527]

برای هر دوره سنی، ۱۰۰ تخم‌مرغ مورد آزمایش قرار گرفتند. ارزیابی جنین‌ها در سنین ۳/۵، ۵، ۸ و ۱۳ روزگی به‌صورت جداگانه انجام شد.



شکل ۱- تصویر عروق خارج جنینی در داخل حفره نمونه‌های مورد بررسی در این پژوهش نشان داده شده‌است.
Figure 1. The image shows the extra-embryonic blood vessels within the cavity of the samples examined in this study.

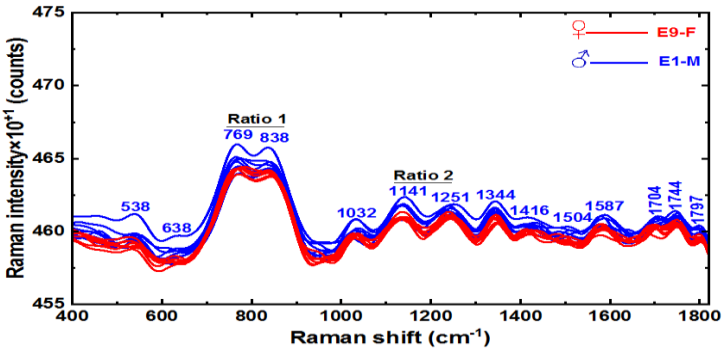
پس از ایجاد یک منفذ در انتهای نوک پهن تخم‌مرغ، ناحیه عروقی جنین به‌طور شناور در بالای زرده قرار می‌گیرد و روی سطح آن باقی می‌ماند. برای نمایش رگ‌های جنینی، یک سیستم دوربین توسعه یافته است که به‌صورت خودکار یک رگ مناسب را در دیافراگم شناسایی و تمرکز پرتو لیزر را بر روی آن متمرکز می‌کند. لیزر با استفاده از یک میکروسکوپ هم‌کانون روی نمونه‌ها متمرکز و از هر نمونه، چندین طیف رامان در نقاط مختلف (رگ‌های خونی) ثبت می‌شود. برای دستیابی به‌دقت بالا در طیف‌سنجی تخم‌مرغ، تمرکز دقیق لیزر روی رگ‌های خونی ضروری است. در این تحقیق، طیف‌سنجی رامان با بهره‌گیری از سیستم میکروراما‌ن (UniRAM, South Korea, 2014) که در مرکز تحقیقات مهندسی سطح پیشرفته و نانو مواد دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز مستقر است، انجام شد که این سیستم مجهز به لیزر حالت جامد برای تحریک نمونه با طول‌موج ۷۸۵ nm و توان ۲۰۰ mW است. همچنین، این سیستم مجهز به میکروسکوپ هم‌کانون Olympus با لنزی که دارای بزرگنمایی ۵۰X است، که رگ‌های خونی جنین تشکیل شده را مشخص می‌کند و طیف رامان اخذ می‌گردد. به‌علاوه، این سیستم دارای طیف‌سنج از نوع CCD (InGaAs, iDus, Andor, Oxford Instruments) برای ثبت طیف رامان است. طیف‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Origin رسم شدند و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

پس از اتمام این مراحل، برای تأیید جنسیت، جنین‌ها از تخم‌مرغ خارج شدند و از هر نمونه به‌طور جداگانه فرآیند استخراج DNA با استفاده از کیت Animal Tissue DNA Isolation ساخت شرکت دنازیست انجام شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ مدل (Thermo Scientific NanoDROP. 2000 C، کشور آمریکا) و همچنین الکتروفورز افقی روی ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفتند. در این تحقیق، ژن CHD به عنوان ژن تعیین جنسیت، با توالی رفت F:5′TATCGTCAGTTTCCTTTTCAGGT-3′ و برگشت R:5′CCTTTTATTGATCCATCAAGCCT-3′ در نظر گرفته شد (Lee *et al*., 2010). برای تعیین جنسیت نمونه‌ها، با استفاده از آغازگرهای طراحی شده، واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر (۸/۵ میکرولیتر آب، ۱۲/۵ میکرولیتر کیت تجاری Taq2x Master Mix Red، ۱ میکرولیتر آغازگر رفت، ۱ میکرولیتر آغازگر برگشت و ۱ میکرولیتر DNA) در دستگاه ترمال سایکلر (مدل Thermalcycler Mini، کشور آلمان) انجام گرفت تعداد سیکل‌های انجام واکنش ۳۰ سیکل و مراحل واکنش به‌ترتیب: دناتوراسیون اولیه، دمای ۹۵ °C، به‌مدت ۵ دقیقه، دناتوراسیون ثانویه، دمای ۹۵ °C و به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها، دمای ۵۷ °C و به‌مدت ۳۰ ثانیه، طویل‌سازی، دمای ۷۲ °C به‌مدت ۳۰ ثانیه و جهت طویل‌سازی نهایی نیز دمای ۷۲ °C به‌مدت ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شدند و در آخر، نتایج نهایی آزمایش روی ژل آگارز دو و نیم درصد مشاهده شدند.

