

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КУРИНЫХ ЭМБРИОНОВ ПО ПОЛУ МЕТОДАМИ ДОИНКУБАЦИОННОГО ВЗВЕШИВАНИЯ ЯИЦ И ВИЗУАЛЬНОЙ ОЦЕНКИ ГОНАД

Блажнова Г.Н.¹, Тимченко Л.Д.¹, Ржепаковский И.В.¹, Пономаренко А.П.¹

¹ФГАОУ ВПО «Северо-Кавказский федеральный университет», Ставрополь, Россия (355009, г. Ставрополь, ул. Пушкина, 1), e-mail: blazhnova-galina@yandex.ru

На основании анализа литературы выявлено, что в птицеводстве начался новый этап – овосексинг. На сегодняшний день существует более десяти методов определения пола куриных эмбрионов. Однако до сих пор не предложено универсального метода, который отвечал требованиям – дешевизны, простоты, минимальной трудоемкости, не требующий специального дорогостоящего оборудования и точность сексирования была максимальной. Перечисленные критерии диктуют необходимость сравнительной оценки эффективности доступных и простых методов половой дифференцировки эмбрионов, в частности доинкубационного сексинга куриных эмбрионов по массе яиц и визуальной оценки половых желез. Сопоставляя эффективность двух указанных методов, доказан низкий процент несовпадений полученных результатов, что позволяет использовать оба метода самостоятельно. Несмотря на незначительную вероятность наличия несовпадений, для исключения ошибки при экспериментальном исследовании целесообразно указанные методы использовать в комплексе.

Ключевые слова: половая дифференцировка, куриный эмбрион, эмбриогенез.

COMPARATIVE EVALUATION OF EFFICIENCY OF DIFFERENTIATION CHICK EMBRYOS ON THE FLOOR METHODS PREINCUBATION WEIGHING EGGS AND VISUAL EVALUATION OF THE GONADS

Blazhnova G.N.¹, Timchenko L.D.¹, Rzhepakovskiy I.V.¹, Ponomarenko A.P.¹

¹North-Caucasian Federal University, Stavropol, Russia (355009, Stavropol, street Pushkin, 1), e-mail: blazhnova-galina@yandex.ru

Based on the analysis of the literature revealed that in poultry began a new phase - ovosexing. Today, there are more than ten methods of determining the sex of chicken embryos. However, so far not offered a single method that meets the requirements of cheapness, simplicity, minimal labour input, which do not require special expensive equipment and precision sexirani was the maximum. Listed criteria dictate the need for a comparative assessment of the efficiency of affordable and simple methods of sexual differentiation of embryos, in particular preincubation of sexing chick embryos by weight of eggs and visual evaluation of the sex glands. Comparing the effectiveness of these two methods, proven low interest rate mismatches of the obtained results, which allows the use of both methods independently. Despite a slight chance of having mismatches, to avoid errors in the experimental study, it is expedient these methods to use in the complex.

Keywords: the sexual differentiation, a chicken embryo, embryogenesis.

Существует мнение, что для получения достоверных показателей морфофункциональных особенностей в онтогенезе, в процессе исследования при формировании экспериментальных групп необходимо учитывать максимальное количество критериев [1]. При этом, для куриного эмбриона (КЭ) чаще используют традиционные критерии: породность, идентичность условий инкубации, размер и масса яиц, целостность и окраска скорлупы, вероятность инфицирования и пр. [5]. Однако, в биологии уже доказано, что одним из определяющих факторов, который потенциально может изменить результаты и обеспечить существенные различия исследуемых показателей между отдельными индивидами в группе является пол [9; 8].

В начале XXI века современная биологическая наука подошла к рубежу, за которым диагностика пола возможна и у эмбрионов птиц с ранних стадий эмбрионального развития [2]. Поэтому, выбор адекватных методов определения пола остается первостепенной задачей не только на птицеводческих предприятиях, но и при проведении научных исследований на куриных эмбрионах как одной из важнейших биологических моделей в экспериментальной биологии.

