

## СМЕЩЕНИЕ ПОЛОВОГО СООТНОШЕНИЯ У КУР ПОСЛЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ ЯИЦ

М. Т. Тагиров

Институт птицеводства НААНУ,  
Борки, Змиевский район, Харьковская область

*E-mail: tagirov-m@yandex.ru*

Установлено, что при инкубации яиц кур породы род-айленд красный после продолжительного хранения (15–21 сут) наблюдается достоверное смещение полового соотношения в сторону формирования самцов. Как среди суточного молодняка, так и среди погибших во вторую половину инкубации зародышей количество самцов практически в два раза выше, чем самок. Выдвинута гипотеза о возможности существования в различных популяциях кур аллельных форм энзима ароматазы или женского фактора на W-хромосоме с разной чувствительностью к внешним влияниям (температура, продолжительное хранение и т. д.), что может привести к вторичному смещению полового соотношения.

**Ключевые слова:** куры, половые хромосомы, инверсия пола, хранение яиц, семенники, яичник.

Благодаря внедрению интенсивных технологий в птицеводстве, прежде всего новейших биотехнологических и инкубационных, повысилась роль продуктов птицеводства как источника высококачественного протеинового продукта. В связи с этим автоматизируются все звенья в цепи производства, включая сбор яиц, их оценку, инкубацию, вакцинацию молодняка, выращивание птицы, убой, переработку и упаковку.

Подсчитано, что в яичном птицеводстве только стран Евросоюза каждый год уничтожаются более 280 млн. [1], а во всем мире – около 4 млрд. [2] цыплят мужского пола сразу после вылупления в связи с неэкономичностью их выращивания на мясо. В странах с высоким уровнем жизни в последние годы все чаще обсуждается этическая сторона проблемы, связанная с массовым умерщвлением цыплят. Решение проблемы ранней диагностики пола или управления половой детерминацией птиц позволит сэкономить значительные финансовые, энергетические и пищевые ресурсы. Появится возможность инкубации яиц либо производства зародышей только определенного пола.

Благодаря применению новейших технологий анализа генома и генной активности за последние 20–30 лет существенно расширилось наше понимание молекулярно-генетических основ регуляции половой дифференциации у позвоночных животных.

Значительных успехов в сексировании инкубируемых яиц достигла американская биотехнологическая компания «Эмбрекс» [3, 4, 5].

Механизмы детерминации пола позвоночных животных можно разделить на два типа: генотипическая (ГДП) и средовая (СДП) детерминация пола. На самом деле эти два типа детерминации пола представляют собой крайности, между которыми существует множество переходных форм. При ГДП, наблюдаемой у млекопитающих, птиц, многих видов рептилий и рыб, один пол продуцирует гаметы, гомозиготные по половой аллели или хромосоме (гомогаметные), а другой пол — равное количество двух различных типов гамет (гетерогаметные) [6].

СДП означает, что пол организма необратимо определяется в раннем эмбриогенезе условиями окружающей среды: температурой, рН, соленостью воды, социальными условиями, относительными ювенальными размерами [7, 8]. Следует, однако, отметить, что у многих видов рыб смена пола после первичной детерминации является частью нормальной жизни и индуцируется различными стимулами окружающей среды.

Классическая теория Фишера [9] предполагает, что половое соотношение в потомстве должно стремиться к соотношению 1:1, но часто при СДП наблюдается смещение в сторону самцов или самок. Молекулярный

механизм, посредством которого температура индуцирует детерминацию пола, до конца не выяснен, однако работы, посвященные влиянию гормонов на половое соотношение, указывают, что полоопределяющие триггеры действуют через изменение концентрации эстрогенов или их рецепторов [10].

Гонады птиц бипотенциальны на 3,5–4,5 сут развития. Направление половой дифференциации гонад зависит от того, какая из составляющих гонады — кортекс или медуллярный слой — получит дальнейшее развитие.

У млекопитающих гонадогенез устойчив к действию половых гормонов: развитие зародыша происходит в среде гормонов матери. Развитие гонад у птиц более лабильно из-за чувствительности к обработке гормонами. Инверсию пола можно индуцировать инъекцией *in ovo* эстрогенов или подавлением их секреции. Таким образом, эстрогены у птиц играют критическую роль в половой детерминации. Синтетические ингибиторы ароматазы — энзима, катализирующего синтез эстрогена из тестостерона, могут индуцировать устойчивую инверсию пола самка → самец [11]. Левая гонада маскулинизируется, а правая становится семенником [12, 13]. Критическим фактором, как отмечают авторы, является время воздействия, соответствующее трем суткам инкубации яиц.

