

УДК 636.01

DOI: 10.31857/2500-2082/2022/6/88-93, EDN: KDBQEQ

РАННИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ И ВТОРИЧНОЕ СООТНОШЕНИЕ ПОЛОВ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ДОИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНОВ *IN VIVO**

Владимир Юрьевич Бабенков¹, доктор биологических наук

Елена Юрьевна Макарова¹

Арсланг Иванович Хахлинов²

Роман Дааваевич Сангаджиев²

Надежда Васильевна Чимидова³, кандидат биологических наук

Алтана Вадимовна Убушаева³

¹Лаборатория общей генетики и биохимии

ФГБОУ ВО «Калмыцкого государственного университета имени Б.Б. Городовикова»

²Региональный научно-производственный центр по воспроизводству сельскохозяйственных животных
и организации проведения оценки животных производителей

ФГБОУ ВО «Калмыцкого государственного университета имени Б.Б. Городовикова»

³ФГБОУ ВО «Калмыцкий государственный университет имени Б.Б. Городовикова», г. Элиста, Россия

E-mail: v.babenkov@mail.ru

Аннотация. В процессе эмбриогенеза происходит образование одной, реже двух яйцеклеток, в отличие от биотехнологии эмбриотрансфера, позволяющего одновременно получать десятки яйцеклеток. Поэтому часто возникает несоответствие между образованием мужских и женских гамет при гаметогенезе (первичное соотношение пола) и полом потомства при

* Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ № 075-03-2022-119/1 «Особенности организации генома крупного рогатого скота мясных пород, ассоциированных с высоким адаптивным и продуктивным потенциалом на основе высокополиморфных генетических маркеров» / The work was carried out within the framework of the State task of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation No. 075-03-2022-119/1 «Features of the organization of the beef cattle breeds' genome associated with high adaptive and productive potential based on highly polymorphic genetic markers».

рождении (вторичное). При оплодотворении яйцеклеток мужских зигот образуется больше, чем женских из-за более высокой оплодотворяющей активности мужских сперматозоидов, по сравнению с женскими. В организме матери в результате нейрогуморальной и биохимической регуляции отбраковываются эмбрионы с генетическими нарушениями. Этому в большей степени подвержены мужские эмбрионы, как основные носители аномальных генов. Несоответствие между первичным и вторичным соотношением полов связано с условиями жизни материнских особей, так как от них зависит количество генетических нарушений у эмбрионов, которые подвергаются дегенерации в процессе эмбриогенеза. Эмбрионы в состоянии неполной дегенерации, после извлечения из матки донора, восстанавливаются и продолжают рост и развитие в условиях культивирования. У частично поврежденных эмбрионов после пересадки суррогатной матери, у которой собственный «блок развития» не распознает чужеродные эмбрионы, восстанавливается способность к тотипотентному развитию.

Ключевые слова: эмбриогенез, гаметогенез, резистентность, гомеостаз, тотипотентность, нидация, хэтчинг, бластоциста, морула, зигота, яйцеклетка

EARLY EMBRYOGENESIS AND SECONDARY SEX RATIO IN TRANSPLANTATION OF PREIMPLANTATION EMBRYOS *IN VIVO*

V.Yu. Babenkov¹, *Grand PhD in Biological Sciences*

E.Yu. Makarova¹

A.I. Khakhlinov²

R.D. Sangadzhiev²

N.V. Chimidova³, *PhD in Biological Sciences*

A.V. Ubushaeva³

¹Laboratory of General Genetics and Biochemistry of Kalmyk State University named after B.B. Gorodovikov

²Regional Research and Production Center for Farm Animals' Reproduction
and Organization of Animal Producers' Evaluation of Kalmyk State University named after B.B. Gorodovikov

