



LOUISE MARQUES COELHO

**REPRODUCTIVE CHARACTERISTICS OF JAPANESE
QUAILS (*Coturnix coturnix japonica*) HATCHED FROM EGGS
INCUBATED UNDER DIFFERENT LIGHT COLORS**

**LAVRAS – MG
2020**

LOUISE MARQUES COELHO

REPRODUCTIVE CHARACTERISTICS OF JAPANESE QUAILS (*Coturnix coturnix japonica*) HATCHED FROM EGGS INCUBATED UNDER DIFFERENT LIGHT COLORS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Fisiologia e Metabolismo Animal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo
Orientador

Prof. Dr. Édison José Fassani
Coorientador

Profa. Dra. Renata Ribeiro Alvarenga
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Coelho, Louise Marques.

Reproductive characteristics of japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*) hatched from eggs incubated under different light colors / Louise Marques Coelho. - 2020.

62 p.

Orientador(a): Márcio Gilberto Zangeronimo.

Coorientador(a): Édison José Fassani, Renata Ribeiro

Alvarenga.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Avicultura. 2. Reprodução. 3. Incubação de ovos. I. Zangeronimo, Márcio Gilberto. II. Fassani, Édison José. III. Alvarenga, Renata Ribeiro. IV. Título.

LOUISE MARQUES COELHO

REPRODUCTIVE CHARACTERISTICS OF JAPANESE QUAILS (*Coturnix coturnix japonica*) HATCHED FROM EGGS INCUBATED UNDER DIFFERENT LIGHT COLORS

CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS DE CODORNAS JAPONESAS (*Coturnix coturnix japonica*) ORIUNDAS DE OVOS INCUBADOS SOB DIFERENTES CORES DE LUZ

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Fisiologia e Metabolismo Animal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADO em 29 de outubro de 2020.

Dr. Édison José Fassani
Dr. Luciano José Pereira
Dr. Adriano Geraldo

UFLA
UFLA
IFMG – Campus Bambuí

Prof. Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo
Orientador

**LAVRAS – MG
2020**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV-UFLA), pela oportunidade concedida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Aos professores Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo, Dr. Édison José Fassani e Dra. Renata Ribeiro Alvarenga, pelo exemplo, orientação e contribuição à formação do meu conhecimento. Aos professores Dr. Adriano Geraldo e Dr. Luciano Pereira pelas contribuições em minha banca de defesa do presente trabalho, e ao Dr. Juliano Vogas Peixoto e Dr. José Rafael Miranda, pelos ensinamentos durante a realização das análises.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária (DMV) da UFLA, especialmente Sr. William e Juliana Tensol do Setor de Fisiologia e Farmacologia Veterinária, que me auxiliaram na condução do experimento em diversos momentos.

Aos integrantes do Núcleo de Estudos em Pesquisa Avícola (NEPAVI) pelo acolhimento, amizade e ajuda em todos os momentos necessários, sem os quais esse trabalho não teria sido realizado. À Ana Patrícia Alves, Danusa Gebin e Bruna Chaves pela troca de experiências e auxílio durante a realização das análises.

À minha mãe Fátima e meu pai Luiz Carlos (*in memoriam*), pelo amor incondicional, total dedicação e por me guiarem em todos os momentos. Aos meus irmãos, Camilla e Renan, pelo incentivo e compreensão.

Ao Júnior, pelo amor e companheirismo, e aos meus amigos, por todos os momentos compartilhados, apoio e incentivo.

A todos que se fizeram presentes e contribuíram de alguma forma, muito obrigada!

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of different colors of light during the incubation of eggs on the reproductive parameters of male and female Japanese quails. A total of 1776 eggs were incubated in four lighting conditions, 24 hours a day, during the entire incubation period: white LED, green LED, red LED and dark (control). The experimental design was a randomized block (incubation time) with four treatments of six replicates of two cages each. After hatching, the birds were housed in brood cages with 18 birds each until 35 days of age, when they were sexed and transferred to production cages for evaluation of reproductive parameters. After the start of laying, the number of eggs in each cage was recorded daily and the values were used to obtain the age of the females at the first egg and at 80% of laying. At 35 and 60 days of age a couple of birds from each cage were euthanized for anatomical and histological evaluation of the gonads. Until 60 days of age, two females from each cage were weighed every three days to determine the growth curve. After 60 days, eggs from each cage were collected to assess external and internal quality. At 70, 74 and 78 days of age, semen collections were performed to evaluate seminal quality. Then, the males were transferred to cages containing 9 females for the fertility test. The hatchability was higher ($P < 0.05$) in eggs incubated in the dark and under the red LED. The age of maximum growth was higher ($P < 0.05$) in birds from eggs incubated in the dark and under the white LED. There was no difference ($P > 0.05$) in the light colors during incubation on the anatomical and histological characteristics of the testicles, except for the diameter of the seminiferous tubules, which was greater ($P = 0.06$) in the dark and in the white LED. There was no effect ($P > 0.05$) of the different colors of light in the incubation on the productive index and egg quality of adult birds. There was also no effect ($P > 0.05$) on sperm quality, except for sperm motility, which values were higher ($P < 0.05$) in birds from eggs incubated in different colors of light. However, this difference was not sufficient ($P > 0.05$) to influence the birds' fertility. It is concluded that the incubation of quail eggs under white, red and green LED lamps, under the studied conditions, does not influence the reproductive characteristics of quails in the production phase.

Keywords: Poultry. Artificial lighting. Incubation. Reproduction.

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito de diferentes cores de luz durante a incubação dos ovos sobre os parâmetros reprodutivos de codornas japonesas machos e fêmeas. Um total de 1776 ovos foi incubado em quatro condições de iluminação, 24 horas por dia, durante todo o período de incubação: LED branca, LED verde, LED vermelha e escuro (controle). O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso (época de incubação) com quatro tratamentos e seis repetições de duas gaiolas cada. Após a eclosão, as aves foram alojadas em gaiolas de cria com 18 aves cada até os 35 dias de idade, quando foram sexadas e transferidas para gaiolas de produção para avaliação dos parâmetros reprodutivos. Após o início da postura, o número de ovos de cada gaiola foi registrado diariamente e os valores foram utilizados para obter a idade das fêmeas ao primeiro ovo e aos 80% de postura. Aos 35 e aos 60 dias de idade um casal de aves de cada gaiola foi eutanasiado para avaliação anatômica e histológica das gônadas. Até os 60 dias de idade, duas fêmeas de cada gaiola foram pesadas a cada três dias para a determinação da curva de crescimento. Após os 60 dias, os ovos de cada gaiola foram coletados para avaliação da qualidade externa e interna. Aos 70, 74 e 78 dias de idade, coletas de sêmen foram realizadas para avaliação da qualidade seminal. Em seguida, os machos foram transferidos para gaiolas contendo 9 fêmeas para o teste de fertilidade. A eclodibilidade foi maior ($P < 0,05$) nos ovos incubados no escuro e sob a LED vermelha. A idade de máximo crescimento foi maior ($P < 0,05$) nas aves provenientes de ovos incubados no escuro e sob a LED branca. Não houve diferença ($P > 0,05$) das cores de luz na incubação sobre as características anatômicas e histológicas dos testículos, com exceção do diâmetro dos túbulos seminíferos, que foi maior ($P = 0,06$) no escuro e na LED branca. Não houve efeito ($P > 0,05$) das diferentes cores de luz na incubação sobre os índices produtivos e qualidade dos ovos das aves adultas. Também não houve efeito ($P > 0,05$) sobre a qualidade espermática, exceto na motilidade espermática, cujos valores foram maiores ($P < 0,05$) nas aves provenientes de ovos incubados nas diferentes cores de luz. Porém, essa diferença não foi suficiente ($P > 0,05$) para influenciar a fertilidade das aves. Conclui-se que a incubação dos ovos de codornas sob lâmpadas LED branca, vermelha e verde, nas condições que foram estudadas, não influencia as características reprodutivas das codornas na fase de produção.

Palavras-chave: Coturnicultura. Iluminação artificial. Incubação. Reprodução.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	9
1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1	Desenvolvimento embrionário do sistema reprodutor das aves	10
2.2	Relação entre o desenvolvimento embrionário e a eficiência reprodutiva das aves adultas	13
2.3	Influência da luz sobre a fisiologia das aves	14
2.4	Influência de diferentes comprimentos de onda sobre as características reprodutivas das aves	17
2.5	Luz na incubação artificial de ovos	19
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
	REFERÊNCIAS	23

SEGUNDA PARTE: ARTIGO

	MANUSCRIPT. Reproductive aspects of Japanese quails (<i>Coturnix coturnix japonica</i>) hatched from eggs incubated under different light colors	30
--	---	-----------

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a coturnicultura vem se destacando de forma significativa no cenário nacional. Em 1990 o rebanho efetivo era de 2,46 milhões de codornas, ultrapassando a marca de 17 milhões de cabeças em 2019. A produção de ovos acompanhou o crescimento do rebanho efetivo, passando de 192 milhões de dúzias em 2009 para 290 milhões em 2017 (IBGE, 2017). Conseqüentemente, um aumento no interesse pela espécie tem sido observado, resultando em diversas pesquisas envolvendo nutrição, manejo e reprodução dessas aves. Além disso, as codornas têm sido amplamente utilizadas como modelo animal para estudos em diversas áreas, como biologia do desenvolvimento, reprodução, endocrinologia, imunologia, comportamento e embriologia experimental.

No que tange ao desenvolvimento embrionário, estudos com embriões de codornas apresentam algumas vantagens em relação às outras espécies, como rápido desenvolvimento e disponibilidade de ovos férteis durante todo o ano. Além disso, apresentam padrões de desenvolvimento semelhantes ao de humanos, genoma sequenciado, disponibilidade de linhagens transgênicas, facilidade de reprodução e manipulação em laboratório, entre outros. Ademais, a gonadogênese em embriões de codornas é similar ao de outras aves. Portanto, sua utilização como modelo experimental pode fornecer informações a respeito do desenvolvimento gonadal em outras espécies de interesse.

Em aves, sabe-se que o estímulo luminoso constitui um importante fator ambiental para as características reprodutivas. A luz exerce efeito sobre a regulação endócrina por afetar a secreção de melatonina e hormônios do eixo reprodutivo, influenciando diretamente a fisiologia reprodutiva desses animais. Por esse motivo, a manipulação do fotoperíodo através da iluminação artificial é comumente utilizada na avicultura industrial em aves adultas, constituindo um fator determinante sobre o desempenho produtivo e reprodutivo das aves de produção.

Em relação à fase embrionária do desenvolvimento, existem evidências que o embrião seja capaz de responder à estímulos luminosos, auditivos, olfatórios, hormonais, variações na temperatura e umidade relativa do ambiente de incubação (JOHNSON, 2015; REED; CLARK, 2011), os quais podem influenciar tanto o desenvolvimento embrionário quanto características pós-eclosão como bem-estar, comportamento, desenvolvimento corporal e desempenho produtivo. Entretanto, não foram encontrados estudos avaliando a influência de diferentes

comprimentos de onda (visualmente percebidos como diferentes cores de luz) durante a incubação dos ovos sobre o desenvolvimento gonadal antes e após a eclosão.

Uma vez que a melatonina é capaz de exercer influência sobre o eixo reprodutivo desde o início do desenvolvimento embrionário, é possível que exista um efeito sobre a formação inicial das gônadas e consequente efeito sobre a eficiência reprodutiva na ave adulta. Nesse caso, informações a respeito do estímulo luminoso durante a fase embrionária poderiam trazer benefícios ao sistema produtivo de ovos comerciais e ovos férteis, como maior fertilidade dos machos, menor idade à maturidade sexual e aumento da atividade ovariana, com consequente aumento na produção de ovos. Dessa forma, objetivou-se avaliar a influência de diferentes cores de luz durante a incubação dos ovos sobre as características reprodutivas de codornas japonesas machos e fêmeas adultas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Desenvolvimento embrionário do sistema reprodutor das aves

As aves são animais ovíparos de fecundação interna. A maior parte do desenvolvimento embrionário acontece fora do organismo materno, já que a postura dos ovos ocorre no estágio de gástrula (HARVEY; SCANES; PHILLIPS, 1986). A determinação sexual ocorre no momento da fertilização porém, ao contrário dos mamíferos, em aves os machos são homozigotos (ZZ) e as fêmeas heterozigotas (ZW) (JOHNSON, 2015; VIZCARRA; ALAN; KIRBY, 2015). A diferenciação de todo o sistema reprodutivo durante a fase embrionária, tanto em machos quanto em fêmeas, é semelhante ao de outras espécies vertebradas (RONG et al., 2011). Portanto, no momento da eclosão, as aves já possuem o aparelho reprodutivo totalmente diferenciado (HARVEY; SCANES; PHILLIPS, 1986; VIZCARRA; ALAN; KIRBY, 2015).