نتایج و بحث

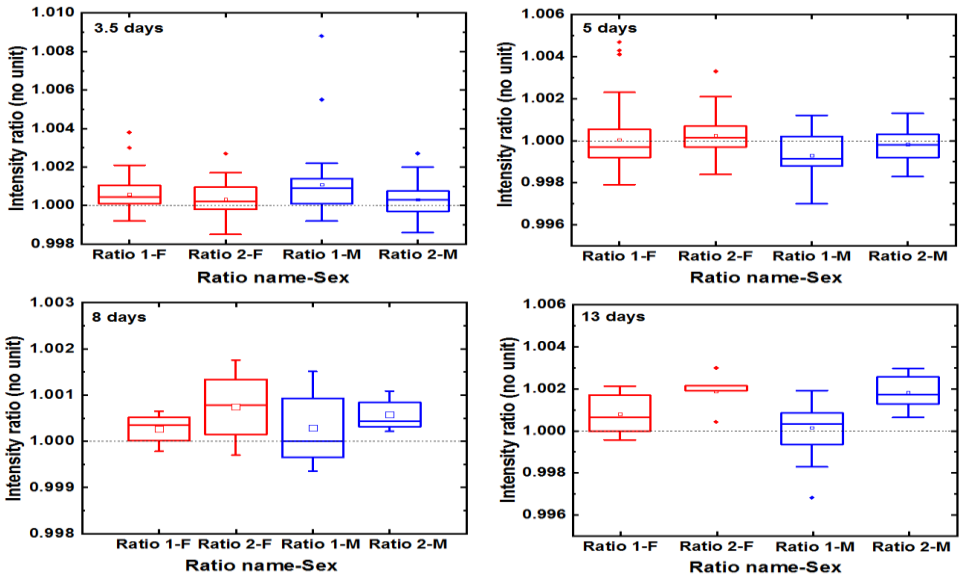
شکل ۲ طیف رامان دو نمونه از تخم‌مرغ‌های مورد مطالعه در این پژوهش را نشان می‌دهد که به‌صورت تصادفی از بین جنسیت‌های نر و ماده انتخاب شدند. ملاحظه می‌شود که هر دو جنسیت پیک‌های رامانی مشابهی را (در موقعیت‌های یکسان) نشان می‌دهند. بنا بر این، نمی‌توان از وجود یا عدم وجود پیک در موقعیت خاصی به تشخیص جنسیت پرداخت. بنا بر این، به‌منظور تشخیص جنسیت باید به دیگر مشخصه (های) طیف رامان (تغییر شدت پیک‌ها) پرداخته شود. همان‌گونه که ملاحظه می‌شود، شدت طیف رامان اخذ شده برای جوجه نر بیشتر از جوجه ماده است. در مورد بقیه نمونه‌ها و بقیه روزها نیز چنین نظمی با تداخل‌های متفاوت دیده می‌شود. بنا بر این، چهار پیکی که بیشترین شدت‌ها را نشان دادند در نظر گرفته شدند و نسبت شدت آن‌ها محاسبه و با روش‌های مختلف که در ادامه می‌آید مورد تجزیه و تحلیل قرار خواهند گرفت تا بتوان نظم و روندهای احتمالی آن‌ها را جهت ارائه مدلی مشخص برای تشخیص جنسیت ارائه کرد.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-17]
[DOI: 10.61882/rap.2026.1527]



شکل ۲- طیف رامان دو نمونه از تخم مرغ‌های ۳/۵ روزه نر و ماده مورد مطالعه.
Figure 2. Raman spectra of two samples from 3.5-day-old male and female eggs in this study