В то же время обработка самцов (ZZ) эстрадиолом приводит к их феминизации, хотя и обратимой. Два важных энзима, необходимых для синтеза эстрогена — P-450-ароматаза и 17βHSD, экспрессируются только в гонадах ZW самок в начале морфологической дифференциации.

Инверсию пола самка → самец можно вызвать пересадкой эмбрионального семенника в генетическую самку перед половой дифференциацией [14]. В этом случае обе гонады развиваются как семенники. Ответственным за реверсию пола считают антимюллеров гормон (АМГ). АМГ — гликопротеин, секретлируемый клетками Сертоли развивающихся семенников. АМГ вызывает регрессию Мюллерова протока у самцов, который в противном случае развивался бы как яичник. У млекопитающих, в частности у мышей, АМГ не является необходимым компонентом, определяющим формирование семенников [15]. У птиц гонадная экспрессия АМГ начинается непосредственно перед половой дифференциацией и его активность выше у самцов [16]. Эта разница важна, поскольку добавление АМГ может вызвать полную реверсию пола у птиц.

Исходя из вышеизложенного, необратимую инверсию пола у птиц в направлении самка → самец можно индуцировать химическими агентами или изменением внешних условий, влияющими на активность соответствующих энзимов или гормонов. В качестве мишеней таких воздействий могут выступать как гипотетический детерминатор самки на W-хромосоме, так и энзим ароматазы, эстрогены или АМГ. Подтверждением этому могут служить результаты исследований, проведенных Фергюсоном [17, 18]. При обработке яиц слишком высокими или низкими температурами в ходе инкубации было получено 10% особей, у которых половой фенотип (гистологические и макроскопические данные) отличался от полового генотипа (W-специфический молекулярный маркер). Очевидно, температурный фактор, по крайней мере в некоторых случаях, может перепрограммировать действие генов, детерминирующих пол у птиц, на противоположное. Неизвестно, встречаются ли в природных условиях особи с реверсированным полом, и с какой частотой.

Ниже описаны результаты экспериментов, в которых установлен факт смещения полового соотношения у кур в результате продолжительного хранения яиц. Этот феномен, случайно обнаруженный нами, был многократно подтвержден в специальных опытах.

### Материалы и методы

Все эксперименты с животными проведены с соблюдением положений «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и других научных целей» [19].

Объектом исследований были инкубационные яйца кур (*Gallus gallus domesticus*) породы род-айленд красный и колорсексной гибридной популяции «Слобожанский», которые содержатся в условиях опытного хозяйства «Борки» Института птицеводства НААНУ. Яйца для исследований отбирали правильной формы с оптимальной для инкубации массой. Хранили их в специальной холодильной комнате, где поддерживалась температура 11,5 °С и относительная влажность воздуха на уровне 85%, в течение 21 или 15 сут. Инкубацию яиц проводили в лабораторном инкубаторе ИЛБ-0,5 в соответствии с рекомендуемыми режимами [20]. Пол суточных цыплят определяли путем вскрытия брюшной полости и обследования внутренних половых органов (семенников

или яичника) японским методом [21], а молодняка и задохликов аутосексной комбинации — по окраске оперения и результатам вскрытия.

### Результаты и обсуждение

Согласно постулатам Менделя в результате случайного распределения половых хромосом в ходе мейотического деления половое соотношение при нормальных условиях должно равняться 1:1 или максимально приближаться к этому. Анализ полового соотношения кондиционного молодняка, выведенного из яиц, заложенных на инкубацию на 3-й день после снесения, доказал справедливость данного постулата. Пол точных цыплят определяли японским методом по степени развития полового бугорка. Из 808 анализированных цыплят 414 (51,2%) оказались самцами, а 394 (48,8%) — самками.

Результаты анализа полового соотношения цыплят, выведенных из яиц после 21-дневного хранения и отходов инкубации, по данным двух экспериментов, представлены в табл. 1.