Em aves, a gonadogênese é marcada por três fases distintas: a formação da crista genital, a diferenciação gonadal e a função gonadal (INTARAPAT; SATAYALAI, 2014). Antes da diferenciação gonadal o embrião possui gônadas bipotenciais ou indiferenciadas, compostas por diversos tipos celulares (INTARAPAT; SATAYALAI, 2014) e canais excretores rudimentares, na forma de ductos de Müller e Wolff (VIZCARRA; ALAN; KIRBY, 2015). A formação das gônadas indiferenciadas ocorre após a colonização das cristas genitais pelas células germinativas primordiais (CGPs) (JOHNSON, 2015; VIZCARRA; ALAN; KIRBY, 2015), que migram da região central do blastodisco para a crista genital através da circulação sanguínea (INTARAPAT; SATAYALAI, 2014). As cristas genitais, por sua vez, se localizam

na região medioventral do mesonefro. Em codornas, as cristas são formadas entre o 3º e 4º dia de desenvolvimento embrionário, marcando o início da diferenciação sexual (CHANG et al., 2012; INTARAPAT; SATAYALAI, 2014; RONG et al., 2011).

A diferenciação gonadal, caracterizada pelo desenvolvimento inicial dos ovários, testículos e alteração dos padrões de síntese de esteroides sexuais, ocorre na primeira metade do desenvolvimento embrionário e é considerada o ponto crítico da origem e desenvolvimento dos sistemas reprodutivos masculino e feminino (VIZCARRA; ALAN; KIRBY, 2015). A partir desse momento, ocorre a diferenciação fenotípica e cerebral das aves (BRUGGEMAN; VAN AS; DECUYPERE, 2002). Estudos mostram que os embriões de aves começam a expressar enzimas esteroidogênicas e sintetizar quantidades mensuráveis de esteroides na primeira semana de incubação (BRUGGEMAN; VAN AS; DECUYPERE, 2002; JOHNSON, 2015), antes mesmo do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal tornar-se funcional na segunda metade da incubação e as concentrações plasmáticas de esteroides sexuais aumentarem consideravelmente (BRUGGEMAN; VAN AS; DECUYPERE, 2002).

Nos machos, o desenvolvimento das gônadas ocorre de forma simétrica nos dois testículos, enquanto nas fêmeas, o processo ocorre de maneira assimétrica. Nessa última categoria, na grande maioria das espécies de aves, apenas o ovário esquerdo torna-se funcional (INTARAPAT; SATAYALAI, 2014). Em codornas, o sexo embrionário pode ser distinguido pela morfologia gonadal entre o 5º (RONG et al., 2011) e o 7º dia de incubação (INTARAPAT; SATAYALAI, 2014). De modo similar, nos embriões do gênero *Gallus* a diferenciação gonadal ocorre entre o 6º e o 7º dia de incubação (BRUGGEMAN; VAN AS; DECUYPERE, 2002; JOHNSON, 2015), enquanto o desenvolvimento do eixo hipofisário-gonadal ocorre no 13º dia (VIZCARRA; ALAN; KIRBY, 2015).

Durante a diferenciação sexual nos machos, as CGPs migram para formar o epitélio germinativo, unindo-se às células de Sertoli presentes no estroma de tecido conjuntivo. Esse processo resulta em uma proliferação epitelial e a consequente formação dos túbulos seminíferos, que se associam intimamente às células de Leydig (HARVEY; SCANES; PHILLIPS, 1986). Após a diferenciação testicular e início da produção de andrógenos pelas células de Leydig ocorre a regressão dos ductos de Müller, devido à ação do hormônio anti-Mulleriano (AMH), e formação dos canais excretórios, derivados dos ductos de Wolff (VIZCARRA; ALAN; KIRBY, 2015). O gene que codifica o AMH se expressa em ambos os sexos por volta do 5º dia de incubação, com concentrações maiores em machos comparado às fêmeas (BRUGGEMAN; VAN AS; DECUYPERE, 2002).

Nas fêmeas, as gônadas se desenvolvem a partir do mesonefro e são inicialmente compostas por um epitélio cortical externo (local da formação dos folículos primordiais e da diferenciação de células germinativas) e uma medula subjacente, ambas colonizadas por CGPs, que migram para os ovários a partir do segundo dia de incubação (JOHNSON, 2015; RONG et al., 2011). O ducto de Müller esquerdo presente no embrião feminino dá origem, posteriormente, ao oviduto funcional (JOHNSON, 2015). Em embriões de galinhas domésticas, a meiose de células germinativas inicia-se aproximadamente aos 15 dias de incubação (HE; MI; ZHANG, 2013).

Após a diferenciação sexual, as gônadas tornam-se funcionais. Em codornas esse processo ocorre entre o 10º e 14º dia de incubação. Nesse período, tanto no córtex ovariano quanto nos testículos observa-se a presença de células germinativas (oogônias e espermatogônias, respectivamente) (CHANG et al., 2012; INTARAPAT; SATAYALAI, 2014). RONG et al. (2011) observaram a diferenciação de CGPs em oogônias em ovários de embriões de codornas a partir do 7º dia, distinção anatômica em regiões cortical (com presença de oogônias) e medular no 10º dia, e presença de folículos primordiais no 13º dia de incubação. Já em machos, CHANG et al. (2012) perceberam a diferenciação de CGPs em espermatogônias no 10º dia, as quais aumentaram consideravelmente em quantidade até o 15º dia. Isso evidencia que, em aves, a diferenciação sexual do ovário ocorre antes da diferenciação testicular, ao contrário do que ocorre em mamíferos (BRUGGEMAN; VAN AS; DECUYPERE, 2002).

Durante o desenvolvimento embrionário, os embriões de aves fêmeas possuem dois ovários, porém na grande maioria das espécies de aves conhecidas ocorre a regressão da gônada direita (INTARAPAT; SATAYALAI, 2014; JOHNSON, 2015). Esta assimetria gonadal está diretamente relacionada a mecanismos de expressão gênica, atividade da enzima aromatase, síntese de estrógeno e expressão seletiva de seus receptores no ovário esquerdo (BRUGGEMAN; VAN AS; DECUYPERE, 2002; JOHNSON, 2015). A ligação do estrógeno aos seus receptores presentes no ovário esquerdo inibe a ação do AMH, resultando em desenvolvimento do córtex ovariano, transformação dos ductos de Müller em um oviduto funcional e desenvolvimento das características sexuais secundárias das fêmeas (BRUGGEMAN; VAN AS; DECUYPERE, 2002). Ao contrário, a ausência de receptores de estrógeno (BRUGGEMAN; VAN AS; DECUYPERE, 2002) no ovário direito resulta em apoptose das suas células, levando à assimetria gonadal já evidente no 10º dia de incubação (JOHNSON, 2015).

2.2 Relação entre o desenvolvimento embrionário e a eficiência reprodutiva das aves adultas

O sistema reprodutor masculino situa-se na parede dorsal da cavidade celomática das aves e é composto por um par de testículos, pequenos epidídimos e longos ductos deferentes (VIZCARRA; ALAN; KIRBY, 2015). Os túbulos seminíferos tornam-se funcionais em resposta ao aumento dos níveis plasmáticos de gonadotrofinas, com início da espermatogênese por volta dos 26 dias de idade em codornas (SIOPEs; WILSON, 1975). Nesse momento, quando as aves atingem a puberdade, a produção de espermatozoides ocorre como resultado da divisão meiótica e diferenciação das células da linhagem germinativa (KIRBY; FROMAN, 2000; VIZCARRA; ALAN; KIRBY, 2015).

Já o sistema reprodutor feminino de codornas, assim como da maioria das espécies aviárias, é composto pelo ovário esquerdo e um oviduto a ele associado (HARVEY; SCANES; PHILLIPS, 1986; JOHNSON, 2015). A formação dos gametas femininos, assim como em mamíferos, também ocorre durante o desenvolvimento embrionário. Durante a embriogênese de poedeiras domésticas, o número de oócitos presentes em ovários aumenta de 28 mil (9º dia de incubação) para aproximadamente 680 mil (17º dia), porém, no momento da eclosão cai para 480 mil células (HUGHES, 1963). No entanto, apenas um número relativamente pequeno, em geral de 250 a 500 desses gametas, será ovulado ao longo da vida na maioria das espécies de aves (JOHNSON, 2015).

Os oócitos encontram-se em folículos ovarianos, que são formados próximo ao momento da eclosão. Após a puberdade, passam a assumir gradativamente uma hierarquia, tornando-se aptos à ovulação (HARVEY; SCANES; PHILLIPS, 1986; JOHNSON, 2015). A capacidade reprodutiva da maior parte das espécies de animais vertebrados é determinada pelo desenvolvimento de gametas maduros, associado às condições fisiológicas favoráveis dos progenitores (JOHNSON, 2015). O início da atividade gonadal e consequente produção de hormônios esteroides em maior quantidade após a puberdade é responsável pelo crescimento do oviduto, que aumenta de tamanho e assume cinco regiões anatômicas distintas (infundíbulo, magno, istmo, útero ou câmara calcífera e vagina). Essas regiões possuem diferentes funções na formação dos ovos (HARVEY; SCANES; PHILLIPS, 1986; JOHNSON, 2015).

Diferentemente do que ocorre em mamíferos, o desenvolvimento embrionário das aves é relativamente independente de alterações na fisiologia materna uma vez que a embriogênese ocorre predominantemente fora do organismo materno. A nível endócrino, a única relação com a mãe é através da deposição de hormônios na gema de ovo (DE GROEF; GROMMEN;

DARRAS, 2008). Por esse motivo, pesquisas com embriões de aves fornecem informações válidas sobre a influência de diferentes fatores sobre o desenvolvimento embrionário, tais como hormônios produzidos ou administrados *in ovo* (DE GROEF; GROMMEN; DARRAS, 2008; HE; MI; ZHANG, 2013). Baseado nisso, estudos sobre o estabelecimento do eixo pituitário-gonadal em embriões têm demonstrado sua importância sobre o desenvolvimento das células germinativas (HE; MI; ZHANG, 2013; WOODS; THOMMES, 1984).

As gonadotrofinas hipofisárias, bem como os esteroides gonadais, desempenham importante papel no desenvolvimento ovariano, estando intimamente relacionados à proliferação e diferenciação das células germinativas no ovário embrionário (HE; MI; ZHANG, 2013). Em resumo, esses autores verificaram que o hormônio folículo estimulante (FSH) acelera a mitose das células germinativas ovarianas e retarda o início da meiose através do estrogênio, enquanto o hormônio luteinizante (LH) promove a secreção de progesterona resultando em iniciação meiótica. Portanto, a produção desses hormônios pelo embrião em desenvolvimento está diretamente relacionada ao desenvolvimento gonadal e gametogênese em aves.

Conforme descrito anteriormente, embora as gônadas masculina e feminina das aves adquiram funcionalidade apenas após a puberdade, a formação e desenvolvimento inicial do sistema reprodutivo das aves ocorre durante o período de incubação dos ovos. Dessa forma, qualquer fator relacionado ao ambiente capaz de modificar o desenvolvimento embrionário poderia influenciar também o desenvolvimento do eixo reprodutivo, podendo afetar a formação testicular e ovariana e, conseqüentemente, a eficiência reprodutiva das aves adultas.

2.3 Influência da luz sobre a fisiologia das aves

Sabe-se que a reprodução das aves é controlada pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal em resposta a diversos fatores ambientais, tais como fotoperíodo, temperatura, disponibilidade de alimento e interações sociais, que são percebidos e transmitidos como sinais nervosos (HARVEY; SCANES; PHILLIPS, 1986). A percepção de estímulos ambientais, associada a fatores endógenos, determinam o ritmo circadiano que regula a atividade neurosecretória. Esse ritmo pode ser drasticamente alterado por meio da manipulação do fotoperíodo (VIZCARRA; ALAN; KIRBY, 2015).

Em geral, nas aves a melatonina possui efeito antigonadotrópico, pois o eixo reprodutivo responde ao aumento na duração dos dias com um aumento na secreção de hormônios reprodutivos e crescimento gonadal, enquanto dias curtos resultam em regressão das gônadas

(BAER; LANSFORD; CHENG, 2015; BALL; KETTERSON, 2007). Mudanças no fotoperíodo também estão relacionadas à idade a maturidade sexual e desenvolvimento corporal das aves (BAXTER et al., 2014).

