

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
VETERINÁRIAS**

**Josué Moura Romão**

**Avaliação da temperatura, umidade e vacinação *in ovo* na incubação artificial de ovos de codornas japonesas (*Coturnix japonica*)**

**Fortaleza – CE**

**2008**

**Josué Moura Romão**

**Avaliação da temperatura, umidade e vacinação *in ovo* na incubação artificial de ovos de codornas japonesas (*Coturnix japonica*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

**Linha de Pesquisa:** Reprodução e sanidade de carnívoros, onívoros, herbívoros e aves.

**Orientador:** Prof. Dr. William Cardoso Maciel

**Fortaleza – CE**

**2008**

R756a Romão, Josué Moura

Avaliação da temperatura, umidade e vacinação *in ovo* na incubação artificial de ovos de codornas japonesas (*Coturnix japonica*)/ Josué Moura Romão. \_\_ Fortaleza, 2008.

99p.; il.

Orientador: Prof. Dr. William Cardoso Maciel

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) –  
Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária

1. Temperatura. 2. Umidade. 3. Vacinação *in ovo*. 4.  
Codorna japonesa. 5. Ovos. I. Universidade Estadual do  
Ceará, Faculdade de Veterinária

CDD: 636.5

**Josué Moura Romão**

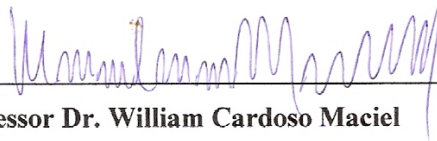
**Avaliação da temperatura, umidade e vacinação *in ovo* na incubação artificial de ovos de codornas japonesas (*Coturnix japonica*)**

Dissertação Aprovada em: 17 de Outubro de 2008

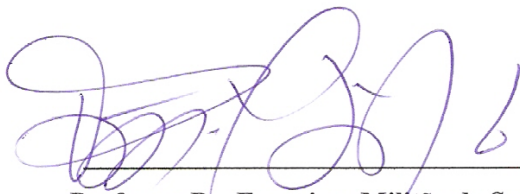
Conceito: Aprovado com Louvor

Nota: 10,0 (Dez)

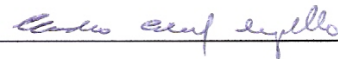
**Banca Examinadora**



**Professor Dr. William Cardoso Maciel**  
Orientador-UECE



**Professor Dr. Francisco Militão de Sousa**  
Examinador-UECE



**Professor Dr. Cláudio Cabral Campello**  
Examinador-UECE

## DEDICATÓRIA

Dedico

A Deus, criador do universo, fonte de sabedoria e amor,  
aos meus dedicados e valorosos pais, Maria Socorro e Antônio Jesualdo,  
à minha amada esposa, Thania,  
aos meus bons irmãos, Vinícius e Filipe,  
por sempre estarem do meu lado e sem os quais eu não seria feliz.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Ceará - UECE, por ter me proporcionado a chance de galgar mais uma etapa na minha vida acadêmica.

À Faculdade de Veterinária - FAVET, pelo apoio incomensurável a essa conquista.

Ao Laboratório de Estudos Ornitológicos - LABEO, pela oportunidade de conhecer o maravilhoso mundo das aves e da pesquisa científica.

À Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa - FUNCAP, que proveu apoio financeiro durante a realização do curso de mestrado, sob a forma de bolsa de estudos colaborando para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. William Cardoso Maciel, por sua orientação desde o início da minha graduação e pela confiança depositada nas minhas atividades de pesquisa científica.

Ao professor Francisco Militão de Sousa, meu co-orientador por suas idéias sobre pesquisa e como enxergar novos e mais amplos horizontes na área da Avicultura.

Ao professor Cláudio Cabral Campello por sua ajuda técnica no ensino da estatística e pesquisa tanto em aulas como em situações práticas, mas principalmente pelo seu apoio em situações da vida em que seus conselhos baseados na experiência e na moralidade foram de grande valia para o meu progresso.

Ao Régis Siqueira de Castro Teixeira, nobre e mais antigo companheiro de trabalhos, sempre presente e pelo qual cultivo grande apreço e amizade.

A Thania Gislaine Vasconcelos de Moraes, pela indispensável companhia na execução de todos os trabalhos de pesquisa, sempre incansável, curiosa, disciplinada e pela sua dedicação incondicional a todos os aspectos da minha vida pessoal e profissional.

Ao Adonai Aragão de Siqueira, pelo companheirismo no laboratório e nas aulas, trabalhos da faculdade e todos estes anos de pesquisa científica.

À Doutora Rosa Patrícia Ramos Salles pela prestimosa colaboração nas etapas de seminário, qualificação, como também na realização de testes sorológicos.

Aos meus bons amigos do Laboratório de Estudos Ornitológicos, José Daniel Moraes de Andrade, Emanuella Evangelista da Silva, Samuel Bezerra de Castro, Camila Muniz Cavalcanti, Wesley Lyeverton Correia Ribeiro, Átilla Holanda de Albuquerque e Elisângela de Souza Lopes, Ricardo José Pimenta Felício Sales pelo apoio nas atividades acadêmicas e a sempre agradável e divertida companhia.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias Faculdade de Veterinária - FAVET pelos valiosos ensinamentos, desde o que se deve

fazer ao que não se deve fazer na pesquisa científica como também na profissão de médico veterinário através de aulas, conversas e exemplos.

Ao Sr. Francisco Alves e Senhora Mairly, pela receptividade e apoio na Granja Sacha, sendo de fundamental importância para o aprofundamento dos meus conhecimentos em avicultura e principalmente em incubação artificial.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para que obtivéssemos êxito neste trabalho.

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                 |   |
|-----------------|---|
| °C              | Graus Celsius                                   |
| pH              | Potencial Hidrogeniônico                        |
| UR              | Umidade Relativa                                |
| cm              | Centímetro                                      |
| cm <sup>2</sup> | Centímetro quadrado                             |
| m <sup>2</sup>  | Metro quadrado                                  |
| g               | Gramma  |
| h               | Hora  |
| n               | número  |
| P               | Probabilidade                                   |
| DN              | Doença de Newcastle                             |
| LABEO           | Laboratório de Estudos Ornitológicos            |
| IBGE            | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| SD              | Standard Deviation                              |
| ND              | Newcastle disease                               |
| NDV             | Newcastle disease vírus                         |
| RH              | Relative Humidity                               |

## LISTA DE FIGURAS

|  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| Capítulo 1   |               |
| Figure 1 Chick/egg weight ratio (%) of Japanese quail eggs incubated in different temperatures   | 37            |
| Figure 2 Hatch time of Japanese quail eggs incubated in different temperatures   | 38            |
| Capítulo 2   |               |
| Figure 1 Total and fertile hatchability of Japanese quail eggs incubated at different humidities   | 51            |
| Figure 2 Relation chick/egg weight of Japanese quail eggs incubated at different relative humidities   | 52            |
| Capítulo 3   |               |
| Figure 1 Hatchability of Japanese quail eggs submitted to different protocols of in ovo injection at various days of incubation                  | 66            |
| Figure 2 Egg weight loss of Japanese quail eggs submitted to different protocols of in ovo injection at various days of incubation               | 68            |
| Figure 3 Hatch weight of Japanese quails submitted to different protocols of in ovo injection at various days of incubation                      | 70            |
| Figure 4 Frequency of embryo mortality of Japanese quail eggs submitted to different protocols of in ovo injection at various days of incubation | 71            |

## LISTA DE TABELAS

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>Revisão de Literatura</b>  |               |
| Tabela 1 Produção mundial de codornas japonesas   | 15            |
| <b>Capítulo 1</b>   |               |
| Table 1 Total and fertile hatchability of Japanese quail eggs incubated in different temperatures             | 36            |
| Table 2 Classification of Japanese quail eggs that failed to hatch after incubation in different temperatures | 39            |
| <b>Capítulo 2</b>   |               |
| Table 1 Weight loss of Japanese quail eggs incubated at different humidities                                  | 51            |
| Table 2 Classification of unhatched eggs incubated at different humidities                                    | 53            |

## RESUMO

A incubação é fundamental para a manutenção e expansão da coturnicultura. Esta pesquisa objetivou estudar fatores que influenciam sobre desempenho da incubação de ovos de codornas: temperatura, umidade e vacinação *in ovo*. Foram realizados três experimentos. O primeiro verificou os efeitos da temperatura de incubação sobre a eclodibilidade, peso ao nascer, tempo de nascimento e mortalidade embrionária. 800 ovos foram divididos em oito grupos e incubados em diferentes temperaturas (34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 e 41°C). As demais condições foram idênticas para todos os grupos, 60% de umidade relativa e viragem a cada 2 horas. No segundo verificou-se os efeitos da umidade durante a incubação de ovos de codornas japonesas sobre a eclodibilidade, perda de peso do ovo, peso ao nascer e mortalidade embrionária. 300 ovos foram divididos em três tratamentos: umidade baixa (36,05%), intermediária (52,25%) e elevada (76,50%). As demais condições foram idênticas para todos os grupos, 37,5°C de temperatura e viragem a cada 30 minutos. O terceiro experimento avaliou os efeitos dos procedimentos de vacinação *in ovo* na incubação dos ovos. Utilizou-se um delineamento fatorial 4x4 com 17 tratamentos (4 dias de injeção x 4 protocolos de injeção, mais um grupo controle). As injeções foram realizadas nos dias 0, 5, 10 ou 15 de incubação. Em cada dia, os ovos foram injetados com 4 protocolos diferentes: injeção de soro fisiológico com ou sem vedação da casca e injeção da vacina viva da doença de Newcastle (DN) com soro ou diluente industrial. Os ovos foram incubados a 37,5°C e 60% UR. Todos os ovos e codornas nascidas foram pesados. Os ovos não eclodidos foram submetidos ao embriodiagnóstico. As codornas nascidas foram submetidas à coleta de sangue para mensuração de anticorpos contra o vírus da DN. Os resultados mostraram que a eclodibilidade foi maior para os ovos incubados a 37 e 38°C; com 76,67 e 80,76%, respectivamente. Os ovos incubados a 34°C não eclodiram, a 35 e 41°C apresentaram eclodibilidade muito baixa. As outras temperaturas proporcionaram eclodibilidade entre 50,33 e 57,73%. Os pesos ao nascer foram elevados nos grupos incubados a 38-41°C em relação a 35-37°C. Observou-se uma relação inversamente proporcional de temperatura e tempo de incubação até 39°C. Os embriões foram resistentes a altas temperaturas até 40°C na fase inicial da incubação, já nos estágios finais com altas temperaturas (39-41°C) houve elevados índices de mortalidade. Os ovos incubados em baixa umidade apresentaram alta eclodibilidade (79%) quando comparados aos incubados em umidade intermediária e elevada. A perda de peso dos ovos foi, respectivamente, 11,96%; 8,94%; e 4,89% para baixa, intermediária e elevada umidade de incubação. O peso ao nascer foi influenciado pelas diferentes umidades de incubação. A inoculação em si (soro com/sem vedação) não foi prejudicial para os ovos com 10 e 15 dias de incubação. Verificou-se que a vacinação *in ovo* com o vírus vivo da DN (cepa HB1) não é recomendada para ovos férteis de codorna em nenhuma idade do embrião, devido aos elevados índices de mortalidade embrionária e pouca resposta de anticorpos após o nascimento.

**Palavras-chave:** temperatura, umidade, vacinação *in ovo*, codorna japonesa, ovos

## ABSTRACT

Incubation is fundamental to expansion and maintenance of quail production. This research aimed to study factors that influence on performance of Japanese quail incubation: temperature, humidity and *in ovo* vaccination. Three experiments were carried out. The first verified the effects of temperatures on hatchability, hatch weight, hatch time and embryo mortality. 800 eggs were divided into eight experimental groups incubated at different temperatures (34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 and 41°C). The other incubation conditions were identical for all groups, 60±5% of relative humidity and egg turning every two hours until transference. The second experiment aimed to verify the effect of relative humidity during incubation of Japanese quail eggs on hatchability, egg weight loss, hatch weight, and embryo mortality. 300 eggs were divided into three experimental groups: low humidity (36.05%), intermediate (52.25%) and high (76.50%). The other incubation conditions were identical for all groups, 37.5°C of temperature and egg turning every 30 minutes until transference. The third experiment aimed to evaluate the effects of *in ovo* vaccination procedures on incubation of Japanese quail eggs. The experiment was carried out in a factorial design (4x4) with 17 experimental treatments (4 injection days x 4 injection protocols, plus 1 control group). The injections were tested at four incubation days: at 0, 5, 10 or 15. At each day, the eggs were submitted to four distinct injection procedures: saline injection with or without egg sealing and Newcastle disease (ND) vaccine plus saline or industrial diluent, both without sealing. The eggs were incubated at 37.5° C and 60% RH. All eggs and hatched quails were weighted. Unhatched eggs were opened to classify embryo mortality. Hatched quail were bled to evaluate antibody response. The results showed that hatchability was higher for eggs incubated at 37 and 38°C, 76.67 and 80.76%, respectively. Eggs incubated at 34°C did not hatch and at 35 and 41°C showed very poor hatchability. The other temperatures had hatch rates from 50.33 to 57.73%. There were higher hatch weights in eggs incubated at 38-41°C compared to those at 35-37°C. The higher temperature became the smaller hatch time was. This relation was observed until 39°C. Embryos seemed to be resistant to embryo death in high temperatures until 40°C at the early period of incubation, however the same was not observed at the later stages when high temperatures (39-41°C) promoted elevated levels of embryo mortality. It was verified that Japanese quail eggs incubated at the lower humidity presented the highest level of hatchability (79%) compared to intermediate and high humidities. Egg weight loss was respectively 11.96%, 8.94%, and 4.89% for low, intermediate and high humidity groups. Furthermore, the weight at hatch was influenced by the different humidities. The injection process itself (saline with/without sealing) was not harmful for eggs at 10 and 15 days of incubation for Japanese quail eggs, however *in ovo* vaccination with live ND vaccine (HB1 strain) is not recommended to fertile quail eggs at any incubation periods due to high levels of embryo mortality and poor post-hatch antibody titers.

**Key words:** temperature, humidity, *in ovo* vaccination, Japanese quail, eggs

## SUMÁRIO

|  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>                             | 5             |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>                                  | 6             |
| <b>LISTA DE TABELAS</b>                                  | 7             |
| <b>RESUMO</b>  | 8             |
| <b>ABSTRACT</b>  | 9             |
| <b>SUMARIO</b>   | 10            |
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>                                      | 12            |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>                           | 14            |
| 2.1 Codornas   | 14            |
| 2.1.1 Coturnicultura                                     | 14            |
| 2.1.2 Codorna Japonesa                                   | 15            |
| 2.1.3 Pesquisas com codornas japonesas                   | 16            |
| 2.2 Componentes do ovo na incubação                      | 16            |
| 2.2.1 Cutícula   | 16            |
| 2.2.2 Casca  | 17            |
| 2.2.3 Membranas da casca                                 | 17            |
| 2.2.4 Albúmen  | 18            |
| 2.2.5 Gema   | 19            |
| 2.3 Aspectos físicos e biológicos pré-incubação          | 20            |
| 2.3.1 Temperatura e umidade relativa durante a estocagem | 20            |
| 2.3.2 Idade das aves, peso do ovo e genética             | 20            |
| 2.3.3 Período de estocagem                               | 23            |
| 2.4 Aspectos da incubação artificial                     | 24            |
| 2.4.1 Temperatura da incubação                           | 24            |
| 2.4.2 Umidade relativa do ar                             | 25            |
| 2.4.3 Viragem do ovo                                     | 26            |
| 2.4.4 Perda de água do ovo                               | 26            |
| 2.4.5 Mortalidade embrionária                            | 27            |
| 2.4.6 Vacinação <i>in ovo</i>                            | 28            |
| <b>3 JUSTIFICATIVA</b>                                   | 29            |
| <b>4 HIPÓTESE CIENTÍFICA</b>                             | 30            |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| <b>5</b>  | <b>OBJETIVO</b>  | 31 |
| <b>6</b>  | <b>CAPÍTULO 1</b> “Effect of temperature on incubation of Japanese quail eggs: hatchability, hatch weight, hatch time and embryo mortality”          | 32 |
|           | Resumo   | 32 |
|           | Abstract   | 33 |
|           | Introduction   | 34 |
|           | Material and Methods   | 34 |
|           | Results  | 36 |
|           | Discussion   | 40 |
|           | Conclusion   | 42 |
|           | References   | 43 |
| <b>7</b>  | <b>CAPÍTULO 2</b> “Effect of relative humidity on incubation of Japanese quail eggs”   | 47 |
|           | Resumo   | 47 |
|           | Abstract   | 48 |
|           | Introduction   | 49 |
|           | Material and Methods   | 50 |
|           | Results  | 51 |
|           | Discussion   | 53 |
|           | References   | 56 |
| <b>8</b>  | <b>CAPÍTULO 3</b> “Effect of <i>in ovo</i> vaccination procedures on Japanese quail embryos ( <i>Coturnix japonica</i> ) and incubation performance” | 60 |
|           | Resumo   | 60 |
|           | Summary  | 61 |
|           | Introduction   | 62 |
|           | Material and Methods   | 63 |
|           | Results and Discussion   | 66 |
|           | Conclusion   | 73 |
|           | References   | 74 |
| <b>9</b>  | <b>CONCLUSÕES GERAIS</b>   | 78 |
| <b>10</b> | <b>PERSPECTIVAS</b>  | 79 |
| <b>11</b> | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>  | 80 |

## 1. INTRODUÇÃO

A coturnicultura é uma atividade avícola que está consolidada no Brasil, como também no Estado do Ceará. A produção de codornas que anteriormente era voltada principalmente para a produção de ovos, passou a explorar também a produção de aves para o abate. Ao longo dos últimos anos, a produção vem crescendo continuamente e o setor tornando-se cada vez mais tecnificado e dinâmico.

Para a manutenção, como também expansão desta atividade é necessária a realização de estudos científicos para uma melhor compreensão da biologia das codornas japonesas e assim possibilitar um aperfeiçoamento das técnicas empregadas seja no campo da genética, nutrição, manejo ou reprodução.

A incubação artificial é uma das principais etapas de todo o manejo produtivo da criação industrial de codornas. Entretanto esta foi desenvolvida baseada, principalmente, nos estudos realizados para outra espécie avícola, a galinha. Essas espécies, apesar de pertencerem à mesma ordem zoológica (*Galliformes*) e possuírem elevada aptidão produtiva, apresentam importantes diferenças morfológicas e fisiológicas. As codornas iniciam a postura mais precocemente que as galinhas, possuem peso corporal que chega a ser dez vezes menor que as galinhas, peso de ovos cinco vezes menor, tempo de incubação de quatro dias a menos e diferente pigmentação dos ovos, além de diversas outras características diferenciais.

As diferenças morfológicas e fisiológicas encontradas entre as duas espécies podem influenciar nas técnicas de incubação empregadas para as mesmas, sendo necessária à realização de pesquisas para o desenvolvimento de técnicas específicas para as necessidades biológicas das codornas japonesas.

Fatores como a temperatura, que é considerada como o principal fator da incubação pode ser estudado para a determinação dos melhores níveis para a incubação de ovos de codorna, levando em conta que o calor metabólico produzido por codornas por conta do tamanho do ovo é diferenciado do de galinhas e de outras espécies com tamanhos de ovos maiores. Da mesma forma, a umidade relativa está entre os principais fatores da incubação artificial, sendo fundamental para a manutenção da regulação hídrica dos embriões em desenvolvimento.

A vacinação *in ovo* é uma técnica que vem sendo utilizada na incubação de ovos de galinhas e perus para a imunização contra doenças e tem apresentado bastante sucesso. Em codornas esta técnica não é realizada e ainda não se sabe o efeito da mesma

na incubação desta espécie. Entretanto com o aumento da produção e tecnificação da coturnicultura no Brasil, torna-se interessante o estudo desta técnica para ovos de codornas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Codornas

#### 2.1.1 Coturnicultura

A produção e o consumo de ovos de codorna têm evoluído nos últimos anos (FRIDRICH e col., 2005), isso porque é uma excelente alternativa para a alimentação humana, podendo ser utilizada tanto para a produção de ovos como para a de carne (OLIVEIRA e col., 2002). Dessa forma, a coturnicultura inicia uma nova fase no Brasil, superando o período de amadorismo e solidificando-se como uma exploração industrial. A sua expansão merece destaque devido à geração de empregos, ao uso de pequenas áreas, ao baixo investimento, ao rápido retorno do capital e como fonte de proteína animal para a população (LEANDRO e col., 2005). A coturnicultura, mais especificamente a criação de codornas japonesas (*Coturnix japonica*), vem despertando a atenção e o interesse de pesquisadores da área avícola no sentido de desenvolver trabalhos que venham contribuir para maior aprimoramento e fixação desta exploração como fonte rentável na produção avícola (FURLAN e col., 1998).

A criação da codorna japonesa, destinada à produção de ovos e carne, tem tido importância relativa em vários países. A popularidade da criação de codornas no Brasil vem do pequeno porte, baixo custo, reduzido período para as aves atingirem a maturidade sexual e boa aceitação da carne e ovos pelos consumidores brasileiros. Devido a todos esses fatores, associado à boa produtividade e fácil manejo, SHANAWAY (1994) cita que a codorna é uma solução prática para o problema da escassez de proteína animal em países em desenvolvimento e uma boa alternativa para substituir a galinha em países desenvolvidos. Outro fator positivo relacionado à coturnicultura é a sua maior eficiência na conversão de ração em ovos comparados com as galinhas poedeiras comerciais (THIYAGASUNDARAM, 1989). No Brasil e no Japão, predomina a produção de ovos, já na França, Itália, Espanha e Grécia, a produção de carne (MURAKAMI e FURLAN, 2002). Segundo CHENG (2002), durante as últimas quatro décadas, outros países como a China, Coréia, Índia, Hungria, Polônia, Estônia, Rússia, República Checa, Eslováquia, Arábia Saudita e Estados Unidos (Sudeste) desenvolveram a criação comercial de codornas.

A criação de codornas no Brasil vem merecendo destaque nesses últimos anos e vem apresentando uma evolução constante dentro do setor avícola, com a melhoria da qualidade dos produtos e a redução dos custos por parte das empresas (FUJIKURA, 2004). A produção de ovos de codorna alcançou 92,5 milhões de dúzias no ano de 2002, perfazendo 5.572.068 aves e gerando uma receita de 48 milhões de reais (IBGE, 2002).

No Brasil, verifica-se um maior plantel de codornas na região Sudeste com 58,9%, em seguida a região Sul com 16,33%, região Nordeste com 15,96%, região Centro-Oeste com 5,96% e região Norte com 2,85% (IBGE, 2002). O Estado de São Paulo é o maior produtor de codornas, possuindo uma população aproximada de 2,5 milhões de aves entre pequenos, médios e grandes criadores.

O Estado do Ceará ocupa a sétima colocação na produção nacional, junto com a Bahia, possuindo uma população de 250 mil aves entre pequenos e médios criadores (FUJIKURA, 2002). A Coturnicultura cearense está em franco desenvolvimento, no entanto, ainda carece de material técnico e pessoal especializado para tornar esse ramo ainda mais competitivo.

Tabela 1. Produção mundial de codornas japonesas.

| <b>Tipo de produção</b> | <b>País</b>    | <b>Número de aves ( x 10<sup>6</sup>)</b> |
|-------------------------|----------------|---|
| <b>Carne</b>            | Brasil         | 6   |
|                         | China          | 25  |
|                         | França         | 50  |
|                         | Índia          | 5   |
|                         | Japão          | 3   |
|                         | Espanha        | 55  |
|                         | Estados Unidos | 25  |
| <b>Ovos</b>             | Brasil         | 1700                                      |
|                         | China          | 7000                                      |
|                         | Estônia        | 7   |
|                         | França         | 60  |
|                         | Hong-Kong      | 144                                       |
|                         | Japão          | 1800                                      |
|                         | Singapura      | 9   |

### 2.1.2 Codorna Japonesa

A codorna comum (*Coturnix coturnix*) é amplamente distribuída na Europa, África e Ásia, mas todas as codornas domesticadas derivam das codornas japonesas, inicialmente classificadas como uma subespécie, mas agora considerada como uma espécie propriamente (*Coturnix japonica*). Estas aves foram inicialmente domesticadas por volta de 1000 anos antes de Cristo e criadas pelo seu canto, mas a seleção sistemática para melhoria da produção de ovos e carne foi iniciada no Japão há apenas

100 anos. Uma grande introdução destas aves foi realizada na América do Norte e Europa durante a década de 1950. O peso das aves selvagens era em torno de 100g, sendo que as fêmeas eram ligeiramente maiores que os machos. A forma domesticada das codornas japonesas é bastante semelhante na plumagem, como também na aparência geral, mas devido à seleção para aumento do tamanho, atualmente estas aves podem pesar até 250g. O número de ovos produzidos também aumentou substancialmente e, como na galinha doméstica, as codornas japonesas estão começando a divergir em linhagens especializadas para a produção de ovos ou para a produção de carne (APPLEBY e col., 2004).