Таблица 1. Соотношение полов у молодняка и погибших зародышей после инкубации хранившихся яиц (род-айленд красный)

Заложено на инкубацию яиц, шт.	Бой, шт.	Неоплодотворенные, шт.	Эмбрионы, погибшие на ранних стадиях развития, шт.	Задохлики, шт.	Молодняк, голов
786	15	41	140	150 (97♂: 53♀ <sup>***</sup> )	440 (286♂: 154♀ <sup>***</sup> )

\*\*\*  $P > 0,999$ .

В первом эксперименте из 176 оплодотворенных яиц после инкубации на предмет пола анализировали 156 особей (35 задохликов и 121 цыпленок). 20 эмбрионов погибли на ранних стадиях, когда по морфологическим признакам невозможно было определить пол. Половое соотношение равнялось 2♂:1♀ (104 петушка и 52 курочки). Используя критерий  $\chi^2$  для исключения случайности наблюдаемого соотношения, доказали достоверные различия (при  $P > 0,999$ ). Есть некоторые данные литературы, свидетельствующие о дифференциальной летальности

того или иного пола у птиц при воздействии экстремальных факторов. Так, Бондаренко [22] обнаружил, что при хранении яиц наблюдалась преимущественная гибель особей мужского пола, а по данным Li et al. [23], молекулярно-генетический анализ погибших в течение первой недели инкубации зародышей пяти различных пород показал достоверное превышение количества особей женского пола над мужскими. Поскольку в нашем эксперименте анализ раннего отхода не проводился, допустили наихудший вариант, удовлетворяющий гипотезе смещения полового соотношения под влиянием хранения, т. е. всех погибших зародышей, у которых не удалось определить пол, отнесли к самкам. Даже при таком допущении критерий  $\chi^2$  был больше табличного при уровне достоверности вероятности  $P > 0,95$ , что свидетельствует о достоверном смещении полового соотношения у цыплят под влиянием условий хранения.

Во втором эксперименте из 434 анализированных особей 279 оказались петушками и 155 курочками, что соответствует половому соотношению 1,8♂:1♀. Критерий  $\chi^2$  выявил достоверную закономерность неслучайности полученного соотношения ( $P > 0,999$ ). Однако, если, как и в первом случае, допустить, что все погибшие зародыши, у которых по морфологическим признакам не удалось определить пол, относятся к самкам, то значение критерия  $\chi^2$  меньше табличного при достоверности вероятности  $P = 0,95$ . Очевидно, такая ситуация сложилась из-за высокого уровня гибели эмбрионов в первую половину инкубации: если в первом опыте она составляла 11,4% (20 шт.), то во втором — 21,7% (120 шт.).

По результатам двух экспериментов из 590 анализированных особей 383 оказались петушками, а 207 курочками, что составило половое соотношение 1,85♂:1♀. Если допустить, что среди погибших зародышей половое соотношение было на уровне 4,0♀:1,0♂, то и в этом случае наблюдается достоверное смещение пола под влиянием условий хранения ( $P > 0,999$ ).

Чтобы выяснить, является ли наблюдавшаяся закономерность особенностью только породы род-айленд красный, следующий эксперимент проводили на колорсексной популяции «Слобожанский». Птица этой популяции отселекционирована по колорсексингу, что позволяет провести определение пола по окраске оперения в суточном возрасте с точностью 99%. Это обусловлено присутствием аллелей генов серебристости

(S \*S/\*S) и полосатости (BARR \*B/\*B) в гомозиготном состоянии у самцов и в гемизиготном – у самок. Сомнительные варианты, которых может быть не более 1%, имеют промежуточные формы окраски пуха. На рис. 1 представлены характерные окраски самки и самца в суточном возрасте. Пол выведенных цыплят и задохликов определяли по окраске оперения, а затем подтверждали вскрытием и проверкой наличия семенников или яичника.



А

Б

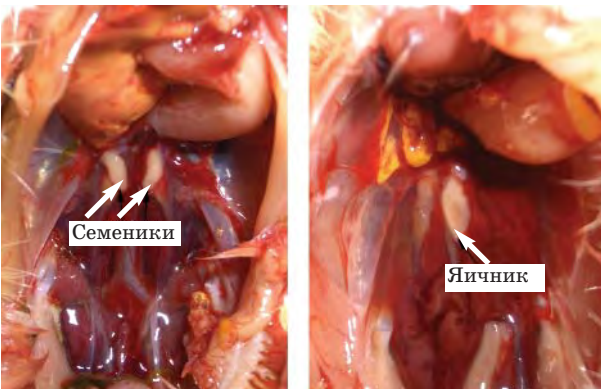


Рис. 1. Окраска самца (А) и самки (Б), характерная для популяции «Слобожанский».