A visão das aves constitui 70% da sua percepção total. Esses animais possuem capacidade visual superior à de humanos e outros mamíferos por perceberem um maior espectro de cores, possuírem sensibilidade visual livre de vibrações e maior harmonia e acuidade visual (ÇAPAR AKYÜZ; ONBAŞILAR, 2018; PRESCOTT; WATHES; JARVIS, 2003). As aves são capazes de perceber o estímulo luminoso através de fotorreceptores retiniais e extraretiniais, estes últimos localizados na glândula pineal e no hipotálamo, pois a luz é capaz de penetrar o crânio e influenciar diretamente estas estruturas (BAI et al., 2019; BAXTER et al., 2014; ÇAPAR AKYÜZ; ONBAŞILAR, 2018; MACKOVÁ; LAMOŠOVÁ; ZEMAN, 1998; SIOPEŠ; WILSON, 1980).

Dois tipos de fotorreceptores estão presentes na retina dos olhos, os cones e bastonetes. Os bastonetes são incapazes de distinguir diferentes cores de luz, portanto, percebem apenas a luz branca através de fotopigmentos de rodopsina (ÇAPAR AKYÜZ; ONBAŞILAR, 2018). Os cones, por outro lado, possuem fotopigmentos de iodopsina e podem ser divididos em cinco subtipos (KRAM; MANTEY; CORBO, 2010), sendo eles os sensíveis às cores violeta (380-435 nm), azul (435-500 nm), verde (500-565 nm) e vermelha (630-780 nm), além de um par de cones cuja função não é totalmente esclarecida (ÇAPAR AKYÜZ; ONBAŞILAR, 2018; LEWIS; CASTON; LEESON, 2007). Além disso, as aves são capazes de responder ao estímulo luminoso independentemente da retina. BAXTER et al. (2014) demonstraram que galinhas poedeiras cegas foram expostas a diferentes cores de luz na fase de criação e tiveram alteração de parâmetros reprodutivos de forma similar às aves que possuíam a retina íntegra. Embora a contribuição dos fotorreceptores retiniais e hipotalâmicos na reprodução ainda seja controversa, essa evidência experimental demonstrou que a fotoestimulação hipotalâmica atua sobre a função reprodutiva das aves (BAXTER et al., 2014; DAWSON et al., 2001).

O efeito do fotoperíodo sobre a fisiologia das aves está diretamente relacionada à atividade da glândula pineal, localizada entre os hemisférios cerebrais e o cerebelo. Assim como a retina e o hipotálamo, a pineal também possui fotorreceptores funcionais (ÇAPAR AKYÜZ; ONBAŞILAR, 2018). Essa glândula é responsável pela síntese da maior parte da melatonina circulante em aves, que é produzida e secretada em oscilações circadianas (PANG; RALPH; REILLY, 1974; ZEMAN; HERICHOVÁ, 2011). Tanto a melatonina quanto a serotonina estão relacionados ao ritmo circadiano. Por meio desse processo, são reguladas as funções endócrinas, temperatura corporal, época de acasalamento e diversos outros processos

fisiológicos (ÇAPAR AKYÜZ; ONBAŞILAR, 2018; MACKOVÁ; LAMOŠOVÁ; ZEMAN, 1998). Em codornas japonesas, a retina também é capaz de sintetizar e secretar melatonina, participando desse mecanismo de regulação (PIERCE, 1999; STEELE et al., 2006).

O hipotálamo localiza-se no tecido cerebral e desempenha importante papel no controle de processos homeostáticos e fisiológicos, incluindo a função reprodutiva. Nas aves, a reprodução é fortemente regulada por neuropeptídeos hipotalâmicos estimulatórios (hormônio liberador de gonadotrofinas; GnRH) e inibitórios (hormônio inibidor de gonadotrofinas; GnIH) (BAXTER et al., 2014; BÉDÉCARRATS et al., 2009; TSUTSUI et al., 2010). O padrão de secreção dos hormônios reprodutivos depende de estímulos endógenos e ambientais, determinando o controle do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal.

O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) é o principal hormônio que regula a atividade reprodutiva em aves. Ele desempenha importante papel na liberação de gonadotrofinas (hormônio luteinizante, LH; e hormônio folículo-estimulante, FSH) pela hipófise anterior, as quais, por sua vez, são responsáveis pela atividade gonadal e a síntese de hormônios esteroides (HARVEY; SCANES; PHILLIPS, 1986; VIZCARRA; ALAN; KIRBY, 2015). Já o hormônio inibidor de gonadotrofinas (GnIH) foi inicialmente isolado em codornas japonesas (TSUTSUI et al., 2000) e, desde então, diversos estudos vêm avaliando sua função e mecanismo de ação. Os níveis desses dois peptídeos hipotalâmicos determinam a atividade do eixo reprodutivo, a maturidade sexual e a manutenção da função reprodutiva (BAXTER et al., 2014; BÉDÉCARRATS et al., 2009; TSUTSUI et al., 2010).

O início da maturidade sexual é, geralmente, desencadeado por condições ambientais que estimulam o eixo hipotâmico-hipofisário-gonadal, desde que ele esteja completamente desenvolvido e responsivo (HARVEY; SCANES; PHILLIPS, 1986). Sob um curto fotoperíodo, as aves sexualmente imaturas apresentam níveis elevados de GnIH, resultando na inibição do eixo reprodutivo. Por outro lado, a exposição a um longo fotoperíodo induz a maturidade sexual através da redução do GnIH e aumento do GnRH (BAXTER et al., 2014; BÉDÉCARRATS et al., 2009; TSUTSUI et al., 2010).

Estudos sugerem que o aumento nos níveis plasmáticos de GnRH observado após a exposição à luz está relacionado diretamente aos fotorreceptores hipotalâmicos, enquanto a síntese e liberação de GnIH é controlada pela melatonina produzida durante fases de escuro pela retina e glândula pineal (BAXTER et al., 2014; VIZCARRA; ALAN; KIRBY, 2015). Durante a escuridão, o GnIH atua tanto no hipotálamo quanto na hipófise anterior, diminuindo a liberação de GnRH e gonadotrofinas, o que resulta em inibição da atividade gonadal e

esteroidogênese (CHOWDHURY et al., 2010; TSUTSUI et al., 2010; VIZCARRA; ALAN; KIRBY, 2015).

Em síntese, a estimulação luminosa do hipotálamo desencadeia a liberação de GnRH, enquanto o aumento do fotoperíodo está relacionado a uma redução na produção de melatonina, o que diminui os níveis de GnIH.

Sabendo que a relação GnRH e GnIH influenciam o desenvolvimento e a atividade gonadal e que esses peptídeos são liberados em resposta ao ritmo circadiano, supõe-se que a estimulação luminosa durante a incubação dos ovos exerça alguma influência sobre a qualidade reprodutiva das aves, uma vez que tanto o eixo reprodutivo quanto a glândula pineal já estão ativos durante o desenvolvimento embrionário.

2.4 Influência de diferentes comprimentos de onda sobre as características reprodutivas das aves

O manejo da iluminação é amplamente utilizado na avicultura comercial de corte e postura. Isso devido à sua influência no crescimento, índices de produtividade, eficiência reprodutiva, comportamento e bem-estar das aves.

De maneira geral, a luz possui cinco principais características: fonte, intensidade, duração, uniformidade e comprimento de onda (MANSER, 1996). Estudos demonstraram a influência das diferentes características da luz tanto na fisiologia reprodutiva das fêmeas (BAXTER et al., 2014; BOBADILLA-MENDEZ et al., 2016; LEWIS; CASTON; LEESON, 2007; REDDY et al., 2012) quanto de machos (CHANG et al., 2016; RETES et al., 2017; YADAV; CHATURVEDI, 2016).

Na prática, as principais fontes luminosas são o sol e diferentes tipos de lâmpadas, tais como incandescente, fluorescente e de LED (*light-emitting diodes*). Já a intensidade está relacionada à potência com que a luz é emitida em uma determinada direção e o comprimento de onda reflete a cor percebida no espectro da luz visível. Em revisão feita por ÇAPAR AKYÜZ e ONBAŞILAR (2018), destaca-se a influência destas características e a percepção diferenciada da luz em diversas espécies de aves, tais como frangos, galinhas, perus, codornas, entre outras.

A luz visível possui um comprimento de onda que varia entre 380 e 740nm, permanecendo entre os raios infravermelhos (longos comprimentos de onda) e radiação ultravioleta (comprimentos de onda mais curtos) (PARVIN et al., 2014). As aves são muito sensíveis aos diferentes comprimentos de onda de luz, que podem afetar sua fisiologia e comportamento de forma diferenciada (ARCHER, 2017; ARCHER; JEFFREY; TUCKER,

2017). A exposição às LED verde, vermelha e azul tem sido amplamente estudada em diversas espécies de aves domésticas, assim como a LED branca, que é formada por alta proporção de luzes de maior comprimento de onda, tal como a luz vermelha (BOBADILLA-MENDEZ et al., 2016; HUTH; ARCHER, 2015; MOBARKEY et al., 2010). Isso permite explicar o fato de diversos trabalhos obterem resultados semelhantes com as LED branca e vermelha, tanto na fase de criação das aves (BAXTER et al., 2014; BOBADILLA-MENDEZ et al., 2016; RETES et al., 2017) quanto durante a incubação de ovos (ARCHER, 2017; DROZDOVA; OKULIAROVA; ZEMAN, 2019).

A intensidade da luz também pode alterar o efeito de diferentes comprimentos de onda sobre as aves (BAXTER et al., 2014; PRAYITNO; PHILLIPS; STOKES, 1997). De acordo com HARRISON et al. (1970), a retina dos olhos pode ser estimulada por luzes de menor comprimento (luz verde/azul) sob baixa intensidade, porém, para atingir os fotorreceptores hipotalâmicos é necessária maior intensidade luminosa. Por outro lado, luzes com comprimentos de onda longos (luz vermelha) possuem elevada quantidade de energia, sendo capazes de penetrar o crânio e o cérebro a partir de uma intensidade de 4 lux, estimulando o hipotálamo e suprimindo a secreção de serotonina e melatonina (BAXTER et al., 2014; ÇAPAR AKYÜZ; ONBAŞILAR, 2018).

A luz vermelha parece estimular a reprodução e o estado de vigília, enquanto as luzes verde e azul estimulam o crescimento e inibem a atividade reprodutiva (ARCHER, 2016; YADAV; CHATURVEDI, 2016). Tais efeitos se devem à capacidade de penetração dos diferentes comprimentos de onda que compõe a luz. Em galinhas, BAXTER et al. (2014) observaram melhoria na performance reprodutiva com a utilização de LED vermelha, resultando em menor idade à maturidade sexual, aumento da atividade ovariana e aumento na produção de ovos comparado à luz LED verde. LEWIS; CASTON e LEESON (2007) não observaram efeito da luz incandescente verde no período de criação sobre a maturação e produtividade em relação à luz incandescente branca. Por outro lado, REDDY et al. (2012) observaram aumento no peso corporal, peso do ovário e oviduto, maior número de folículos ovarianos pré-ovulatórios, maior produção de ovos e maior atividade secretória do eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano em galinhas expostas a luz vermelha (650 nm) em relação às lâmpadas incandescentes tradicionais (450 nm).

Em codornas, BOBADILLA-MENDEZ et al. (2016) observaram melhores resultados com a LED branca em relação a lâmpadas incandescentes, fluorescentes brancas e de LED verde, azul e vermelha, como menor idade a maturidade sexual e maior desenvolvimento dos órgãos reprodutivos após esse período. De modo similar, avaliando o desempenho reprodutivo

de codornas japonesas machos expostos a diferentes fontes luminosas, RETES et al. (2017) observaram maiores testículos aos 57 dias em aves mantidas sob LED branca, porém, menor idade a maturidade sexual foi obtida com lâmpadas fluorescentes e de LED vermelha. A qualidade espermática e a fertilidade dos machos não foram afetadas pelas diferentes fontes de luz nesse estudo. Já ELKOMY et al. (2019) verificaram maior peso corporal até a 5ª semana de idade em codornas japonesas machos e fêmeas criadas sob luz LED vermelha comparado às luzes verde e branca.