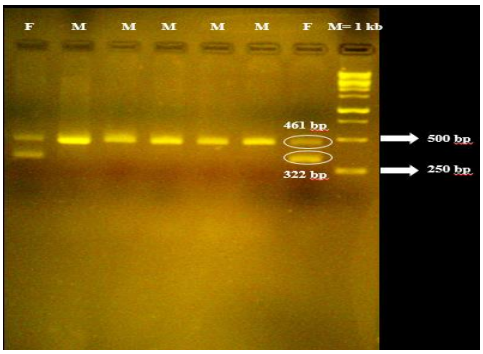
در طیف‌های رامان ارائه شده در شکل ۲ باندهای رامانی در موقعیت‌های ۵۳۸ و ۶۳۸cm^{-1} به‌ترتیب مرتبط با $Fe—O_2$ (Hemoglobin) و C—S (Protein) هستند (Galli *et al*., 2016) باندهای ارتعاشی در موقعیت‌های ۷۶۹، ۸۳۸، ۱۰۳۲، ۱۱۴۱ و ۱۲۵۱cm^{-1} نیز به‌ترتیب مرتبط با Porphyrin، Antisymmetric stretch vibration of choline group ($N^+(CH_3)_3$)، Phenylalanine، Phosphodioxy stretching vibrations in nucleic acids و Amide III هستند (Galli *et al*., 2018؛ Galli *et al*., 2017). پیک‌های مشاهده شده در موقعیت‌های ۱۳۴۴، ۱۴۱۶، ۱۵۰۴ و ۱۵۸۷cm^{-1} نیز به‌ترتیب مربوط به CH_x deformation modes of lipids and proteins، C=C stretching vibrations، Porphyrin و Amide I ofalpha helix secondary structure and/or C=C stretching vibrations هستند (Galli *et al*., 2017؛ Galli *et al*., 2018). در نهایت، باندهای رامانی در موقعیت‌های ۱۷۰۴، ۱۷۴۴ و ۱۷۹۷ نیز مرتبط با Amide I و C=O stretching vibration هستند (Galli *et al*., 2018). شکل ۳ نمودار شمعی (شمعدانی) داده‌های به‌دست آمده از محاسبه نسبت پیک‌های غالب مورد اشاره را برای حالت تجمعی در مورد تخم‌مرغ‌های مورد آزمایش در روزهای مختلف جوجه‌کشی نشان می‌دهد. نمودار شمعی توزیع آماری داده‌های به‌دست آمده را نشان می‌دهد که حاوی اطلاعاتی از نوع شاخص‌های مرکزی هم‌چون مد، میانه، میانگین، میانگین وزن‌دار و همچنین شاخص‌های پراکندگی هم‌چون دامنه تغییرات است.



شکل ۳- نمودار شمعی دو نسبت مرتبط با شدت باندهای رامانی غالب برای تخم‌مرغ‌های ۳/۵ تا ۱۳ روزه به‌صورت تجمعی برای جنسیت‌های نر و ماده مورد مطالعه
Figure 3. The candlestick chart of two ratios related to the intensity of dominant Raman bands for 3.5 to 13-day-old eggs cumulatively for the studied male and female sexes

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-17]
[DOI: 10.61882/rap.2026.1527]

صحت‌سنجی تعیین جنسیت با استفاده از تکنیک PCR



شکل ۴- نتایج الکتروفورز تعدادی از محصولات PCR روی ژل ۲/۵ درصد آگارز. چاهک ۱ نشان‌دهنده نشانگر مولکولی یک کیلو بازی (شرکت یکتاتجهیز آزما) است. ردیف‌های M و F بالا نیز به‌ترتیب نمونه‌های نر و ماده را نشان می‌دهند.
Figure 4. Agarose gel electrophoresis of selected PCR products on a 2.5% agarose gel. Lane 1 represents the 1 kb DNA ladder (Yekta Tajhiz Azma Co., Iran). The labels M and F above the lanes indicate Male and Female samples, respectively.

در نهایت، طبق نتایج بررسی همبستگی پیرسون بین تعیین جنسیت ۱۰۰ جنین جوجه ۳/۵ روزه با استفاده از طیف‌سنج رامان و تکنیک PCR، با استفاده از طیف‌سنجی رامان می‌توان جنسیت جنین جوجه را با صحت حدودا ۸۲ درصد تعیین کرد (جدول ۱) که با نتایج پژوهشگران دیگر هم‌خوانی دارد (Galli *et al*., 2018؛ Galli *et al*., 2017).