Внизу представлено типичное развитие семенников и яичника у кур в суточном возрасте

Опытные яйца хранили в течение 15 сут, а затем инкубировали при стандартных условиях. В контрольной группе яйца закладывали на инкубацию через 2 сут после сбора. Следует отметить, что явное смещение полового соотношения цыплят породы род-айленд красный наблюдали и после хранения яиц продолжительностью 15 сут (данные не приведены). Результаты инкубации яиц и анализа полового соотношения среди эмбрионов и молодняка представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2. Результаты инкубации яиц популяции «Слобожанский»

Заложено на инкубацию яиц, шт.	Неоплодотворенные, шт.	Кровь-кольцо, шт. (%)	Задохлики, шт (%)	Кондиционный молодняк, голов (%)
Контроль, 86	25	1 (1,6)	9 (14,8)	51 (83,6)
Опыт, 164	29	23 (14,8)	21 (12,8)	86 (63,7)

Сравнение результатов сексирования по окраске оперения в контрольной группе с данными вскрытия показало полное их соответствие. Как следует из представленных в табл. 3 данных, условия хранения яиц колорсексной популяции «Слобожанский» в течение 15 сут не привели к достоверному смещению полового соотношения у молодняка. Наблюдавшиеся отклонения находятся в пределах статистически допустимой ошибки.

Таблица 3. Соотношение полов у молодняка и задохликов из свежих и хранившихся (15 сут) яиц (колорсексная популяция «Слобожанский»)

Заложено на инкубацию яиц, шт.	Задохлики, шт.	Молодняк, голов
Контроль, 60	9 (7♂:2♀)	51 (25♂:26♀)
Опыт, 107	21 (6♂:15♀*)	86 (47♂:39♀)

\* $P > 0,95$ .

В то же время среди отходов инкубации в опытной группе наблюдается статистически достоверное превышение количества самок над самцами: 6♂ и 15♀ ( $P > 0,95$ ), что соответствует картине, описанной в работе Li и др. [23]. Результаты анализа категории «задохликов» (табл. 1) коррелируют с данными, полученными ранее в работе Бондаренко [22]. Среди отходов во второй половине инкубации соотношение полов составило 1,8♂:1♀ ( $P > 0,999$ ). Следует также отметить, что среди курочек по цвету оперения один цыпленок оказался петушком с хорошо развитыми семенниками (рис. 2, А). Является ли это результатом инверсии пола — пока остается под вопросом. При экспериментальном подавлении активности ароматазы наблюдаются переходные формы, характеризующиеся различной степенью развития семенников [24], что не было обнаружено в нашем эксперименте. А среди 47 петушков опытной группы при вскрытии

наблюдали 11 особей (23,4%) со слабо развитыми вторичными половыми признаками (рис. 2, Б).

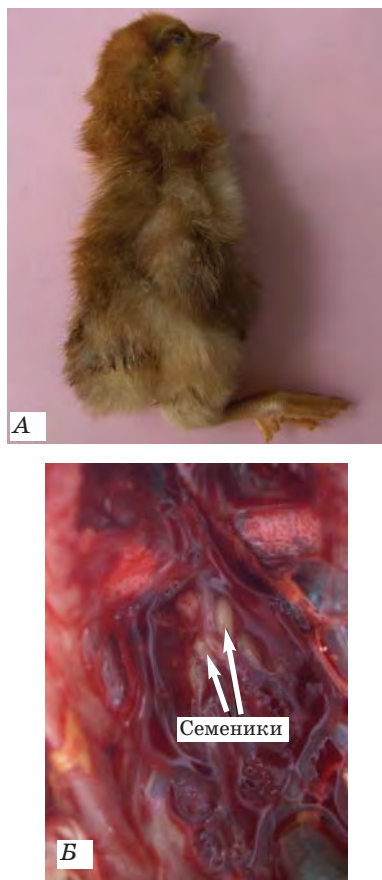


Рис. 2. А — цыпленок, соответствующий по окраске оперения самке, имел хорошо развитые семенники; Б — слабо развитые вторичные половые признаки у самцов, выведенных из яиц после продолжительного хранения