Os resultados observados em galinhas e codornas japonesas sugerem que luzes de maior comprimento de onda possuem maior capacidade de penetração no tecido cerebral profundo, atingindo os fotorreceptores pineais e hipotalâmicos mais facilmente que luzes de curto comprimento de onda (LEWIS; MORRIS, 2006). Atrelado a isso, diferentes respostas aos principais comprimentos de onda têm sido encontrados, tornando a luz artificial colorida uma importante ferramenta a ser explorada na avicultura comercial e de postura.

2.5 Luz na incubação artificial de ovos

Sabe-se que bons índices de produtividade em um incubatório estão diretamente relacionados aos fatores que compõe o ambiente de incubação, tais como temperatura, umidade, rolagem dos ovos, concentrações de dióxido de carbono e luminosidade (ARCHER, 2017; DROZDOVA; OKULIAROVA; ZEMAN, 2019). Embora diversos estudos tenham demonstrado que a luz na incubação seja importante, na maioria dos incubatórios comerciais a incubação dos ovos é feita em condições de escuridão completa. Uma provável razão para a luz não ser utilizada em incubatórios comerciais se deve ao fato de as fontes de iluminação inicialmente utilizadas possuírem efeitos deletérios sobre os embriões, como o aquecimento causado por lâmpadas incandescentes e fluorescentes, que parece acelerar o desenvolvimento embrionário podendo diminuir a eclodibilidade (ARCHER; JEFFREY; TUCKER, 2017; ARCHER; MENCH, 2014b). No entanto, com o advento da tecnologia de lâmpadas LED (*light-emitting diodes*), esse problema pôde ser eliminado, uma vez que essas lâmpadas estão sendo cada vez mais utilizadas em substituição às fontes de iluminação tradicionais por serem energeticamente mais eficientes sem promover aquecimento do ambiente (ARCHER; JEFFREY; TUCKER, 2017; PARVIN et al., 2014; ZHANG et al., 2016).

Dados da literatura indicam que embriões de aves são capazes de responder ao estímulo luminoso pelo fato de possuírem o sistema sensorial que responde à luz, composto principalmente pela retina e glândula pineal, desde uma fase muito precoce do desenvolvimento

embrionário (REED; CLARK, 2011; ZEMAN; GWINNER; SOMOGYIOVA, 1992). ERWIN; BOONE e BARNETT (1971) demonstraram que embriões de aves são capazes de responder à luz desde o terceiro dia do desenvolvimento. De modo similar, outros trabalhos demonstraram que tanto células retiniais (PIERCE, 1999) quanto células pineais (HALDAR; FUKADA; ARAKI, 2003) já estão presentes em embriões de codornas desde o início da embriogênese. No entanto, os mecanismos através dos quais as respostas fisiológicas ocorrem não são claramente elucidados.

A exposição de ovos às luzes LED branca e vermelha durante a incubação influencia a qualidade dos pintinhos devido à melhor maturação do umbigo (ARCHER, 2017; ARCHER; JEFFREY; TUCKER, 2017), além de resultar em menor mortalidade embrionária precoce e maior número de pintos sem defeitos quando comparado ao escuro (ARCHER; JEFFREY; TUCKER, 2017; HUTH; ARCHER, 2015). Em codornas japonesas, FARGHLY e MAHROSE (2012) evidenciaram maior peso à eclosão e menor mortalidade embrionária de pintainhas expostas à luz incandescente contínua comparado à escuridão, e não observaram diferença na atividade, aparência, conformação de pernas e aspecto do umbigo das aves. Esses resultados estão relacionados às respostas fisiológicas e metabólicas à luz durante a embriogênese, devido à maior taxa de desenvolvimento embrionário causado pela exposição à luz (ARCHER, 2017; FARGHLY; MAHROSE, 2012).

O fotoperíodo e o momento do início da exposição à luz durante a incubação são importantes para efeitos pós-eclosão (ARCHER; MENCH, 2013; 2014a; ARCHER; SHIVAPRASAD; MENCH, 2009; ÖZKAN et al., 2012). No entanto, não só o fotoperíodo, intensidade luminosa e comprimento de onda estão envolvidos na percepção da luz pelo embrião, mas também características como a espessura e coloração da casca dos ovos (MAURER et al., 2015; MAURER; PORTUGAL; CASSEY, 2011). A casca do ovo representa um fator importante na determinação da forma como a luz afeta o embrião em desenvolvimento, uma vez que absorve grande parte da luz a qual o ovo é exposto. Trabalhos demonstram que a porcentagem de luz incidida sobre o ovo que de fato atinge o embrião é muito baixa, pois em média 99,8% da luz é absorvida pela casca (SHAFEY et al., 2002; SHAFEY et al., 2004). Esses resultados estão de acordo com MAURER et al. (2015), que também observaram uma transmissão inferior a 0,1% através da casca de ovos de diferentes espécies de aves. Isso funciona como um mecanismo de proteção, pois previne a entrada de comprimentos de onda prejudiciais como a radiação ultravioleta, que pode levar a anormalidades no desenvolvimento embrionário, ao mesmo tempo que facilita a transmissão de luz benéfica (LAHTI, 2008).

Existem evidências de que toda a casca do ovo permita a passagem da luz, funcionando como um filtro para comprimentos de onda específicos. HUTH e ARCHER (2015) observaram que a luz LED branca é filtrada de modo que os comprimentos de onda de luz são deslocados para a tonalidade vermelha, enquanto as luzes vermelha e verde monocromáticas não são filtradas ou deslocadas como a luz branca (ARCHER, 2017). O aumento na concentração de pigmentos, bem como aumento na espessura da casca, está inversamente relacionado à transmissão de luz através da casca do ovo (MAURER et al., 2015). HUTH e ARCHER (2015) obtiveram resultados distintos para eclodibilidade de ovos de frangos de corte e galinhas poedeiras, e atribuíram esta diferença às diferentes pigmentações da casca.

Os mecanismos pelos quais a luz na incubação influencia o desenvolvimento embrionário e a eclodibilidade não são conhecidos, mas a melatonina possivelmente está envolvida nesses processos (DROZDOVA; OKULIAROVA; ZEMAN, 2019). Estudos anteriores demonstraram que a glândula pineal sintetiza melatonina de modo rítmico durante o desenvolvimento embrionário tanto em condições *in vivo* (ZEMAN; GWINNER, 1993) quanto *in vitro* (LAMOŠOVÁ et al., 1995). Oscilações circadianas das concentrações de melatonina refletem o ciclo de luz/escuridão durante a incubação, sinalizando o fotoperíodo para embriões de aves (DROZDOVA; OKULIAROVA; ZEMAN, 2019; ZEMAN; HERICHOVÁ, 2011) (ARCHER; MENCH, 2014a).

Em trabalho realizado por MACKOVÁ; LAMOŠOVÁ e ZEMAN (1998), foi observado aumento da atividade dos pinealócitos na segunda metade do desenvolvimento embrionário de aves, acompanhado por maior síntese e secreção de melatonina. Além disso, os autores observaram altos níveis de melatonina circulante durante os períodos de escuridão e baixos níveis em condições de iluminação sob luz fluorescente branca a uma intensidade de 200 a 400 lux durante a incubação.

A luz durante a incubação também está relacionada à expressão de fotorreceptores (ROZENBOIM et al., 2013) e alteração dos padrões de secreção hormonal (BAI et al., 2019), melhorando o desempenho produtivo das aves (ZHANG et al., 2012; ZHANG et al., 2016). Além disso, não parecem apresentar efeitos negativos sobre o desenvolvimento dos olhos dessas aves (ARCHER; SHIVAPRASAD; MENCH, 2009; ZHANG et al., 2016). No período pós-eclosão, estudos demonstraram que o fornecimento de luz na incubação tem efeito sobre a redução na susceptibilidade ao estresse (ARCHER; MENCH, 2013; ARCHER; SHIVAPRASAD; MENCH, 2009; HUTH; ARCHER, 2015; ÖZKAN et al., 2012) e na resposta ao medo (ARCHER; MENCH, 2014b) de frangos de corte, indicando seu efeito sobre o bem-estar e comportamento dessas aves. FARGHLY e MAHROSE (2012) também perceberam que

pintainhas eclodidas após a exposição à luz parecem ser mais ativas que aquelas incubadas em escuridão total.

Em frangos de corte, o estímulo luminoso durante a incubação está relacionado a um aumento do ganho de peso (ROZENBOIM et al., 2013; ZHANG et al., 2012; ZHANG et al., 2016), melhor taxa de conversão alimentar e melhor desenvolvimento do músculo do peito (ZHANG et al., 2012). De modo similar, em codornas japonesas a exposição à luz também resultou em maior ganho de peso diário e menor conversão alimentar até as oito semanas de idade, porém, durante a fase de produção, não afetou a conversão alimentar e massa de ovos produzida (FARGHLY; MAHROSE, 2012).

A velocidade de desenvolvimento do embrião e os padrões comportamentais dos pintinhos podem ser influenciados pelo comprimento de onda ao qual o ovo é exposto no período de incubação (MAURER et al., 2015). Diferentes comprimentos de onda afetam os fotorreceptores de forma distinta, podendo ser o mecanismo ou parte dele pela qual as cores de luz afetam a fisiologia durante a embriogênese (ROZENBOIM et al., 2013).

Curtos comprimentos de onda, como a luz monocromática verde, parecem estar relacionados ao estabelecimento do ritmo circadiano em embriões. Comparado à incubação em condições de escuridão, a luz verde pode resultar em menor tempo de incubação e peso à eclosão e maior eclodibilidade em frangos de corte (SHAFEY; AL-MOHSEN, 2002). Exposição de embriões de frangos de corte à LED verde melhorou a conversão alimentar, o ganho de peso e o desenvolvimento do músculo de peito quando comparado às LED azul, branca e escuro (BAI et al., 2019; ROZENBOIM et al., 2004; ZHANG et al., 2012; ZHANG et al., 2016). Segundo os autores, este resultado se deve, provavelmente, devido a um aumento na proliferação e diferenciação de células satélites em estágios embrionários tardios. BAI et al. (2019) também observaram um aumento na secreção de melatonina e a secreção de hormônios do eixo somatotrópico.

Já a exposição dos ovos a comprimentos de onda maiores (luz LED branca e vermelha) parece ser benéfica ao processo de incubação, podendo aumentar o número de pintos eclodidos, bem como sua qualidade, relacionada a menor ocorrência de pintos sujos, fracos, com mal formações e umbigo não cicatrizado, além de melhorar o bem-estar e capacidade de lidar com agentes estressores durante a produção, quando comparado a LED verde (ARCHER, 2017). Estudos evidenciam melhorias na eclodibilidade com a utilização de luzes monocromáticas branca, vermelha ou combinação de ambas (ARCHER, 2016; 2017; ARCHER; JEFFREY; TUCKER, 2017). Além disso, essas luzes também resultaram em aumento da qualidade dos pintinhos devido a melhor maturação do umbigo (ARCHER, 2016; 2017; ARCHER;

JEFFREY; TUCKER, 2017; HUTH; ARCHER, 2015) e maior bem-estar pós-eclosão, com redução nas respostas de medo e susceptibilidade ao estresse comparado à luz verde e incubação em condições de escuro (ARCHER, 2017).

Conforme apresentado, fica evidente que a utilização de luz durante a incubação dos ovos pode conferir efeitos positivos tanto durante a incubação, quanto no desempenho das aves após a eclosão. Uma vez que as lâmpadas de LED apresentam baixo consumo de energia e não promovem aquecimento do ambiente em comparação com os demais tipos de lâmpadas, sua utilização em incubatórios comerciais pode ser implementada sem impactar significativamente nos resultados ou custo do processo. No entanto, no que tange aos benefícios de sua utilização visando melhoria na reprodução das aves, mais pesquisas devem ser realizadas.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É notório que estímulo luminoso durante a incubação dos ovos exerce forte influência sobre as aves após a eclosão, afetando seu bem-estar, comportamento, desenvolvimento corporal e desempenho produtivo. Porém, não foram encontrados trabalhos avaliando o impacto da luz na incubação sobre as características reprodutivas de codornas japonesas. A produção de melatonina desde o início do desenvolvimento embrionário possivelmente exerce influência sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, o que tem relação direta com a formação das gônadas das aves, podendo afetar a eficiência reprodutiva na fase adulta. Sendo assim, a realização de pesquisas que demonstrem os efeitos do uso da luz na incubação sobre a eficiência reprodutiva se faz necessária.