³Kalmyk State University named after B.B. Gorodovikov, Elista, Russia

E-mail: v.babenkov@mail.ru

Abstract. *In the natural process of embryogenesis, one, less than two eggs are produced, unlike in the biotechnology of embryo transfer, which allows hormonal treatment to produce dozens of eggs at once. This leads to a discrepancy, sometimes to a large extent, between the formation of male and female gametes at gametogenesis (primary sex ratio) and the sex of progeny at birth (secondary sex ratio). In fertilization, male zygotes form more than female zygotes due to the higher fertilization activity of male spermatozooids compared to female sperm. In the mother's body, as a result of neuro-humoral and biochemical regulation by means of a «development block», embryos with genetic disorders are discarded. Male embryos, as the primary carriers of abnormal genes, are more susceptible to this process. The disparity between primary and secondary sex ratios is related to differences in the living conditions of the mother, as these conditions determine the number and significance of genetic disorders in embryos that are degenerated during embryogenesis. Embryos in incomplete degeneration, after extraction from the donor's uterus, are restored and continue to grow and develop in a cultured environment. In partially damaged embryos, the ability to totipotent development is restored after the transfer of a surrogate mother whose own «development unit» does not recognize foreign embryos.*

Keywords: *embryogenesis, gametogenesis, resistance, homeostasis, totipotency, nidium, hatching, blastocyst, morula, zygote, egg*

Сельскохозяйственные животные отличаются признаками, которые имеют экономическое значение в производстве. Так, в молочном скотоводстве в приоритете — молочная продуктивность.

Хромосомная теория наследственности в большой степени объясняет процессы детерминации и дифференциации пола у млекопитающих. Несомненно, что пол эмбриона зависит от его генотипа, который формируется при оплодотворении яйцеклетки и образовании зиготы.

Механизм генетической регуляции соотношения гамет с набором X- и Y-хромосом из поколения в поколение поддерживается 1:1, в чем выражается первичное соотношение полов. [5–8, 10]

У всех видов млекопитающих наблюдается существенное несоответствие между первичным и вторичным соотношением полов при рождении потомства, когда количество самцов и самок не равно. Причины этого отклонения остаются неизвестными.

По данным В.И. Лимонова, у крупного рогатого скота при искусственном осеменении бычков рождалось несколько больше (52,0%), чем телочек (48,0%).

Из 827 учтенных отелов нетелей в колхозе «Заветы Ильича» (Домодедовский район, Московская область) бычками растелились 481, телочками — 346. [7]

По нашим данным, напротив, бычков рождалось на 5,8% меньше, чем телочек — 47,1% против 52,9% (табл. 1). За три года из 1097 учтенных отелов в племязаводе «Луч» (Брестская область, Белоруссия) рождением бычков закончились 517, телочек — 580 при достоверной разнице $P < 0,01$. [1–3] Эта тенденция прослеживалась на протяжении трех учтенных лет (данные за 1991 год утеряны). Бычки рождались от 44,3 до 48,5% случаев, телочки — 51,5...55,7%.

Различие в данных по соотношению полов, полученных в разных исследованиях, может быть связано с влиянием таких факторов, как уровень и тип кормления родителей, их состояние, возраст, уровень продуктивности. Поэтому высока степень вероятности возникновения различий в функциональной зрелости яйцеклеток и спермиев, а также последующего развития зигот и эмбрионов в процессе раннего эмбриогенеза.

Таблица 1.
Соотношение пола телят при искусственном осеменении

Год	Учено отелов	Бычки	%	Телочки	%
1990	456	219	48,0	237	52,0
1992	336	163	48,5	173	51,5
1993	305	135	44,3	170	55,7
Всего за три года	1097	517	47,1	580	52,9

Примечание. ** $P < 0,01$.

В настоящее время широко используется метод эмбриотрансфера — трансплантации эмбрионов животных. Гормональная стимуляция полиовуляции позволяет за один половой цикл получать большое количество ранних эмбрионов и, соответственно, потомства после трансплантации реципиентам. Это дает возможность отслеживать развитие эмбрионов в эмбриогенезе.

Цель работы — установить какие процессы и на каких стадиях эмбриогенеза приводят к несоответствию между первичным и вторичным соотношением полов в потомстве крупного рогатого скота.