No Brasil há a ocorrência destas duas linhagens, e a selecionada para produção de carne é chamada de codorna Européia ou codorna Italiana (MÓRI e col., 2005). Estas linhagens são muito similares na plumagem e na aparência geral, contudo elas apresentam diferentes pesos corporais e diferentes tamanhos dos ovos. O peso corporal da linhagem para postura é, em média, 105g para os machos e 130g para as fêmeas com 8 semanas de idade (AGGREY e col., 2003), e 10,8g é o peso médio de seus ovos (PINTO e col., 2002). O peso corporal das codornas de corte é, em média, 182g para machos, 221g para fêmeas às 7 semanas de idade (OLIVEIRA e col., 2002), e 13,12g é a média de peso de seus ovos (MÓRI e col., 2005).

### **2.1.3 Pesquisas com codornas japonesas**

As codornas japonesas não podem ser consideradas entre os principais animais de produção em nível mundial (MINVIELLE, 2004). Entretanto as codornas possuem uma presença significativa para a pesquisa científica avícola. Isto se justifica pelas importantes características que essa espécie possui para a pesquisa, desta forma os trabalhos relacionados a elas se expandiram de temas basicamente relacionados à avicultura para outras áreas da biologia e medicina. Pelo fato dessas aves poderem ser mantidas em quantidade relativamente grande em pequenas instalações, elas vêm sendo utilizadas desde pesquisas em embriologia até pesquisas espaciais (ORBAN e col., 1999).

## **2.2 Componentes do ovo na incubação**

### **2.2.1 Cutícula**

Durante o desenvolvimento do ovo das aves, uma fina camada ou filme transparente chamando de cutícula é depositado sobre a superfície do ovo. A cutícula

consiste de aproximadamente 90% de proteínas, pouco carboidrato e pequena quantidade de lipídeos (SIMONS, 1971).

A cutícula seca imediatamente após a oviposição, tornando-se uma barreira contra invasões bacterianas e perda de água do ovo (SIMONS, 1971). Entretanto antes da oviposição a cutícula apresenta permeabilidade. Desta forma ela só se transforma de uma barreira permeável para uma barreira semipermeável pelo processo de secagem logo após a oviposição. Estudos relatam que a cutícula contribui para a conservação de água no ovo de forma diferente em diferentes umidades (BOARD e HALLS, 1973). Logo, acredita-se que esta estrutura muda suas propriedades por influência da umidade relativa externa. As características funcionais da cutícula durante o início do período de incubação também se modificam com a idade da ave passando de uma significativa barreira para a perda de água para uma facilitadora da mesma (PEEBLES e BRAKE, 1986).

### **2.2.2 Casca**

A maior parte da casca do ovo consiste de cristais de carbonato de cálcio. Cerca de 2 a 3% desta camada calcificada é composta de uma matriz orgânica composta principalmente de proteínas (TAYLOR, 1970). Os poros da casca do ovo atravessam essa camada para permitir a difusão dos gases (BURLEY e VADEHRA, 1989).

Aves jovens produzem ovos com a casca mais espessa e poros mais longos que as aves mais velhas (BRITTON, 1977; PEEBLES e BRAKE, 1987). A melhor eclodibilidade de ovos é encontrada quando as aves estão no meio do ciclo de postura quando a espessura da casca é a menor e a porosidade é a maior (PEEBLES e BRAKE, 1987). A casca do ovo geralmente se torna mais fina com o avançar da idade (ROLAND, 1976), mas pode tornar-se mais espessa em lotes de aves muito velhas caso a produtividade de ovos se reduza em relação ao consumo de cálcio (PEEBLES e BRAKE, 1987). A porosidade da casca tende a ser a menor no início e no fim do ciclo de postura (PEEBLES e BRAKE, 1987) quando geralmente a eclodibilidade se encontra baixa.

### **2.2.3 Membranas da Casca**

Dentro da casca do ovo se encontram duas membranas, a interna e a externa. Estas possuem espessuras diferentes e estão em íntimo contato exceto na região da parte larga do ovo, onde as duas se separam para formar a câmara de ar. As membranas da

casca consistem de uma mistura de proteínas e glicoproteínas (BURLEY e VADEHRA, 1989).

As membranas da casca funcionam retendo o fluido do albúmen e promovendo resistência à invasão bacteriana (BURLEY e VADEHRA, 1989).

Em relação à penetração bacteriana, as membranas agem como um filtro, sendo a membrana interna da casca mais impermeável às bactérias do que a própria casca. No entanto, a resistência das membranas pode ser rapidamente quebrada quando um pesado inóculo bacteriano é usado e, especialmente, quando os ovos são mantidos a 37° C. Microorganismos podem ser recuperados da superfície interna da membrana interna da casca minutos após o desafio (WILLIAMS e col., 1968). O crescimento bacteriano nas próprias membranas da casca será restrito se o ferro ( $\text{Fe}^{++}$ ) estiver indisponível ou deficiente.

#### **2.2.4 Albúmen**

O albúmen posiciona a gema e o blastoderma no centro do ovo impedindo o seu contato com a casca logo após a postura do ovo. A qualidade do albúmen diminui com a estocagem (HURNIK e col., 1978) e com a idade da ave (BURLEY e VADEHRA, 1989). A quantidade de proteína também sofre redução com a idade da ave (CUNNINGHAM e col., 1960).

Na oviposição, as proteínas do albúmen possuem várias defesas não específicas antimicrobianas e possivelmente antivirais (BURLEY e VADEHRA, 1989) contra microorganismos que podem invadir o ovo imediatamente após a oviposição, antes da secagem da cutícula e antes que as modificações estruturais das membranas da casca tenham ocorrido completamente. O pH do albúmen na oviposição é de aproximadamente 7,6, sendo ligeiramente mais básico que o fluido uterino (ARAD e col., 1989) e pode se elevar para 9 com a perda do dióxido de carbono dissolvido (STERN, 1991). A capacidade tamponante do albúmen é mais fraca entre o pH de 7,5 e 8,5 (COTERILL e col., 1959), o que contribui para o rápido aumento na perda de dióxido de carbono. Este aumento no pH provavelmente limita as propriedades antimicrobianas das proteínas do albúmen (VOET e VOET, 1990), entretanto estas são compensadas pelo aparecimento de um pH pouco favorável para o crescimento bacteriano, pois estas apresentam uma melhor faixa de crescimento entre o pH de 6,5 e 7,5 (CASE e col., 1989). Além disso, a mudança no pH pode reduzir os efeitos prejudiciais das proteínas bactericidas sobre o blastoderma.

A liquefação do albúmen provavelmente serve para liberar macromoléculas, glicose e íons essenciais e facilita a movimentação destes para o blastoderma (SPRATT, 1948; BURLEY e VADEHRA, 1989). Além disso, a liquefação pode agir reduzindo a barreira para a difusão dos gases promovida pelo albúmen (MEUER e BAUMANN, 1988).

### **2.2.5 Gema**

A gema é formada pelo ovário e é composta de aproximadamente 50% de água e 30% de lipídeos, com o restante sendo formado principalmente por proteínas. Estes constituem a maior parte dos nutrientes necessários para o desenvolvimento do embrião, com exceção das partes oriundas do albúmen e da casca. O blastoderma é posicionado sobre a gema dentro do núcleo de Pander e abaixo da camada perivitelínica (ROMANOFF, 1960).

A camada perivitelínica que recobre a gema é composta de 80 a 90% de proteínas e está dividida em três partes: camada externa, camada contínua e camada interna (BURLEY e VADEHRA, 1989). A camada perivitelínica contém proteínas com atividade antibacteriana e também representa uma barreira física contra a invasão de microorganismos (BURLEY e VADEHRA, 1989). O peso e o volume da gema aumentam com a idade da ave (CUNNINGHAM e col., 1960).

À medida que os ovos envelhecem após a postura, a camada perivitelínica torna-se mais fraca e mais elástica e alguns de seus componentes são modificados ou removidos (FASENKO e col., 1995). As modificações de peso, em proteínas da membrana perivitelínica estão associadas ao aumento do pH do albúmen. Estes efeitos podem ser inibidos com a aplicação de óleo sobre a casca do ovo e podem ser aumentados com o aumento da taxa da elevação do pH do albúmen (FROMM, 1967). O pH da gema é de aproximadamente 6,0 e não contém dióxido de carbono dissolvido, mas a adição de dióxido de carbono no ambiente de estocagem promove uma redução na movimentação de água do albúmen para a gema (ROMANOFF e ROMANOFF, 1949). De forma semelhante, a redução na temperatura de estocagem retarda a movimentação de água do albúmen para a gema (MUELLER, 1959). Tanto a temperatura como o pH afetam a qualidade do albúmen. A redução na resistência da camada perivitelínica observada durante a estocagem tem sido associada à dissolução da camada da chalaza do albúmen que ocorre em estocagens de longos períodos, ao contrário de estocagens de ovos de pouca duração.

## **2.3 Aspectos físicos e biológicos pré-incubação**

### **2.3.1 Temperatura e umidade relativa durante a estocagem**

A melhor eclodibilidade após longos períodos de estocagem (>14 dias) é obtida quando a temperatura de estocagem se encontra em torno de 12°C (OLSEN e HAYNES, 1948; FUNK e FORWARD, 1960), mas 15°C é melhor para ovos estocados por oito dias enquanto 18°C é recomendado para aqueles estocados por dois dias (KIRK e col., 1980). Todas estas temperaturas estão abaixo do “zero fisiológico”, temperatura em que ocorre um retardo do desenvolvimento do embrião. A temperatura na estocagem está diretamente relacionada com mudanças qualitativas no albúmen (WALSH, 1993). A razão para que a temperatura de 12°C seja a mais recomendada para longos períodos de estocagem é pelo fato de que esta é a menor temperatura possível que mantém uma boa umidade, não havendo assim uma grande desidratação do ovo. O impacto desta desidratação pode ser observado pela simples estocagem de ovos em um refrigerador doméstico por duas semanas a uma temperatura de 4°C. Entretanto a umidade relativa durante o período de estocagem não chega a ser crítica (FUNK e FORWARD, 1960). A baixa umidade durante a estocagem parece afetar somente ovos provenientes de aves com idade bastante avançada que apresentam ovos com qualidade de albúmen ruim (WALSH, 1993) Esta é provavelmente a explicação para o fato de que KAUFMAN (1939) concluiu em experimentos de longos períodos de estocagem que a umidade baixa não foi a responsável pelas elevadas taxas de mortalidade.

MEIJERHOF e col. (1994) verificaram que o aumento da temperatura na região do ninho das aves e na área de estocagem de ovos reduziu a eclodibilidade de ovos de matrizes de frango de corte com 59 semanas de idade, diferente de observações em aves com 37 semanas com ovos estocados durante períodos curtos. Este achado é provavelmente devido às diferenças na qualidade do albúmen, pois as aves mais velhas possuíam uma qualidade inferior no início da estocagem em comparação com as aves mais jovens (WALSH, 1993).

### **2.3.2 Idade das aves, peso do ovo e genética**

Alguns autores relatam a influência da idade da fêmea nas características da progênie, em frangos (WILSON, 1991), codornas japonesas (YANNAKOPOULOS e TSERVENI-GOUSHI, 1987), perus (CHRISTENSEN e col., 1996) e patos (APPLEGATE e col., 1998). Os pesquisadores afirmam que a fertilidade (WOODARD

e ALPLANALP, 1967; INSCO e col., 1971; NARAHARI e col., 1988) e a eclodibilidade dos ovos incubados reduzem à medida que as aves vão ficando mais velhas (NARAHARI e col., 1988; ELIBOL e col., 2002). O aumento nos índices de mortalidade embrionária (NOBLE e col., 1986) e o declínio da sobrevivência de pintinhos (MCNAUGHTON e col., 1978) são comuns em ovos de galinha provenientes de aves muito jovens. Situação similar é observada em ovos de aves velhas, quando comparados às aves mais jovens (NOVO e col., 1997). Em algumas pesquisas, foi relatado que o peso dos pintinhos de codornas japonesas de um dia de idade foram superiores quanto mais velhos eram os pais (TSERVENI-GOUSHI, 1986; YANNAKAPOULOS e TSERVESI-GOUSHI, 1987; REIS e col., 1997).

RICKLEFS e STARCK (1998) sugeriram que o crescimento do embrião é similar nas aves precociais e altriciais, além disso, o crescimento nas espécies é influenciado principalmente por dois fatores: peso do ovo e período de incubação.

WILSON (1991) demonstrou que o tempo de incubação está positivamente correlacionado com o peso do ovo. Há uma relação positiva entre o tempo de incubação e o peso do ovo (BURTON e TULLETT, 1985), com algumas variações devido à idade da reprodutora (CRITTENDEN e BOHREN, 1961; SMITH e BOHREN, 1975), raça e linhagem dentro de uma raça (SMITH e BOHREN, 1975; WILSON, 1991).

O tempo de nascimento pode reduzir em até 10 horas com o avanço da idade da ave (SMITH e BOHREN, 1975; SHANAWANY, 1984). Foi hipotetizado que estes efeitos ocorrem devido a uma redução na mortalidade embrionária inicial (CRITTENDEN e BOHREN, 1962). Esta é causada por um aumento na taxa do metabolismo embrionário nos dois primeiros dias de incubação (CRITTENDEN e BOHREN, 1962; MATHER e LAUGHLIN, 1979) antes de um bom nível de trocas gasosas de oxigênio pela circulação embrionária ser estabelecida (CIROTTA e ARANGI, 1989) e da barreira imposta pelo espesso albúmen (MEUER e BAUMANN, 1988) das aves jovens ter diminuído. VICK e col. (1993) demonstraram claramente que usando uma menor umidade durante a incubação de ovos de lotes de galinhas jovens pode-se superar a barreira combinada da espessa casca do ovo e do espesso albúmen, reduzindo assim a mortalidade embrionária inicial e aumentando a eclodibilidade.

O peso dos pintinhos ao nascer pode ser influenciado por vários fatores, incluindo a espécie, linhagem, nível de nutrientes do ovo, condições ambientais, tamanho do ovo (WILSON 1991), perda de peso durante a incubação, peso da casca e

outros resíduos ao nascer (TULLET e BURTON, 1982), qualidade da casca e condições de incubação (PEEBLES e BRAKE, 1987).

A seleção animal visando à criação de linhagens especializadas de produção pode modificar os parâmetros de incubação e as características dos pintinhos, como eclodibilidade, tempo de nascimento, desenvolvimento embrionário, perda de peso dos ovos e peso dos pintinhos de galinhas (MACNABB e col., 1993; SUAREZ e col., 1997), perus (NESTOR e NOBLE, 1995; CHRISTESEN e col., 2000) e codornas (LILJA e col., 2001).

O tamanho do ovo varia consideravelmente entre muitas espécies de aves e grande parte dessa variação é devida à variação genética aditiva (BOAG e VAN NOORDWIJK, 1987; LESSELLS e col., 1989). O tempo de incubação é uma característica herdável (CRITTENDEN e BOHREN, 1961; SIEGEL e col., 1968) e pode ser modificada pela seleção (SMITH e BOHREN, 1974).

Foi realizado um estudo com sete linhagens de galinhas na idade de 47 semanas submetidas ao mesmo programa de manejo e nutrição. As linhagens que apresentaram melhor qualidade de albúmen obtiveram uma maior taxa de nascimentos em ovos submetidos à estocagem, mesmo em aves velhas, mas os ovos de linhagens com menor qualidade de albúmen não obtiveram os mesmos índices. Em lotes de aves jovens, os ovos devem ser estocados por mais tempo preferencialmente para linhagens que apresentam boa qualidade de albúmen para a obtenção de bons índices de eclodibilidade (BRAKE e col., 1997). Desta forma, as diferenças genéticas sobre a qualidade do albúmen explicam os diversos relatos científicos dos efeitos genéticos sobre a eclodibilidade.

Esta diferença na qualidade do albúmen está bem demonstrada pelos achados de FOSTER (1993), que demonstrou a relação entre o período de estocagem e a fertilidade de ovos em duas linhagens de galinhas. Foi observado que a fertilidade aumentou com o aumento do período de estocagem em estocagens de curto período e diminuiu em estocagens de longa duração. Entretanto estes resultados não refletem precisamente a participação da infertilidade verdadeira. A possível explicação para esta observação foi que a mortalidade embrionária inicial ocorreu por um período insuficiente de estocagem ou pelo excesso da mesma, desta forma a qualidade de albúmen se encontrava muito boa ou muito ruim. Mais argumentos são dados quando se realiza a comparação entre as duas linhagens, a de albúmen com alta qualidade e a de albúmen com baixa qualidade. A primeira linhagem foi selecionada para apresentar ovos com elevada qualidade de

albúmen. Desta forma é necessária uma estocagem mais longa para que reduzir o nível de mortalidade embrionária inicial observada através da ovoscopia. Trabalhos recentes (BRAKE e col.,1997) demonstraram uma clara redução na eclodibilidade de ovos férteis com albúmen de elevada qualidade quando comparados com ovos férteis com menor qualidade de albúmen. Nestas observações verificou-se que não houve a influência do peso do ovo ou qualidade da casca (BRAKE e col., 1997).

### **2.3.3 Período de estocagem**

Diversos autores relataram os efeitos da estocagem sobre a eclodibilidade dos ovos. WILSON (1991) afirma que o maior potencial para a maior eclodibilidade de ovos é logo após a postura do mesmo. Entretanto, ASMUNDSON e MACILRAITH (1948) observaram que ovos estocados a 12,8°C obtiveram melhor eclodibilidade quando submetidos a um período de estocagem de três dias quando comparados com ovos incubados frescos. De forma semelhante, FUNK e col. (1950) verificaram em ovos de galinha que com um ou dois dias de estocagem obtiveram melhores índices de eclodibilidade quando comparado com ovos frescos incubados.

BRAKE e col. (1997) afirmaram que não existe um período perfeito de estocagem fixado. Este pode variar bastante de acordo com a idade do lote de aves, a linhagem, espécie. Esta situação pode ser mais bem exemplificada quando se observa o comportamento das aves selvagens de incubação e construção do ninho. Como as aves selvagens põem seus ovos por vezes no solo ou em uma árvore sem refrigeração, algumas vezes por períodos prolongados de tempo? BRAKE e col., (1997) relataram que existe uma simples explicação para esta situação na natureza. No início da postura a fêmea está cheia de reservas de nutrientes e consome elevadas quantidades de alimento. Este elevado nível de nutrientes permite que os primeiros ovos da postura tenham elevada qualidade de albúmen e qualidade de casca. À medida que a postura continua a fêmea perde o apetite como se fosse um prenúncio de muda (MROSOVSKY e SHERRY, 1980) e esta diminuição no consumo de nutrientes pode promover uma redução na qualidade do albúmen dos últimos ovos postos pela fêmea. Desta forma, os primeiros ovos da postura são mais resistentes ao ambiente como também se observa em lotes de galinhas jovens enquanto os ovos das aves selvagens que são postos no fim da postura são mais sensíveis às condições ambientais, como também é observado em lotes de aves de produção em idade avançada (WALSH, 1993; MEIJERHOF e col.,

1994). Desta forma quando o último ovo é posto, basicamente todos estão com a qualidade do albúmen similar.

Uma estocagem excessivamente longa é prejudicial. Evidências de necrose e alterações regressivas no blastoderma, mesmo em temperaturas de 13°C foram relatadas (ARORA e KOSIN, 1966; MATHER e LAUGHLIN, 1979) e o encolhimento do blastoderma em 10°C foi observada (FUNK e BIELLER, 1944; MATHER e LAUGHLIN, 1979). KAUFMAN (1939) observou que a perda de água do ovo por si só não é a razão para a mortalidade em períodos de estocagem prolongados. O albúmen atinge um pH de 9 a 9,5 após períodos prolongados de estocagem (GOODRUM e col., 1989), nível este que está bem acima do nível ótimo. O aquecimento periódico de ovos estocados por longos períodos é eficiente para manter a eclodibilidade destes ovos provavelmente pela indução da produção metabólica de gás carbônico baixando assim o pH do tecido (KUCERA e RADDATZ, 1980). Entretanto o metabolismo também produz amônia neste estágio de desenvolvimento (NEEDHAM, 1931) que também reduz a qualidade do albúmen (BENTON e BRAKE, 1994). Isto deve ocorrer por causa de células mais diferenciadas do embrião possuírem maior sensibilidade ao pH e exibem um crescimento heterogêneo levando a morte do embrião. Condições de estocagem com elevada concentração de dióxido de carbono, bolsas plásticas e baixas temperaturas podem prorrogar a latência e manter a eclodibilidade dos ovos.

## **2.4 Aspectos da incubação artificial**

### **2.4.1 Temperatura da incubação**

A temperatura caracteriza-se como o fator mais importante para definir a eclodibilidade de ovos férteis (WILSON, 1991). A temperatura ótima de incubação para as aves domésticas situa-se entre 37 e 38°C, podendo esta variar de acordo com a umidade e a ventilação da máquina incubadora (VISSCHEDIJK, 1991).

A temperatura de incubação apresenta uma correlação direta com o tempo de incubação de um embrião de ave, como se observa em perus (FRENCH, 1994) e frango (DECUYPERE e col.,1979). Desta forma temperaturas abaixo de um nível ótimo retardam o desenvolvimento embrionário, enquanto que temperaturas acima da mesma aceleram o desenvolvimento do mesmo (ROMANOFF, 1960; WILSON, 1991).

Desvios de temperatura de incubação, além de alterarem a velocidade do desenvolvimento embrionário, também podem levar o embrião à morte (WILSON,

1991). Os extremos de temperatura podem causar degeneração e morte embrionária inicial, ou seja, na primeira semana de incubação (PRIMMETT e col.,1988). Os embriões são mais sensíveis a altas temperaturas no final da incubação (ONO e col., 1994), o que pode promover elevados índices de mortalidade na última semana de incubação (14-21 dias).

Alguns estudos demonstraram o efeito do uso de temperaturas mais elevadas que o padrão (37,5°C) na incubação artificial de frangos de corte.

HAMMOND e col. (2007) verificaram que temperaturas de incubação de 38,5°C comparada com 37,5°C podem melhorar algumas características do embrião de galinha como: o peso ao nascer, aumento do tamanho dos ossos da perna, mais fibras musculares e núcleos celulares no gastrocnêmio, uma maior motilidade do embrião in ovo como também uma redução de tecido adiposo.

Já LEKSRIOMPONG (2005) estudou o efeito da temperatura na segunda metade do período de incubação de ovos de galinha. Ela observou que quando os ovos foram submetidos a temperaturas de incubação ainda mais elevadas (39,5 a 40,6°C) os pintinhos nascidos apresentaram uma redução no peso corporal, coração, moela, proventrículo e intestino delgado enquanto o fígado e saco da gema sofreram um aumento de tamanho. A autora também verificou o efeito negativo de elevadas temperaturas (39,5 a 40,6°C) de incubação sobre parâmetros como o consumo de ração, ganho de peso das aves e até mesmo os níveis de mortalidade até os 14 dias de criação.

De acordo com ROMIJIN e LOCKHORST (1960), no início da incubação a transferência de energia por evaporação é superior ao calor metabólico do embrião, desta forma, o ovo recebe calor do meio. Já na segunda etapa da incubação a produção de calor metabólico aumenta consideravelmente, sendo superior a quantidade de calor perdido por evaporação.