REFERÊNCIAS

- ARCHER, G. Spectrum of white light during incubation: warm vs cool white LED lighting. **Int. J. Poult. Sci**, 15, n. 9, p. 343-349, 2016.
- ARCHER, G. Exposing broiler eggs to green, red and white light during incubation. **animal**, 11, n. 7, p. 1203-1209, 2017.
- ARCHER, G.; JEFFREY, D.; TUCKER, Z. Effect of the combination of white and red LED lighting during incubation on layer, broiler, and Pekin duck hatchability. **Poultry science**, 96, n. 8, p. 2670-2675, 2017.
- ARCHER, G.; MENCH, J. The effects of light stimulation during incubation on indicators of stress susceptibility in broilers. **Poultry science**, 92, n. 12, p. 3103-3108, 2013.

ARCHER, G.; MENCH, J. The effects of the duration and onset of light stimulation during incubation on the behavior, plasma melatonin levels, and productivity of broiler chickens. **Journal of animal science**, 92, n. 4, p. 1753-1758, 2014a.

ARCHER, G.; MENCH, J. Natural incubation patterns and the effects of exposing eggs to light at various times during incubation on post-hatch fear and stress responses in broiler (meat) chickens. **Applied Animal Behaviour Science**, 152, p. 44-51, 2014b.

ARCHER, G.; SHIVAPRASAD, H.; MENCH, J. Effect of providing light during incubation on the health, productivity, and behavior of broiler chickens. **Poultry science**, 88, n. 1, p. 29-37, 2009.

BAER, J.; LANSFORD, R.; CHENG, K. Japanese Quail as a Laboratory Animal Model. *In: Laboratory Animal Medicine*: Elsevier, 2015. p. 1087-1108.

BAI, X.; CAO, J.; DONG, Y.; WANG, Z. *et al.* Melatonin mediates monochromatic green light-induced satellite cell proliferation and muscle growth in chick embryo. **PloS one**, 14, n. 5, p. e0216392, 2019.

BALL, G.; KETTERSON, E. Sex differences in the response to environmental cues regulating seasonal reproduction in birds. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 363, n. 1490, p. 231-246, 2007.

BAXTER, M.; JOSEPH, N.; OSBORNE, V.; BEDECARRATS, G. Red light is necessary to activate the reproductive axis in chickens independently of the retina of the eye. **Poultry Science**, 93, n. 5, p. 1289-1297, 2014.

BÉDÉCARRATS, G.; MCFARLANE, H.; MADDINENI, S.; RAMACHANDRAN, R. Gonadotropin-inhibitory hormone receptor signaling and its impact on reproduction in chickens. **General and comparative endocrinology**, 163, n. 1-2, p. 7-11, 2009.

BOBADILLA-MENDEZ, M.; ROJAS-GRANADOS, C.; ANDRADE, E.; RETES, P. *et al.* Effect of different light sources on reproductive anatomy and physiology of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Animal reproduction science**, 168, p. 50-56, 2016.

BRUGGEMAN, V.; VAN AS, P.; DECUYPERE, E. Developmental endocrinology of the reproductive axis in the chicken embryo. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, 131, n. 4, p. 839-846, 2002.

ÇAPAR AKYÜZ, H.; ONBAŞILAR, E. Light wavelength on different poultry species. **World's Poultry Science Journal**, 74, n. 1, p. 79-88, 2018.

CHANG, G.; CHEN, R.; QIN, Y.; ZHANG, Y. *et al.* The Development of Primordial Germ Cells (PGCs) and Testis in the Quail Embryo. **Pakistan Veterinary Journal**, 32, n. 1, p. 88-92, 2012.

CHANG, S.; ZHUANG, Z.; LIN, M.; CHENG, C. *et al.* Effects of monochromatic light sources on sex hormone levels in serum and on semen quality of ganders. **Animal reproduction science**, 167, p. 96-102, 2016.

CHOWDHURY, V.; YAMAMOTO, K.; UBUKA, T.; BENTLEY, G. *et al.* Melatonin stimulates the release of gonadotropin-inhibitory hormone by the avian hypothalamus. **Endocrinology**, 151, n. 1, p. 271-280, 2010.

DAWSON, A.; KING, V.; BENTLEY, G.; BALL, G. Photoperiodic control of seasonality in birds. **Journal of biological rhythms**, 16, n. 4, p. 365-380, 2001.

DE GROEF, B.; GROMMEN, S.; DARRAS, V. The chicken embryo as a model for developmental endocrinology: development of the thyrotropic, corticotropic, and somatotropic axes. **Molecular and cellular endocrinology**, 293, n. 1-2, p. 17-24, 2008.

DROZDOVA, A.; OKULIAROVA, M.; ZEMAN, M. The effect of different wavelengths of light during incubation on the development of rhythmic pineal melatonin biosynthesis in chick embryos. **animal**, p. 1-6, 2019.

ELKOMY, H. E.; TAHA, A. E.; BASHA, H. A.; ABO-SAMAHA, M. I. *et al.* GROWTH AND REPRODUCTION PERFORMANCE OF JAPANESE QUAILS (*Coturnix coturnix japonica*) UNDER VARIOUS ENVIRONMENTS OF LIGHT COLORS. **Slovenian Veterinary Research**, 56, n. 22-Suppl, 2019.

ERWIN, W.; BOONE, M.; BARNETT, B. Response of the developing embryo to light. **Poultry science**, 50, n. 6, p. 1883-1884, 1971.

FARGHLY, M.; MAHROSE, K. Effects of light during storage and incubation periods on pre and post hatch performance of Japanese quail. **Egypt J Poult Sci**, 32, p. 947-958, 2012.

HALDAR, C.; FUKADA, Y.; ARAKI, M. Effects of gonadal steroids on pineal morphogenesis and cell differentiation of the embryonic quail studied under cell culture conditions. **Developmental brain research**, 145, n. 1, p. 71-79, 2003.

HARRISON, P.; LATSHAW, J.; CASEY, J.; MCGINNIS, J. Influence of decreased length of different spectral photoperiods on testis development of domestic fowl. **Reproduction**, 22, n. 2, p. 269-275, 1970.

HARVEY, S.; SCANES, C.; PHILLIPS, J. Avian Reproduction. In “Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocrinology” (I. Chester-Jones, PM Ingleton, and JG Phillips, Eds.). : Plenum, New York, NY 1986.

HE, B.; MI, Y.; ZHANG, C. Gonadotropins regulate ovarian germ cell mitosis/meiosis decision in the embryonic chicken. **Molecular and cellular endocrinology**, 370, n. 1-2, p. 32-41, 2013.

HUGHES, G. The population of germ cells in the developing female chick. **Development**, 11, n. 3, p. 513-536, 1963.

HUTH, J.; ARCHER, G. Effects of LED lighting during incubation on layer and broiler hatchability, chick quality, stress susceptibility and post-hatch growth. **Poultry science**, 94, n. 12, p. 3052-3058, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa da Pecuária Municipal. Disponível em: < <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=destaques>>. Acesso em: 03/11/2020.

INTARAPAT, S.; SATAYALAI, O. Microanatomical study of embryonic gonadal development in Japanese Quail (*Coturnix japonica*). **Anatomy research international**, 2014, p. 1-9, 2014.

JOHNSON, A. Reproduction in the female. *In*: **Sturkie's avian physiology**: Elsevier, 2015. p. 635-665.

KIRBY, J.; FROMAN, D. Reproduction in the Male birds. *Sturkie's Avian Physiology*, chapter, 23: 597. : Academics Press 2000.

KRAM, Y.; MANTEY, S.; CORBO, J. Avian cone photoreceptors tile the retina as five independent, self-organizing mosaics. **PloS one**, 5, n. 2, p. e8992, 2010.

LAHTI, D. C. Population differentiation and rapid evolution of egg color in accordance with solar radiation. **The Auk**, 125, n. 4, p. 796-802, 2008.

LAMOŠOVÁ, D.; ZEMAN, M.; MACKOVA, M.; GWINNER, E. Development of rhythmic melatonin synthesis in cultured pineal glands and pineal cells isolated from chick embryo. **Experientia**, 51, n. 9-10, p. 970-975, 1995.

LEWIS, P.; CASTON, L.; LEESON, S. Green light during rearing does not significantly affect the performance of egg-type pullets in the laying phase. **Poultry science**, 86, n. 4, p. 739-743, 2007.

LEWIS, P.; MORRIS, T. **Poultry lighting: the theory and practice**. Northcot, 2006. 0955210402.

MACKOVÁ, M.; LAMOŠOVÁ, D.; ZEMAN, M. Regulation of rhythmic melatonin production in pineal cells of chick embryo by cyclic AMP. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, 54, n. 5, p. 461-466, 1998.

MANSER, C. Effects of lighting on the welfare of domestic poultry: a review. **Animal Welfare**, 5, n. 4, p. 341-360, 1996.

MAURER, G.; PORTUGAL, S.; HAUBER, M.; MIKŠÍK, I. *et al.* First light for avian embryos: eggshell thickness and pigmentation mediate variation in development and UV exposure in wild bird eggs. **Functional Ecology**, 29, n. 2, p. 209-218, 2015.

MAURER, G.; PORTUGAL, S. J.; CASSEY, P. An embryo's eye view of avian eggshell pigmentation. **Journal of Avian Biology**, 42, n. 6, p. 494-504, 2011.

MOBARKEY, N.; AVITAL, N.; HEIBLUM, R.; ROZENBOIM, I. The role of retinal and extra-retinal photostimulation in reproductive activity in broiler breeder hens. **Domestic animal endocrinology**, 38, n. 4, p. 235-243, 2010.

ÖZKAN, S.; YALÇIN, S.; BABACANOĞLU, E.; KOZANOĞLU, H. *et al.* Photoperiodic lighting (16 hours of light: 8 hours of dark) programs during incubation: 1. Effects on growth and circadian physiological traits of embryos and early stress response of broiler chickens. **Poultry science**, 91, n. 11, p. 2912-2921, 2012.

PANG, S.; RALPH, C.; REILLY, D. Melatonin in the chicken brain: its origin, diurnal variation, and regional distribution. **General and comparative endocrinology**, 22, n. 4, p. 499-506, 1974.

PARVIN, R.; MUSHTAQ, M.; KIM, M.; CHOI, H. Light emitting diode (LED) as a source of monochromatic light: a novel lighting approach for behaviour, physiology and welfare of poultry. **World's poultry science journal**, 70, n. 3, p. 543-556, 2014.

PIERCE, M. Circadian organization in quail retina: Differential regulation of melatonin synthesis and iodopsin gene expression in vitro. **Visual neuroscience**, 16, n. 5, p. 843-848, 1999.

PRAYITNO, D.; PHILLIPS, C.; STOKES, D. The effects of color and intensity of light on behavior and leg disorders in broiler chickens. **Poultry science**, 76, n. 12, p. 1674-1681, 1997.

PRESCOTT, N.; WATHES, C.; JARVIS, J. Light, vision and the welfare of poultry. **Animal welfare**, 12, n. 2, p. 269-288, 2003.

REDDY, I.; DAVID, C.; SELVARAJU, S.; MONDAL, S. *et al.* GnRH-1 mRNA, LH surges, steroid hormones, egg production, and intersequence pause days alter in birds exposed to longer wavelength of light in the later stages of production in *Gallus gallus domesticus*. **Tropical animal health and production**, 44, n. 6, p. 1311-1317, 2012.

REED, W.; CLARK, M. Beyond maternal effects in birds: responses of the embryo to the environment. : Oxford University Press 2011.

RETES, P.; ESPÓSITO, M.; DAS NEVES, D.; VIANA, A. *et al.* Influence of different types of lamps on the reproductive development of male Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Theriogenology**, 94, p. 59-63, 2017.

RONG, C.; GUOBIN, C.; YURONG, Q.; BICHUN, L. *et al.* The development of ovary in quail's embryo. **African Journal of Biotechnology**, 10, n. 4, p. 712-717, 2011.

ROZENBOIM, I.; EL HALAWANI, M.; KASHASH, Y.; PIESTUN, Y. *et al.* The effect of monochromatic photostimulation on growth and development of broiler birds. **General and comparative endocrinology**, 190, p. 214-219, 2013.

ROZENBOIM, I.; PIESTUN, Y.; MOBARKEY, N.; BARAK, M. *et al.* Monochromatic light stimuli during embryogenesis enhance embryo development and posthatch growth. **Poultry science**, 83, n. 8, p. 1413-1419, 2004.

SHAFEY, T.; AL-MOHSEN, T. Embryonic growth, hatching time and hatchability performance of meat breeder eggs incubated under continuous green light. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, 15, n. 12, p. 1702-1707, 2002.