Были поставлены следующие задачи:

- выявить количественное соотношение полов телят при трансплантации эмбрионов разных стадий развития, полученных в результате полиовуляции у коров-доноров;
- определить способность к нидации эмбрионов с частичной дегенерацией после пересадки реципиентам;
- найти выживаемость разнополюх эмбрионов в организме матери в процессе раннего эмбриогенеза;
- изучить выживаемость поврежденных эмбрионов вне организма матери и определить эмбрионы какого пола в процессе раннего эмбриогенеза в большей степени подвержены дегенерации;
- установить имеют ли место критические стадии развития при формировании мужских и женских эмбрионов при раннем эмбриогенезе;
- подтвердить существующую концепцию равновероятного образования мужских и женских зигот при гаметогенезе в практике трансплантации доимплантационных эмбрионов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа представляет собой аналитическое исследование, основанное на данных наших многолетних практических экспериментов по биотехнологии эмбриотрансфера в Биотехнологическом центре Брестской области Белоруссии (1987–2003 годы) [1–3] и Центре по производству эмбрионов ООО «Бетагран Липецк» РФ (2014–2016 годы). [4]

Таблица 2.
Зависимость соотношения пола телят от возраста эмбрионов

Возраст эмбриона	Учено отелов	Растелились, n – %	
		бычками	телочками
Без учета возраста	1093	564-51,6	529-48,4
Семидневные морулы	665	367-55,2***	298-44,8
Восьмидневные бластоцисты	428	197-46,0	231-54,0***

Примечание. *** $P < 0,001$.

Гормональную стимуляцию полиовуляции, извлечение, оценку качества, культивирование, замораживание и пересадку эмбрионов проводили по общеизвестным методикам.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Представляют интерес данные, которые мы получили при анализе соотношения пола полученных телят-трансплантатов (табл. 2.).

Для пересадки эмбрионов использовали половозрелых телок-реципиентов *черно-пестрой* породы. Доноры эмбрионов — коровы молочных и мясных пород. Породный фактор, как косвенный, не учитывали.

Всего было 1093 отела. В результате родилось 564 бычка и 529 телочек, или 51,6 и 48,4% соответственно. Как видно, при пересадке эмбрионов различного возраста телочек рождалось на 3,2% меньше, чем бычков.

В то же время, при учете пола телят в зависимости от стадии развития эмбрионов получены неожиданные результаты.

При пересадке семидневных морул бычков (55,2%) рождалось уже на 10,4% больше, чем телочек (44,8%).

Пересадка восьмидневных бластоцист привела к противоположному результату: бычков (46,0%) родилось на 8% меньше, чем телочек (54,0%). Среди бластоцист в большей степени, чем среди морул, присутствуют эмбрионы женского пола.

Преимущество в рождении бычков при пересадке морул по сравнению с пересадкой бластоцист составило 9,2% (55,2 против 46%) при высокодоверительной разнице ($P < 0,001$). Внутри групп разница в рождении бычков и телочек после пересадки морул также отличалась высокой достоверностью ($P < 0,001$).

Теория равновероятного образования мужских и женских особей не объясняет различия между первичным и вторичным соотношениями полов. Проведенные эксперименты по пересадке разновозрастных эмбрионов свидетельствуют о том, что в эмбриогенезе, после оплодотворения яйцеклеток, мужских зигот образуется больше, чем женских.

Известно, что у млекопитающих самки отличаются большей продолжительностью жизни, чем самцы. Это наблюдается как в утробе матери, так и у взрослых особей — чаще погибают зародыши мужского пола.

Гены, как носители наследственной информации, сосредоточены в молекулах ДНК хромосом, которые в организме парные. Хромосомы в каждой паре одинаковы, за исключением пары половых хромосом. Если у самок они одинаковые (XX), то у самцов отличаются (XY).

Известно, что некоторые генетические заболевания связаны с половыми различиями их носителей. Самцы подвержены им значительно чаще, чем самки. Считается, что это обусловлено генетическими нарушениями в паре половых хромосом самцов.

У самок X-хромосома парная и нарушения в геноме одной из них могут быть компенсированы здоровым геном второй хромосомы — дефектный

ген не проявляет себя, так как подавляется доминирующим здоровым геном. Поскольку у самцов половые хромосомы непарные, то возможность такой замены отсутствует. Именно в непарности половых хромосом заключается более низкая жизнеспособность самцов. Исходя из этого, следовало бы ожидать, что вероятность рождения потомков мужского пола должна быть существенно ниже, но этого в репродукции млекопитающих не происходит.