К настоящему времени известны современные методы дифференцировки по полу куриных эмбрионов. К ним относят: молекулярно-генетические, подсчет количества Z-хромосом в кариотипах кровяных клеток, просвечивание скорлупы с целью регистрации окраски глаз самцов и самок, сканирование гонад методом ядерного магнитного резонанса, выявление эстрогенных гормонов в пробе аллантоисной жидкости [2]. Однако, каждый из указанных методов имеет свои недостатки в силу их дороговизны, высокой чувствительности, трудоемкости и высокотехнологичности, вследствие чего методы *in ovo* классифицируются как лабораторные, многие из них находятся на стадии разработки и используются только в научных исследованиях [3; 8; 2].

Наряду с вышеописанными методами, на практике используют традиционные, простые и доступные методы, перечень которых в литературе представлен доинкубационным сексингом КЭ по массе яиц [7] и визуальной оценкой симметрии гонад [4].

Несмотря на широкий перечень методов сексинга пола КЭ, на сегодняшний день не предложено универсального, который бы устраивал всех исследователей и применялся бы во многих отраслях биологии. На наш взгляд, наиболее точная половая дифференцировка куриных эмбрионов для получения точных результатов может быть обеспечена при использовании комплекса методов.

Цель работы – дифференцировать куриных эмбрионов по полу методами взвешивания яиц перед инкубацией и визуальной оценки гонад и провести сравнительную оценку эффективности этих методов.

Материалы и методы исследования

В работе использованы куриные эмбрионы кросса Родонит 3 на разных этапах развития. Последовательность работы заключалась в следующем: отбор 2100 яиц по системе аналогов, которых условно разделили по полу в соответствии рекомендациям Рольник В.В. путем взвешивания каждого яйца перед инкубацией на электронных весах «ВЛТЭ-150» (Россия) (первый метод). Отталкиваясь от среднего числового значения массы яиц с массой выше среднего, условно относили к эмбрионам мужского пола, ниже среднего - женского пола. Укомплектованные по полу эмбрионы закладывали в инкубатор ИЛБ-0,5 (Россия).

Далее, с 8-х по 19-е сутки инкубации под стереомикроскопом МС-2 фирмы ЛОМО (Россия), для оценки половых желез проводили препарирование эмбрионов, условно разделенных по полу первым методом (второй метод). При этом, на каждые указанные сутки развития вскрывали разное количество зародышей. Этот факт методически обусловлен разными причинами на разных этапах инкубации. Так, численность исследуемых эмбрионов в предплодном периоде развития (8- 12-е сутки инкубации) больше, что обусловлено целью исключения вероятности ошибки в определении пола, которая может быть существенной, в связи с малоразличимым, по мнению [6], отсутствием или наличием симметрии в развитии гонад в указанный период эмбриогенеза.

Считается, что с 13-х суток развития КЭ и до вылупления симметрия в гонадах четко выраженная [10] и пол можно определить без ошибки, поэтому, число эмбрионов, начиная с этих суток развития, меньше, чем в предплодном периоде.

В период с 8-х по 19-е дни инкубации в обеих группах (эмбрионы-самцы, эмбрионы-самки) учитывали замерших, с кровяными кольцами зародышей и неоплодотворенные яйца, которые выбраковывались, чем обусловлено различие посуточного количества эмбрионов. В дальнейшем было обчислено количество эмбрионов обеих групп с учетом выбраковки и выявлены несовпадения второго метода в сравнении с первым.

Результаты экспериментальной работы подвергали вариационно-статистической обработке с использованием программы Primer of Biostatistics (Version 4.03).

Результаты исследований

Установлено, что средняя масса одного яйца ($n=2100$) составила $63,3 \pm 0,12$ г. При этом, выявлено 1134 яйца (54%), масса которых являлась ниже средней, то есть с условно женскими куриными эмбрионами и 966 яиц (46%) выше средней массы - с предположительно мужскими эмбрионами.