SHAFEY, T.; AL-MOHSEN, T.; AL-SOBAYEL, A.; AL-HASSAN, M. *et al.* Effects of eggshell pigmentation and egg size on the spectral properties and characteristics of eggshell of meat and layer breeder eggs. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, 15, n. 2, p. 297-302, 2002.

SHAFEY, T.; GHANNAM, M.; AL-BATSHAN, H.; AL-AYED, M. Effect of pigment intensity and region of eggshell on the spectral transmission of light that passes the eggshell of chickens. **International Journal of Poultry Science**, 3, n. 3, p. 228-233, 2004.

SIOPEL, T.; WILSON, W. Participation of the eyes in the photostimulation of chickens. **Poultry science**, 59, n. 5, p. 1122-1125, 1980.

SIOPEL, T. D.; WILSON, W. O. The cloacal gland—an external indicator of testicular development in coturnix. **Poultry Science**, 54, n. 4, p. 1225-1229, 1975.

STEELE, C.; TOSINI, G.; SIOPEL, T.; UNDERWOOD, H. Time keeping by the quail's eye: circadian regulation of melatonin production. **General and comparative endocrinology**, 145, n. 3, p. 232-236, 2006.

TSUTSUI, K.; BENTLEY, G.; BEDECARRATS, G.; OSUGI, T. *et al.* Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) and its control of central and peripheral reproductive function. **Frontiers in neuroendocrinology**, 31, n. 3, p. 284-295, 2010.

TSUTSUI, K.; SAIGOH, E.; UKENA, K.; TERANISHI, H. *et al.* A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. **Biochemical and biophysical research communications**, 275, n. 2, p. 661-667, 2000.

VIZCARRA, J.; ALAN, R.; KIRBY, J. Reproduction in male birds. *In: Sturkie's avian physiology*: Elsevier, 2015. p. 667-693.

WOODS, J.; THOMMES, R. Ontogeny of hypothalamo-adenohypophyseal-gonadal (HAG) interrelationships in the chick embryo. **Journal of Experimental Zoology**, 232, n. 3, p. 435-441, 1984.

YADAV, S.; CHATURVEDI, C. M. Interactive effect of light colours and temporal synergism of circadian neural oscillations in reproductive regulation of Japanese quail. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 162, p. 65-71, 2016.

ZEMAN, M.; GWINNER, E. Ontogeny of the rhythmic melatonin production in a precocial and an altricial bird, the Japanese quail and the European starling. **Journal of Comparative Physiology A**, 172, n. 3, p. 333-338, 1993.

ZEMAN, M.; GWINNER, E.; SOMOGYIOVA, E. Development of melatonin rhythm in the pineal gland and eyes of chick embryo. **Experientia**, 48, n. 8, p. 765-768, 1992.

ZEMAN, M.; HERICHOVÁ, I. Circadian melatonin production develops faster in birds than in mammals. **General and comparative endocrinology**, 172, n. 1, p. 23-30, 2011.

ZHANG, L.; ZHANG, H.; QIAO, X.; YUE, H. *et al.* Effect of monochromatic light stimuli during embryogenesis on muscular growth, chemical composition, and meat quality of breast muscle in male broilers. **Poultry science**, 91, n. 4, p. 1026-1031, 2012.

ZHANG, L.; ZHU, X.; WANG, X.; LI, J. *et al.* Green light-emitting diodes light stimuli during incubation enhances posthatch growth without disrupting normal eye development of broiler embryos and hatchlings. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, 29, n. 11, p. 1562, 2016.

MANUSCRIPT

**Reproductive aspects of Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*) hatched from eggs
incubated under different light colors**

Louise M. Coelho¹, Márcio G. Zangeronimo^{1*}, et al.

¹ Department of Veterinary Medicine, Federal University of Lavras, Lavras-MG, 37200-900,
Brazil

*Corresponding author: zangeronimo@ufla.br (MG Zangeronimo)

*Artigo formatado de acordo com as normas do periódico Theriogenology
(Versão preliminar)*

ABSTRACT

32

33 The objective of this study was to evaluate the effect of different colors of light during the
34 incubation of eggs on the reproductive parameters of male and female Japanese quails. A total
35 of 1776 eggs were incubated in four lighting conditions, 24 hours a day, during the entire
36 incubation period: white LED, green LED, red LED and dark (control). The experimental
37 design was a randomized block (incubation time) with four treatments of six replicates of two
38 cages each. After hatching, the birds were housed in brood cages with 18 birds each until 35
39 days of age, when they were sexed and transferred to production cages for evaluation of
40 reproductive parameters. After the start of laying, the number of eggs in each cage was recorded
41 daily and the values were used to obtain the age of the females at the first egg and at 80% of
42 laying. At 35 and 60 days of age a couple of birds from each cage were euthanized for
43 anatomical and histological evaluation of the gonads. Until 60 days of age, two females from
44 each cage were weighed every three days to determine the growth curve. After 60 days, eggs
45 from each cage were collected to assess external and internal quality. At 70, 74 and 78 days of
46 age, semen collections were performed to evaluate seminal quality. Then, the males were
47 transferred to cages containing 9 females for the fertility test. The hatchability was higher
48 ($P<0.05$) in eggs incubated in the dark and under the red LED. The age of maximum growth
49 was higher ($P<0.05$) in birds from eggs incubated in the dark and under the white LED. There
50 was no difference ($P>0.05$) in the light colors during incubation on the anatomical and
51 histological characteristics of the testicles, except for the diameter of the seminiferous tubules,
52 which was greater ($P=0.06$) in the dark and in the white LED. There was no effect ($P>0.05$) of
53 the different colors of light in the incubation on the productive index and egg quality of adult
54 birds. There was also no effect ($P>0.05$) on sperm quality, except for sperm motility, which
55 values were higher ($P<0.05$) in birds from eggs incubated in different colors of light. However,
56 this difference was not sufficient ($P>0.05$) to influence the birds' fertility. It is concluded that

57 the incubation of quail eggs under white, red, and green LED lamps, under the studied
58 conditions, does not influence the reproductive characteristics of quails.

59

60 **Keywords:** Artificial lighting; Incubation; Poultry; Reproduction.

61

62 **1. Introduction**

63 Artificial lighting is widely used in poultry because it influences several metabolic and
64 physiological processes of birds, affecting their productive and reproductive performance [1].
65 The main reproductive parameter evaluated in this activity is the production of commercial eggs
66 by females. However, the production of fertile eggs, the main indicator of the productive
67 efficiency of a breeder, also depends on the reproductive capacity of the males, whose emphasis
68 has been relatively low in the current literature.

69 In a quail production system, light is a widely used environmental factor for optimizing
70 egg production [2]. The luminosity is able to stimulate sexual responses directly influencing
71 both the production and the quality of eggs [3]. In addition to the illumination time
72 (photoperiod), the intensity and wavelength, which is perceived by animals in the form of
73 different colors of light, are important [4]. Although several studies show that light is also an
74 important factor for the embryonic development of birds [5-7], in commercial hatcheries the
75 incubation of eggs is done in conditions of complete darkness, with light still being neglected
76 [8]. A probable reason for this is due to the fact that traditionally used lighting sources have
77 deleterious effects on embryos, such as reduced hatchability due to the heating caused by certain
78 types of lamps [9]. However, light emitting diodes (LED) lamps are being increasingly used to
79 replace traditional lighting sources in production systems because they are more energy
80 efficient, provide adequate lighting and do not overheat the environment [10].

81 It is known that the embryos of birds are able to respond to the light stimulus because
82 they have the sensory system composed of the hypothalamus, retina and pineal gland already
83 present in a very early stage of embryonic development [11]. According to Erwin, Boone [12],
84 embryos are able to respond to light from the third day of their development. At this age, the
85 embryo already has a pineal gland sensitive to light [11]. This perception of the light stimulus
86 results in increased neurosecretory activity [13], which can affect both embryonic development
87 [6] and post-hatch development [13]. In fact, several studies have shown the effect of the light
88 stimulus during incubation not only on hatchability [5], but also on the quality of chicks [7],
89 bird behavior [14] and post-hatch performance [15]. However, this effect depends on the
90 lighting program used [7]. There is evidence that not only the photoperiod, but also the
91 beginning of exposure to light during incubation is important to influence several anatomical
92 features after hatching [16].

93 Since photostimulation is related to the activity of the hypothalamic-pituitary axis at an
94 early stage of embryonic development [11], it is possible that light may influence
95 gametogenesis and the beginning of gonadal development. The greater production of steroid
96 hormones by the gonads, such as estrogens and testosterone, is related not only to post-hatch
97 body development, but also to the birds' reproductive capacity [17]. However, there is not
98 enough information to prove the influence of light during incubation on the reproductive
99 efficiency of adult birds. The hypothesis raised in the present study is that different light
100 wavelengths during incubation may influence the initial development of the gonads and,
101 consequently, the reproductive performance of birds. Therefore, the objective was to evaluate
102 the influence of different colors of light during the incubation period of eggs on the reproductive
103 characteristics of adult Japanese quails.

104

105

106 2. Materials and methods

107 2.1. Location, animals, and experimental design

108 The experiment was conducted in the Departments of Veterinary Medicine and Animal
109 Science at the Federal University of Lavras, in Lavras, Minas Gerais, Brazil. The entire
110 experimental procedure was approved by the institution's Animal Use Ethics Committee, under
111 protocol 020/18.

112 A total of 1776 fertile Japanese quail eggs (*Coturnix coturnix japonica*), divided into
113 groups of 296 eggs each, were selected. Dirty, cracked, shell-shaped and irregularly shaped
114 eggs were discarded, as well as very small or very large eggs. Then, the eggs were individually
115 weighed, preheated to 26 °C for eight hours and disinfected with a solution of formaldehyde
116 (37%) and potassium permanganate (99%) at a ratio of 2: 1 [18]. The eggs were then randomly
117 allocated to four automatic incubators (Luna 480, Chocmaster[®], Piraquara, Brazil), with
118 different lighting conditions. Three lighting systems with green, red, and white LEDs (light-
119 emitting diode) were tested, in addition to an incubator kept in the dark (control). The lights
120 were kept on throughout the incubation period [19], at an intensity of 50 lx measured with the
121 aid of a luximeter (SKLD-400, Skill-Tec[®], São Paulo, Brazil). Luminous insulation in all
122 incubators was carried out to avoid interference from external light in the treatments. The eggs
123 were incubated at 37.5 °C and 60% humidity, with automatic rolling [20] every two hours from
124 the second to the 15th day of incubation. The experiment was repeated six times in time. At each
125 repetition, the lighting system was changed between the incubators to avoid the effect of the
126 equipment. The flowchart of the experimental procedure is presented in Figure 1.

127 The eggs that did not hatch remained in the incubators until 20 days after the beginning
128 of the experiment, then they were opened, and the contents used for the determination of the
129 embriodiagnosis. Hatched eggs were counted, and their values used to calculate hatchability
130 (total hatched eggs / total incubated fertile eggs). Shortly after hatching, the birds were

131 individually weighed on precision scales (ATX224, Shimadzu[®], Kyoto, Japan) and taken to the
132 breeding and rearing house. The incubation time (time in hours from the time of incubation
133 until the hatching of the first bird) and the hatch window (time between the first and the last
134 hatching) of each treatment were also determined.

135 After hatching, healthy animals were randomly housed in groups of 18 birds in growth
136 cages (50 cm wide × 70 cm deep × 25.5 cm high) until 35 days of age, when they were sexed.
137 The experimental design was a randomized block (incubation time) with four treatments and
138 six replications of two cages each.

139 Water and feed formulated with corn and soybean meal for each breeding stage [21]
140 were provided *ad libitum* until the end of the experiment. The relative humidity and ambient
141 temperature were recorded daily with the aid of a thermohygrometer (Simpla TH02, Akso[®],
142 São Leopoldo-RS, Brazil), maintaining a temperature of 38 °C in the first three days of creation
143 with the aid of heaters (EW7707, Delonghi[®], Treviso, Italy) and reduced 0.5 °C per day until
144 the 28th day of age of the birds [22]. The luminosity, promoted by white LED, was adjusted
145 through a timer, the luminous regime being 24L: 00E during the first two days of life, 23L: 01E
146 until the 15th day, 14L: 10E until the end of the growth (35 days) and increased by 30 minutes
147 each day until reaching 17L: 07E, which was maintained until the end of the experimental
148 period [23].