Известно, что сперматозоиды с X- и Y-хромосомами имеют разную массу для животных, у которых гетерогаметны самцы. Сперматозоиды с различными половыми хромосомами имеют отличия по массе и величине, поэтому могут быть разделены на две фракции. [3, 5, 10] У крупного рогатого скота средний размер Y-хромосомы — 2,22 мкм, X-хромосомы — 6,17 мкм. Меньшая масса сперматозоидов с Y-хромосомой обеспечивает их большую подвижность и оплодотворяющую способность. В процессе оплодотворения частота формирования мужских зигот превалирует над частотой образования женских.

В биотехнологии эмбриотрансфера индукция полиовуляции с помощью фолликулостимулирующих гормонов позволяет одномоментно получать большое число яйцеклеток. Можно заключить, что после их оплодотворения количество мужских зигот будет выше, чем женских.

В то же время, большая часть зародышей с генетическими дефектами в организме самки подвержены избирательному отторжению. Поскольку основные носители дефектных генов — мужские эмбрионы, то именно они отторгаются больше. Здесь мы видим проявление «фактора компенсации», который имеет место в репродуктивной системе генома женских особей, что крайне важно для эволюционного развития популяций видов. С одной стороны, мужских эмбрионов образуется больше, с другой — в процессе эмбриогенеза значительная часть из них подвергается дегенерации. Происходит выравнивание соотношения эмбрионов разного пола к моменту имплантации.

Процесс отбраковки эмбрионов становится минимальным при формировании бластоцисты. Подтверждением этому служат практические исследования в области эмбриотрансфера ранних эмбрионов у коров. Так, после получения эмбрионов *in vivo*, при морфологической оценке их состояния наиболее часто признаки дегенерации встречаются на стадии морулы. Это признак их отторжения организмом матери до формирования бластоцисты.

Процесс дегенерации и последующий апоптоз эмбрионов происходит лишь в организме истинной матери. Изъяты из матки эмбрионы с признаками дегенерации вне организма матери способны к регенерации и полному восстановлению тотипотентности. Хотя ожидаемым было их полное разрушение.

Таким образом, имеют место некие факторы, заложенные в геноме эмбрионов, усиливающие их гомеостаз и, как следствие, резистентность и тотипотентность развития вне материнской матки. Здесь следует учитывать прерывание нейрогуморальной и биохимической регуляции между организмом матери и эмбрионом. Прекращается действие «блока развития», который останавливает

дробление бластомеров, что, в свою очередь, приводит к восстановлению гомеостатического потенциала эмбрионов.

Здесь мы сталкиваемся с неожиданным противоречием. Следует ожидать, что возвращение эмбрионов в стадии частичной дегенерации в среду матки (пересадка реципиентам) должно возобновить процесс дальнейшего распада и стельность наступить не может. Практика как наших, так и других исследований показывает успешные результаты. [1, 2, 3, 6, 9]

В технологии эмбриотрансфера качество эмбрионов определяют по морфологическим признакам. У эмбрионов в состоянии частичной дегенерации, когда распад клеток бластомеров еще не достиг критической стадии, среди поврежденных бластомеров выделяется группа живых клеток. Именно такие, условно пригодные эмбрионы способны к восстановлению после извлечения из матки донора (табл. 3).

Эффективность пересадки одного отличного эмбриона была на 21,2% выше, чем одного условно пригодного (53,7 против 32,5%) при достоверной разнице $P < 0,01$. Сам факт наступления стельности в 32,5% случаев показывает, что частично поврежденные эмбрионы имеют тенденцию к регенерации и полноценному восстановлению.

Ожидаемым было преимущество в уровне стельности между пересадкой двух условных (56,2%) или отличных (59,8%) против одного условно пригодного эмбриона (32,5%) при достоверности $P < 0,01$; $P < 0,001$. Результаты пересадки двух условно пригодных или двух отличных эмбрионов практически не отличались — 56,2 и 59,8% соответственно. Это служит прямым подтверждением нашего утверждения о полном восстановлении гомеостата и способности к тотипотентному развитию поврежденных эмбрионов.

Связь между геномом истинной матери и ее эмбрионом, посредством которой осуществляется механизм остановки дробления бластомеров, у суррогатной матери отсутствует по отношению к чужеродному эмбриону.