#### **2.4.2 Umidade relativa do ar**

A umidade relativa constitui um fator físico de muita importância durante o processo de incubação artificial. Pelo menos 75% do ovo é constituído de água cuja preservação deve ser mantida durante todo o processo de incubação. Os cuidados com a preservação do volume de água no ovo ocorrem desde a postura até durante a incubação, objetivando a eclosão de pintinhos bem hidratados (CAMPOS, 2000).

A desidratação dos pintinhos pode ser influenciada pela umidade relativa do ar durante a incubação como também no nascimento, mas também existe a influência do

período de tempo que o pintinho fica dentro da nascedoura até ser retirado (BRUZUAL e col., 2000). O peso ao nascer dos pintinhos também é influenciado pelo tempo de remoção do nascedouro e pela umidade da incubadora (REINHART e HURNIK, 1984). LUNDY (1969) relatou que o nível de umidade relativa no processo de incubação para bons níveis de eclosão deve estar entre 40 e 70%.

### **2.4.3 Viragem do ovo**

A viragem do ovo é um fenômeno natural durante a incubação natural das aves. Nos processos de incubação artificial se faz necessário a utilização da viragem mecânica para poder simular situação semelhante a que ocorre normalmente na natureza. O uso da viragem mecânica foi apontado na incubação artificial como um redutor de problemas com o mal-posicionamento dos embriões (ROBERTSON, 1961) e também previne a adesão anormal do embrião às membranas da casca do ovo (NEW, 1957). A viragem é necessária para assegurar a correta utilização do albúmen para o desenvolvimento do embrião durante o período normal de incubação (RANDLE e ROMANOFF, 1949). O conhecimento dos efeitos fisiológicos da viragem dos ovos sobre o acúmulo de proteínas no líquido amniótico, aumento da área vascularizada e também sobre as trocas gasosas (DEEMING, 1989; TAZAWA, 1980; WILSON, 1991; PEARSON e col., 1996) enfatizou a importância deste aspecto para a incubação artificial. A viragem do ovo durante a incubação envolve diversos parâmetros como a frequência, o eixo em que o ovo é acondicionado na máquina como também o eixo de viragem do mesmo, o ângulo de viragem, o plano de rotação e o estágio da incubação em que é necessária a viragem dos ovos (WILSON, 1991; ELIBOL e col., 2002).

### **2.4.4 Perda de água do ovo**

A perda de água do ovo é um processo natural durante a incubação dos ovos. Este parâmetro tem sido utilizado para estimar a taxa de trocas gasosas dos ovos incubados (PAGANELLI e col., 1978; RAHN e col., 1979) e também tem sido correlacionada com a taxa de metabolismo e desenvolvimento embrionário (RAHN e AR, 1980; BURTON e TULLET, 1983). Perdas muito altas ou muito baixas influenciam o desenvolvimento do embrião (RAHN e AR, 1974) e, conseqüentemente, a eclodibilidade dos ovos férteis (MEIR e col., 1984). Temperaturas de incubação acima da ótima provocam uma perda de água excessiva, superior a 14% pelos ovos, podendo

levar à morte do embrião por causa de desidratação. Já a utilização de temperaturas de incubação inferiores ao nível ideal pode promover uma perda de água pelo ovo embrionado insuficiente, abaixo de 12%, esta situação pode reduzir a eclodibilidade dos ovos por causa de uma elevada hidratação dos ovos que pode dificultar as trocas gasosas através das membranas excessivamente úmidas (ROMANOFF, 1930). Espécies domésticas como os frangos de corte e perus perdem aproximadamente entre 12 e 14% de água durante todo o processo de incubação (RAHN e col., 1981).

#### **2.4.5 Mortalidade embrionária**

Um ovo que é incubado e não eclode reduz a eficiência reprodutiva de um plantel de aves e, desta forma, o interesse econômico para a indústria avícola (ETCHES, 1996). O ovo que não eclode pode ser infértil, pode ser fértil e morreu antes da incubação, ou seja, durante a estocagem, ou então pode ter morrido durante o processo de incubação artificial. Nas galinhas, durante as três semanas de incubação da espécie, a mortalidade embrionária é mais freqüente na primeira semana, menos freqüente na segunda e se apresenta intermediária na terceira semana de incubação (PAYNE, 1919; MOSELEY e LANDAUER, 1949). Desta forma a distribuição temporal da mortalidade embrionária na incubação artificial se encontra principalmente em duas fases, a primeira fase durante a primeira semana e a segunda fase durante a terceira semana (JASSIM e col., 1996) durante a qual o desenvolvimento funcional do embrião se modifica em elevadas taxas.

Elevados índices de mortalidade ocorrem, por exemplo, no início do desenvolvimento embrionário durante a formação da vascularização do embrião (ETCHES, 1996). Também ocorre elevada mortalidade na fase final de desenvolvimento embrionário com as mudanças na nutrição e no sistema respiratório (PAYNE, 1919). A mortalidade embrionária pode ocorrer devido a causas genéticas como também do ambiente (ETCHES, 1996) como por exemplo, anormalidades cromossômicas durante o desenvolvimento inicial do embrião (THORNE e col., 1991) ou a deficiência da casca do ovo em promover as trocas gasosas e de água necessárias para o desenvolvimento do embrião (RAHN e col., 1979).

#### **2.4.6 Vacinação *in ovo***

O conceito de vacinação *in ovo* foi demonstrado ser eficaz no início da década de 1980. SHARMA e BURMESTER (1982) demonstraram que galinhas que haviam sido vacinadas com o Herpesvírus causador de Marek em perus (HVT sorotipo 3) na fase embrionária apresentaram melhor proteção a desafio aos 3 dias de idade do que aves vacinadas ao nascer. Quando desafiadas aos 7 dias de idade, ambas apresentaram o mesmo índice de proteção. SHARMA e BURMESTER (1983) realizaram a vacinação *in ovo* e em pintinhos ao nascer com os sorotipos 1 e 2 do Herpesvírus de Marek e verificaram melhor proteção nas aves vacinadas com 18 dias de vida embrionária quando desafiadas com três dias de nascidas com uma cepa virulenta do vírus de Marek. SHARMA e col. (1984) demonstraram que o vírus da Marek inoculado aos 18 dias de vida embrionária se replicou apresentando altos títulos no pulmão e baço. Esta precoce replicação viral dá suporte a uma significativa resposta imunitária ao nascimento do pintinho. Além de vacinações contra o vírus da doença de Marek, as vacinações *in ovo* vem sendo pesquisadas para diversas outras doenças como doença de Newcastle (AHMAD e SHARMA, 1992), Bouda aviária (KARAKA e col., 1998), doença infecciosa da bursa (SHARMA, 1986) e bronquite infecciosa das aves (WAKENEL e SHARMA, 1986). Estudos também têm sido realizados para avaliar a eficácia do uso de simultâneo de diversos vírus na vacinação *in ovo* (SHARMA e col., 2002).

### **3. JUSTIFICATIVA**

Devido ao crescente aumento da produção de codornas japonesas no Estado do Ceará e no Brasil, tanto para a produção de ovos como também para o abate, torna-se necessário o estudo das técnicas de produção destas aves, principalmente na área de incubação artificial, por ser fundamental para a manutenção e expansão desta atividade avícola. Dentre os fatores que influenciam a incubação, a temperatura e a umidade relativa estão entre os mais importantes para o desenvolvimento das técnicas de incubação artificial. Também se torna importante o estudo da técnica de vacinação *in ovo*, visto que esta vem sendo empregada nos incubatórios na avicultura industrial para a imunização das aves, mas que até o momento ainda não se conhece os seus efeitos sobre a incubação de ovos de codornas japonesas.

#### **4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS**

A codorna japonesa apresenta requerimentos específicos de temperatura e umidade para a obtenção de índices satisfatórios de eclodibilidade, peso ao nascer, tempo de nascimento e mortalidade embrionária em ovos de codornas japonesas.

A aplicação *in ovo* da vacina contra a doença de Newcastle não é prejudicial ao processo de incubação de ovos de codornas japonesas e favorece a produção precoce de anticorpos.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo geral**

Avaliar a temperatura, a umidade relativa e a vacinação *in ovo* durante a incubação artificial de ovos de codornas japonesas (*Coturnix japonica*)

### **5.2 Objetivos específicos**

Verificar o efeito de diferentes temperaturas sobre o desempenho da incubação de ovos de codornas japonesas (*Coturnix japonica*)

Estudar diferentes umidades relativas durante o período de incubação artificial de ovos de codornas japonesas (*Coturnix japonica*)

Avaliar os procedimentos de vacinação *in ovo* sobre o desempenho da incubação de ovos de codornas japonesas (*Coturnix japonica*)

## **6. CAPÍTULO 1**

### **Effect of temperature on incubation of Japanese quail eggs: hatchability, hatch weight, hatch time and embryo mortality**

**Efeito da temperatura da incubação em ovos de codornas japonesas: eclodibilidade, peso ao nascer, tempo de nascimento e mortalidade embrionária**

**Periódico Científico: Animal Reproduction**

#### **RESUMO**

A temperatura é um fator muito importante que afeta o desenvolvimento embrionário, a eclodibilidade e o desempenho pós-nascimento. A temperatura ótima de incubação é normalmente definida como aquela que permite uma eclodibilidade máxima. Este trabalho visa verificar os efeitos de diferentes temperaturas de incubação sobre a eclodibilidade, peso ao nascer, tempo de nascimento e mortalidade embrionária de ovos de codornas japonesas (*Coturnix japonica*). Um total de 800 ovos foram divididos em oito grupos experimentais (n=100) que foram incubados em diferentes temperaturas (34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 e 41°C). As demais condições de incubação foram idênticas para todos os grupos, 60±5% de umidade relativa e viragem a cada 2 horas até a transferência para a nascedoura no 15º dia de incubação. Os resultados mostraram que a eclodibilidade dos ovos férteis foi maior para os ovos incubados a 37 e 38°C; 76,67 e 80,76%, respectivamente. Os ovos incubados a 34°C não eclodiram e os incubados a 35 e 41°C apresentaram um índice muito baixo de eclodibilidade. As outras temperaturas proporcionaram eclodibilidade entre 50,33 e 57,73%. Os pesos ao nascer foram elevados nos grupos incubados em temperaturas altas (38-41°C) quando comparados aos grupos incubados em temperaturas baixas (35-37°C). Observou-se uma enorme diferença no tempo de nascimento de acordo com a temperatura de incubação. A diferença de tempo entre o grupo de ovos que eclodiram mais cedo (40°C) e os ovos que eclodiram por último (35°C) foi de 156,3 horas ou 6,51 dias. Os embriões apresentaram-se resistentes a altas temperaturas até 40°C durante o período inicial da incubação, contudo o mesmo não foi observado nos estágios finais de incubação, quando altas temperaturas (39-41°C) promoveram elevados índices de mortalidade embrionária (Mortalidade final e em ovos bicados).

**Palavras-chave:** temperatura, incubação, Codorna japonesa, ovos

## ABSTRACT

Temperature is a very important factor affecting embryo development, hatchability and post hatch performance. Optimum incubation temperature is normally defined as that required to achieve maximum hatchability. This work was carried out to verify the effects of different incubation temperatures on hatchability, hatch weight, hatch time and embryo mortality of Japanese quail eggs (*Coturnix japonica*). A total of 800 eggs were divided in eight experimental groups (n=100) that were incubated at different temperatures (34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 and 41°C). The other incubation conditions were identical for all groups, 60±5% of relative humidity and egg turning every two hours up to transference to the hatcher at 15 days of incubation. The results showed that fertile hatchability was higher for eggs incubated at 37 and 38°C, 76.67 and 80.76%, respectively. Eggs incubated at 34°C did not hatch and those incubated at 35 and 41°C showed very poor hatchability. The other temperatures had hatch rates from 50.33 to 57.73%. There were higher hatch weights in eggs incubated in high temperatures (38-41°C) compared to the ones incubated in the lower ones (35-37°C). There was an enormous difference in the hatching time according to the incubation temperature. The difference of time between the groups of eggs that hatched earlier (40°C) compared to the ones the hatcher later (35°C) was 156.3 hours or 6.51 days. Embryos seemed to be resistant to embryo death in high temperatures until 40°C at the early period of incubation, however the same was not observed at the later stages of incubation when high temperatures (39-41°C) promoted elevated levels of embryo mortality (late death and pipped eggs).

**Key words:** temperature, incubation, Japanese quail, eggs

## INTRODUCTION

Temperature is a very important factor affecting embryo development (Romanoff, 1972), hatchability (Deeming and Ferguson, 1991) and post hatch performance (Wilson, 1991). Embryonic development and incubation period depends on the age of the embryo, duration of exposure as well as humidity, type of incubator and temperature (Wilson, 1991). During artificial incubation, the embryo temperature is dependent on incubator temperature, embryonic metabolic rate, and thermal conductance of the egg and surrounding air (French, 1997). Optimum incubation temperature is normally defined as that required to achieve maximum hatchability (French, 1997). However, Decuypere and Michels (1992) have argued that the quality of the hatchings should also be considered.

The incubation process on domestic chicken can be performed under temperatures higher or lower than the one considered optimum for the specie (37.5°C). However, changes in incubational temperature may alter the standard embryo development with detrimental effects for hatchability (Alda, 1994). The major effects of incubation at temperatures outside the optimal range are increases in embryonic mortality, deformities and failure to hatch (Romanoff, 1960; Lundy, 1969).

There are several studies that observed the effect of temperature on length of incubation (Romanoff, 1936; Michels *et al.*, 1974; French 1994, Suarez *et al.*, 1996), on the rate of embryo growth (Decuypere *et al.*, 1979; Dias and Muller, 1998), and on hatchability (Lundy, 1969; Wilson, 1991; Lourens *et al.*, 2005). However, there are few studies about these effects on Japanese quail incubation performance.

This work was carried out to evaluate the effect of different incubation temperatures on hatchability, hatch weight, hatching time and embryo mortality of Japanese quail eggs.

## MATERIAL AND METHODS

### **Birds**

A total of 150 Japanese quails (*Coturnix japonica*), 50 males and 100 females, were used for egg collections. The birds were reared in experimental cages in the Laboratório de Estudos Ornitológicos- Universidade Estadual do Ceará. They were lodged at a ratio of two females and one male in each cage. Birds were 22 week old and

averaged 90% of egg laying production. All quails were supplied with balanced feed, water *ad libitum* and exposed to 17 hours/day of light.

### **Incubation**

The eggs were selected for incubation verifying egg shape, extreme sizes and eggshell integrity by candling. They were divided into eight experimental groups according to incubation temperature. The eggs were incubated at 34°C (n=100), 35°C (n=100), 36°C (n=100), 37°C (n=100), 38°C (n=100), 39°C (n=100), 40°C (n=100) and 41°C (n=100). Each group of eggs was incubated in a separated incubator, according to its experimental incubation temperature. Incubation process was done by automatic incubators with relative humidity of 60±5% and egg turning every 2 hours. At the 15<sup>th</sup> day of incubation (360h) egg turning was stopped and the eggs were transferred to the hatcher which maintained the same temperature and relative humidity until hatch.

### **Weight measurement and Hatching Time**

All eggs were identified, individually, and weighed, by a precision balance (0.001g), on the first day of incubation. After transference, eggs were monitored to verify their hatching time every six hours. All quail chicks were weighed individually after hatching.

### **Embryonic mortality**

Eggs that failed to hatch were opened for macroscopically observation, thus they were classified according to time of embryonic mortality. They were staged as infertile, early embryo death, intermediate embryo death, late embryo death and pipped eggs. This classification was similar to Pedroso *et al.* (2006) that classified the embryo mortality in quail as early death embryos (1 up to 4 days), intermediate (5 up to 15 days) and late death embryos (16 up to 18 days).

### **Statistical Analysis**

Each experimental group (n=100) consisted of five replicates of 20 eggs. All data were analyzed using the Statistix software 8.0 (2003). The results were submitted the test of Shapiro-Wilk to verify normality and to Bartlett's test to verify homogeneity of variances. Hatchability, chick/egg weight and hatch time means were submitted to Analysis of Variance through general linear model and the means were compared with

the test of Tukey. Embryo mortality means were compared through Kruskal-Wallis' test. Statements of significance were based on  $P < 0.05$ .

## RESULTS

Table 1 shows the total hatchability which consisted of hatch rate of all eggs incubated and the fertile hatchability which was obtained from incubated eggs excluding the infertile ones.

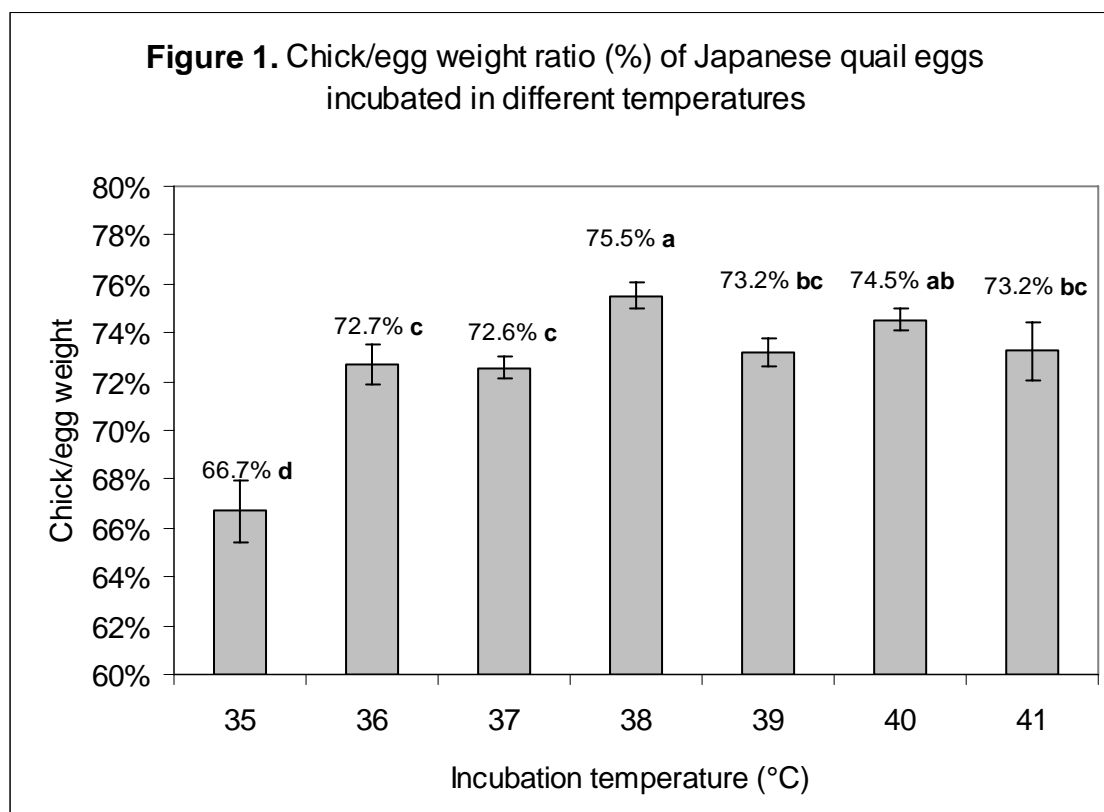
**Table 1.** Total and fertile hatchability of Japanese quail eggs incubated in different temperatures

| Temperature (°C) | Total hatchability            | Fertile hatchability          |
|------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|                  | Mean $\pm$ SD (%)             | Mean $\pm$ SD (%)             |
| 34               | 0.00 $\pm$ 0.00 <sup>d</sup>  | 0.00 $\pm$ 0.00 <sup>d</sup>  |
| 35               | 4.00 $\pm$ 2.24 <sup>cd</sup> | 4.36 $\pm$ 2.48 <sup>cd</sup> |
| 36               | 48.00 $\pm$ 7.58 <sup>b</sup> | 54.63 $\pm$ 8.37 <sup>b</sup> |
| 37               | 69.00 $\pm$ 6.52 <sup>a</sup> | 76.67 $\pm$ 7.24 <sup>a</sup> |
| 38               | 75.00 $\pm$ 6.12 <sup>a</sup> | 80.76 $\pm$ 7.75 <sup>a</sup> |
| 39               | 53.00 $\pm$ 6.71 <sup>b</sup> | 57.73 $\pm$ 7.81 <sup>b</sup> |
| 40               | 46.00 $\pm$ 7.42 <sup>b</sup> | 50.33 $\pm$ 5.35 <sup>b</sup> |
| 41               | 15.00 $\pm$ 5.00 <sup>c</sup> | 16.68 $\pm$ 6.48 <sup>c</sup> |

<sup>a,b,c,d</sup> Means within the columns with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ )

The experimental egg groups presented higher fertile hatchabilities compared to the total hatchability, except for the eggs incubated at 34°C which had no hatched quail chicks. The eggs incubated at 37°C and 38°C had the highest hatchabilities. They were followed by the eggs incubated at 36°C, 39°C and 40°C that presented fertile hatch rates between 50.33% and 57.33%. The lowest hatch rates were found for the eggs incubated at 35°C and 41°C. It was verified that extremely high or low temperatures was very harmful for egg hatchability.

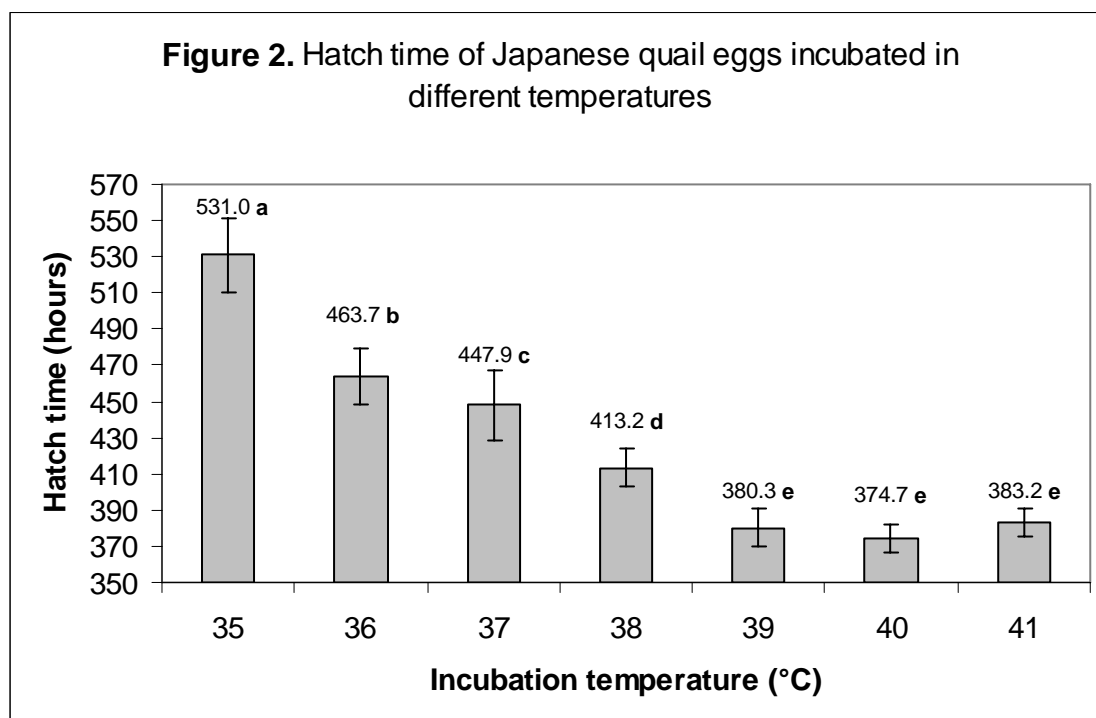
The figure 1 shows the chick/egg weight ratio (%) of Japanese quail eggs in different temperatures from 35°C up to 41°C.



<sup>a,b,c,d</sup> Means in the columns with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ )

The chick/egg weigh of Japanese quail chicks varied from 66.7% to 75.5%, showing that incubation temperature promoted a variation up to 13% of Japanese quail hatch weight. The highest proportional weights at hatch were observed for eggs incubated at the 38°C, 39°C 40°C and 41°C. Their means of hatch weight varied from 9.11g to 9.68g. They were followed by eggs incubated at 36°C and 37°C that had the following hatch weight means 8.78g and 9.14g. The lowest weights at hatch were found in eggs incubated at 35°C that had a mean hatch weight of 8.45g. There was no hatch for eggs incubated at 34°C. In general the higher incubation temperatures promoted heavier quail chicks than the lower ones.