149

150 2.2. Female performance

151 The females were housed in groups of nine birds in production cages (32 cm wide ×
152 38 cm deep × 16 cm high) until 90 days of age. From 1 to 60 days of age, six birds of each cage
153 were identified and individually weighted every three days to determine the growth curve. The
154 Gompertz model was used to estimate the weight at maturity for growth (A), growth rate (B)
155 and age of maximum weight gain (M) of the birds [24]. The growth curve was determined for

156 each cage using the software Statistica version 13.3 (Statsoft Inc, Tulsa, USA) according to the
157 following model:

$$158 \quad \text{Live weight} = A \times \exp(-\exp(-B \times (\text{day} - M)))$$

159 where A is the maturity weight, B is the growth rate, and M is the maximum growth age
160 (inflection point of the curve). Each parameter of the Gompertz curve (A , B and M) of each
161 treatment was statistically evaluated.

162 The laying start date for each cage was recorded. After laying, eggs from each cage were
163 counted and weighed daily, and egg mass (g / bird / day) and laying intensity (number of eggs
164 / number of birds / day \times 100) were calculated at 60 days old. In addition to the age at the first
165 egg, the age at which the birds reached 80% of laying was also recorded.

166 At 35 and 60 days of age, one bird in each cage was euthanized by cervical dislocation
167 and dissected to remove the ovary and oviduct, which were weighed on a precision scale of
168 0.0001g (ATX224, Shimadzu[®], Kyoto, Japan). In the ovaries, the pre-ovulatory follicles
169 (yellow) were counted and removed for weighing the ovarian stroma and larger ovarian follicle.
170 The relative weight (%) of the ovary and oviduct was calculated as a function of the live weight
171 (LW) of the birds. The length of the oviduct was measured with the aid of a ruler on a flat
172 surface.

173 For histological analysis, ovaries (without pre-ovulatory follicles) were collected, fixed
174 in Bouin (75% saturated picric acid, 25% 37% formaldehyde and 5% PA acetic acid) for 12
175 hours and transferred to ethyl alcohol 70% until processing [25]. The tissues were dehydrated
176 in batteries with an increasing alcoholic gradient, diaphanized in xylol PA and included in
177 paraffin. From each ovary, two histological sections from 3 to 5 μm thick were obtained. The
178 cuts were processed according to routine histological methods and stained with hematoxylin
179 and eosin [26]. Ovarian follicles were classified as primary and growing [27] and analyzed
180 using a binocular optical microscope (CX31, Olympus Optical from Brazil[®], São Paulo, Brazil).

181 From 62 to 64 days of age of the birds, all fresh whole eggs from each cage were
182 collected, weighed and subsequently immersed in containers containing saline solutions with
183 densities ranging between 1.050 and 1.080 g/cm³ to determine specific gravity [28]. Then, three
184 eggs were selected according to the average egg weight of the plot and identified.

185 The largest and smallest diameter of each egg was evaluated with the aid of a caliper
186 and the values were used to calculate the shape index using the formula: $SI = (\text{egg width} / \text{egg}$
187 $\text{length}) \times 100$ [29]. Then the eggs were gently broken on a flat glass surface. The yolk height
188 and albumen height were also evaluated with the aid of a caliper. Then, the yolk was separated
189 from the albumen and weighed. The shells were washed, dried at room temperature for 72 hours
190 and then weighed and evaluated for thickness at three points in the equatorial region of the egg
191 [29], with the aid of a digital thickness gauge (419 , 0002, Novotest by Dasqua[®], Cornegliano
192 Laudense-LO, Italy) with an accuracy of 0.01 mm. Albumen weight was obtained by the
193 difference between egg weight and yolk and shell weights. The percentage of each component
194 (yolk, albumen and shell) was calculated by the weight of each component in relation to the
195 egg weight $\times 100$ [30].

196 The Haugh unit was calculated from the formula: $HU = 100 \log (H + 7.57 - 1.7 W^{0.37})$,
197 where H = albumen height (mm) e W = egg weight (g) [31].

198

199 2.3. Male performance

200 After sexing, 192 males were transferred to production cages (32 cm wide \times 38 cm deep
201 \times 16 cm high) in groups of four where they remained until 90 days of age. At 35 and 60 days
202 of age, a male from each cage was selected according to the average weight of each parcel,
203 euthanized by the cervical dislocation method, and dissected to collect the testicles. The right
204 and left testicles were weighed, and their dimensions (width, length, and depth) were obtained
205 with the aid of a digital caliper (150mm / MTX, Digimess, São Paulo, Brazil). The

206 gonadosomatic index (GI) was estimated by the equation $GI = [(testicle\ weight/body\ live\ weight)$
207 $\times 100]$ and testicular volume (TV) was calculated using the equation: $TV = 4/3\pi ab^2$, where a
208 \acute{e} is half the largest axis and b is half of the smallest axis of the testis [32].

209 At 70, 74 and 78 days of age, three males from each cage were subjected to three semen
210 collections to assess sperm quality. For this, the birds were kept in individual cages in order to
211 avoid copulation and trained until all selected males were able to ejaculate using the back-
212 abdominal massage method, according to Burrows and Quinn [33] and semen collection was
213 performed at 08 am. Cloacal gland foam was removed and weighed, and then the semen was
214 collected in capillary microhematocrit tubes without heparin graded for volume determination
215 and sperm evaluation. All the analysis was performed by the same trained person, who were
216 blinded about the treatments that the birds belong to increase reliability.

217 Then, the semen was diluted in PBS in the proportion of 1 μ l of semen to 10 μ l of PBS
218 (1:11). Immediately after dilution, a sample was placed between slide and cover slip and sperm
219 motility and intensity of movements were valued, at a magnification of 200 \times under a light
220 microscope (CX31, Olympus, Tokyo, Japan). Sperm motility was expressed as a percentage of
221 cells in motion and the intensity of movements was classified on a scale of 0 to 5, where 0
222 represents minimum intensity and 5 the maximum intensity. Sperm viability was determined in
223 a drop of semen mixed with a drop of the eosin-nigrosine dye [34] placed between slide and
224 cover slip. A total of 200 cells were analyzed at 400 \times magnification for staining. Sperm viability
225 (SV) was obtained by the relationship between the number of live (unstained) sperm cells and
226 dead (stained) cells, by the equation: $SV = (live\ cells / total\ number\ of\ cells) \times 100$.

227 For the evaluation of sperm concentration, 5 μ l of the semen were diluted in 500 μ l of
228 formaldehyde citrate solution (2.9 g of sodium citrate, 4 ml of 37% formaldehyde commercial
229 solution and 100 ml distilled water q.s.p.). A Neubauer chamber was used to count the number
230 of sperm present in five fields under an optical microscope (400 \times). This value was then

231 multiplied by 5, to obtain the number of sperm present in the central area of the chamber, by
232 the degree of final dilution of the sample (1: 111) and by the correction factor (10) to obtain the
233 number of spermatozoa per μl of semen. Another aliquot of this solution was removed to assess
234 sperm morphology, represented by the percentage of abnormal cells that presented defects in
235 the head, intermediate part, or tail. A total of 200 cells were analyzed at $400\times$ magnification.

236 At 78 days of age, males were transferred to growth cages with 9 females, remaining in
237 a 3:1 ratio (female:male) [35]. The eggs from each cage were collected from 88 to 90 days of
238 age. A total of 120 eggs per treatment was selected. The eggs were identified and incubated in
239 standard dark conditions, as previously described. Eggs that did not hatch until 20 days of
240 incubation were broken to assess the presence of the embryo. The fertility rate (%) was obtained
241 from the number of embryonated eggs (which hatched or not hatched) by the total number of
242 incubated eggs [23, 30].

243

244 *2.4. Statistical analysis*

245 The data were subjected to analysis of variance (ANOVA) after the normality test,
246 homoscedasticity of variance and error independence, and the means were compared using the
247 Scott-Knott test at 5%. For variables where normality was not achieved, non-parametric
248 statistical analysis was used, with the means being compared using the Friedman test. All
249 statistical analysis was performed using the ACTION[®] version 3.6 statistical package, with
250 $\alpha=5\%$.

251

252

253

254

255

256 3. Results

257 3.1. Female performance

258 The hatchability of the eggs was greater ($P=0.03$) when the dark or the red LED was
259 used (Table 1). There was no effect of light ($P>0.05$) on hatching weight, incubation time, on
260 the birds' birth window and on the time of embryonic mortality.

261 Birds hatched from eggs incubated under white LED or in the dark had ($P=0.04$) greater
262 interval of maximum growth by the Gompertz curve, however, this result did not influence
263 ($P>0.05$) the weight at growth maturity (inflection point of the curve) or growth rate (Table 2,
264 Figure 2).

265 The different colors of light in the incubation did not influence ($P>0.05$) the age at the
266 first egg and the age at which the birds reached 80% of laying; egg weight and laying intensity
267 at 60 days of age; the weight, shape, and density of the egg; nor the characteristics of the yolk,
268 eggshell, and albumen. There was also no difference ($P>0.05$) in the weight and length of the
269 oviduct, in the weight of the ovary and ovarian stroma and in the total number of follicles
270 evaluated at 35 to 60 days of age (Table 3; Figure 3). There was also no change ($P>0.05$) in the
271 number of birds with pre-ovulatory follicles at 35 days of age.

272 The different colors of light also did not influence ($P>0.05$) the relative weight of the
273 viscera at 35 and 60 days of age, except for the heart weight at 35 days, which was higher
274 ($P<0.05$) in birds from eggs incubated under green and red LED (Table 4).

275

276 3.2. Male performance

277 The anatomical-histological characteristics of the quail's testicles at 35 and 60 days of
278 age were not influenced ($P>0.05$) by the colors of light at incubation, except for the diameter
279 of the seminiferous tubules at 35 days of age, which were larger ($P=0.05$) in birds from eggs
280 incubated in the dark or under white LED (Table 5; Figure 4).

281 The semen characteristics were also not influenced ($P>0.05$) by the colors of light in the
282 incubation, except for sperm motility, which was higher ($P=0.02$) in birds hatched from eggs
283 incubated under white, red, and green LED (Table 6). There was no difference ($P>0.05$) for the
284 other parameters of sperm quality, as well as in the amount of foam produced and the birds'
285 fertility rate. There were also no differences ($P>0.05$) in the gonadosomatic index and testicular
286 volume of quails at any of the ages evaluated (35 and 60 days of age).

287

288 **4. Discussion**

289 Although studies have shown that the neurosecretory activity of the hypothalamic-
290 pituitary-gonadal axis during bird embryogenesis is functional [36, 37], the use of LEDs in
291 different colors, 24 hours a day, at 50 lx during the entire incubation period did not result in
292 significant effects on the reproductive activity of Japanese quails after hatching. Lighting
293 management has been widely used in commercial poultry and broiler farming for many years
294 because it affects growth, productivity rates, reproductive efficiency and even the behavior and
295 welfare of birds [6, 16]. However, few studies have been conducted verifying the effect of light
296 during incubation on the characteristics of birds after hatching.

297 In females, oocytes are found in ovarian follicles, which are formed near the time of
298 hatching [38]. According this author, the reproductive activity of most species of vertebrate
299 animals during and after puberty is dependent on the secretion of substances secreted by the
300 developing follicles. The greater number of active follicles is related to the greater production
301 of steroid hormones which, in turn, are responsible for the growth of the oviduct, which plays
302 an important role in the formation and consequent quality of eggs [38, 39]. Although gonads
303 acquire functionality only after puberty, the initial formation and development of the birds'
304 reproductive axis occurs during the embryonic phase. Thus, any factor related to the incubation
305 environment that can modify the embryonic development could also influence the development

306 of the reproductive axis, the ovarian formation and, consequently, the reproductive efficiency
307 of adult birds.

308 In males, photostimulation is related to the development of the testicles, sexual maturity
309 and maintenance of reproductive function [40, 41]. It occurs because birds are able to perceive
310 the light stimulus through retinal and extraretinal photoreceptors, since light is able to penetrate
311 the skull and directly influence the hypothalamus and also the activity of the pineal gland [13,
312 40]. However, this ability to penetrate light into the developing embryo has received little
313 attention.