В процессе исследований особый интерес представляет метод культивирования эмбрионов, как процедура создания условий для стимулирования роста и созревания ранних эмбрионов, в том числе с повреждениями в стадии не летальной дегенерации.

Таблица 3.
Жизнеспособность эмбрионов разных категорий качества

Показатель	Количество и качество эмбрионов			
	один условно пригодный	один отличный	два условно пригодных	два отличных
Количество пересадок эмбрионов	40	761	80	179
Уровень стельности, n — %	13–32,5	409–53,7**	45–56,2**	107–59,8***
Число эмбрионов	40	761	160	358
Всего отелов	13	Без учета	35	90
Из них отелов двойнями, n — %	—	—	11–31,4	44–48,9
Родилось телят, всего	13	Без учета	46	134

Примечание. ** — $P < 0,01$; *** — $P < 0,001$.

Результаты культивирования таких эмбрионов, извлеченных из матки коровы-донора на шестой день после осеменения, представлены на рисунке.

После извлечения из матки 16 морул с дегенеративными изменениями в разной степени были поставлены на культивирование. Из них 12 эмбрионов с неполной компактизацией зародышевого комплекса, что говорит о нарушениях связей между бластомерами, и четыре эмбриона с лизисом бластомеров.

Культивирование 12 поврежденных эмбрионов в течение 36 ч привело к полному восстановлению у девяти морул (75%) до стадии развития зрелых бластоцист, у трех морул (25%) дробление прекратилось и процесс дегенерации привел к апоптозу (см. рисунок, 2-я стр. обл.).

Результаты культивирования в данном эксперименте также бесспорно подтверждают вывод об остановке процесса дегенерации, вызванного воздействием организма матери. Более того, у эмбрионов с признаками распада после извлечения из матки происходит регенерация и восстановление гомеостаза.

Однако прогноз о последующей способности восстановленных эмбрионов к имплантации в матку приемной матери оставался открытым.

Мы изучили возможность эмбрионов, восстановившихся в процессе культивирования из частично поврежденных, к имплантации в матку реципиентов после трансплантации.

Экспандированные бластоцисты, полученные в результате 36-часового культивирования условно пригодных семидневных морул, пересаживали телкам-реципиентам случного возраста нескольких групп. В контрольных группах аналогичным реципиентам были пересажены восьмидневные интактные бластоцисты (табл. 4).

К сожалению, в разрезе групп реципиентов данные по количеству проведенных пересадок и уровню стельности утеряны. Тем не менее, рассматриваемая нами способность восстановленных эмбрионов к имплантации и тотипотентному развитию, результатами экспериментов подтверждается.

После отелов реципиентов, которым пересаживали интактные свежеполученные эмбрионы, соотношение родившихся бычков и телочек было близким по значению и составляло соответственно 46,0 и 54,0%.

В группах, где пересаживали эмбрионы после культивирования, из 68 родившихся телят количество бычков было существенно больше, чем телочек — 46 против 22 (67,6 и 32,3% соответственно).

Причина такого кардинального различия во вторичном соотношении полов заслуживает особого внимания. Такая разница не может быть влиянием случайных факторов. Поскольку среди родившихся телят было значительно больше бычков, следует заключение, что из числа эмбрионов, которые подверглись отбраковке в организме истинной матери, но восстановились при культивировании с последующей индукцией в матке реципиентов, большинство были мужского пола.

Это подтверждает выводы, сделанные нами ранее, что при оплодотворении яйцеклеток мужских зигот образуется больше, чем женских.

Таблица 4.
Соотношение пола телят после трансплантации интактных и культивированных эмбрионов в технологии *in vivo*

Показатель	Пересадка эмбрионов на стадии бластоцисты	
	свежие, интактные	после культивирования морул до стадии бластоцист
Учтенные отелы	428	68
Всего родилось телят	428	68
Телочек, n – %	231–54,0	22–32,3
Бычков, n – %	197–46,0	46–67,6

Так как мужские эмбрионы больше подвержены отбраковке в организме матери, чем женские, количественный итог в воспроизводстве потомства разного пола при развитии эмбрионов в раннем эмбриогенезе близок по значению (46,0 и 54,0%), но кардинально отличается от результатов экспериментов по пересадке эмбрионов после культивирования (67,6 и 32,3%).