جدول ۱- نتایج همبستگی پیرسون بین داده‌های طیف‌سنجی رامان و تکنیک PCR
Table 1. Pearson's Correlation Results between Raman Spectroscopy Data and the PCR Technique

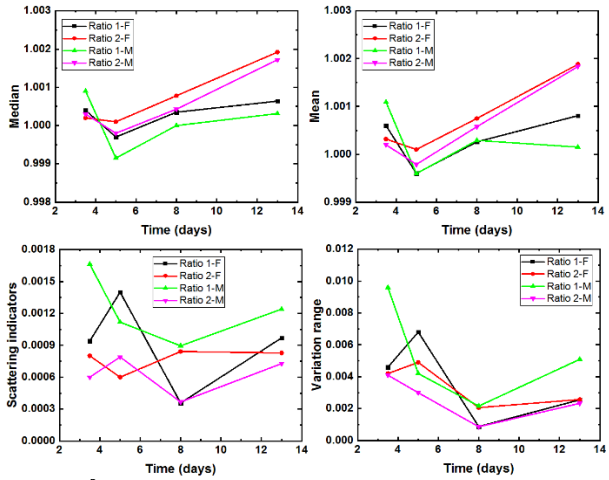
متغیرها Variables	ضریب همبستگی پیرسون Pearson's correlation coefficient	تعداد نمونه‌ها Number of samples	مقدار معنی‌داری *P*-Value	تفسیر همبستگی Correlation interpretation
طیف‌سنجی رامان و تکنیک PCR Raman spectroscopy and the PCR technique	0.82	100	0.0001 > P	همبستگی قوی و مثبت Strong and positive correlation

مطابق با تجزیه و تحلیل طیف‌های رامان، میانگین شدت فلورسانس بین جنس‌ها تفاوت معنی‌داری داشت، اگرچه هم‌پوشانی زیادی وجود داشت. بنا بر این، منبع این فلورسانس و امکان بهره‌برداری از آن برای تعیین جنسیت بیشتر مورد بررسی قرار گرفت. دوره زمان فلورسانس بیشتر برای هر دو جنس مورد بررسی قرار گرفت. فلورسانس تخم‌مرغ نر و ماده بیشترین تفاوت را در روز ۳/۵ نشان داد، در حالی‌که تفاوت شدت پس از آن به‌تدریج کاهش یافت. در این نقطه از جوجه‌کشی، طیف فلورسانس خون نر و ماده شکل طیفی متفاوتی را نشان داد. پس از روز ۴، شدت فلورسانس در جنس نر بیشتر باقی ماند، اما شکل طیفی مختلف به‌سرعت کاهش یافت و به‌طور کامل در روز ۵ از دست رفت. پس از روز ۸، همچنین شدت فلورسانس در هر دو جنس مشابه شد. فلورسانس بالاتر خون نر در مراحل اولیه جوجه‌کشی به تفاوت در اریتروپوئز بین جنس‌ها مربوط بود.