#### **Возможный механизм наблюдавшегося смещения соотношения полов**

В результате проведенных исследований был впервые установлен факт достоверного смещения соотношения полов под влиянием продолжительного хранения яиц у кур породы род-айленд красный, содержащихся в условиях опытного хозяйства «Борки» Института птицеводства НААНУ. Поскольку в контроле соотношение самок и самцов приближается к 1:1, то можно исключить

возможность неравномерного распределения половых хромосом в мейозе, а следовательно, и первичное смещение пола. Как упоминалось выше, вторичное смещение пола за счет инверсии в направлении самка → самец возможно при подавлении активности ароматазы на ранних стадиях развития. Можно предположить, что для нормальной индукции пола самки на определенной стадии развития (у кур это соответствует 3-м сут инкубации) необходим критически минимальный уровень энзима ароматазы, что, возможно, достигается определенной температурой инкубации и степенью развития зародыша. Известно, что после продолжительного хранения эмбрионы развиваются с большим отставанием, особенно в первую, критическую неделю. Несовпадение наблюдавшегося явления на птице популяции «Слобжанский» может свидетельствовать о существовании видо- и породоспецифических аллельных форм ароматазы или гипотетического детерминатора самки на W-хромосоме, по-разному чувствительных к факторам внешней среды.

Таким образом, у птиц, в частности у кур, может наблюдаться статистически достоверное смещение полового соотношения в сторону самцов под влиянием условий хранения яиц.

Наблюдавшееся смещение полового соотношения является характерным признаком породы род-айленд красный, селекцию которой проводят при Институте птицеводства НААНУ.

У разных пород кур может наблюдаться зависимость от пола дифференциальная смертность эмбрионов под влиянием стрессовых факторов. Причина, которая вызывает выборочную летальность того или иного пола, пока еще не выяснена.

Автор выражает искреннюю признательность сотрудникам лаборатории репродукции птиц и других подразделений Института птицеводства НААНУ за оказанную помощь при инкубации яиц, определении пола у суточного молодняка и погибших эмбрионов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Klein S., Flock D., Ellendorff F. Management of newly hatched male layer chicks – current knowledge on sex determination and sex diagnosis in chicken: potential solutions // *W. Poult. Sci. J.* — 2003. — V. 59, N 1. — P. 62–64.
2. Preisinger R. Sex determination in poultry — a primary breeder's view // *Ibid.* — 2003. — V. 59, N 1. — P. 54–58.
3. *Embrex Awarded U.S. Patent for Its Poultry Gender Sort Technology.* USA. Embrex, Inc. (ticker: EMBX, exchange: NASDAQ) News release-8-Mar. — 2001. — 2 p.
4. Пат. 06176119 США, А 01 К 4500. Method for localizing allantoic fluid of avian eggs / Gore A.K., Bryan T. (США); Embrex, Inc. — Заяв. 20. 10. 98; Опубл. 23. 01. 2001. — 2 с.
5. Пат. 06244214 США, А 01 К 4300. Concurrent in ovo injection and detection method and apparatus / Hebrank J.H. (США); Embrex, Inc. — Заяв. 22.12.99; Опубл. 12.06.2001. — 2с.
6. Sarah B. M., Kraak, Ido Pen. Sex Determining Mechanisms in Vertebrates / Sex ratios: concepts and research methods. — Cambridge University Press, 2002. — P. 158–178.
7. Francis R. C., Barlow G. W. Social control of primary sex differentiation in the Midas cichlid // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1993. — N 90. — P. 10673–10675.
8. Holmgren K., Mosegaard H. Implications of individual growth status on the future sex of the European eel // *J. Fish Biol.* — 1996. — N 49. — P. 910–925.
9. Fisher R. A. The genetical theory of natural selection. — Oxford Univ. Press, 1930. — 47 p.
10. Pieau C., Dorizzi M. Oestrogens and temperature-dependent sex determination in reptiles: all is in the gonads // *J. Endocrinol.* — 2004. — N 181. — P. 367–377.
11. Elbrecht A., Smith R. G. Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens // *Science.* — 1992. — N 255. — P. 467–470.
12. Vaillant S., Dorizzi M., Pieau C, Richard-Mercier N. Sex reversal and aromatase in chicken // *J. Exp. Zool.* — 2001. — N 290. — P. 727–740.
13. Smith C. A., Katz M., Sinclair A. H. DMRT1 is up-regulated in the gonads during female-to-male sex reversal in ZW chicken embryos // *Biol. Reprod.* — 2003. — N 68. — P. 560–570.
14. Maraud R., Vergnaud O., Rashedi M. New insights on the mechanism of testis differentiation from the morphogenesis of experimentally induced testes in genetically female chicken embryos // *Am. J. Anat.* — 1990. — N 188. — P. 429–437.
15. Behringer R. R., Finegold M. J., Cate R. L. Mullerian inhibiting substance function during mammalian sexual development // *Cell.* — 1994. — N 79. — P. 415–425.
16. Smith C. A., Smith M. J., Sinclair A. H. Gene expression during gonadogenesis in the chicken embryo // *Gene.* — 1999. — N 234. — P. 395–402.
17. Ferguson M. W. J. Temperature dependent sex determination and growth in reptiles and manipulation of poultry sex by incubation temperature // In Proceedings of the 9th European Poultry Conference in Glasgow. — 1994. — P. 380–382.
18. Ferguson M. W. J. Method of hatching avian eggs // Pat. WO 94/13132. — 1994.
19. *European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.* — N 123. Council of Europe. — Strasbourg, 18/03/1986.
20. Тагіров М. Т., Шомина Н. В., Артеменко А. Б. и др. Инкубация яєц сєльськохозяєственной птицы. — Харьков, 2009. — 132 с.
21. Бондаренко Ю. В. Современные методы определения пола молодняка сєльськохозяєственной птицы (теория и практика). — Харьков, 2004. — 71 с.
22. Бондаренко Ю. В. Дифференциальная смертность особей мужского и женского пола у кур // Науч.-тех. бюл. Укр. НИИ птицеводства УААН. — Харьков. — 1986. — № 20. — С. 3–6.
23. Li W. M., Feng Y. P., Zhao R. X. et al. Sex Ratio Bias in Early-Dead Embryos of Chickens Collected During the First Week of Incubation // *Poult. Sci.* — 2008. — N 87. — P. 2231–2233.
24. Yang X., Zheng J., Na R. et al. Degree of Sex Differentiation of Genetic Female Chicken Treated with Different Doses of an Aromatase Inhibitor // *Sex Dev.* — 2008. — N 2. — P. 309–315.