Таким образом, данные исследований позволили объяснить причины несоответствия между первичным и вторичным соотношением полов у млекопитающих, в нашем контексте у крупного рогатого скота. Существующая разница не имеет постоянной величины, так как ее значение определяется случайным сочетанием таких факторов, как количество и значимость для будущего потомства генетических нарушений у эмбрионов, которые могут быть различными в различных условиях жизни материнских особей. Поэтому разница в соотношении пола у потомства при рождении всегда варьирует.

В начале статьи мы приводим противоположные данные о рождаемости бычков и телочек в потомстве нетелей при искусственном осеменении у В.И. Лимонова [7] и авторов настоящей статьи. [1–3] Полученные результаты это несоответствие подтверждают.

Закключение, сделанное нами после проведенных исследований, не ограничивается сферой эмбрионального развития при полиовуляции в эмбриотрансфере, а имеет место в общем понимании процесса раннего эмбриогенеза при естественной репродукции.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Бабенков В.Ю. Зависимость соотношения полов при трансплантации от стадии развития эмбрионов // Вет. газ. 1997. № 1 (35).
2. Бабенков В.Ю., Кыса И.С. Детерминация пола и стадии развития эмбрионов при трансплантации // Конкурентоспособное производство продукции животноводства в Республике Беларусь : Мат. Межд. науч.-произв. конф. Жодино, 1999. С. 79.
3. Бабенков В.Ю. Биотехнологические методы интенсификации воспроизводства молочного и мясного скота: 03.00.23: дисс. ... док. биол. наук. Дубровицы: ВИЖ. 2004. 234 с.
4. Бабенков В.Ю., Хромов Н.И., Машталер Д.В. Вспомогательные репродуктивные технологии в воспроизводстве и селекции КРС // Фермер. Черноземье. 2017. № 4. С. 24–25.
5. Брусиловский А.И. Жизнь до рождения / 2-е изд., перераб. и доп. М.: Знание, 1991. С. 56–60.

6. Завертяев Б.П. Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота. Ленинград: Агропромиздат, 1989. 255 с.
7. Лимонов В.И. Современное состояние проблемы иммунных взаимоотношений в системе мать-плод // Успехи современной генетики. 1985. № 13. С. 103–108.
8. Морозов Е.И., Тарасевич Е.И., Анохина В.С. Генетика в вопросах и ответах. Минск: изд-во «Университетское», 1989. 288 с.
9. Эрнст Л.К., Сергеев Н.И. Трансплантация эмбрионов сельскохозяйственных животных. М.: Агропромиздат, 1989. 302 с.
10. Beatty R.A. Sex determination in farm and laboratory animals: a review // Vet. Rec. 1972. V. 90. P. 243.
3. Babenkov V.Yu. Biotehnologicheskie metody intensifikatsii vosproizvodstva molochnogo i myasnogo skota: 03.00.23: diss. ... dok. biol. nauk. Dubrovicy: VIZH. 2004. 234 s.
4. Babenkov V.Yu., Hromov N.I., Mashtaler D.V. Vspomogatel'nye reproduktivnye tekhnologii v vosproizvodstve i selekcii KRS // Fermer. Chernozem'e. 2017. № 4. S. 24–25.
5. Brusilovskij A.I. Zhizn' do rozhdeniya / 2-e izd., pererab. i dop. M.: Znanie, 1991. S. 56–60.
6. Zavertyaev B.P. Biotehnologiya v vosproizvodstve i selekcii krupnogo rogatogo skota. Leningrad: Agropromizdat, 1989. 255 s.
7. Limonov V.I. Sovremennoe sostoyanie problemy immunnyh vzaimootnoshenij v sisteme mat'-plod // Uspekhi sovremennoj genetiki. 1985. № 13. S. 103–108.
8. Morozov E.I., Tarasevich E.I., Anohina V.S. Genetika v voprosah i otvetah. Minsk: izd-vo «Universitetskoe», 1989. 288 s.
9. Ernst L.K., Sergeev N.I. Transplantatsiya embrionov sel'skohozyajstvennyh zhivotnyh. M.: Agropromizdat, 1989. 302 s.
10. Beatty R.A. Sex determination in farm and laboratory animals: a review // Vet. Rec. 1972. V. 90. P. 243.

REFERENCES