Результаты количественного несовпадения куриных эмбрионов-самок при разделении эмбрионов по полу методом визуализации гонад в сравнении с методом доинкубационного взвешивания яиц отражены в табл. 1.

Приведенные в табл. 1 результаты в целом свидетельствуют о том, что из 1134 эмбрионов 42 эмбриона (3,7%) подверглись выбраковке, которая приходилась на предплодный период эмбриогенеза кур. В итоге количество эмбрионов-самок с учетом выбраковки в эксперименте составило 1092.

Из данных, отраженных в табл. 1 видно, что в процессе использования указанных методов, имеются несовпадения результатов по полу. Так, при вскрытии 1092 эмбрионов, которые в соответствии с первым методом считались самками, визуально установлено, что с

8-х по 12-е дни инкубации 62 эмбриона являлись эмбрионами-самцами, что на 5,66% зародышей не совпало с результатами, полученными первым методом.

Таблица 1

Количество куриных эмбрионов-самок при разделении эмбрионов по полу методом визуализации гонад в процессе развития

Сутки развития	Посуточное распределение количества эмбрионов-♀	Число выбракованных эмбрионов	Количество эмбрионов-♀ с учетом выбраковки	Несовпадение с результатами разделения по полу первым методом	
				Абсолютное количество не совпадений результатов	%
8	120	12	108	16	1,46
9	120	10	110	16	1,46
10	120	6	114	13	1,19
11	120	5	115	10	0,91
12	120	4	116	7	0,64
13	78	2	76	Несовпад. не обн.	-
14	76	2	74	Несовпад. не обн.	-
15	76	1	75	Несовпад. не обн.	-
16	76	0	76	Несовпад. не обн.	-
17	76	0	76	Несовпад. не обн.	-
18	76	0	76	Несовпад. не обн.	-
19	76	0	76	Несовпад. не обн.	-
Итого:	1134	42	1092	62	5,66

При этом, больше половины несовпадений (45 эмбрионов) приходится на 8, 9 и 10-е сутки развития. Это подтверждает ошибку при использовании метода доинкубационного взвешивания яиц. В то время, как с 13-х по 19-е сутки развития КЭ несовпадений не обнаружено, следовательно, вероятность ошибки исключена.

Результаты количественного несовпадения куриных эмбрионов-самцов при разделении эмбрионов по полу методом визуализации гонад в сравнении с методом доинкубационного взвешивания яиц представлены в табл. 2.

Анализируя данные, представленные в табл. 2, можно отметить, что в группе эмбрионов-самцов (966), разделенных по полу первым методом, 24 эмбриона (2,5%) подверглись выбраковке. Поэтому, итоговое количество эмбрионов, которые использованы в эксперименте, заключающемся в визуальной оценке гонад, составило 942.

После препарирования на разные сроки инкубации 942 эмбриона, условно принятых за мужские, и визуальной оценки гонад установлено, что семь из них являлись эмбрионами-самками, что на 0,7% не совпало с результатами, полученными первым методом.

Таблица 2

Количество куриных эмбрионов-самцов при разделении эмбрионов по полу методом визуализации гонад в процессе развития

Сутки развития	Посуточное распределение количества эмбрионов -♂	Число выбракованных эмбрионов	Количество эмбрионов-♂ с учетом выбраковки	Несовпадение с результатами разделения по полу первым методом	
				Абсолютное количество несовпадений результатов	%
8	100	4	96	2	0,2
9	100	2	98	2	0,2
10	100	3	97	1	0,1
11	100	3	97	1	0,1
12	100	3	97	1	0,1
13	68	2	66	Несовпад. не обн.	-
14	68	1	67	Несовпад. не обн.	-
15	66	2	64	Несовпад. не обн.	-
16	66	1	65	Несовпад. не обн.	-
17	66	2	64	Несовпад. не обн.	-
18	66	1	65	Несовпад. не обн.	-
19	66	0	66	Несовпад. не обн.	-
Итого:	966	24	942	7	0,7