شکل ۵ تغییرات چهار شاخص میانه، میانگین، پراکندگی و دامنه تغییرات را برای دو نسبت شدت پیک‌های رامان در جنسیت‌های مختلف جوجه‌ها (نر و ماده) در روزهای مختلف جوجه‌کشی نشان می‌دهد. در هر دو شاخص میانه و میانگین، تغییرات نظم‌دار و قابل مشاهده‌ای در روزهای مختلف جوجه‌کشی وجود دارند. برای هر دو نسبت، روند تغییرات میانه و میانگین در جنسیت‌های نر و ماده متفاوت است. این تفاوت می‌تواند به‌عنوان شاخصی برای تفکیک جنسیت‌ها مورد استفاده قرار گیرد. به‌طور خاص، در روزهای ابتدایی (روزهای ۳/۵ و ۵)، کاهش قابل توجهی در مقادیر دیده می‌شود که در روزهای بعدی (روز ۱۳) به افزایش مجدد می‌رسد. شاخص پراکندگی و دامنه تغییرات نشان دهنده نوسانات داده‌ها در هر جنسیت و نسبت هستند. در روزهای ابتدایی (روز ۳/۵)، پراکندگی و دامنه تغییرات برای جنسیت نر به‌طور قابل توجهی بیشتر است، در حالی‌که این مقادیر برای جنسیت ماده کم‌تر هستند. در روزهای میانی (روزهای ۵ و ۸)، کاهش کلی در این شاخص‌ها دیده می‌شود، که نشان دهنده ثبات نسبی در این بازه زمانی است. الگوهای متفاوت تغییرات شاخص‌های رامان بین جنسیت‌های نر و ماده (به‌ویژه در روزهای ۳/۵ و ۵) نشان می‌دهند که این روش می‌تواند برای تشخیص جنسیت تخم‌مرغ‌ها به‌کار گرفته شود. شاخص پراکندگی و دامنه تغییرات می‌توانند اطلاعات مفیدی را در مورد تفکیک جنسیت در روزهای ابتدایی ارائه دهند، زیرا تفاوت‌ها در این شاخص‌ها در روزهای اولیه واضح‌تر هستند. نتایج نشان می‌دهند که روز ۳/۵ از جوجه‌کشی بهترین زمان برای تشخیص جنسیت بر اساس شدت پیک‌های رامان است زیرا در این بازه، تفاوت‌های جنسیتی در مؤلفه‌های رامانی بیشترین وضوح را دارند. بررسی دقیق‌تر در مورد تأثیر شرایط محیطی همانند دما، رطوبت و غیره بر شدت پیک‌های رامان می‌تواند دقت این روش را افزایش دهد.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-17]
[DOI: 10.61882/rap.2026.1527]

تحلیل بیشتر داده‌ها با استفاده از روش‌های آماری پیشرفته مانند تحلیل خوشه‌بندی یا یادگیری ماشین می‌تواند الگوهای دقیق‌تری برای تشخیص جنسیت استخراج کند. این روش بر اساس تغییرات شدت پیک‌های رامان به‌نظر می‌رسد که پتانسیل خوبی برای تشخیص غیر تهاجمی جنسیت در تخم‌مرغ‌ها دارد و می‌تواند به‌عنوان یک روش سریع و کارآمد در صنعت جوجه‌کشی مورد استفاده قرار گیرد.



شکل ۵- نمودار تغییرات چهار شاخص شامل میانه، میانگین، پراکندگی و دامنه تغییرات به‌دست آمده از نمودارهای شمعی (شکل ۳) برای دو نسبت مورد نظر جنسیت‌های مختلف

Figure 5. The chart of changes in four indicators, including median, mean, dispersion, and the range of changes, obtained from candlestick charts (Figure 4) for the two desired ratios of different genders