The figure 2 shows the hatching time of Japanese quail eggs incubated at different increasingly temperatures from 35°C up to 41°C.



<sup>a,b,c,d,e</sup> Means in the columns with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ )

There was an enormous difference in the hatching time according to the incubation temperature. The difference of time between the group of eggs that hatched earlier (40°C) compared to the one that hatched later (35°C) was 156.3 hours or 6.51 days. The average hatch time ranged from 374.7 to 531.0 hours, which is the same of 15.61 and 22.12 days of incubation until hatch, respectively. The increase of incubation temperature from 35°C to 41°C reduced expressively the hatching time of Japanese quail eggs, however this effect was observed for incubation temperatures up to 39°C, since the hatching time of eggs incubated in higher temperatures were similar to that one. The eggs incubated at 34°C were followed up to 30 days of incubation to verify the hatching time, however they did not hatch and when they were opened (30d) the quail embryos were already dead.

The table 2 shows the classification of eggs that failed to hatch after incubation in different temperatures. The eggs were considered infertile, early embryo death, intermediate embryo death, late embryo death or pipped egg with dead embryo.

**Table 2.** Classification of Japanese quail eggs that failed to hatch after incubation in different temperatures

| Temp.<br>(°C) | Infertile              | Early<br>death           | Intermediate<br>death   | Late death                | Pipped egg               | Total            |
|---------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|------------------|
| Mean ± SD (%) |                        |                          |                         |                           |                          |                  |
| 34            | 11 ± 4.18 <sup>a</sup> | 35 ± 12.75 <sup>a</sup>  | 36 ± 10.84 <sup>a</sup> | 18 ± 4.47 <sup>abc</sup>  | 0 ± 0.00 <sup>b</sup>    | 100 <sup>a</sup> |
| 35            | 10 ± 9.35 <sup>a</sup> | 13 ± 4.47 <sup>abc</sup> | 9 ± 9.62 <sup>ab</sup>  | 38 ± 10.37 <sup>a</sup>   | 24 ± 8.94 <sup>a</sup>   | 94 <sup>ab</sup> |
| 36            | 12 ± 5.70 <sup>a</sup> | 1 ± 2.24 <sup>c</sup>    | 5 ± 7.07 <sup>ab</sup>  | 12 ± 5.70 <sup>abc</sup>  | 22 ± 9.75 <sup>a</sup>   | 52 <sup>c</sup>  |
| 37            | 10 ± 0.00 <sup>a</sup> | 4 ± 4.18 <sup>bc</sup>   | 1 ± 2.24 <sup>b</sup>   | 6 ± 6.52 <sup>bc</sup>    | 10 ± 6.12 <sup>ab</sup>  | 31 <sup>d</sup>  |
| 38            | 8 ± 4.47 <sup>a</sup>  | 6 ± 2.24 <sup>abc</sup>  | 0 ± 0.00 <sup>b</sup>   | 3 ± 4.47 <sup>c</sup>     | 8 ± 4.47 <sup>ab</sup>   | 25 <sup>d</sup>  |
| 39            | 8 ± 4.47 <sup>a</sup>  | 6 ± 4.18 <sup>abc</sup>  | 3 ± 6.71 <sup>ab</sup>  | 15 ± 10.61 <sup>abc</sup> | 15 ± 11.73 <sup>ab</sup> | 47 <sup>c</sup>  |
| 40            | 9 ± 6.52 <sup>a</sup>  | 6 ± 5.48 <sup>abc</sup>  | 1 ± 2.24 <sup>b</sup>   | 19 ± 8.94 <sup>abc</sup>  | 18 ± 8.37 <sup>a</sup>   | 53 <sup>c</sup>  |
| 41            | 8 ± 7.58 <sup>a</sup>  | 29 ± 10.84 <sup>ab</sup> | 9 ± 4.18 <sup>ab</sup>  | 31 ± 11.94 <sup>ab</sup>  | 9 ± 4.18 <sup>ab</sup>   | 86 <sup>b</sup>  |

<sup>a,b,c,d</sup> Means within the columns with different superscripts differ significantly (P < 0.05)

The rate of infertile eggs ranged from 8% to 12% of total eggs. This classification of unhatched egg is not dependant of incubation temperature, this way there was no statistical difference among groups. The early embryo death was more critical for eggs incubated in extreme temperatures such as 34°C and 41°C. The intermediate embryo death was higher in eggs incubated at 34°C and lower levels were found in the central temperatures (36 to 40°C). The late embryo death was lower in eggs incubated at 37 and 38°C, while the other temperatures presented higher levels. Only eggs incubated at 34°C had no pipped eggs. In general, the eggs incubated at 37 and 38°C had lower levels of unhatched eggs while the other presented higher levels reaching 100% for eggs incubated at 34°C.

## DISCUSSION

### **Hatchability**

The highest hatch rates were found for eggs incubated at 37°C and 38°C which is in accordance to the optimal temperature to the development of the chicken embryos that occurs within the narrow temperature range of 37 to 38 °C (Romanoff, 1960). Pedroso *et al.* (2006) found similar fertile hatchability for Japanese quail eggs incubated at 36.5°C and 37.5°C, that was 76.57% and 76.55%, respectively. The eggs incubated at 34°C were not able to hatch, however these eggs present quail embryos that developed up to final stages. The temperature of 35°C was very aggressive for embryo survival promoting a poor hatchability (4.36%). It has been reported that hypothermic incubation (35°C) promotes a series of physiological dysfunctions in chicken embryos (Black and Burggren, 2004a,b). The incubation at 36°C presented much better hatch rate compared to 35°C, however it was considerably lower than 37 and 38°C. The temperatures above 38°C were also harmful to quail embryos decreasing the hatch rates. Incubation temperatures above the optimal have been reported to negatively impact hatchability, feed conversion, BW, and general post-hatch chick and poult performance (Gladys *et al.*, 2000). However higher and lower than optimal incubation temperatures may not be considered completely detrimental to quail incubation since it can be used in an intermittent way throughout the incubation. Callebaut (1990) studied artificial incubation of Japanese quail eggs trying to mimic the natural incubation conditions with daily 8 hours interruptions (low temperatures) and he found that it was possible to lengthen the embryonic period by one-third without apparent harm and with potential improvement in hatchability.

### **Hatch weight**

The incubation temperature promoted a higher hatch weight in eggs incubated in high temperatures (38-41°C) compared to those incubated in the lower ones (35-37°C). In a general way the higher temperatures tended to increase the hatch weight. This was also observed by Pedroso *et al.* (2006) that found an increase chick/egg weight ratio from eggs incubated in a lower and in a higher temperature. However they found a higher difference which was 51.54% and 64.49% for 36.5°C and 37.5°C, respectively. Hammond *et al.* (2007) verified that higher incubation temperatures 38.5°C compared

to 37.5°C increases not only the chick hatch weight but it also promotes longer leg bones, more muscle fibers and nuclei in the gastrocnemius, more *in ovo* embryo motility during incubation and a reduction in adipose tissue. However much higher temperatures can be potentially detrimental to incubation of quail eggs, since Leksrisompong (2005) observed that chicken eggs incubated in temperatures from 39.5 to 40.6°C showed body weight, and weights of the heart, gizzard, proventriculus, and small intestines frequently reduced.

### **Hatch time**

The incubation time can be influenced by many factors like temperature (Suarez *et al.*, 1996; Wilson, 1991), egg weight (Burton and Tullet, 1985), age of breeder (Smith and Bohren, 1975) and also preincubation storage (Bohren, 1978). Incubation temperatures above the optimal temperature have been reported to accelerate growth rates of avian embryos (Romanoff, 1960; Christensen *et al.*, 1999). The incubation temperature highly influenced the hatching time of Japanese quail eggs. The lower temperature that allowed embryo hatching was 35°C. Compared to 38°C this temperature increased almost 5 days in the hatching time. Chicken eggs incubated in the same temperatures had a lower difference between the hatching times, which was 4 days (Tazawa *et al.*, 1988). Pedroso *et al.* (2006) found similar hatching times for Japanese quail eggs; however they studied incubations at 36.5°C and 37.5°C with 442.5 and 413.6 hours, respectively. The change of incubation temperature for small periods can also influence the hatching time as reported by Leandro *et al.* (2000) that verified the effects of small period (5 hours) of heat (40°C) or cold (32°C) stress in chicken eggs incubated at 37.8°C and verified an increase of hatching time around 10 and 8 hours, respectively.

### **Embryo mortality**

Embryo mortality pattern of Japanese quail eggs was similar to the one observed in chickens, in which there are two phases of increased embryonic mortality during incubation: the first phase occurs during the first week of incubation and the second phase during the last week (Jassim *et al.*, 1996). This way the intermediate embryo death was less frequent than the other mortality classifications for temperatures that had hatched quails. In general, all embryo mortality classifications tended to be lower for eggs incubated in the central temperatures (37°C and 38°C). Embryos seemed to be resistant to embryo death in high temperatures of incubation up to 40°C at the early

period of incubation, however the same was not observed at the later stages of incubation when high incubation temperatures (39-41°C) promoted high levels of embryo mortality (late death and pipped eggs). These results are in accordance to Ono *et al.* (1994) that verified that chicken embryos are more susceptible to high temperatures in the end of incubation. Both extremes of high and low incubation temperatures may reduce hatchability due to the lack of a complete capacity to thermoregulate its own temperature since the embryos are poikilotherm until hatch. Thus, the more pronounced consequences of this situation are physiological and morphological alterations that lead to failure to hatch with mortality at various stages of embryo development.

## CONCLUSION

The most suitable incubation temperatures for Japanese quail eggs were 37 and 38°C. The incubation temperature highly influenced the hatchability of Japanese quail eggs with the best performance for eggs incubated at 37 and 38°C, while higher and lower temperatures presented low hatch rates. In general, high incubation temperatures (38, 39, 40 and 41°C) increased hatch weight and decreased hatching time, while low temperatures (34, 35, 36 and 37°C) promoted inverse effects. As for hatchability, the extremely high and low temperatures promoted critical levels of embryo mortality compared to the mild temperatures of incubation (37 and 38°C).

## REFERENCES

Alda TRBL. Causas de mortalidade embrionária e deformidades do embrião. In; Pinheiro MR. Manejo da incubação. São Paulo, FACTA, 1994. pp.160-177.

Black JL, Burggren WW. 2004a. Acclimation to hypothermic incubation in developing chicken embryos (*Gallus domesticus*) I. Developmental effects and chronic and acute metabolic adjustments. *The Journal of Experimental Biology* 207:1543-1552.

Black JL, Burggren WW. 2004b. Acclimation to hypothermic incubation in developing chicken embryos (*Gallus domesticus*) II. Hematology and blood O<sub>2</sub> transport. *The Journal of Experimental Biology* 207:1553-1561.

Bohren BB. 1978. Preincubation storage effects on hatchability and hatching time of lines selected for fast and slow hatching. *Poultry Science* 57:581-583.

Burton FG, Tullet SG. 1985. The effect of egg weight and shell porosity on the growth and water balance of the chicken embryo. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 81:377-385.

Callebaut ME. 1990. Hatching of Japanese quail chicks (*Coturnix coturnix japonica*) following long, daily cyclical interruptions of their incubation. *Poultry Science* 69:2241-2243.

Christensen VL, Donaldson WE, Nestor KE. 1999. Length of plateau and pipping stages of incubation affects the physiology and survival of turkeys. *British Poultry Science*. 40:297-303.

Decuypere E, Michels H. 1992. Incubation temperature as a management tool: a review. *World's Poultry Science Journal* 48:28-38.

Decuypere E, Nouwen EJ, Kuhn ER, Geers R, Michels H. 1979. Iodohormones in the serum of chick embryos and post-hatching chickens as influence by incubation

temperature. Relationship with the hatching process and thermogenesis. *Ann Biol Anim Biochem Biophys* 19:1713-1723.

Deeming DC, Ferguson MWJ. 1991. Physiological effects of incubation temperature on embryonic development in reptiles and birds. In: *Egg Incubation*, Deeming DC and Ferguson MWJ, ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp. 147-172

Dias PF, Muller YMR. 1998. Características do desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus domesticus*, em temperaturas e períodos diferentes de incubação. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 35:233-235.

French NA. 1994. Effect of incubation temperature on the gross pathology of turkey embryos. *British Poultry Science* 35:363-371.

French NA. 1997. Modeling incubation temperature: The effects of incubator design, embryonic development, and egg size. *Poultry Science*. 76:124–133.

Gladys GE, Hill D, Meijerhof R, Saleh TM, Hulet R. M, 2000. Effect of embryo temperature and age of breeder flock on broiler post hatch performance. *Poultry Science*. 79 (Suppl. 1): 123 (abstr.).

Hammond CL, Simbi BH, Stickland NC. 2007. In ovo temperature manipulation influences embryonic motility and growth of limb tissues in the chick (*Gallus gallus*). *The Journal of Experimental Biology* 210:2667-2675.

Jassim EW, Grossman M, Kops WJ, Luykx RAJ. 1996. Multiphasic analysis of embryonic mortality in chickens. *Poultry Science*, 75:464-471.

Leandro NSM, Gonzales E, Varoli Jr. JCV, Loddi MM, Takita TS. 2000. Incubabilidade e Qualidade de Pintos de Ovos Matrizes de Frangos de Corte Submetidos a Estresse de Temperatura. *Brazilian Journal of Poultry Science*. 2:39-44.

Leksrisompong N. 2005. Effect of temperature during incubation and brooding on broiler chickens. Raleigh, United States: North Carolina State University. Master's degree Thesis.

Lourens A, Van de Brand H, Meijerhof R, Kemp B. 2005. Effect of eggshell temperature during incubation on embryo development, hatchability, and posthatch development. *Poultry Science* 84:914-920.

Lundy H. 1969. A review of the effects of temperature, humidity, turning and gaseous environment in the incubator on the hatchability of the hen's egg. Chapter 9. in: *The fertility and hatchability of the hen's egg*. Carter TC and Freeman BM, ed Oliver and Boyd, Edinburgh, UK. pp 143-176.

Michels H, Geers R, Muambi S. 1974. The effect of incubation temperature on pre and post hatching development and chickens. *British Poultry Science* 15:517-523.

Ono H, Hou PCL, Tazawa H. 1994. Responses of developing chicken embryos to acute changes in ambient temperature: Noninvasive study of heart rate. *Israel Journal of Zoology*, 40:467-480.

Pedroso AA, Café MB, Leandro NSM, Stringhini JH, Chaves LS. 2006. Desenvolvimento embrionário e eclodibilidade de ovos de codornas armazenados por diferentes períodos e incubados em umidades e temperaturas distintas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35:2344-2349.

Romanoff AL. 1936. Effects of different temperatures in the incubator on the prenatal and postnatal development of the chick. *Poultry Science* 15:311-315.

Romanoff AL. 1960. The influence of environment on early development. In *The Avian Embryo: Structural and Functional Development*, Macmillan: New York. pp. 195-207.

Romanoff AL. 1972. Pathogenesis of the avian embryo. An analysis of causes of malformations and prenatal death vol. 4, Chapter. 4 Wiley-Interscience, New York (1972), pp. 57-106.

Smith KP, Bohren BB. 1975. Age of pullet effect on hatching time, egg weight and hatchability. *Poultry Science* 54:959-963.

Statistix, 2003. Statistix for Windows Manual. Copyright © 1985-2003. Analytical Software. Version 8.0.

Suarez ME, Wilson HR, McPherson BN, Mather FB, Wilcox CJ. 1996. Low temperature effects on embryonic development and hatch time. *Poultry Science* 75:924-932.

Tazawa H, Wakayama H, Turner JS, Paganelli CV. 1988. Metabolic compensation for gradual cooling in developing chick embryos. *Comp. Biochem. Physiol.* 89:125-129.

Wilson HR. 1991. Physiological requirements of the developing embryo: Temperature and turning. In *Avian Incubation*. SG Tullet, ed. Butterworth-Heinemann, London. pp 145-156.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully thank FUNCAP and CNPq for their scholarship support to J.M. Romao and T.G.V. Moraes.

## 7. CAPÍTULO 2

### Effect of relative humidity on incubation of Japanese quail eggs

#### Efeito da Umidade Relativa durante a incubação de ovos de codornas japonesas

Periódico Científico: Livestock Research for Rural Development

#### Resumo

Esta pesquisa teve o objetivo de verificar os efeitos da umidade relativa durante a incubação de ovos de codornas japonesas sobre a eclodibilidade, perda de peso do ovo, peso ao nascer e mortalidade embrionária. Um total de 150 codornas japonesas (*Coturnix japonica*) foram utilizadas para a coleta de ovos (n=300). Estes foram divididos em três grupos experimentais: grupo incubado em baixa umidade (36,05±6,06% UR; n=100), grupo incubado em umidade intermediária (52,25±4,99% UR; n=100) e grupo incubado em elevada umidade (76,50±4,44% UR; n=100). Cada grupo de ovos foi incubado em máquinas separadas, de acordo com sua umidade relativa durante a incubação. O processo de incubação ocorreu em incubadoras automáticas com temperatura de 37,5°C e viragem a cada 30 minutos. No 15º dia de incubação (360h), os ovos foram transferidos para a máquina nascedoura, onde se manteve a mesma temperatura e umidade, porém sem a viragem dos ovos. Todos os ovos foram pesados no 1º, 5º, 10º e 15º dia de incubação e todas as codorninhas foram pesadas ao nascer. Os ovos de codorna japonesa incubados em baixa umidade apresentaram alta eclodibilidade (79%) quando comparada a eclodibilidade dos grupos incubados em umidade intermediária e elevada. A perda de peso dos ovos foi, respectivamente, 11,96%; 8,94%; e 4,89% para baixa, intermediária e elevada umidade de incubação. O peso ao nascer foi influenciado pelas diferentes umidades de incubação, porém a mortalidade embrionária não apresentou diferença estatística entre os grupos de umidades diferentes.

**Palavras-chave:** *Coturnix japonica*, eclodibilidade, peso ao nascer, perda de peso do ovo, mortalidade embrionária

## **Abstract**

This research aimed to verify the effect of relative humidity during incubation of Japanese quail eggs on hatchability, egg weight loss, hatch weight, and embryo mortality. A total of 150 Japanese quails (*Coturnix japonica*) were used for egg collections. The eggs were divided into three experimental groups: low humidity group ( $36.05 \pm 6.06\%$  RH; n=100), intermediate humidity group ( $52.25 \pm 4.99\%$  RH; n=100) and high humidity group ( $76.50 \pm 4.44\%$  RH; n=100). Each group of eggs was incubated in an individual incubator, according to its experimental relative humidity during incubation. Incubation process was done by automatic incubators with temperature of  $37.5^{\circ}\text{C}$ , and egg turning every 30 minutes. At the 15<sup>th</sup> day of incubation (360h) egg turning was stopped and the eggs were transferred to the hatcher that maintained the same temperature and relative humidity until hatch. All eggs were weighted on 1<sup>st</sup>, 5<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup>, and 15<sup>th</sup> day of incubation and quail chicks at hatch. Japanese quail eggs incubated at the lower humidity presented the highest level of hatchability (79%) compared to intermediate and high humidities. Egg weight loss was respectively 11.96%, 8.94%, and 4.89% for low, intermediate and high humidity groups. Furthermore, the weight at hatch was influenced by the different incubational humidities. Embryo mortality presented no statistical difference among the different humidity treatments.

**Key-words:** *Coturnix japonica*, hatchability, hatch weight, egg weight loss, embryo mortality

## Introduction

Japanese quail raising is an important poultry business in Brazil. The quails have been reared for both egg and meat production all over the country, mainly by small and medium breeders. Incubation procedures are important to maintenance and improvement of quail egg production in Brazil, which is increasing over the last years. One of the key points of incubation is the humidity control of incubators to allow a successful incubation performance.

Water accounts for 68.25% of total eggs mass before incubation (Martin and Arnold 1991). The amount of moisture lost from the eggs during incubation can affect hatchability (Lundy 1969) and chick weight (Burton and Tullett 1985).

During incubation, a certain amount of water must be around the embryos to protect them from drying out at an early stage of development (Yoshizaki and Saito 2002). Conversely, at a late stage of development, the drying of embryos is necessary to initiate air breathing (Bainter and Fehér 1974).

Usually 12 to 14% of water is lost during incubation of broiler and turkey eggs (Rahn et al 1981). Too low or too high water loss influences embryo development (Rahn and Ar, 1974), and, consequently, egg hatchability (Meir et al 1984). The rate of water loss from eggs during incubation can be regulated through changes in incubator relative humidity (Peebles et al 1987; Tullett 1990).

The temperature can highly influence the relative humidity, and both contribute to water loss during incubation, this way temperature and humidity must be carefully monitored during incubation, because the embryo is not able to control the water loss of egg (Ar 1991).

The relationship between temperature and relative humidity was studied and standardized for duck (Cheng et al 2005), turkey (Applegate et al 1999) and broiler incubation (Van Brecht et al 2003), even though it was not sufficiently studied this relationship on Japanese quail incubation.

The objective of this research was verifying the effect of relative humidity during incubation of Japanese quail eggs on hatchability, egg weight loss, hatch weight, and embryo mortality.

## Material and Methods

A total of 150 Japanese quails (*Coturnix japonica*), 50 males and 100 females, were used for egg collections. The birds were reared in experimental cages in the Laboratório de Estudos Ornitológicos- UECE and they were lodged at a ratio of two females and one male in each cage. The Japanese quails were 22 week old and averaged 90% of egg production. All quails were supplied with balanced feed, water *ad libitum* and 17 hours/day of light.

The eggs were collected and submitted to selection according to industrial parameters for egg incubation, verifying egg shape, extreme sizes and eggshell integrity by candling. They were divided into three experimental groups: low humidity group ( $36.05 \pm 6.06\%$  RH; n=100), intermediate humidity group ( $52.25 \pm 4.99\%$  RH; n=100) and high humidity group ( $76.50 \pm 4.44\%$  RH; n=100). Each group of eggs was incubated in an individual incubator, according to its experimental relative humidity during incubation. Incubation process was done by automatic incubators with temperature of  $37.5^{\circ}\text{C}$ , and egg turning every 30 minutes. At the 15<sup>th</sup> day (360h) of incubation egg turning was stopped and the eggs were transferred to the hatcher which maintained the same temperature and relative humidity until hatch.

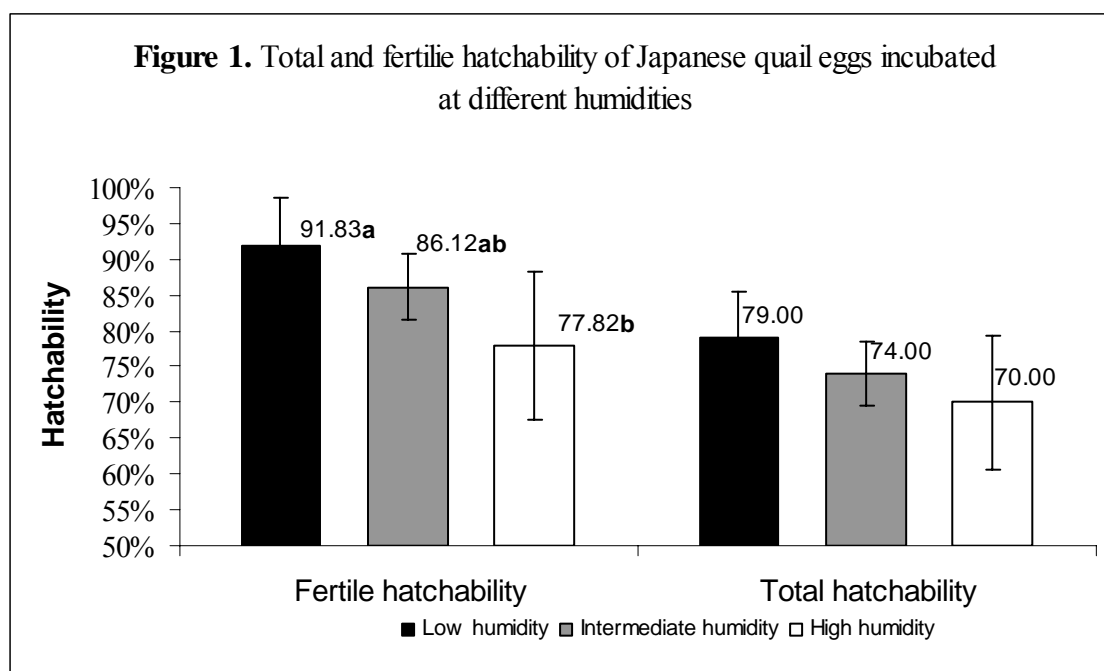
All eggs were identified, individually, and weighted with a precision balance (0.001g), on 1<sup>st</sup>, 5<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup>, and 15<sup>th</sup> day of incubation. All quail chicks were weighted after hatching.