В результате перегруппировки по половому признаку в процессе взаимодополняющего использования двух описанных методов установлено, что от общего числа зародышей (2100), выбранных изначально для эксперимента, в итоге выявлено 1037 эмбрионов женского пола и 997 - мужских эмбрионов, что в процентном соотношении - 49,4% и 47,4% соответственно. Благодаря этому, сформированы с высокой степенью достоверности группы разнополых куриных эмбрионов.

Заключение

Сопоставляя эффективность метода визуальной оценки гонад и метода взвешивания инкубационных яиц с целью половой дифференцировки эмбрионов, можно отметить достаточно низкий процент несовпадений полученных результатов, суммарно по обеим половозрастным группам, разделенным в процессе эксперимента, не превышает 6,36%.

Таким образом, для разделения куриных эмбрионов по полу возможно самостоятельное использование обоих методов. Однако, учитывая, хотя и незначительную, вероятность наличия несовпадений, для исключения ошибки предпочтительно использование указанных методов в комплексе.

Исследование проведено при финансовой поддержке Минобрнауки России, в рамках выполнения базовой части государственного задания (2014/2016).

Список литературы

1. Арешидзе Д.А., Тимченко Л.Д., Сивакова Н.Н. и др. Принципиальный подход к формированию экспериментальных групп при изучении онтогенетических преобразований в организме человека (аналитический обзор проблемы) // Вестник Московского государственного областного университета. Серия «Естественные науки». – 2006. – № 4. – С. 23-26.
2. Бондаренко М.Ю., Али Омар Хусейн Сравнительная характеристика и современная классификация методов определения пола сельскохозяйственной птицы (Аналитический обзор) // Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Тваринництво». – 2013. - Вип. 7. - № 23. – С. 111-120.
3. Бутенко В.Д. Акустический способ определения пола цыплят суточного возраста: дис. ... канд. с-х. наук: 06.02.04. – Волгоград, 2002. – 143 с.
4. Генчев А.Г., Османян А.К. Рост и развитие эмбрионов в зависимости от их пола и возраста кур бройлерного типа // Известия ТСХА. – 1996. – Вып. 4. – С. 179-188.
5. Долгорукова, А.М. Эмбриональное развитие мясных кур в зависимости от возраста птицы, морфологического и биохимического состава яиц: дис. ... канд. биол. наук 03.00.13. – Боровск, 2007. – 140 с.
6. Левина С.Е. Очерки развития пола в раннем онтогенезе высших позвоночных. М., Изд-во: «Наука», 1974. – 238 с.
7. Рольник В.В. Биология эмбрионального развития птиц. – Ленинградское отделение: Изд-во «Наука», 1968. – 425 с.
8. Тагиров М.Т. Смещение полового соотношения у кур после продолжительного хранения яиц // Биотехнология - 2010. – Т. 3. – № 3. – С. 84-90.
9. Таов И.Х. Влияние возраста коров на течение беременности, морфофункциональные, продуктивные показатели и репродуктивный потенциал их потомства: дис. ... докт. с/х. наук: 06.02.01. – Нальчик, 2004. – 306 с.
10. Хохлов Р.Ю. Функциональная морфология органов размножения кур в онтогенезе: дис. ... док. биол. наук: 16.00.02. – Уфа, 2009. – 480 с.

Рецензенты:

Квочко А.Н., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой физиологии, хирургии и акушерства
ФГБОУ ВПО «Ставропольский государственный аграрный университет», г. Ставрополь.

Федько Н.А., д.м.н., профессор, декан факультета гуманитарного и медико-биологического
образования ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет»,
г.Ставрополь.