خون جنین جوجه‌های نر و ماده در دوران جوجه‌کشی از لحاظ ماده ژنتیکی و ترکیبات خونی تفاوت‌های قابل توجهی دارد. از نظر ماده ژنتیکی، جنسیت در پرندگان به‌وسیله کروموزوم‌های جنسی تعیین می‌شود. جوجه‌های نر دارای کروموزوم‌های ZZ و جوجه‌های ماده دارای کروموزوم‌های ZW هستند. این تفاوت در کروموزوم‌ها منجر به تمایز در ساختار گنادها می‌شود، به‌طوری‌که بیضه‌ها در نرها و تخمدان‌ها در ماده‌ها تشکیل می‌شوند. ژن DMRT1 که روی کروموزوم Z قرار دارد، نقش کلیدی را در تمایز بیضه‌ها ایفا می‌کند و در غدد جنسی اولیه، این ژن باعث تمایز به‌سمت بیضه‌ها در نرها می‌شود. این تفاوت‌ها نه‌تنها به شناخت بهتر فرآیند تعیین جنسیت کمک می‌کنند بلکه می‌توانند کاربردهای عملی مانند کاهش تلفات جوجه‌ها و افزایش کارایی تولید در صنعت جوجه‌کشی داشته باشند (Ioannidis *et al*., 2021). مطالعات زیادی بر اساس تفاوت ترکیبات خونی نر و ماده انجام شده‌اند. نتایج مطالعه ماتسوما و همکاران (Matsumoto *et al*., 2024) نیز نشان می‌دهند که ساختار مولکولی گلبول‌های قرمز بین نرها و ماده‌ها تفاوتی ندارد، بلکه درجات اشباع اکسیژن آن‌ها متفاوت است. علاوه بر این، طول‌موج تحریک مناسب برای جنسیت جوجه ۷۸۵ نانومتر است که جنسیت بر اساس درجه اشباع اکسیژن قابل شناسایی است. چندین مطالعه قبلی نتایج این مطالعه را تایید می‌کنند. به‌عنوان مثال، میل اکسیژن Hb برای جوانان سالم غیر سیگاری در زنان کمتر از مردان است، همان‌طور که با فشار جزئی بالاتر اکسیژن برای زنان هنگامی‌که ۵۰ درصد Hb اشباع شده است آشکار می‌شود. آتون و همکاران (Eaton *et al*., 1978) نرخ آزادشدن اکسیژن از خون زنان را در مقایسه با خون مردان سریع‌تر گزارش کردند. اشباع منطقه‌ای اکسیژن مغز اندازه‌گیری شده با استفاده از طیف‌سنجی مادون قرمز نزدیک در زنان به‌طور قابل توجهی کمتر از مردان بود. بنا بر این، آن‌ها نشان دادند که اساس تشخیص جنسیت جنین جوجه در تشخیص درجه اشباع اکسیژن نهفته است، به‌طوری‌که خون نر احتمالاً دارای میل اکسیژن بالاتری نسبت به خون ماده است. علاوه بر این، در مطالعه موریتا فوجیمورا و همکاران (Morita-Fujimura *et al*., 2009)، تفاوت‌های طیفی واضح مشخص شدند و به گروه‌های مولکولی اختصاص داده می‌شوند. طیف جنین‌های نر نشان دهنده ارتعاشات کششی قوی‌تری از پیوند فسفو دی‌استر اسیدهای نوکلئیک و حالت‌های کشش C-C است. در مقابل، طیف جنین‌های ماده حالت‌های تغییر شکل آمید III و CHx را با شدت کمی بیشتر نشان می‌دهد. همچنین، سیگنال فلورسانس متوسط برای جنین‌های نر نسبت به ماده‌ها قوی‌تر بود که ممکن است به‌دلیل هماتوکریت بالاتر در این جنین‌ها باشد.

مزایای روش‌های طیف‌سنجی و یا فلورسانس نه‌تنها در دقت زیاد و زمان تحلیل کوتاه آن‌ها نهفته هستند، بلکه قابلیت استفاده از این روش‌ها در مراحل اولیه جنینی نیز اهمیت دارد. به‌ویژه، بهره‌برداری از فلورسانس پتانسیل ایجاد سیستم‌های صنعتی برای تعیین جنسیت تخم مرغ را دارد که نیازی به طیف‌سنج‌های گران‌قیمت ندارند. این سیستم‌ها می‌توانند فقط از چند آشکارساز نور با فیلترهای باندگذر مناسب برای اندازه‌گیری شدت سیگنال در محدوده‌های طیفی انتخاب شده استفاده کنند (Clinton *et al*., 2016).

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-17]
[DOI: 10.61882/rap.2026.1527]

تخم‌هایی که به‌عنوان نر شناسایی می‌شوند، می‌توانند بلافاصله پس از تعیین جنسیت از سینی تخم‌مرغ خارج شوند. این کار نه‌تنها ظرفیت بارگیری در انکوباتورها را در مراحل اولیه افزایش می‌دهد، بلکه تولید تخم‌های نر حاوی پروتئین‌های با کیفیت زیاد و مقادیر نسبتاً کمی از بافت جنینی را پس از ۸۰ تا ۸۸ ساعت جوجه‌کشی، بسته به مقررات ملی، بیشتر می‌کند. این تخم‌ها می‌توانند به‌عنوان محصولات نهایی با کیفیت (مانند خوراک ماهی) فروخته شوند (Galli *et al*., 2018).