The eggs that failed to hatch were opened for macroscopically observation. Thus they were classified according to time of embryonic mortality. The eggs staged as infertile were the ones with true infertility or pre-incubation mortality. They were also staged as early dead embryos or intermediate dead embryos according to embryo mortality stage. Unhatched eggs classified as late dead were the ones with final stage mortality or pipped eggs with dead embryos.

A total of 300 eggs was divided into 3 experimental groups according to the humidity during incubation. Five replications of twenty eggs per group were followed for each experimental group and data were analyzed using the Statistix software 8.0 (2003). The results were submitted to Analysis of Variance through general linear model and the means egg weight loss and hatch weight were compared with the test of Tukey. The means of hatchability and embryo mortality were compared using Kruskal Wallis test. Statements of significance were based on  $p < 0.05$ .

## Results

Figure 1 shows the fertile and total hatchability of Japanese quail eggs incubated at different relative humidities.



*a-b Means in a column with different superscript differ significantly ( $p < 0.05$ )*

Figure 1 shows that the group incubated in the lower humidity ( $36.05 \pm 6.06\%$  RH) presented the highest levels of fertile and total hatchability and the group incubated with the highest humidity ( $76.50 \pm 4.44\%$  RH) presented the lowest levels of hatchability. The group of eggs incubated in intermediate humidity ( $52.25 \pm 4.99\%$ ) had hatchability levels between the two other groups. The means of hatchability were statistically different just for fertile hatchability ( $p < 0.05$ ).

Table 1 shows the egg weight loss of Japanese quail eggs incubated at different relative humidities.

**Table 1.** Weight loss of Japanese quail eggs incubated at different humidities

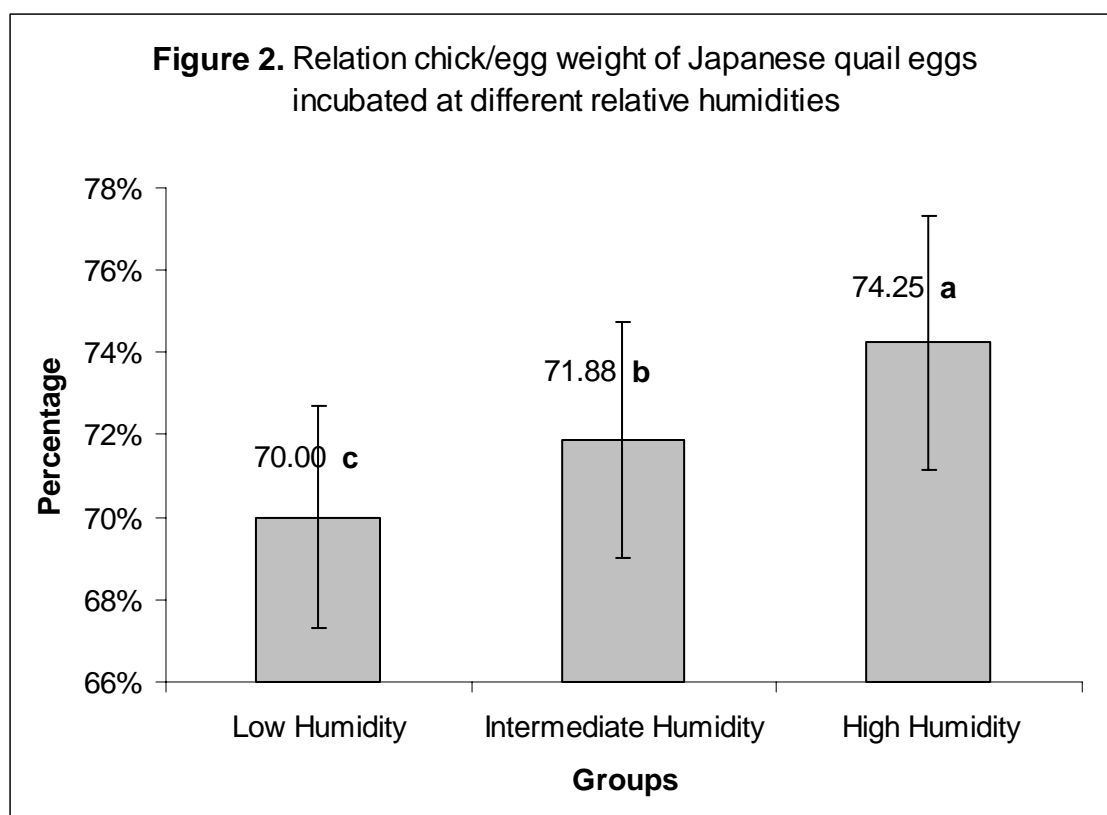
|                    | Low humidity           | Intermediate Humidity | High Humidity         |
|--------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Days of incubation | Mean $\pm$ SD(%)       | Mean $\pm$ SD(%)      | Mean $\pm$ SD(%)      |
| 5                  | $4.27 \pm 0.62^{a,A}$  | $3.46 \pm 0.58^{b,A}$ | $1.58 \pm 0.26^{c,A}$ |
| 10                 | $7.89 \pm 1.18^{a,B}$  | $6.48 \pm 1.12^{b,B}$ | $3.14 \pm 0.50^{c,B}$ |
| 15                 | $11.96 \pm 1.83^{a,C}$ | $8.94 \pm 1.56^{b,C}$ | $4.89 \pm 0.68^{c,C}$ |

*a-c Means in a row with different superscript differ significantly ( $p < 0.05$ )*

*A-C Means in a column with different superscript differ significantly ( $p < 0.05$ )*

Japanese quail eggs incubated at different humidities presented different rates of egg weight loss during the incubation, at the 5<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup> and 15<sup>th</sup> day ( $p < 0.05$ ). The weight loss was directly influenced by humidity during incubation. The eggs submitted to the high humidity treatment showed more than twice the weight loss of eggs incubated in low humidity. The weight loss of eggs incubated in the intermediate humidity was between the losses of the two other groups. The eggs averaged approximately 0.797, 0.596, and 0.326% daily weight loss for low, intermediate and high humidity treatments, respectively.

Figure 2 shows the percentage ratio between chick weight at hatch and initial egg weight of Japanese quail eggs incubated at different relative humidities.



*Different letters (a,b,c) indicate significant differences among groups ( $p < 0.05$ )*

The heavier chicks were those which eggs presented the lower egg weight loss. The percentage ratio between Japanese chick weight at hatch and initial egg weight decreased as the experimental humidities increased. The real chick weights were  $8.89 \pm 0.80$ ,  $8.77 \pm 0.86$ , and  $9.47 \pm 0.82$  g for low, intermediate and high humidities. The chick weight in the intermediate humidity group was slightly smaller than the chicks from the low humidity group because the initial egg weight of the low humidity group

( $12.70 \pm 0.88\text{g}$ ) was higher than the egg weight of the intermediate humidity group ( $12.20 \pm 0.90\text{g}$ ).

Table 2 shows the classification of the Japanese quail eggs that did not hatch in each humidity group.

**Table 2.** Classification of unhatched eggs incubated at different humidities

|             | Low humidity     | Intermediate Humidity | High Humidity    |
|-------------|------------------|-----------------------|------------------|
| Categories  | Mean $\pm$ SD(%) | Mean $\pm$ SD(%)      | Mean $\pm$ SD(%) |
| Infertile   | $14.00 \pm 7.65$ | $13.00 \pm 6.00$      | $10.00 \pm 5.16$ |
| Early death | $2.00 \pm 2.30$  | $6.00 \pm 5.16$       | $5.00 \pm 7.57$  |
| Late death  | $5.00 \pm 3.82$  | $6.00 \pm 2.30$       | $15.00 \pm 3.82$ |

It was not found intermediate embryo mortality. Infertility or pre-incubational mortality is not affected by incubational humidity.

Japanese quail eggs incubated at low humidity ( $36.05 \pm 6.06\%$  RH) presented lower rates of early and late embryo death. The eggs incubated at high humidity ( $76.50 \pm 4.44\%$  RH) presented the highest rate of late embryo death. Despite the great numerical differences, embryo mortality categories were not statistical different ( $p < 0.05$ ).

## Discussion

### Hatchability

Lundy (1969) reported 50 to 60% RH to produce the best hatchability in chicken eggs, and it was also verified that the best hatchability rate is obtained when the egg weight loss is around 12%. Pedroso et al (2006) found  $77.85\% \pm 7.38$  and  $75.28\% \pm 12.07$  for Japanese quail eggs incubated at 55% RH and 65% RH, respectively. We verified different hatch rates for fertile eggs ( $p < 0.05$ ).

### Egg weight loss

The egg weight loss is an important parameter for incubation. It has been used to estimate vital gas exchange (Paganelli et al 1978; Rahn et al 1979) and has been

correlated with the rate of embryonic metabolism and development (Rahn and Ar 1980; Burton and Tullet 1983).

Ar and Rahn (1980) examined the loss of mass in eggs during incubation and evidences showed that this was essentially due to loss of water. About 10 to 11% of the water is lost in domestic fowl eggs during the incubation period (Tullett and Deeming 1987). The temperature can highly influence the relative humidity, and both contribute to water loss during incubation, this way temperature and humidity must be carefully monitored during incubation, because the embryo is not able to control the water loss of egg (Ar 1991).

Soliman et al (1994) found an egg weight loss of 11.32% in Japanese quail eggs incubated 37.5°C dry bulb and 30°C wet bulb (56% UR). We verified that the different humidities highly influenced the egg weight loss. It was observed that the eggs incubated in low humidity lost more than twice the egg weight loss of eggs incubated in high humidities.

### **Chick weight**

The weight of chicks at hatch can be affected by several factors, including species, breed, egg nutrient levels, egg environment, egg size (Wilson 1991), weight loss during incubation period, weight of shell and other residues at hatch (Tullet and Burton 1982), shell quality and, incubator conditions (Peebles and Brake 1987). In this experiment the only parameter that varied was humidity, this way chick weight was mostly influenced by this condition. The different humidities promoted different rates of egg weight loss which were inversely proportional to chick weight at hatch.

Bruzual et al (2000) reported that relative humidity inferior to 63% during incubation decrease chick weight. Small chicks have higher surface area to weight ratios and are therefore more easily dehydrated than larger chicks. Dehydration has been reported to be associated with higher mortality of chicks from young breeders (Wyatt et al 1985).

### **Embryo mortality**

The water loss is one of the most important processes that cause embryonic death (Tiwary and Maeda 2005). Romanoff (1930) reported that insufficient egg weight loss during incubation can reduce the gas exchange through the egg membranes

promoting a decreased hatchability. In the other hand, Soliman et al (1994) suggested that early deaths are result of excessive weight loss in Japanese quail eggs.

It was reported that high RH (75-80%) increased mortality and a low RH (40-50%) lowered late embryo death of eggs laid by older hens (Robertson 1961; Bruzual et al 2000). Pedroso et al (2006) observed 18.56% of early embryo mortality of Japanese quail eggs incubated at 55% RH.

## References

**Applegate T J, Dibner J J and Kitchell M L 1999** Effect of turkey (*Meleagris gallopavo*) breeder hen age and egg size on poult development. 2. Intestinal villus growth, enterocyte migration and proliferation of the turkey poult; *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology*, 124(4):381-389.

**Ar A 1991** Egg water movements during incubation. In: S.G. Tullet. (ed). *Avian Incubation*. London, (Buterworth-Heinemann) 157-173.

**Ar A and Rahn H 1980** Water in the avian egg overall budget of incubation; *American Zoologist*, 20:373-384.

**Bainter K Jr and Feher G 1974** Fate of egg white trypsin inhibitor and start of proteolysis in developing chick embryo and newly hatched chick; *Developmental Biology*, 36: 272-278.

**Burton F G and Tullet SG 1983** A comparison of the effect of eggshell porosity on the respiration and growth of domestic fowl, duck and turkey embryos; *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A*, 75:167-174.

**Burton F G and Tullet S G 1985** The effect of egg weight and shell porosity on the growth and water balance of the chicken embryo; *Comparative Biochemistry and Physiology*, 81:377-385.

**Bruzual J J, Peak S D, Brake J and Peebles E D 2000** Effects of relative humidity during incubation on hatchability and body weight of broiler chicks from younger breeder flocks; *Poultry Science*, 79: 827-830.

**Cheng Y S, Rouvier R and Poivey J P 2005** Selection responses in duration of fertility and its consequences on hatchability in the intergeneric crossbreeding of ducks; *British Poultry Science*, 46(5): 565-571.

**Lundy H 1969** A review of the effects of temperature, humidity, turning and gaseous environment in the incubator on hatchability of hen's eggs. In: T. C. Carter and B. M. Freeman, ed. Oliver and Boyd, (Edinburgh, UK). The Fertility and Hatchability of the Hen's Egg. Pages 143–176.

**Martin P A and Arnold T W 1991** Relationships among fresh mass, incubation time, and water loss in Japanese quail eggs; *The Condor*, 93:28-37.

**Meir M, Nir A and Ar A 1984** Increasing hatchability of turkey eggs by matching incubator humidity to shell conductance of individual eggs; *Poultry Science*, 63:1489-1496

**Paganelli C V, Ackerman R A and Rahn H 1978** The avian egg: In vitro conductances to oxygen, carbon dioxide, and water vapor in late development. In: J. Piiper (ed) *Respiratory function in birds, adult and embryonic*, (Springer-Verlag, Berlin, Germany) 212-218

**Pedroso A A, Café M B, Leandro N S M, Stringhini J H and Chaves L S 2006** Desenvolvimento embrionário e eclodibilidade de ovos de codornas armazenados por diferentes períodos e incubados em umidades e temperaturas distintas; *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35(6):2344-2349.

**Peebles E D and Brake J 1987** Eggshell quality and hatchability in broiler breeders eggs; *Poultry Science*, 66:596-604.

**Peebles E D, Brake J and Gildersleeve R P 1987** Effects of eggshell cuticle removal and incubation humidity on embryonic development and hatchability of broilers; *Poultry Science*, 66:834–840.

**Rahn H and Ar A 1974** The avian egg: Incubation time and water loss; *Condor*, 76:147-152.

**Rahn H, Ar A and Paganelli C V 1979** How bird eggs breathe; *Scientific American*, 240: 46-55.

**Rahn H and Ar A 1980** Gas exchange of the avian egg: time, structure and function; American Zoologist, 20:477-484.

**Rahn H, Christensen V L and Edens F W 1981** Changes in shell conductance, pores, and physical dimensions of egg and shell during the first breeding cycle of turkey hens; Poultry Science, 60:2536-2541.

**Robertson I S 1961** Studies on the effect of humidity on the hatchability of hen's eggs. The determination of optimum humidity for incubation; Journal of Agricultural Science, 57:185-194.

**Romanoff A L 1930** Biochemistry and biophysics of the development of hen's egg. Memoirs of Cornell University Agricultural Experimental Station, 132:1-27.

**Soliman F N K, Rizk R E and Brake J 1994** Relationship between shell porosity, shell thickness, egg weight loss, and embryonic development in Japanese quail eggs; Poultry Science 73:1607-1611.

**Statistix 2003** Statistix for Windows Manual. Copyright © 1985-2003. Analytical Software. Version 8.0.

**Tiwari A K and Maeda T 2005** Effects of egg storage position and injection of solutions in stored eggs on hatchability in chickens (*Gallus domesticus*) - Research note. The Journal of Poultry Science, 42:356-362.

**Tullett S C and Burton F G 1982** Factors affecting the weight and water status of the chick at hatch. British Poultry Science, 23:361-369.

**Tullett S G and Deeming D C 1987** Failure to turn eggs during incubation: effects on embryo weight, development of the chorioallantois and absorption of albumen; British Poultry Science, 28:239-243.

**Tullett S G 1990** Science and art of incubation; Poultry Science, 69:1-15.

**Van Brecht A, Aerts J M, Degraeve P and Berckmans D 2003** Quantification and control of the spatiotemporal gradients of air speed and air temperature in an incubator; Poultry Science, 82(11):1677-1687.

**Wilson H R 1991** Interrelationship of egg size, chick size, posthatching growth, and hatchability. World's Poultry Science Journal, 47:5-20.

**Wyatt C L, Weaver W D Jr. and Beane W L 1985** Influence of egg size, eggshell quality and posthatch holding time on broiler performance; Poultry Science, 64:2049–2055.

**Yoshizaki N and Saito H 2002** Changes in shell membranes during the development of quail embryos; Poultry Science, 81: 246-251.

#### Acknowledgments

The author (JMR) thanks the Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa-FUNCAP for the grant support.

## 8. CAPÍTULO 3

Effect of *in ovo* vaccination procedures on Japanese quail embryos  
(*Coturnix japonica*) and incubation performance

**Efeito dos procedimentos de vacinação *in ovo* sobre embriões de codorna japonesa  
(*Coturnix japonica*) e desempenho da incubação**

**Periódico Científico: Ciência Animal Brasileira**

### RESUMO

Esta pesquisa avaliou os efeitos dos procedimentos de vacinação *in ovo* na incubação artificial de codornas japonesas. Foi realizado um delineamento fatorial 4x4 com 17 tratamentos (4 dias de injeção x 4 protocolos de injeção, mais um grupo controle). As injeções foram realizadas em nos dias 0, 5, 10 ou 15 de incubação. Em cada um desses dias, os ovos foram injetados com 4 protocolos diferentes: injeção de soro fisiológico com ou sem vedação da casca e injeção da vacina viva da doença de Newcastle (DN) com soro ou diluente industrial. Os ovos foram incubados a 37,5°C e 60% UR. Todos os ovos e codornas nascidas foram pesados. Os ovos não eclodidos foram submetidos ao embriodiagnóstico. As codornas nascidas foram criadas para coleta de sangue e avaliação de títulos de anticorpos contra o vírus da DN. Os resultados demonstraram que a inoculação em si (soro com/sem vedação) não foi prejudicial para os ovos com 10 e 15 dias de incubação. Verificou-se que a vacinação *in ovo* com o vírus vivo da DN (cepa HB1) não é recomendada para ovos férteis de codorna em nenhuma idade do embrião, devido aos elevados índices de mortalidade embrionária e pouca resposta de anticorpos após o nascimento.

**Palavras-chave:** injeção *in ovo*, vacinação, codorna japonesa, ovos, doença de Newcastle

## SUMMARY

This work aimed to evaluate the effects of *in ovo* vaccination procedures on incubation of Japanese quail eggs. The experiment was carried out in a factorial design (4x4) with 17 experimental treatments (4 injection days x 4 injection protocols, plus 1 control group). The injections were tested at four incubation days: at 0, 5, 10 or 15. At each injection day, the eggs were submitted to four distinct injection procedures: saline injection with or without egg sealing and Newcastle disease (ND) vaccine plus saline or industrial diluent, both without sealing. The eggs were incubated at 37.5° C and 60% RH. All eggs and hatched quails were weighted. Unhatched eggs were opened to classify embryo mortality. Hatched quail were raised to obtain blood to evaluate antibody response against Newcastle disease virus (NDV). The injection process itself (saline with/without sealing) was not harmful for eggs at 10 and 15 days of incubation for Japanese quail eggs, however *in ovo* vaccination with live ND vaccine (HB1 strain) is not recommended to fertile quail eggs at any incubation periods due to high levels of embryo mortality and poor post-hatch antibody titers.

**Key-words:** *in ovo* injection, vaccination, Japanese quail, eggs, Newcastle disease

## INTRODUCTION

*In ovo* technology has been studied in the last few years for administration of hormones, nutrients and vaccines. It has been widely applied for vaccination purposes. This technology is already present in 30 countries and accounts for more than 85% of broilers and 60% breeders vaccinated in United States and Canada (BERCHIERI & BOLIS, 2003).

In chicken, *in ovo* vaccines are administered to embryos on day 18 of incubation, which is normally when incubating eggs are transferred to the hatcher (LI et al., 2005). This method offers the advantages of reducing chick handling, improving hatchery manageability through automation, reducing the costs of live production and stimulating an early immune response (JOHNSTON et al., 1997). Many studies have proceeded to investigate the efficacy and safety of *in ovo* vaccination against Marek's disease (SHARMA & BURMESTER, 1982), infectious bronchitis (WAKENELL & SHARMA, 1986), infectious bursal disease (IBD) (GIAMBRONE et al., 2001), and Newcastle disease (AHMAD & SHARMA, 1992).

Newcastle disease (ND) is a highly contagious viral disease of poultry and other bird species caused by specified viruses of the avian paramyxovirus type I (APMV-I) belonging to the family Paramyxoviridae (MAYO, 2002).

Studies within the last few years have shown, however, that only few live vaccines that are routinely administered to hatched chickens may also be injected into embryonated eggs during the late stages of embryonation without a lethal effect (MAST & MEULEMANS, 2003). NDV strains of low virulence such as the B1 strain (AHMAD & SHARMA, 1992) and NDV clone-30 (MEBATSION et al., 2001), that are routinely administered to hatched chicks cannot be employed for *in ovo* vaccination in their current form due to their embryonic lethality. To attenuate NDV strains, different approaches have been applied. Ahmad and Sharma described a Hitchner B1 derived NDV strain for *in ovo* vaccination, mutated by the chemical agent ethyl methanesulfonate (AHMAD & SHARMA, 1992). According to LIMA et al. (2004) vaccination programs can efficiently eradicate this Newcastle virus in quails.

However, it was not studied the *in ovo* vaccination procedures against Newcastle disease for Japanese quail eggs. Thus, the objective of this research was to evaluate the effect of *in ovo* vaccination procedures on incubation performance in Japanese quail embryos (*Coturnix japonica*), analyzing the effect of the inoculation itself as well the vaccinal virus on the embryos.

## MATERIAL AND METHODS

### **Birds and egg collection**

Eighty Japanese quails (*Coturnix japonica*) were used for egg collections. They were housed in experimental battery cages in the Laboratório de Estudos Ornitológicos from Universidade Estadual do Ceará. Three females and one male were lodged in each cage (25 x 25 x 20cm). The birds were 12 weeks of age and averaged 90% egg production. Water and balanced feed were supplied *ad libitum* according to NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1994). They were also submitted to 17 hours/day of light. All the collected eggs were selected verifying egg shape, extreme sizes and eggshell integrity by candling.

### **Experimental groups**

A total of 950 quail eggs was divided into a factorial design (4x4) with 17 experimental treatments (4 injection days x 4 injection types, plus 1 control group), all groups had 50 eggs, except for control group that had 150 eggs.

The *in ovo* injections were tested at four incubation days: at 0 day (prior to incubation), 5 days, 10 days or 15 days of incubation (transference day).

At each injection day, the experimental eggs were submitted to four distinct injection procedures: saline injection without egg sealing, saline injection with egg sealing, Newcastle vaccine plus saline injection without sealing or Newcastle vaccine plus industrial diluent injection without sealing.

### **Injection procedures**

The eggs were removed from incubators and the *in ovo* injection was performed at room temperature in a clean lab. First the eggs were disinfected with ethyl alcohol (70%) and then they were placed with their large end up. This part of eggshell was holed with a sterile hollow needle (0.8mm diameter) to allow the injection of 0.025mL of inoculum. The eggs were injected by an adjustable micropipette with plastic tips adapted with hollow needles (0.7mm diameter). The inoculum was delivered at 4-5mm depth from eggshell surface. The injection procedure made a hole in the egg shell with an area of approximately 0.5mm<sup>2</sup>. The sealing procedure was performed just after the eggs were injected by filling the hole made by the injection with non-toxic glue. Then the eggs were placed again in the incubator machines.