### ЗМІЩЕННЯ СТАТЕВОГО СПІВВІДНО- ШЕННЯ У КУРЕЙ ПІСЛЯ ДОВГОТРИВА- ЛОГО ЗБЕРІГАННЯ ЯЄЦЬ

*М. Т. Тагіров*

Інститут птахівництва НААНУ  
Борки, Зміївський район,  
Харківська область

*E-mail: tagirov-m@yandex.ru*

Встановлено, що під час інкубації яєць курей породи род-айленд червоний після тривалого зберігання (15–21 доба) спостерігається достовірне зміщення статевого співвідношення в бік формування самців. Як серед добового молодняку, так і серед загиблих протягом другої половини інкубації зародків кількість самців практично в два рази більша порівняно із самками. Висунуто гіпотезу про можливість існування в різних популяціях курей алельних форм ензиму ароматази або жіночого фактора на *W*-хромосомі з різною чутливістю до зовнішнього впливу (температура, тривале зберігання і т. д.), що може призвести до вторинного зміщення статевого співвідношення.

**Ключові слова:** кури, статеві хромосоми, інверсія статі, зберігання яєць, сімєнники, яєчник.

### CHICKEN SEX RATIO SHIFT UPON LONG TERM EGG STORAGE

*M. T. Tagirov*

Poultry Institute of Ukrainian Academy  
of Agricultural Sciences,  
Borki of Zmiivskiy region, Kharkiv region

*E-mail: tagirov-m@yandex.ru*

Statistically significant shift of sex ratio towards the formation of males upon incubation of Rod-Island Red breed hen's eggs after the long term storage period was observed. As among the day old chickens and embryos died during the second part of incubation the number of males exceeded that of females practically two times. A hypothesis about possible existence of allele forms of an enzyme aromatase or of a female factor on the *W* chromosome differently sensitive to the environmental factors (temperature, long term storage etc.) in various bird populations is suggested, which in turn may lead to the secondary shift of sex ratio.

**Key words:** bird, sex chromosomes, sex inversion, egg storage, testicles, ovary.