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه، بررسی‌های دقیقی برای تعیین مناسب‌ترین زمان برای تشخیص جنسیت جنین مرغ بومی با استفاده از طیف‌سنجی میکرو رامان انجام شدند. نتایج نشان می‌دهند که روز ۳/۵ انکوباسیون بهترین زمان برای این کار است. از مزایای استفاده از روش‌های طیف‌سنجی و فلورسانس می‌توان به دقت زیاد و زمان تحلیل کوتاه اشاره کرد. این روش‌ها می‌توانند به توسعه سیستم‌های صنعتی برای تشخیص جنسیت تخم مرغ‌ها کمک کنند. این روش‌ها را می‌توان به‌طور مؤثری در صنعت طیور مورد استفاده قرار داد و به بهبود فرآیندهای پرورش جوجه‌ها کمک کرد. با تشخیص زود هنگام جنسیت، می‌توان از تلفات ناشی از جوجه‌های با جنسیت ناخواسته در مرغداری‌ها جلوگیری و به صرفه‌جویی در منابع کمک کرد. همچنین، این روش‌ها از جنبه اخلاقی و انسانی مورد توجه هستند، زیرا از کشتن جوجه‌های یک‌روزه جلوگیری می‌کنند.

References

Biederman, I., & Shiffrar, M. M. (1987). Sexing day-old chicks: A case study and expert systems analysis of a difficult perceptual-learning task. *Journal of Experimental Psychology: Learning, Memory, and Cognition,* 13(4), 640. https://doi.org/10.1037/0278-7393.13.4.640

Bogliolo, L., Leoni, G. G. & Ledda, S. (2020). Raman spectroscopy-based approach to study the female gamete. *Theriogenology*, 150, 268-275. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.059.

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. https://doi.org/10.1159/000448502.

Eaton, W. A., Hanson, L. K., Stephens, P. J., Sutherland, J. C., & Dunn, J. B. R. (1978). Optical spectra of oxy-and deoxyhemoglobin. *Journal of the American Chemical Society*, 100(16), 4991-5003. DOI: 10.1021/ja00484a013

Fridolfsson, A. K. & Ellegren, H. (1999). A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology*, 116-121. https://doi.org/10.2307/3677252

Galli, R., Preusse, G., Schnabel, C., Bartels, T., Cramer, K., Krautwald-Junghanns, M. E., & Steiner, G. (2018). Sexing of chicken eggs by fluorescence and Raman spectroscopy through the shell membrane. *PloS One*, 13(2), e0192554. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192554

Galli, R., Preusse, G., Uckermann, O., Bartels, T., Krautwald-Junghanns, M. E., Koch, E., & Steiner, G. (2017). In ovo sexing of domestic chicken eggs by Raman spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 88(17), 8657-8663. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01868

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. https://doi.org/10.3382/ps/pew282

Ioannidis, J., Taylor, G., Zhao, D., Liu, L., Idoko-Akoh, A., Gong, D., & Clinton, M. (2021). Primary sex determination in birds depends on DMRT1 dosage, but gonadal sex does not determine adult secondary sex characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(10), e2020909118. https://doi.org/10.1073/pnas.202090911

Ishigaki, M., Hitomi, H., Ozaki, Y., & Nishiyama, A. (2022). Exposing intracellular molecular changes during the differentiation of human-induced pluripotent stem cells into erythropoietin-producing cells using Raman spectroscopy and imaging. *Scientific Reports*, 12(1), 20454. https://doi.org/10.1038/s41598-022-24725-1.

Lee, J. C. I., Tsai, L. C., Hwa, P. Y., Chan, C. L., Huang, A., Chin, S. C., & 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. https://doi.org/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

Morinha, F., Cabral, J. A., & Bastos, E. (2012). Molecular sexing of birds: A comparative review of polymerase chain reaction (PCR)-based methods. *Theriogenology*, 78(4), 703-714. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.04.015

Morita-Fujimura, Y., Tokitake, Y., & Matsui, Y. (2009). Heterogeneity of mouse primordial germ cells reflecting the distinct status of their differentiation, proliferation and apoptosis can be classified by the expression of cell surface proteins integrin α6 and c-Kit. *Development, Growth & Differentiation*, 51(6), 567-583. https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2009.01119.

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

Sato, H., Popp, J., Wood, B. R., & Ozaki, Y. (Eds.). (2023). Raman Spectroscopy in Human Health and Biomedicine. *World Scientific*. 10.1142/97898112646100007

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

Souza, M. A., Santos, A. S., da Silva, S. W., Braga, J. W. B., & Sousa, M. H. (2022). Raman spectroscopy of fingerprints and chemometric analysis for forensic sex determination in humans. *Forensic Chemistry*, 27, 100395. https://doi.org/10.1016/j.forc.2021.100395

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-17]

[DOI: 10.61882/rap.2026.1527]

[DOI: 10.61882/rap.2026.1527] [Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-17]