### **Injected substances**

All treatments consisted of injection of 0.025mL of a solution as follows: saline, vaccine plus saline or vaccine plus industrial diluent.

Saline: Physiological saline solution 0.9% Sodium Chloride. Na<sup>+</sup> 154 mEq/L, Cl<sup>-</sup> 154 mEq/L. Total osmolarity of 308 milliosmoles per liter.

Vaccine: live freeze-dried vaccine of Newcastle disease, Hitcher B1 strain (HB1).

Industrial diluent: Sterile diluent for vaccination by eye drop route. Both vaccine and diluent were made by the same manufacturer.

Live freeze-dried vaccines were rehydrated just before the use for injection into quail eggs with industrial diluent or saline according to each experimental treatment. The vaccine dilution was prepared by mixing 1000 doses of vaccine with 30 mL of diluent. All procedures from storage to manipulation of injected substances were carried out according to manufacturers' recommendations.

### **Egg and hatch weight measurements**

All eggs were identified, individually, and weighted on their collection day and at the 15<sup>th</sup> day of incubation to verify egg weight loss. All hatched quail were weighed individually after hatching. Weight measurements were obtained with a precision balance (0.001g).

### **Incubation and post-hatch period**

Eggs were incubated in horizontal position by automatic hatcher with temperature of 37.5°C, relative humidity of 60% and egg turning every 2 hours. At the 15<sup>th</sup> day of incubation (360h) the eggs were transferred to the hatcher which maintained the same conditions of humidity and temperature, but without turning. After hatch the quails were housed in an experimental poultry facility. They were reared up to 15 days, in experimental cages according to each treatment. Each cage was supplied with water and balanced feed *ad libitum*, 24 hours of light and heat. After 15 days, all quail chicks were euthanized to perform the blood collections.

### **Embryonic mortality**

Eggs that failed to hatch were opened for macroscopically observation, thus they were classified according to time of embryonic mortality. They were staged as infertile-

early death embryo, which were the eggs with true infertility, pre-incubation mortality or initial stage mortality. The embryos that presented mortality in the intermediate development stage were classified as intermediate embryo death. Unhatched eggs classified as final embryo death were the ones with late stage mortality or pipped eggs with dead embryos. This classification was according to PEDROSO et al. (2006) that classified the embryo mortality in quail chicks as early death embryos (1 up to 4 days), intermediate (5 up to 15) and late death embryo (16 up to 18 days).

### **Blood collection and serological tests**

The hatched quails were reared separately according to each experimental group up to 15 days, when they were submitted to blood collections in order to assess the antibody response against Newcastle disease vaccination.

After euthanasia for beheading, blood samples were collected from jugular vein. Sera were separated, identified and frozen at -20°C until the serological tests were performed.

Serological analysis was performed by haemagglutination inhibition test (HI) according to ALLAN & GOUGH (1974) methodology. The test was done in V-bottomed microtitre plates with 96 wells. It started with addition of 25 µL of phosphate buffered saline-PBS (pH 7.2) in each well of the microtitre plates. A multichannel pipette was used to perform serial twofold dilutions of each serum sample along the row by transferring 25 µL of fluid from one well to the next. 25 µL of ND virus antigen at a concentration of 4 haemagglutination units was added to each well. The side of plates was tapped gently to mix, and then they were covered and allowed to stand at room temperature (26°C) for 30 minutes. Afterwards, 25 µL of a 1% suspension of red blood cells was added to each well. The side of plates was tapped gently to mix again, and then they were covered and allowed to stand at room temperature for 45 minutes for the appearance of a pattern of haemagglutination. The agglutination pattern was read and the titers were recorded as the highest dilution of serum that caused complete inhibition of haemagglutination.

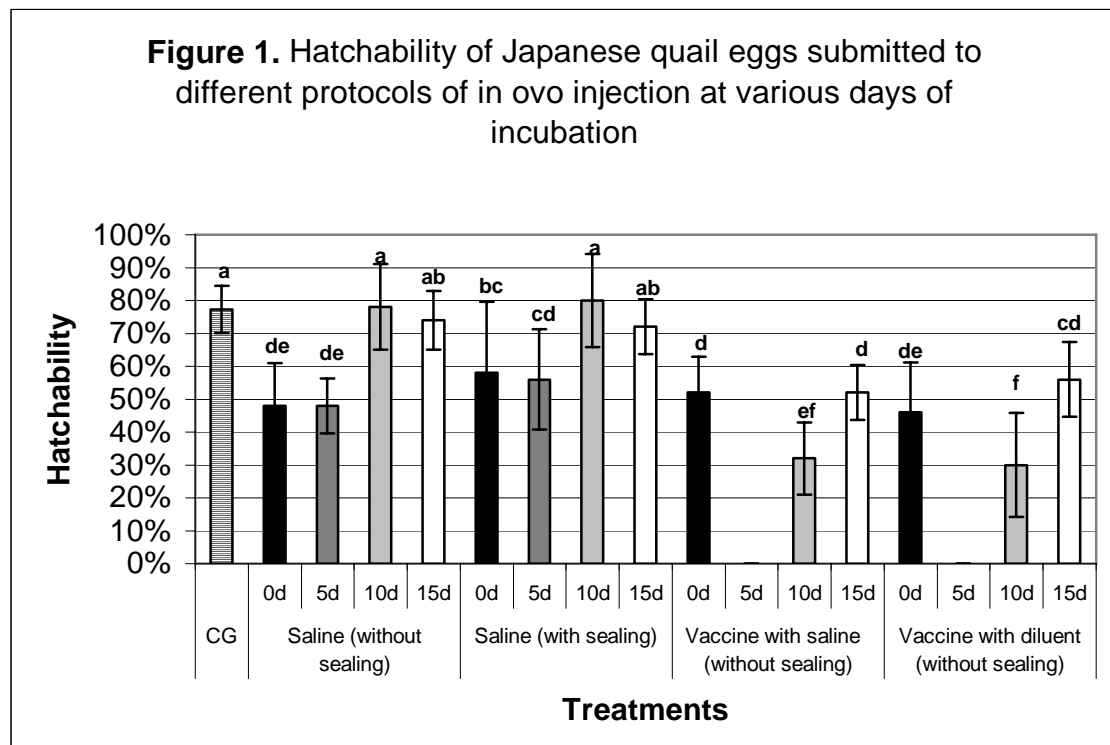
HI results from individual birds were expressed as the reciprocal of the end point serum dilution. Three rows of wells were left as controls: the first row contained a known NDV antiserum (positive control), the second row contained NDV antigen alone (negative control) and the third row contained normal saline with chicken red blood cells (reagent control).

## Statistical Analysis

A total of 950 quail eggs was divided into a factorial design (4x4) with 17 experimental treatments (4 injection days x 4 injection types, plus 1 control group). Each experimental group (n=50) consisted of five replicates of 10 eggs, except for the control group with 150 eggs and five replicates of 30 eggs. All data were analyzed using the Assistat v. 7.5 (2008). The results were submitted the test of Shapiro-Wilk to verify normality and to Bartlett's test to verify homogeneity of variances. Hatchability, egg weight loss and chick/egg weight means were submitted to Analysis of Variance through general linear model. Means of hatchability were compared with the test of Duncan and the means of egg weight loss and chick/egg were compared with the test of Tukey. Embryo mortality means were compared through Kruskal-Wallis' test. Statements of significance were based on  $P < 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

The figure 1 shows the hatch rates of Japanese quail eggs that were *in ovo* injected at four different periods of incubation with four different solutions..



a,b,c,d,e,f Means within the columns with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ )

The results showed that all non sealed groups of eggs that received *in ovo* injection before the incubation (0 day) presented similar hatch rates. This shows that at this period the injection of live vaccine of ND is not detrimental to hatchability compared to the groups that received saline. At this period the embryo is still in its early stages of development and almost all egg's volume is filled by albumen and yolk. According to BURLEY & VADEHRA (1989) the albumen proteins present non-specific defenses against microorganisms and probably against virus. This could be the reason why the live virus was not able to affect the egg hatchability compared to the eggs that received saline. The process of *in ovo* injection before incubation even with saline solution was harmful to embryo survival, since the hatch rates of injected eggs was lower than the control group.

The hatchability of eggs injected with saline (with or without sealing) at 5 days was similar to the ones injected before the incubation. However their results were completely different to the ones that were injected at 5 days with vaccine that had no hatched quails. This result shows that the *in ovo* injection of live vaccine of Newcastle disease (HB1) was totally lethal to quail embryos at 5 days of development. This finding is in accordance to some studies within the last few years that have shown that only few live vaccines that are routinely administered to hatched chicks may also be injected into embryonated eggs during the late stages of embryonation without a lethal effect (MAST & MEULEMANS, 2003). NDV strains of low virulence such as the B1 strain (AHMAD & SHARMA, 1992) and NDV clone-30 (MEBATION et al., 2001), that are routinely administered to hatched chicks cannot be employed for *in ovo* vaccination in their current form due to their embryonic lethality.

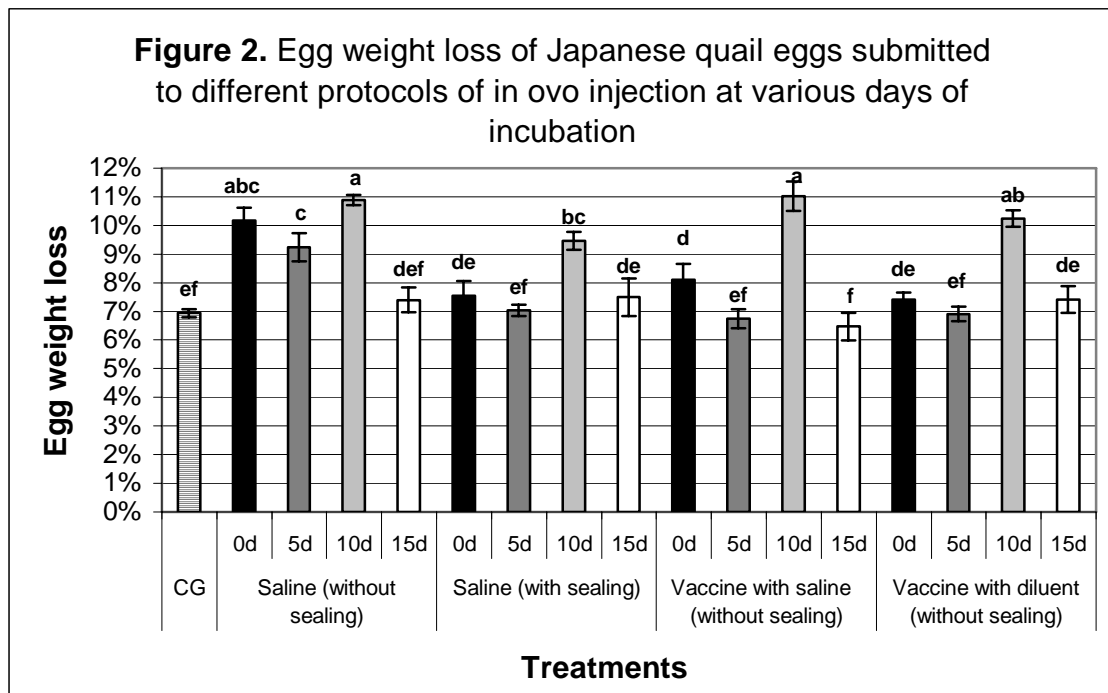
The eggs injected at 10 and 15 days with saline presented hatch rates similar to the control group, showing that the injection procedure was not detrimental to quail embryos at 10 and 15 days of development. However the same was not observed when the eggs were injected with vaccine. Hatchabilities of eggs that received vaccine at 10 and 15 days were lower than the control group. However the embryos with 15 days of development seemed to be more resistant to live vaccination compared to embryonated eggs vaccinated at 10 days, since these ones showed a lower hatch rates compared to the older ones. This way we observed that HB1 strain can not be applied to *in ovo* vaccination to quail eggs due to its poor hatchability. It is relevant to observe that at the transference day (15 days for quails and 18 days for chickens) Japanese quail embryos seem to be more resistant than chicken embryos that receiving an *in ovo* vaccination

with a lentogenic NDV strain since the last ones can presented up to 100% mortality (SARAVANABAVA et al., 2005). Maybe a process of attenuation of this strain could produce a better hatchability for quail eggs. To attenuate NDV strains, different approaches have been applied. AHMAD & SHARMA (1992) described a Hitchner BI derived NDV strain for *in ovo* vaccination, mutated by the chemical agent ethyl methanesulfonate. The La sota strain has also been attenuated to *in ovo* vaccination by selection of scape mutants with monoclonal antibodies (MAST et al., 2006).

The eggs injected at different ages (5, 10 and 15 days) with saline followed by eggshell sealing or not presented no statistical difference for each day of injection. It shows that the eggshell sealing procedure was not a critical procedure for successful *in ovo* injection, except for eggs injected before the incubation.

The use of saline solution or industrial diluent to rehydrate the freeze-dried vaccine did not promote differences among the groups of eggs vaccinated at the same period. Thus, it was verified that both saline solution and industrial diluent have similar hatch rate performances concerning their use to *in ovo* vaccination against Newcastle disease.

The figure 2 shows the percentage weight loss of Japanese quail eggs that were *in ovo* injected at four different periods of incubation with four different solutions.



a,b,c,d,e,f Means within the columns with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ )

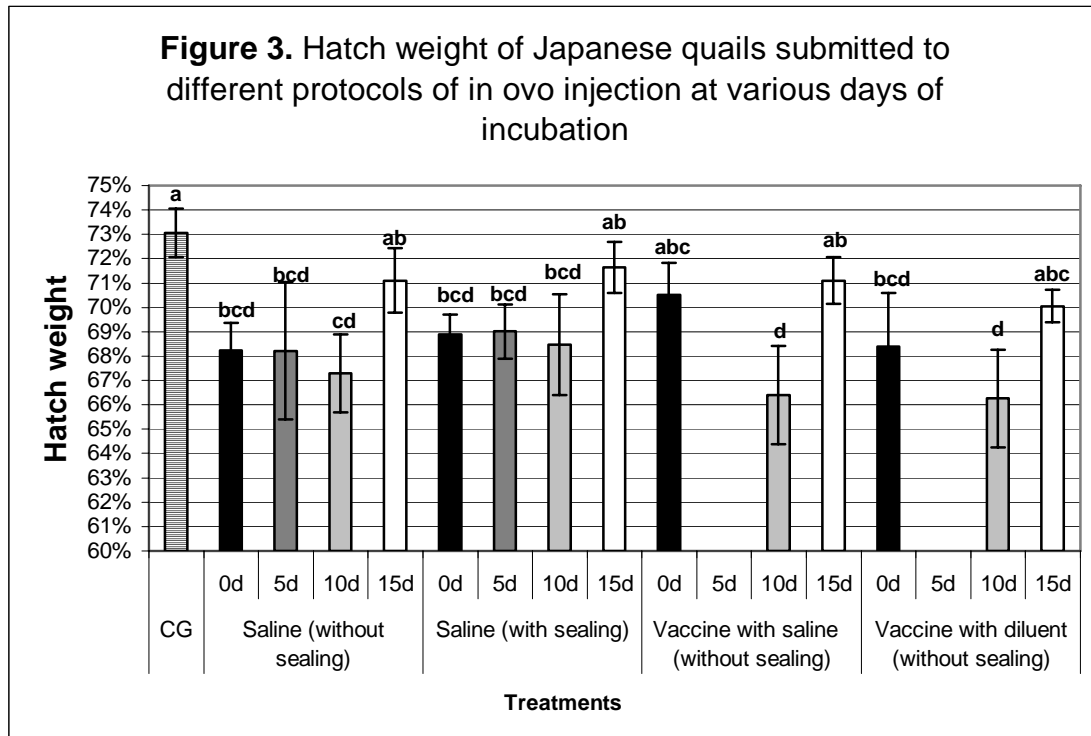
The egg weight loss is an important parameter for incubation. It has been used to estimate vital gas exchange (PAGANELLI et al., 1978; RAHN et al., 1979) and has been correlated with the rate of embryonic metabolism and development (RAHN & AR, 1980; BURTON & TULLET, 1983). AR & RAHN (1980) examined the loss of mass in eggs during incubation and evidences showed that this was essentially due to loss of water. The water vapor conductance is related to the pore area and thickness of eggshell (RAHN & AR, 1974).

The results showed that egg weight loss was higher or at least similar for eggs that were injected compared to the ones from the control group. That can be explained by the hole that was made to perform the injection of solutions. The process of *in ovo* injection into the egg creates a hole with approximately  $0.5\text{mm}^2$  that increases the conductance area of eggshell. Without artificial holes, the gas exchange is made only by the pores that are naturally distributed on eggshell.

Comparing the eggs that were injected with saline followed by sealing or not, it was possible to observe that the process of sealing eggshell after injection reduced the egg weight loss of eggs for injections at 0, 5 and 10 days of incubation. It was not found statistical difference for eggs injected at 15 days, this way this process does not interfere when *in ovo* injection is performed at the later stages of embryo development.

In a general way, the eggs injected at 10 days of incubation presented higher levels of weight loss compared to eggs that were injected earlier (0 and 5 days) and later (15 days). The increase of weight loss and therefore the conductance between the egg and the environment can be particularly interesting for poultry embryos at the later stages of incubation for a better performance of gas exchange and respiration. In chicken eggs, the *in ovo* injection performed by 16 gauge (1.6mm diameter) needles provide an addition of 25 to 30% of relative pore volume which can be considered as a physiological advantage (BERCHIERI & BOLIS, 2003).

The figure 3 shows the chick/egg weight ratio (%) of Japanese quail eggs that were *in ovo* injected at four different periods of incubation with four different solutions.



a,b,c,d Means within the columns with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ )

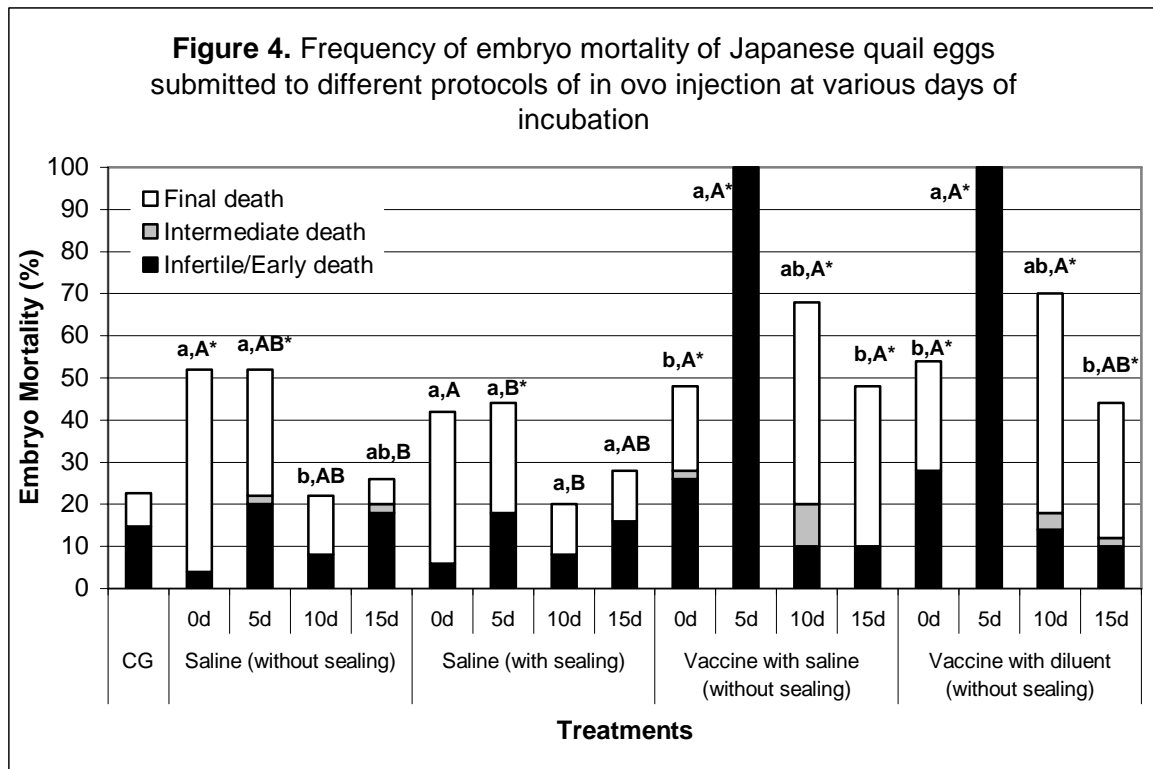
The weight of chicks at hatch can be affected by several factors, including species, breed, egg nutrient levels, egg environment, egg size (WILSON, 1991), weight loss during incubation period, weight of shell and other residues at hatch (TULLET & BURTON, 1982), shell quality and, incubator conditions (PEEBLES et al., 1987). In this experiment the hatch weight was affected by new factors, such as the procedures of *in ovo* injection. Most of Japanese quail eggs submitted to *in ovo* injection presented a reduced hatch weight compared to the eggs that were not injected (control group). The eggs injected at 10 days of incubation were the ones that presented the lowest chick/egg weight ratio. We believe that this lower hatch weight for eggs injected at 10 days can be related to their weight loss during incubation. Increased weight loss and reduced hatch weight may promote detrimental effects on survival of newly hatched quails, since these parameters may lead to dehydration. Small chicks have higher surface area to weight ratios and are therefore more easily dehydrated than larger chicks. Dehydration has been reported to be associated with higher mortality of chicks from young breeders (WYATT et al., 1985).

The eggs injected at 15 days of incubation seemed to be the least affected by *in ovo* injection, concerning hatch weight, since these eggs presented the highest hatch weights among injected eggs and despite their inferior numerical value, they did not present statistical differences to the control group ( $p < 0.05$ ).

Despite the numerical difference between saline injected eggs with sealing and saline injected eggs without sealing, there was no statistical difference among them. This way the process of sealing eggs after injection did not significantly interfere on hatch weight of eggs injected at 0, 5, 10 or 15 days of incubation.

In general, the eggs injected with vaccine or saline solution presented no statistical difference into each day of injection, showing that the *in ovo* vaccination with Newcastle disease virus did not alter initial weight of hatched Japanese quails.

The figure 4 shows the frequency of embryo mortality of Japanese quail eggs that were *in ovo* injected at four different periods of incubation with four different solutions.



<sup>a-b</sup> Columns within each injection protocol with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ )

<sup>A-B</sup> Columns within each day of injection with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ )

\* Columns with an asterisk differ significantly to control group ( $P < 0.05$ )

The process of sealing eggs did not significantly reduce the embryo mortality rates for eggs injected with saline, in the same day of injection. It was not found

differences between eggs injected in the same day with vaccine plus saline or diluent. Most of injection treatments results differed from the control group that was not submitted to any injection procedure. The only groups that did not differed significantly were the ones injected at 10 or 15 days with saline (with/without sealing) and the one injected with saline followed by sealing at 0 day of incubation. Most of injected groups seemed to have higher levels of final death than infertile/early death. On the other hand, the eggs injected with saline at 15 days and the ones injected with vaccine at 0 and 5 days showed infertile/early death as the main reason for failure to hatch. The intermediate embryo death was the least relevant classification of unhatched eggs and does not appeared in all groups. That is similar to chicken eggs that do not present relevant intermediate mortality, since there are two phases of increased embryonic mortality during incubation: the first phase occurs during the first week of incubation and the second phase during the last week (JASSIM et al., 1996). The process of *in ovo* injection can increase embryo mortality since the hole made in the eggshell provides the opportunity to microbial infection. When the hole is made at the later stages of embryo development the time of exposure to a microbial challenge is smaller and the embryo is more prepared to face a microbial challenge, but when the process is done in the earlier stages of incubation the exposure time is longer and the embryo has not a well developed immune system (BERCHIERI & BOLIS, 2003), this way the process can be detrimental to quail embryo survival.

The hatched quails were bled at 15 days of age to evaluate antibody titers against Newcastle disease virus. In general the birds did not respond well. Eggs injected at 0 day did not have quails with antibody against NDV. The eggs injected at 5 days of incubation with vaccine had 0% of hatchability. The eggs injected with vaccine at 10 and 15 days presented 8.7% and 6.9% of hatched quails with antibodies to Newcastle disease. These poor levels of response to *in ovo* vaccination can be explained by the use of an aggressive and inadequate NDV strain for *in ovo* vaccination purpose. Furthermore, it is necessary to study more the injection site in quail eggs since different locations can promote varied *in ovo* vaccination responses. For example, it was verified that the injection of Marek's vaccine in air cell provided no protection for chicks, when it was applied in allantoic fluid the protection ranged from 25 to 50% and when it was applied in amniotic fluid the protection was 90% (BERCHIERI & BOLIS, 2003).

## CONCLUSION

The injection process itself (saline with/without sealing) is not harmful for eggs at 10 and 15 days of incubation for Japanese quail eggs, however *in ovo* vaccination with live Newcastle vaccine (HB1 strain) is not recommended to fertile quail eggs at any incubation periods due to high levels of embryo mortality and poor post-hatch antibody titers.

## REFERENCES

- AHMAD, J.; SHARMA, J.M. Evaluation of a modified-live virus vaccine administered *in ovo* to protect chickens against Newcastle disease. **American Journal of Veterinary Research**, v.53, p.1999–2004, 1992.
- ALLAN, W.H.; GOUGH, R.E. A standard haemagglutination inhibition test for Newcastle disease.1.A comparison of macro and micro methods. **The Veterinary Record**, v.95, p.120-123, 1974.
- AR, A.; RAHN, H. Water in the avian egg: overall budget of incubation. **American Zoologist**, v.20, p.373- 384, 1980.
- ASSISTAT, 2008. Assistência Estatística. Versão 7.5 Beta. INPI 0004051-2.
- BERCHIERI, JR. A.; BOLIS, D.A. Vacinações e aplicações de produtos intra-ovo. In: MACARI, M.; GONZALES, E. (ed). **Manejo da Incubação**: FACTA, Campinas-Brasil, p.267-283, 2003.
- BURLEY, R.W.; VADEHRA, D.V. The Avian Egg: Chemistry and Biology. John Wiley and Sons, New York, NY, 372p, 1989. p 68–71.
- BURTON, F.G.; TULLET, S.G. A comparison of the effect of eggshell porosity on the respiration and growth of domestic fowl, duck and turkey embryos. **Comparative Biochemistry and Physiology-Part A**, v.75, p.167-174, 1983.
- GIAMBRONE, J. J.; DORMITORIO, T.; BROWN, T. Safety and efficacy of *in ovo* administration of infectious bursal disease viral vaccines. **Avian Diseases**, v.45, p.44–148, 2001.
- JASSIM, E.W.; GROSSMAN, M.; KOPS, W.J.; LUYKX, R.A.J. Multiphasic analysis of embryonic mortality in chickens. **Poultry Science**, v.75, p.464-471, 1996.

JOHNSTON, P.A.; LIU, H.; O'CONNELL, T.; PHELPS, P.; BLAND, M.; TYCZKOWSKI, J.; KEMPER, A.; HARDING, T.; AVAKIAN, A.; HADDAD, E.; WHITFILL, C.; GILDERSLEEVE, R.; RICKS, C. A. Applications in *in ovo* technology. **Poultry Science**, v.76, p.165–178, 1997.

LI C.S.; WANG, L.Y.; CHOU, C.C. Field evaluation of flock production performance of *in ovo* injection of infectious bursal disease virus immune complex vaccine in commercial broiler farms. **Journal of Applied Poultry Research**, v.14, p.338–344, 2005.

LIMA, F.S.; SANTIN, E.; PAULILLO, A.C.; JUNIOR, L.D.; MORAES, V.M.B.; GAMA, N.M.Q.; ITURRINO, R.P.S. Evaluation of different programs of Newcastle disease vaccination in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **International Journal of Poultry Science**, v.3, n.5, p.354-356, 2004.

MAST, J.; MEULEMANS, G. Attenuated mutant Newcastle disease virus strains for *in ovo* vaccination, method for preparing and their use. European Patent WO 03/030932 A1, 2003.

MAST, J.; NANBRU, C.; DECAESSTECKER, M.; LAMBRECHT, B.; COUVREUR, B.; MEULEMANS, G.; BERG, T. Vaccination of chicken embryos with escape mutants of La Sota Newcastle disease virus induces a protective immune response. **Vaccine**, v.24, p.1756–1765, 2006.

MAYO, M.A. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. **Archives of Virology**, v.147, p.1655–1656, 2002.

MEBATION, T.; VERSTEGEN, S.; DE VAAN, L.T.; ROMER-OBERDORFER, A.; SCHRIER, C.C. A recombinant Newcastle disease virus with low-level V protein expression is immunogenic and lacks pathogenicity for chicken embryos. **Journal of Virology**, v.75, p.420-428, 2001.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirements of poultry**. Washington, D.C.: p.44-45, 1994.

PAGANELLI, C.V.; ACKERMAN, R.A.; RAHN, H. The avian egg: In vitro conductances to oxygen, carbon dioxide, and water vapor in late development. In: PIIPER, J. (ed). **Respiratory function in birds, adult and embryonic**, Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1978, p.212-218.

PEEBLES, E.D.; BRAKE, J.; GILDERSLEEVE, R.P. Effects of eggshell cuticle removal and incubation humidity on embryonic development and hatchability of broilers. **Poultry Science**, v.66, p.834–840, 1987.

PEDROSO, A.A.; CAFÉ, M.B.; LEANDRO, N.S.M.; STRINGHINI, J.H.; CHAVES, L.S. Desenvolvimento embrionário e eclodibilidade de ovos de codornas armazenados por diferentes períodos e incubados em umidades e temperaturas distintas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.6, p.2344-2349, 2006.

RAHN, H.; AR, A. The avian egg: Incubation time and water loss. **Condor**, v.76, p.147-152, 1974.

RAHN, H.; AR, A.; PAGANELLI, C.V. How bird eggs breathe. **Scientific American**, v.240, p.46-55, 1979.

RAHN, H.; AR, A. Gas exchange of the avian egg: time, structure and function. **American Zoologist**, v.20, p.477-484, 1980.

SARAVANABAVA, K.; NACHIMUTHU, K.; PADMANABAN, V.D. Effect of tuftsin on embryo vaccination with Newcastle disease virus vaccine. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.28, p.269–276, 2005.

SHARMA, J.M.; BURMESTER, B.R. Resistance to Marek's Disease at hatching in chickens vaccinated as embryos with the turkey herpesvirus. **Avian Diseases**, v.26, p.134-149, 1982.

TULLETT, S.C.; BURTON, F.G. Factors affecting the weight and water status of the chick at hatch. **British Poultry Science**, v. 23, p. 361-369, 1982.

WAKENELL, P.S.; SHARMA, J.M. Chicken embryonal vaccination with avian infectious bronchitis virus. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, p.933–938, 1986.

WILSON, H.R. Interrelationship of egg size, chick size, posthatching growth, and hatchability. **World's Poultry Science Journal**, v.47, p. 5-20, 1991.

WYATT, C.L.; WEAVER, W.D.JR.; BEANE, W.L. Influence of egg size, eggshell quality and posthatch holding time on broiler performance. **Poultry Science**, v.64, p.2049–2055, 1985.

## 9. CONCLUSÕES GERAIS

Concluiu-se que todos os fatores estudados na pesquisa, temperatura de incubação, umidade relativa e os procedimentos de vacinação em ovo podem exercer grande influência sobre o desempenho da incubação de ovos de codornas japonesas.

As melhores temperaturas de incubação para ovos de codornas japonesas foram 37 e 38°C. Verificou-se que a temperatura influenciou bastante a eclodibilidade com os melhores desempenhos para 37 e 38°C, enquanto temperaturas maiores e menores obtiveram menores taxas de eclosão. De forma geral, elevadas temperaturas (38, 39, 40 e 41°C) aumentaram o peso ao nascer e reduziram o tempo de nascimento enquanto temperaturas menores (34, 35, 36 e 37°C) promoveram efeitos inversos. Da mesma forma que a eclodibilidade, os extremos superiores e inferiores de temperaturas promoveram níveis críticos de mortalidade embrionária quando comparada com temperaturas intermediárias (37 e 38°C).

A umidade exerceu influência sobre o desempenho da incubação das codornas, sendo que ovos incubados em umidades baixas ( $36,05 \pm 6,06\%$ ) apresentaram melhores índices de eclodibilidade comparados a ovos incubados em umidade elevada ( $76,50 \pm 4,44\%$ ). Os resultados de ovos incubados em umidade intermediária ( $52,25 \pm 4,99\%$  RH) foi similar aos outros dois níveis de umidade. A perda de peso dos ovos também foi influenciada inversamente pela umidade da incubação, enquanto que o peso ao nascer teve uma relação direta com o nível de umidade das máquinas.

Os ovos férteis de codornas japonesas obtiveram melhores desempenhos de incubação após a injeção *in ovo* quando este procedimento é realizado nos estágios finais de incubação (10 ou 15 dias) em relação aos estágios iniciais (0 ou 5 dias). Os procedimentos de injeção *in ovo* quando realizados com soro fisiológico (com ou sem vedação da casca) não foram prejudiciais para os ovos nas idades de 10 e 15 dias de incubação. Já o uso da injeção *in ovo* para inoculação de vacina viva contra a doença de Newcastle foi prejudicial para o desempenho da incubação, não sendo recomendado em virtude dos elevados índices de mortalidade embrionária como também índices baixos ou nulos de imunização.

## 10. PERSPECTIVAS

A pesquisa de fatores biológicos e físicos que podem influenciar a qualidade da incubação de ovos de codornas é fundamental para o desenvolvimento desta atividade produtiva. Pois desta forma a incubação destas aves pode ser baseada nos seus próprios aspectos biológicos e não em outras espécies, como a galinha.

Com o estudo da temperatura verificou-se que a melhor faixa para todo o período de incubação se encontra entre 37 e 38°. Estabelecendo assim um limite de segurança para a obtenção de um bom desempenho reprodutivo. Entretanto verificou-se que os embriões de codorna japonesa são resistentes a elevadas (39-40° C) temperaturas no período inicial e intermediário da incubação, o que abre precedentes para novas pesquisas visando o uso parcial de temperaturas mais elevadas nas técnicas de incubação de codornas japonesas, podendo até promover reduções no tempo de incubação dos ovos sem prejuízos para incubação.

Os resultados obtidos com a pesquisa de umidade relativa durante a incubação artificial revelaram que apesar da umidade ter uma importância na incubação inferior à temperatura, também pode influenciar o resultado da mesma. O achado de que a incubação em baixa umidade foi superior ao de umidades elevadas servirá de alerta para os procedimentos de incubação em codornas japonesas, para que durante a incubação o técnico tenha em mente que desvios de umidade para mais podem ser bem mais prejudiciais do que a ocorrência de baixas umidades. Com a realização de mais pesquisas, o uso de umidades relativas baixas poderá até mesmo ser apontado como um protocolo de incubação satisfatório.

Os resultados da pesquisa com injeção *in ovo* em ovos de codornas japonesas possibilitaram verificar que o processo em si de inoculação não é prejudicial aos 10 e 15 dias de incubação, sendo este um período viável para inoculações em ovos de codornas, entretanto no que diz respeito à vacinação *in ovo*, serão necessários mais estudos com o uso de vírus vacinal mais atenuados para não prejudicar significativamente o desempenho da incubação artificial e que promovam uma adequada resposta protetora de anticorpos.

## 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGREY, S.E.; ANKRA-BADU, G.A.; MARKS, H.L. Effect of long-term divergent selection on growth characteristics in Japanese quail. **Poultry Science**, v.82, p.538–542, 2003.

AHMAD, J.; SHARMA, J.M. Evaluation of a modified live virus vaccine administered *in ovo* to protect chickens against Newcastle disease. **American Journal of Veterinary Research**, v.53, p.1999–2004, 1992.

ALDA, T.R.B.L. Causas de mortalidade embrionária e deformidades do embrião. In; PINHEIRO, M.R. (ed). **Manejo da incubação**. São Paulo, FACTA, 1994, p.160-177.

ALLAN, W.H.; GOUGH, R.E. A standard haemagglutination inhibition test for Newcastle disease.1.A comparison of macro and micro methods. **The Veterinary Record**, v.95, p.120-123, 1974.

APPLEBY, M.C.; MENCH, J.A.; HUGHES, B.O. Poultry: Origins. In: APPLEBY, M.C.; MENCH, J.A.; HUGHES, B.O. (Eds.). **Poultry Behavior and Welfare**. Edingurh: CABI Publishing, 2004. p.1-11.

APPLEGATE, T.J.; HARPER, D.; LILBURN, M.S. Effect of hen production age on egg composition and embryo development in commercial Pekin ducks. **Poultry Science**, v.77, p.1608-1612, 1998.

ARAD, Z.; EYLATH, U.; GINSBURG, M.; EYAL-GILADI, H. Changes in uterine fluid composition and acid-base status during shell formation in the chicken. **American Journal of Physiology**, v.257, p.732–737, 1989.

AR, A. Egg water movements during incubation. In: TULLET, S.G. (ed). **Avian Incubation**. London, (Buterworth-Heinemann), 1991, p.157-173.

AR, A.; RAHN, H. Water in the avian egg: overall budget of incubation. **American Zoologist**, v.20, p.373- 384, 1980.

ARORA, L.L.; KOSIN, I.L. Developmental response of early turkey and chicken embryos to preincubation holding of eggs: Inter-and intra-species differences. **Poultry Science**, v.45, p.958–970, 1966.

ASMUNDSON, V.S.; MACILRAITH, J.J. Preincubation tests with turkey eggs. **Poultry Science**, v.27, p.394–401, 1948.

ASSISTAT, 2008. Assistência Estatística. Versão 7.5 Beta. INPI 0004051-2.

BAINTER, K.JR.; FEHER, G. Fate of egg white trypsin inhibitor and start of proteolysis in developing chick embryo and newly hatched chick. **Developmental Biology**, v.36, p. 272-278, 1974.

BENTON, C.E.; BRAKE, J. The effect of the presence of an embryo on albumen height and pH during preincubation storage and incubation. **Poultry Science**, v.73 (Suppl. 1):38. (Abstr.), 1994.

BERCHIERI, JR. A.; BOLIS, D.A. Vacinações e aplicações de produtos intra-ovo. In: MACARI, M.; GONZALES, E. (eds). **Manejo da Incubação**: FACTA, Campinas-Brasil, p.267-283, 2003.

BLACK, J.L.; BURGGREN, W.W. Acclimation to hypothermic incubation in developing chicken embryos (*Gallus domesticus*) I. Developmental effects and chronic and acute metabolic adjustments. **The Journal of Experimental Biology**, v.207, p.1543-1552, 2004a.

BLACK, J.L.; BURGGREN, W.W. Acclimation to hypothermic incubation in developing chicken embryos (*Gallus domesticus*) II. Hematology and blood O<sub>2</sub> transport. **The Journal of Experimental Biology**, v.207, p.1553-1561, 2004b.

BOAG, P.T.; VAN NOORDWIJK, A.J. Quantitative genetics. In: COOKE, F.; BUCKLEY, P.A. (Eds). **Avian Genetics**. London: Academic Press, 1987. p.45-78.

BOARD, R.G.; HALLS, N.A. The cuticle: A barrier to liquid and particle penetration of the hens egg. **British Poultry Science**, v.14, p.69–97, 1973.

BOHREN, B.B. Preincubation storage effects on hatchability and hatching time of lines selected for fast and slow hatching. **Poultry Science**, v. 57, p.581-583, 1978.

BRAKE, J.; WALSH, T.J.; BENTON, C.E.; PETITTE, J.N.; MEIJERHOF, R.; PENALVA, G. Egg Handling and Storage. **Poultry Science**, v.76, p.144–151,1997.

BRITTON, W.M. Shell membrane of eggs differing in shell quality from young and old hens. **Poultry Science**, v.56, p.647–653, 1977.

BRUZUAL, J.J.; PEAK, S.D.; BRAKE, J.; PEEBLES, E.D. Effects of relative humidity during incubation on hatchability and body weight of broiler chicks from young breeder flocks. **Poultry Science**, v.79, p.827–830, 2000.

BURLEY, R.W.; VADEHRA, D.V. *The Avian Egg: Chemistry and Biology*. John Wiley and Sons, New York, NY, 372p, 1989. p 68–71.

BURTON, F.G.; TULLET, S.G. A comparison of the effect of eggshell porosity on the respiration and growth of domestic fowl, duck and turkey embryos. **Comparative Biochemistry and Physiology-Part A**, v.75, p.167-174, 1983.

BURTON, F.G.; TULLET, S.G. The effect of egg weight and shell porosity on the growth and water balance of the chicken embryo. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.81, p.377-385, 1985.

CALLEBAUT, M.E. Hatching of Japanese quail chicks (*Coturnix coturnix japonica*) following long, daily cyclical interruptions of their incubation. **Poultry Science** , v.69, p.2241-2243, 1990.

CAMPOS, E.J. Avicultura: Razões, fatos e divergências. Belo Horizonte: FEP-MVZ, 2000. 311 p.

CASE, C.L.; FUNKE, B.R.; TORTORA, G.J. Microbiology: An Introduction. The Benjamin/ Cummings Publishing Co., Inc., Redwood City, CA. 1989. Page 173.

CHENG, K.M. Reprodução de codornas: onde estamos indo? In: 1º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE COTURNICULTURA, 2002, Lavras. **Anais...** Lavras:UFLA, 2002. p.12-25.

CHENG, Y.S.; ROUVIER, R.; POIVEY, J.P. Selection responses in duration of fertility and its consequences on hatchability in the intergeneric crossbreeding of ducks. **British Poultry Science**, v.46, n.5, p.565-571, 2005.

CHRISTENSEN, V.L.; DONALDSON, W.E.; MCMURTRY, J.P. Physiological differences in late embryos from turkeys breeders at different ages. **Poultry Science**, v.75, p.172-178, 1996.

CHRISTENSEN, V.L.; DONALDSON, W.E.; NESTOR, K.E. Length of plateau and pipping stages of incubation affects the physiology and survival of turkeys. **British Poultry Science**, v. 40, p.297-303, 1999.

CHRISTENSEN, V.L.; NOBLE, D.O.; NESTOR, K.E. Influence of selection for increased body weight, egg production, and shank width on the length of the Incubation period of turkeys. **Poultry Science**, v.79, p.613-618, 2000.

CIROTTA, C.; ARANGI, I. How do avian embryos breathe? Oxygen transport in the blood of early chick embryos. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.94, p.607–613, 1989.

COTTERILL, O.J.; GARDNER, F.A.; CUNNINGHAM, F.E.; FUNK, E.M. Titration curves and turbidity of whole egg white. **Poultry Science**, v.38, p.836–842, 1959.

CRITTENDEN, L.B.; BOHREN, B.B. The genetic and environmental effect of hatching time, egg weight and holding time on hatchability. **Poultry Science**, v.40, p.1736–1750, 1961.

CRITTENDEN, L.B.; BOHREN, B.B. The effects of current egg production, time in production, age of pullet, and inbreeding on hatchability and hatch time. **Poultry Science**, v.41, p.428–433, 1962.

CUNNINGHAM, F.E.; COTTERILL, D.J.; FUNK, E.M. The effect of season and age of the bird on the chemical composition of egg white. **Poultry Science**, v.39, p.300–308, 1960.

DECUYPERE, E.; MICHELS, H. Incubation temperature as a management tool: a review. **World's Poultry Science Journal**, v.48, p.28-38, 1992.

DECUYPERE, E.; NOUWEN, E.J.; KÜHN, E.R.; GESS, R.; MICHELS, H. Iodohormones in the serum of chick embryos and post-hatching chickens as influence by incubation temperature. Relationship with the hatching process and thermogenesis. **Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**, v.19, p.1713-1723, 1979.

DEEMING, D.C. Characteristics of unturned eggs: Critical period, retarded embryonic growth and poor albumen utilisation. **British Poultry Science**, v.30, p.239–249, 1989.

DEEMING, D.C.; FERGUSON, M.W.J. Physiological effects of incubation temperature on embryonic development in reptiles and birds. In: **Egg Incubation**, DEEMING, D.C.; FERGUSON, M.W.J. (ed.). Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1991, p.147-172.

DIAS, P.F.; MULLER, Y.M.R. Características do desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus domesticus*, em temperaturas e períodos diferentes de incubação. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 35, p.233-235, 1998.

ELIBOL, O.; PEAK, S.D.; BRAKE, J. Effect of flock age, length of egg storage, and frequency of turning during storage on hatchability of broiler hatching eggs. **Poultry Science**, v.81, p.945–950, 2002

ETCHES, R.J. *Reproduction in Poultry*. CAB International, Wallingford, UK. 1996, 318p.

FASENKO, G.M.; CHRISTENSEN, V.L.; BAKST, M.R.; PETITTE, J.N. Evaluating yolk membranes from short and long stored turkey eggs using transmission electron microscopy. **Poultry Science**. 74(Suppl. 1):44. (Abstr.), 1995.

FORSTER, A. **Züchterische Möglichkeiten einer Verbesserung der Schlupfrate in Reinzuchtlinien eines Zuchtprogrammes für braune Legehybriden**. 1993. Ph.D. dissertation. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Kiel, Germany.

FRENCH, N.A. Effects of temperature incubation on the gross pathology of turkey embryos. **British Poultry Science**, v.35, p.363-371, 1994.

FRENCH, N.A. Modeling incubation temperature: The effects of incubator design, embryonic development, and egg size. **Poultry Science**, v.76, p.124–133, 1997.

FRIDRICH, A.B.; VALENTE, B.D.; FELIPE-SILVA, A.S.; SILVA, M.A.; CORRÊA, G.S.S.; FONTES, D.O.; FERREIRA, I.C. Exigência de proteína bruta para codornas européias no período de crescimento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p.261-265, 2005.

FROMM, D. Some physical changes in the perivitelline layer of the hen's egg during storage. **Journal of Food Science**, v.32, p.52–56, 1967.

FUJIKURA, W.S. Situação e Perspectivas da coturnicultura no Brasil. In: 1<sup>o</sup> SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE COTURNICULTURA, 2002, Lavras. **Anais...**Lavras:UFLA, 2002.

FUJIKURA, W.S. The position of São Paulo in the national quail egg market and the profile of the São Paulo city consumer. In: 2º CONGRESSO INTERNACIONAL DE COTURNICULTURA, 2004, Lavras. **Anais...**Lavras:UFLA, 2004.

FUNK, E.M.; BIELLIER, H.V. The minimum temperature for embryonic development in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). **Poultry Science**, v.23, p.538–540, 1944.

FUNK, E.M.; FORWARD, J.; KEMPSTER, H.C. Effect of holding temperature on hatchability of eggs. Missouri Agricultural Experimental. Station Bulletin. 539, Columbia, MO. 1950.

FUNK, E.M.; FORWARD, J. Effect of holding temperature on hatchability of chicken eggs. Missouri Agricultural Experimental Station Bulletin. 732, Columbia, MO. 1960

FURLAN, A.C.; ANDREOTTI, M.O.; MURAKAMI, A.E.; SCAPINELLO, C.; MOREIRA, I.; FRAIHA, M.; CAVALIERI, F.L.B. Valores energéticos de alguns alimentos determinados com codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, p.1147-1150, 1998.

GIAMBRONE, J. J.; DORMITORIO, T.; BROWN, T. Safety and efficacy of *in ovo* administration of infectious bursal disease viral vaccines. **Avian Diseases**, v.45, p.44–148, 2001.

GLADYS, G.E.; HILL, D.; MEIJERHOF, R.; SALEH, T.M.; HULET, R.M. Effect of embryo temperature and age of breeder flock on broiler post hatch performance. **Poultry Science**. 79 (Suppl. 1): 123 (abstr.), 2000.

GOODRUM, J.W.; BRITTON, W.M.; DAVIS, J.B. Effect of storage conditions on albumen pH and subsequent hardcooked eggs peelability and albumen shear strength. **Poultry Science**, v.68, p.1226–1231, 1989.

HAMMOND, C.L.; SIMBI, B.H.; STICKLAND, N.C. *In ovo* temperature manipulation influences embryonic motility and growth of limb tissues in the chick (*Gallus gallus*). **The Journal of Experimental Biology**, v.210, p.2667-2675, 2007.

HURNIK, G.I.; REINHART, B.S.; HURNIK, J.F. Relationship between albumen quality and hatchability in fresh and stored eggs. **Poultry Science**, v.57, p.854–857, 1978.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo agropecuário 2002. [Acesso: 2 janeiro, 2006] Disponível em: URL:<http://www.ibge.gov.br/ibgeteen/datas/pecuaria/home.html>.

INSCO, W.M.; MACLAURA, D.W.; BEGIN, J.J.JR.; JOHNSON, T.H. The relationship on egg weight to hatchability of Coturnix eggs. **Poultry Science**, v.50, p.297- 298, 1971.

JASSIM, E.W.; GROSSMAN, M.; KOOPS, W.J.; LUYKX, R.A.J. Multiphasic analysis of embryonic mortality in chickens. **Poultry Science**, v.75, p.464–471, 1996.

JOHNSTON, P.A.; LIU, H.; O'CONNELL, T.; PHELPS, P.; BLAND, M.; TYCZKOWSKI, J.; KEMPER, A.; HARDING, T.; AVAKIAN, A.; HADDAD, E.; WHITFILL, C.; GILDERSLEEVE, R.; RICKS, C. A. Applications in *in ovo* technology. **Poultry Science**, v.76, p.165–178, 1997.

KARACA, K.; SHARMA, J.M.; WINSLOW, B.J.; JUNKERT, D.E.; REDDY, S.; COCHRAN, M.; MCMILLEN, J. Recombinant fowlpox viruses coexpressing chickens type I IFN and Newcastle disease virus HN and F genes: influence of IFN on protective efficacy and humoral responses of chickens following *in ovo* or post-hatch administration of recombinant viruses. **Vaccine**, v.16, p.1–7, 1998.

KAUFMAN, L. An experimental study of the effects of storage on embryonal development of hens' eggs. In: **Proceedings, SEVENTH WORLD'S POULTRY CONGRESS EXPOSITION**, Cleveland, OH. 1939. Pages 186–187.

KIRK, S.; EMMANS, G.C.; MCDONALD, R.; ARNOT, D. Factors affecting the hatchability of eggs from broiler breeders. **British Poultry Science**, v.21, p.37–53, 1980.

KUCERA, P.; RADDATZ, E. Spatio-temporal micromeasurements of the oxygen uptake in the developing chick embryo. **Respiration Physiology**, v.39, p.199–215, 1980.

LEANDRO, N.S.M.; GONZALES, E.; VAROLI, JR.J.C.V.; LODDI, M.M.; TAKITA, T.S. Incubabilidade e Qualidade de Pintos de Ovos Matrizes de Frangos de Corte Submetidos a Estresse de Temperatura. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 2, p.39-44, 2000.

LEANDRO, N.S.M.; VIEIRA, N.S.; MATOS, M.S.; CAFÉ, M.B.; STRINGHINI, J.H.; SANTOS, D.A. Desempenho produtivo de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) submetidas a diferentes densidades e tipos de debicagem. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.27, p.129-135, 2005.

LEKSRISOMPONG, N. **Effect of temperature during incubation and brooding on broiler chickens**, 2005. Raleigh, United States: North Carolina State University. Master's degree Thesis (Tese), 2005.

LESSELLS, C.M.; COOKE, F.; ROCKWELL, R.F. Is there a trade-off between egg weight and clutch size in wild Lesser Snow Geese (*Anser c. caerulescens*)? **Journal of Evolutionary Biology**, v.2, p.457-472, 1989.

LI C.S.; WANG, L.Y.; CHOU, C.C. Field evaluation of flock production performance of *in ovo* injection of infectious bursal disease virus immune complex vaccine in commercial broiler farms. **Journal of Applied Poultry Research**, v.14, p.338–344, 2005.

LILJA, C.; BLOM, J.; MARKS, H.L. A comparative study of embryonic development of Japanese quail selected for different patterns of postnatal growth. **Zoology**, v.104, p.115–122, 2001.

LIMA, F.S.; SANTIN, E.; PAULILLO, A.C.; JUNIOR, L.D.; MORAES, V.M.B.; GAMA, N.M.Q.; ITURRINO, R.P.S. Evaluation of different programs of Newcastle

disease vaccination in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **International Journal of Poultry Science**, v.3, n.5, p.354-356, 2004.

LOURENS, A.; VAN DE BRAND, H.; MEIJERHOF, R.; KEMP, B. Effect of eggshell temperature during incubation on embryo development, hatchability, and posthatch development. **Poultry Science**, v.84, p.914-920, 2005.

LUNDY, H. A review of the effects of temperature, humidity, turning and gaseous environment in the incubator on the hatchability of the hen's egg. In: CARTER, T.C.; FREEMAN, B.M. (Eds). **The Fertility and Hatchability of the Hen's Egg**. Edinburgh, UK: Oliver and Boyd, 1969. p.143-176.

MARTIN, P.A.; ARNOLD, T.W. Relationships among fresh mass, incubation time, and water loss in Japanese quail eggs. **The Condor**, v.93, p.28-37, 1991.

MAST, J.; MEULEMANS, G. Attenuated mutant Newcastle disease virus strains for *in ovo* vaccination, method for preparing and their use. European Patent WO 03/030932 A1, 2003.

MAST, J.; NANBRU, C.; DECAESSTECKER, M.; LAMBRECHT, B.; COUVREUR, B.; MEULEMANS, G.; BERG, T. Vaccination of chicken embryos with escape mutants of La Sota Newcastle disease virus induces a protective immune response. **Vaccine**, v.24, p.1756–1765, 2006.

MATHER, C.M.; LAUGHLIN, K.F. Storage of hatching eggs: The interaction between parental age and early embryonic development. **British Poultry Science**, v.20, p.595–604, 1979.

MAYO, M.A. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. **Archives of Virology**, v.147, p.1655–1656, 2002.

MCNABB, F.M.A.; DUNNINGTON, E.A.; SIEGEL, P.B.; SUVARNA, S. Perinatal thyroid hormones and hepatic 5' deiodinase in relation to hatching time in weight-selected lines of chickens. **Poultry Science**, v.72, p.1764–1771, 1993.

MCNAUGHTON, J.L.; DEATON, J.W.; REECE, F.N.; HAYNES, R.L. Effect of age of parents and hatching egg weight on broiler chick mortality. **Poultry Science**, v.57, p.38-44, 1978.

MEBATION, T.; VERSTEGEN, S.; DE VAAN, L.T.; ROMER-OBERDORFER, A.; SCHRIER, C.C. A recombinant Newcastle disease virus with low-level V protein expression is immunogenic and lacks pathogenicity for chicken embryos. **Journal of Virology**, v.75, p.420-428, 2001.

MEIJERHOF, R.; NOORDHUIZEN, J.P.T.M.; LEENSTRA, F.R. Influence of pre-incubation treatment on hatching results of broiler breeder eggs produced at 37 and 59 weeks of age. **British Poultry Science**, v.35, p.249-257, 1994.

MEIR, M.; NIR, A.; AR, A. Increasing hatchability of turkey eggs by matching incubator humidity to shell conductance of individual eggs. **Poultry Science**, v.63, p.1489-1496, 1984.

MEUER, H.J.; BAUMANN, R. Oxygen pressure in intra and extraembryonic blood vessels of early chick embryo. **Respiration Physiology**, v.71, p.331-342, 1988.

MICHELS, H.; GEERS, R.; MUAMBI, S. The effect of incubation temperature on pre and post hatching development and chickens. **British Poultry Science**, v.15, p.517-523, 1974.

MINVIELLE, F. The future of Japanese quail for research and production. **World's Poultry Science Journal**, v.60, p.500-507, 2004.

MÓRI, C.; GARCIA, E.A.; PAVAN, A.C.; PICCININ, A.; SCHERER, M.R.; PIZZOLANTE, C.C. Desempenho e qualidade dos ovos de codornas de quatro grupos genéticos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, p.864-869, 2005.

MOSELEY, H.R.; LANDAUER, W. Genetics and physiology of embryonic development. In: TAYLOR, L.W., ed. **Fertility and Hatchability of Chicken and Turkey Eggs**. John Wiley and Sons, New York, NY. 1949. Pages 244–337.

MROSOVSKY, N.; SHERRY, DF. Animal anorexias. **Science**, v.207, p.837–842, 1980.

MUELLER, W.J. Factors affecting the quality loss in egg albumen during storage. **Poultry Science**, v.38, p.843–845, 1959.

MURAKAMI, E.A.; FURLAN, A.C. Pesquisa na nutrição e alimentação de codornas em postura no Brasil. In: 1<sup>o</sup> SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE COTURNICULTURA, 2002, Lavras. **Anais...**Lavras: UFLA, 2002. p.113-120.

NARAHARI, D.; MUJEER, K.A.; THANGAVEL, A.; RAMAMURTHY, N.; VISWANATHAN, S.; MOHAN, B.; BURUNGANANDAN, B.; SUNDARARASU, V. Traits influencing the hatching performance of Japanese quail eggs. **British Poultry Science**, v.29, p.101-112, 1988.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirements of poultry**. Washington, D.C.: p.44-45, 1994.

NEEDHAM, J. Chemical Embryology. Vol. 2. Cambridge University Press, London, UK. 1931, 639p.

NESTOR, K.E.; NOBLE, D.O. Influence of selection for increased egg production, body weight, and shank width on egg composition and the relationship of the egg traits to hatchability. **Poultry Science**, v.74, p.427–433, 1995.

NEW, D.A.T. A critical period for the turning of hen's eggs. **Journal Embryology and Experimental Morphology**, v.5, p.393–399, 1957.

NOBLE, R.C.; LONSDALE, F.; CONNER, K.; BROWN, D. Changes in the lipid metabolism of the chick embryo with parental age. **Poultry Science**, v.65, p.409-416, 1986.

NOVO, R.P.; GAMA, L.T.; SOARES, M.C. Effects of oviposition time, hen age and extra dietary calcium on egg characteristics and hatchability. **Journal of Applied Poultry Research**, v.6, p.335-343, 1997.

OLIVEIRA, E.G.; ALMEIDA, M.I.M.; MENDES, A.A.; VEIGA, N.; DIAS, K. Desempenho produtivo de codornas de ambos os sexos para corte alimentadas com dietas com quatro níveis protéicos. **Archives of Veterinary Science**, v.7, p.75-80, 2002.

OLSEN, M.W.; HAYNES, S.K. The effect of different holding temperatures on the hatchability of hen's eggs. **Poultry Science**, v.27, p.420-426, 1948.

ONO, H.; HOU, P.C.L.; TAZAWA, H. Responses of developing chicken embryos to acute changes in ambient temperature: Noninvasive study of heart rate. **Israel Journal of Zoology**, v.40, p.467-480, 1994.

ORBAN, J.I.; PIERT, S.J.; GURYEVA, T.S.; HESTER, P.Y. Calcium utilization by quail embryos during activities preceding space flight and during embryogenesis in microgravity aboard the orbital space station, MIR. **Journal of Gravitational Physiology**, v.6, n.2, p.33-41, 1999.

PAGANELLI, C.V.; ACKERMAN, R.A.; RAHN, H. The avian egg: In vitro conductances to oxygen, carbon dioxide, and water vapor in late development. In: PIIPER, J. (ed). **Respiratory function in birds, adult and embryonic**, Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1978, p.212-218.

PAYNE, L.F. Distribution of mortality during the period of incubation. **Journal of American Association of Instructors and Investigators in Poultry Husbandry**, v.6, p.9-12, 1919.

PEARSON, J.T.; HAQUE, M.A.; HOU, P.C.; TAZAWA, H. Developmental patterns of O<sub>2</sub> consumption, heart rate and O<sub>2</sub> pulse in unturned eggs. **Respiration Physiology**, v.103, p.83–87, 1996.

PEEBLES, E.D.; BRAKE, J. The role of the cuticle in water vapor conductance by the eggshell of broiler breeders. **Poultry Science**, v.65, p.1034–1039, 1986.

PEEBLES, E.D.; BRAKE, J. Eggshell quality and hatchability in broiler breeder eggs. **Poultry Science**, v.66, p.596–604, 1987.

PEEBLES, E.D.; BRAKE, J.; GILDERSLEEVE, R.P. Effects of eggshell cuticle removal and incubation humidity on embryonic development and hatchability of broilers. **Poultry Science**, v.66, p.834–840, 1987.

PEDROSO, A.A.; CAFÉ, M.B.; LEANDRO, N.S.M.; STRINGHINI, J.H.; CHAVES, L.S. Desenvolvimento embrionário e eclodibilidade de ovos de codornas armazenados por diferentes períodos e incubados em umidades e temperaturas distintas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.6, p.2344-2349, 2006.

PRIMMETT, D.R.N.; STEM, C.D.; KEYNES, R.J. Heat shock causes repeated segmental anomalies in the chick embryo. **Development**, v.104, p.331-339, 1988.

PINTO, R.; FERREIRA, A.S.; ALBINO, L.F.T.; GOMES, P.C.; VARGAS, JR. J.G. Níveis de proteína e energia para codornas Japonesas em postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.1761-1770, 2002.

RAHN, H.; AR, A. The avian egg: Incubation time and water loss. **Condor**, v.76, p.147-152, 1974.

RAHN, H.; AR, A.; PAGANELLI, C.V. How bird eggs breathe. **Scientific American**, v.240, p.46-55, 1979.

RAHN, H.; AR, A. Gas exchange of the avian egg: time, structure and function. **American Zoologist**, v.20, p.477-484, 1980.

RAHN, H.; CHRISTENSEN, V.L.; EDENS, F.W. Changes in shell conductance, pores, and physical dimensions of egg and shell during the first breeding cycle of turkey hens. **Poultry Science**, v.60, p. 2536-2541, 1981.

RANDLE, C.A.; ROMANOFF, A.L. Maldevelopment of the avian amnion as influenced by some environmental conditions. **Poultry Science**, v.28, p.780–781, 1949.

REINHART, B.S.; HURNIK, G.I. Traits affecting the hatching performance of commercial chicken broiler eggs. **Poultry Science**, v.63, p.240–245, 1984.

REIS, L.H.; GAMA, L.T.; SOARES, M.C. Effects of short conditions and broiler breeder age on hatchability, hatching time, and chick weights. **Poultry Science**, v.76, p.1459-1466, 1997.

RICKLEFS, R.E.; STARCK, M.J. Embryonic growth and development. In: RICKLEFS RE, STARCK MJ. (Eds). **Avian Growth and Development**. New York: Oxford University Press, 1998. p.31–58.

ROBERTSON, I.S. The influence of turning on the hatchability of hen's eggs. II. The effect of turning frequency on the pattern of mortality, the incidence of malpositions, malformations and dead embryos with no somatic abnormality. **Journal Agricultural Science**, v.57, p.39–47, 1961a.

ROBERTSON, I.S. Studies on the effect of humidity on the hatchability of hen's eggs. The determination of optimum humidity for incubation. **Journal of Agricultural Science**, v.57, p.185-194, 1961.

ROLAND, D.A. Recent developments in eggshell quality. **Feedstuffs**, v.48, p.31–32, 1976.

ROMANOFF, A.L. Biochemistry and biophysics of the development hen's egg. **Memoirs of Cornell University Agricultural Experimental Station**, v.132, p.1-27, 1930.

ROMANOFF, A.L. Effects of different temperatures in the incubator on the prenatal and postnatal development of the chick. **Poultry Science**, v.15, p.311-315, 1936.

ROMANOFF, A.L. The Avian Embryo. Structural and Functional Development. MacMillan Co., New York, NY. 1960a, 1305p.

ROMANOFF, A.L. Pathogenesis of the avian embryo. An analysis of causes of malformations and prenatal death vol. 4, Chapter 4. Wiley-Interscience, New York, 1972, p. 57–106.

ROMANOFF, A.L.; ROMANOFF, A.J. The Avian Egg. John Wiley and Sons, Inc., New York, NY. 1949, 918p.

ROMIJIN, C.; LOCKHORST, W. Foetal heat production in the fowl. **Journal of Physiology**, v.150, p.239-249, 1960.

SARAVANABAVA, K.; NACHIMUTHU, K.; PADMANABAN, V.D. Effect of tuftsin on embryo vaccination with Newcastle disease virus vaccine. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.28, p.269–276, 2005.

SHANAWANY, M.M. Inter-relationship between egg weight, parental age and embryonic development. **British Poultry Science**, v.25, p.449–455, 1984.

SHANAWAY, M.M. Common diseases of quail. Chapter 9 In: Quail Production System – A Review. Food & Agriculture Organization of the United Nations, Roma, 1994 p 101-118.

SHARMA, J.M.; BURMESTER, B.R. Resistance to Marek's Disease at hatching in chickens vaccinated as embryos with the turkey herpesvirus. **Avian Diseases**, v.26, p.134-149, 1982.

SHARMA, J.M.; BURMESTER, B.R. Embryo vaccination against Marek's disease with serotypes 1, 2 and 3 vaccines administered singly or in combination. **Avian Diseases**, v.27, p.453-463, 1983.

SHARMA, J.M.; LEE, L.F.; WAKENELL, P.S. Comparative viral, immunologic, and pathologic responses of chickens inoculated with herpesvirus of turkeys as embryos or at hatch. **American Journal of Veterinary Research**, v.45, p.1619-1623, 1984.

SHARMA, J.M. Embryo vaccination of specificpathogen- free chickens with infectious bursal disease virus: tissue distribution of the vaccine and protection of hatched chickens against disease. **Avian Diseases**, v.30, p.776-781, 1986.

SHARMA, J.M.; ZHANG, Y.; JENSEN, A.D.; SILKE, B.; RAUTENSCHLEIN, C.; YEH, H.Y. Field Trial in Commercial Broilers with a Multivalent *In ovo* Vaccine Comprising a Mixture of Live Viral Vaccines Against Marek's Disease, Infectious Bursal Disease, Newcastle Disease, and Fowl Pox. **Avian Diseases**, v.46, p.613-622, 2002.

SIEGEL, P.B.; COLEMAN, J.W.; GRAVES, H.B.; PHILLIPS, R.E. Incubation period of chicken selected bidirectionally for juvenile body weight. **Poultry Science**, v.47, p.105-107, 1968.

SIMONS, P.C.M. Ultrastructure of the hen eggshell and its physiological interpretation. Center for Agriculture Publishing and Documentation. University of Wageningen, The Netherlands, 1971.

SMITH, K.P.; BOHREN, B.B. Direct and correlated response to selection for hatching time in the fowl. **British Poultry Science**, v.15, p.597-604, 1974.

SMITH, K.; BOHREN, B.B. Age of pullet effects on hatch time, egg weight and hatchability. **Poultry Science**, v.54, p.959-963, 1975.

SOLIMAN, F.N.K.; RIZK, R.E.; BRAKE, J. Relationship between shell porosity, shell thickness, egg weight loss, and embryonic development in Japanese quail eggs. **Poultry Science**, v.73, p.1607-1611, 1994.

SPRATT, N.T. Development of the early chick blastoderm on synthetic media. **Journal of Experimental Zoology**, v.107, p.39–64, 1948.

STATISTIX, 2003. Statistix for Windows Manual. Copyright © 1985-2003. Analytical Software. Version 8.0.

STERN, C.D. The sub-embryonic fluid of the domestic fowl and its relationship to the early development of the embryo. In: TULLETT, S. G., ed. **Avian Incubation**. Butterworth-Heinemann, London, UK. 1991. Pages 81–90.

SUAREZ, M.E.; WILSON, H.R.; MATHER, F.B.; WILCOX, C.J.; MCPHERSON, B.N. Effects of strain and age of the broiler breeder female on incubation time and chick weight. **Poultry Science**, v.76, p.1029–1036, 1997.

SUAREZ, M.E.; WILSON, H.R.; MCPHERSON, B.N.; MATHER, F.B.; WILCOX, C.J. Low temperature effects on embryonic development and hatch time. **Poultry Science**, v.75, p.924-932, 1996.

TAZAWA, H. Adverse effect of failure to turn avian egg on the embryo oxygen exchange. **Respiration Physiology**, v.41, p.137–142, 1980.

TAZAWA, H.; WAKAYAMA, H.; TURNER, J.S.; PAGANELLI, C.V. Metabolic compensation for gradual cooling in developing chick embryos. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 89, p.125-129, 1988.

TAYLOR, T.G. How an eggshell is made. **Scientific American**, v.222, p.88–95, 1970.

TIWARI, A.K.; MAEDA, T. Effects of egg storage position and injection of solutions in stored eggs on hatchability in chickens (*Gallus domesticus*) - Research note. **The Journal of Poultry Science**, v.42, p.356-362, 2005.

THIYAGASUNDARAM, T.S. Comparative egg production efficiency of chickens, ducks and quails. **Poultry International**, v.28, p.60, 1989.

THORNE, M.H.; COLLINS, R.K.; SHELDON, B.L. Chromosome analysis of early embryonic mortality in layer and broiler chickens. **British Poultry Science**, v.32, p.711–722, 1991.

TSERVENI-GOUSHI, A.S. Relationship between parental age, egg weight and hatching weight of Japanese quail. **British Poultry Science**, v.28, p.749-752, 1986.

TULLETT, S.C.; BURTON, F.G. Factors affecting the weight and water status of the chick at hatch. **British Poultry Science**, v.23, p.361-369, 1982.

TULLETT, S.G.; DEEMING, D.C. Failure to turn eggs during incubation: effects on embryo weight, development of the chorioallantois and absorption of albumen. **British Poultry Science**, v.28, p.239–243, 1987.

TULLETT, S.G. Science and art of incubation. **Poultry Science**, v.69, p.1–15, 1990.

VAN BRECHT, A.; AERTS, J.M.; DEGRAEVE, P.; BERCKMANS, D. Quantification and control of the spatiotemporal gradients of air speed and air temperature in an incubator. **Poultry Science**, v.82, n.11, p.1677-1687, 2003.

VICK, S.V.; WALSH, T.J.; BRAKE, J. Relationship of incubation humidity and flock age of hatchability of broiler hatching eggs. **Poultry Science**, v.72, p.251–248, 1993.

VISSCHEDIJK, A.H.J. Physics and Physiology of incubation. **British Poultry Science**, v.32, p.3-20, 1991.

VOET, D.; VOET, J. Biochemistry, page 369. John Wiley and Sons, New York, NY. 1990. 369p.

WAKENELL, P.S.; SHARMA, J.M. Chicken embryonal vaccination with avian infectious bronchitis virus. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, p.933–938. 1986.

WALSH, T.J. **The Effects of Flock Age, Storage Humidity, Carbon Dioxide, and Length of Storage on Albumen Characteristics, Weight Loss and Embryonic Development of Broiler Eggs**. Master's thesis, North Carolina State University, Raleigh, NC, 1993.

WILLIAMS, J.E.; DILLARD, L.H.; HALL, G.O. The penetration patterns of *S. typhimurium* through the outer structures of chicken eggs. **Avian diseases**, v.12, p.445-466, 1968.

WILSON, H.R. Physiological requirements of the developing embryo: Temperature and turning. In TULLET, S.G. (ed.). **Avian Incubation**. Butterworth-Heinemann, London, 1991a, p.145-156.

WILSON, H.R. Interrelationship of egg size, chick size, posthatching growth, and hatchability. **World's Poultry Science Journal**, v.47, p.5-20, 1991.

WOODARD, A.E.; ALPLANALP, H. The effect of mating ratio and age on fertility and hatchability in Japanese quail. **Poultry Science**, v.46, p.383-388, 1967.

WYATT, C.L.; WEAVER, W.D.JR.; BEANE, W.L. Influence of egg size, eggshell quality and posthatch holding time on broiler performance. **Poultry Science**, v.64, p.2049–2055, 1985.

YOSHIZAKI, N.; SAITO, H. Changes in shell membranes during the development of quail embryos. **Poultry Science**, v.81, p.246-251, 2002.

YANNAKOPOULOS, A.L.; TSERVENI-GOUSHI, A.S. Research note: Effect of breeder quail age and egg weight on chick weight. **Poultry Science**, v.66, p.1558-1560, 1987.