314 In quails, in general way, the complete formation of the hypothalamic-pituitary-ovarian
315 axis occurs in the second half of embryonic development [42], when gonads are already formed
316 [43]. However, according these authors, these reproductive organs only become functional
317 between the 10th and the 14th day of incubation, suggesting the participation of the
318 aforementioned axis about their activity. Studies also show that birds are able to respond to the
319 light stimulus from the third day of embryonic development [44]. However, why light in
320 incubation influences embryo development and hatchability are not known. Possibly melatonin
321 is involved in these processes [20]. Studies have shown that the pineal gland synthesizes
322 melatonin rhythmically during development embryonic in both *in vivo* [45] and *in vitro*
323 conditions [46]. Macková, Lamošová [47] verified an increase in pinealocyte activity in the
324 second half of the embryonic development of birds, accompanied by greater synthesis and
325 secretion of melatonin, mainly during darkness, when comparing this system with white
326 fluorescent lighting at an intensity of 200 to 400 lx during incubation. This increase in melatonin
327 can have negative effects on gonadal development at this stage.

328 Light during incubation may also be related to the expression of photoreceptors [48]
329 and, consequently, alteration of hormonal secretion patterns [13]. Assessing broiler chickens in
330 the post-hatch period, studies have shown that light supply during incubation reduced the

331 susceptibility of birds to stress [6, 14] and fear response [8], indicating its effect on animal
332 welfare and behavior. Farghly and Mahrose [5] also observed that chicks hatched after exposure
333 to light appear to be more active than those incubated in total darkness. Also in broilers, the
334 light stimulus during incubation increased weight gain [10, 48] and improved feed conversion
335 and development of the chest muscle [49]. In Japanese quails, exposure to incandescent light
336 between 20 and 25 lx during incubation also increased weight gain and reduced feed conversion
337 up to eight weeks of age, however, during the production phase, it did not affect feed conversion
338 and egg mass produced [5].

339 Considering the light intensity, according to Lewis and Morris [50], if the intensity is
340 higher than 4 lx, it is able to pass through the skull and reach the pineal photoreceptors,
341 suppressing the secretion of serotonin and melatonin. During the incubation phase, Drozdova,
342 Okuliarova [20] observed that 27 lx were sufficient to influence the secretion of melatonin by
343 the chicken embryo. In quails in the breeding phase, 30 lx were sufficient to verify effects on
344 testicular development, sperm quality and plasma testosterone levels [32]. However, in the
345 present study, when using a light intensity of 50 lx during incubation, there were no important
346 effects on testicular development and sperm quality.

347 With regard to the different light colors during incubation, higher levels of melatonin
348 were observed in chicken embryos incubated under red and white light and lower levels under
349 green light [20]. These changes in the levels of melatonin could possibly interfere with GnRH
350 secretion patterns and other reproductive axis hormones related to gonadal development. In this
351 case, adequate photostimulation during this period could be considered a favorable point for
352 gonadal development. However, in the present study, the lighting during incubation did not
353 affect the size of the testicles either at 35 or 60 days after hatching in quails. Although the
354 diameter of the seminiferous tubules at 35 days of age was smaller when the red and green
355 lights were used, the height of the epithelium of these tubules was not affected. This justifies

356 the absence of effects also on the sperm concentration and the volume of the ejaculate. Although
357 light in the breeding phase has influenced the testicular development and sexual maturity of
358 male Japanese quails, Retes, Espósito [51] also did not observe the influence of luminosity on
359 sperm quality. In the present study, only sperm motility was positively influenced by the
360 presence of light in the incubation. In this case, it is possible that light during incubation may
361 be able to affect the development of cells related to the production of seminal plasma, since the
362 composition of this fluid affects sperm motility by mechanisms that are still little known [52].
363 Even though motility was lower in males from eggs incubated in the dark, the average values
364 remained satisfactory (79.6%), which explains the lack of effect on fertility. In males, the
365 reduction in fertility, in general, is related not only to the sperm concentration, but also to the
366 volume of semen produced [53] and to the potential of the sperm to undergo an acrosome
367 reaction.

368 Different wavelengths can affect photoreceptors differently, which may be the
369 mechanism or part of it by which light colors can affect physiology during embryogenesis [48].
370 Short wavelengths, such as green light, seem to be related to the establishment of circadian
371 rhythm in embryos. Compared to incubation in dark conditions, green light reduced incubation
372 time and hatching weight and increased hatchability in broilers [54]. In addition, there is also
373 evidence that this type of light improves feed conversion, weight gain and the development of
374 the chest muscle when compared to the dark and also the lights coming from blue or white LED
375 [10, 13]. According to these authors, this result is probably due to the increase in proliferation
376 and differentiation of satellite cells in embryos. Bai, Cao [13] also observed higher secretion of
377 melatonin, growth hormone and insulin-like growth factors with the green light. In the present
378 study, there was no influence of this type of light on hatching weight, nor changes in growth
379 rate of females assessed by the Gompertz curve or viscera weight at 35 and 60 days of age.

380 On the other hand, the exposure of eggs to longer wavelengths, such as lights from white
381 and red LED lamps, appears to be beneficial to the incubation process. Studies have shown that
382 these lights have improved chick quality [6, 7, 9] and the stress response when compared to
383 green light or incubation in the dark [7]. In the present study, there was also no influence of this
384 type of light on the hatching rates or productive efficiency of the birds, probably due to the low
385 stress condition to which the birds were subjected after hatching.

386 An important factor that can also influence the effect of light on embryonic development
387 is the characteristic of the eggshell. Evidence suggests that the eggshell acts as a filter for
388 specific wavelengths, being able to absorb until 99% of the light to which the egg is exposed
389 [55]. The increase in the concentration of pigments, as well as an increase in the thickness of
390 the shell, is inversely related to the transmission of light through the egg shell [56]. The
391 transmission of light through the shell increases with increasing wavelengths between 250 and
392 700 nm, and the color of light transmitted to the inside of the shell corresponds to the color
393 reflected on the outer surface of the egg, especially for the blue-green region of the light
394 spectrum [56]. Already Archer [7] suggests that light from white LEDs is filtered so that the
395 wavelengths of light are shifted to red, while red and green lights are not filtered or shifted like
396 white light.

397 In quails, Coleman and McNabb [57] evaluated the effect of the eggshell pigmentation
398 on embryonic development and found that embryos in depigmented eggs developed more
399 quickly than pigmented eggs exposed to light. Khalil [58], evaluating the effect of exposure to
400 light from Japanese quail eggs, found better embryonic development, hatchability and post-
401 hatch performance with white fluorescent lamps with high luminous intensity (620-835 lx).
402 Farghly and Mahrose [5] obtained similar results using incandescent lamps at a luminous
403 intensity of 20 lx. However, Farghly, Mahrose [59] found no differences between eggs
404 incubated in dark and light conditions at the same light intensity. Therefore, it is necessary that

405 more studies be carried out evaluating the passage of light through the eggshell with patterns
406 of spots, such as quail eggs, instead of homogeneous pigmentation, as well as different
407 luminous intensities on them.

408

409 **5. Conclusion**

410 The use of white, green, or red LED lights, at an intensity of 50 lx, 24 hours a day
411 throughout the embryonic development period does not influence the reproductive
412 characteristics of Japanese quails.

413

414 **Funding**

415 This work was supported by Brazilian development institutions FAPEMIG (CVZ APQ
416 00996/14), CNPq (PQ 305478 / 2015-0) and CAPES (88881.030399 / 2013-01).

417

418 **Declaration of interest**

419 The authors declare that they have no conflicts of interest.

420

421 **CRediT authorship contribution statement**

422 L.M. Coelho: Project administration, methodology, formal analysis and writing – original draft,
423 review & editing. A.P.A. Leão, LF. Bernardes, V.V. Alves, B.G. Martins and J.V. Peixoto:
424 Methodology and formal analysis. L.J. Pereira: Writing – review & editing. E.J. Fassani and
425 R.R. Alvarenga: Investigation and writing – review & editing. M.G. Zangeronimo: Funding
426 acquisition, conceptualization, methodology, formal analysis, project administration, writing –
427 review & editing.

428

429

430 **References**

- 431 [1] Bobadilla-Mendez M, Rojas-Granados C, Andrade E, Retes P, Ferreira L, Alvarenga R, et
 432 al. Effect of different light sources on reproductive anatomy and physiology of Japanese
 433 quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Anim Reprod Sci.* 2016;168:50-6.
 434
- 435 [2] Elkomy HE, Taha AE, Basha HA, Abo-Samaha MI, Sharaf MM. Growth and reproduction
 436 performance of japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*) under various environ-
 437 ments of light colors. *Sl. Vet. Res.* 2019;56.
 438
- 439 [3] Yadav S, Chaturvedi CM. Interactive effect of light colours and temporal synergism of
 440 circadian neural oscillations in reproductive regulation of Japanese quail. *J Photoch.*
 441 *Photobiol. B: Biology.* 2016;162:65-71.
 442
- 443 [4] Kim MJ, Parvin R, Mushtaq MMH, Hwangbo J, Kim JH, Na JC, et al. Growth performance
 444 and hematological traits of broiler chickens reared under assorted monochromatic light
 445 sources. *Poult Sci.* 2013;92:1461-6.
 446
- 447 [5] Farghly M, Mahrose K. Effects of light during storage and incubation periods on pre and
 448 post hatch performance of Japanese quail. *Egypt J Poult Sci.* 2012;32:947-58.
 449
- 450 [6] Huth J, Archer G. Effects of LED lighting during incubation on layer and broiler
 451 hatchability, chick quality, stress susceptibility and post-hatch growth. *Poult Sci.*
 452 2015;94:3052-8.
 453
- 454 [7] Archer G. Exposing broiler eggs to green, red and white light during incubation. *animal.*
 455 2017;11:1203-9.
 456
- 457 [8] Archer G, Mench J. Natural incubation patterns and the effects of exposing eggs to light at
 458 various times during incubation on post-hatch fear and stress responses in broiler (meat)
 459 chickens. *Appl. Anim Behav. Sci.* 2014;152:44-51.
 460
- 461 [9] Archer G, Jeffrey D, Tucker Z. Effect of the combination of white and red LED lighting
 462 during incubation on layer, broiler, and Pekin duck hatchability. *Poult Sci.* 2017;96:2670-
 463 5.
 464
- 465 [10] Zhang L, Zhu X, Wang X, Li J, Gao F, Zhou G. Green light-emitting diodes light stimuli
 466 during incubation enhances posthatch growth without disrupting normal eye development
 467 of broiler embryos and hatchlings. *Asian-Austral. J. Anim. Sci.* 2016;29:1562.
 468
- 469 [11] Zeman M, Gwinner E, Somogyiova E. Development of melatonin rhythm in the pineal
 470 gland and eyes of chick embryo. *Experientia.* 1992;48:765-8.
 471
- 472 [12] Erwin W, Boone M, Barnett B. Response of the developing embryo to light. *Poult Sci.*
 473 1971;50:1883-4.
 474
- 475 [13] Bai X, Cao J, Dong Y, Wang Z, Chen Y. Melatonin mediates monochromatic green light-
 476 induced satellite cell proliferation and muscle growth in chick embryo. *PloS one.*
 477 2019;14:e0216392.
 478

- 479 [14] Archer G, Mench J. The effects of light stimulation during incubation on indicators of
480 stress susceptibility in broilers. *Poult Sci.* 2013;92:3103-8.
481
- 482 [15] Rozenboim I, Piestun Y, Mobarkey N, Barak M, Hoyzman A, Halevy O. Monochromatic
483 light stimuli during embryogenesis enhance embryo development and posthatch growth.
484 *Poult Sci.* 2004;83:1413-9.
485
- 486 [16] Archer G, Mench J. The effects of the duration and onset of light stimulation during
487 incubation on the behavior, plasma melatonin levels, and productivity of broiler chickens.
488 *J. Anim. Sci.* 2014;92:1753-8.
489
- 490 [17] Elnagar SA, Abd-Elhady AM. Exogenous estradiol: productive and reproductive
491 performance and physiological profile of Japanese quail hens. *Int. J. Poult. Sci.*
492 2009;8:634-41.
493
- 494 [18] Oznurlu Y, Sur E, Ozaydin T, Celik I, Uluisik D. Histological and histochemical
495 evaluations on the effects of high incubation temperature on the embryonic development
496 of tibial growth plate in broiler chickens. *Micr. Res. Tech.* 2016;79:106-10.
497
- 498 [19] Archer G, Shivaprasad H, Mench J. Effect of providing light during incubation on the
499 health, productivity, and behavior of broiler chickens. *Poult Sci.* 2009;88:29-37.
500
- 501 [20] Drozdova A, Okuliarova M, Zeman M. The effect of different wavelengths of light during
502 incubation on the development of rhythmic pineal melatonin biosynthesis in chick
503 embryos. *Animal.* 2019:1-6.
504
- 505 [21] Rostagno H, Albino L, Hannas M, Donzele J, Sakomura N, Perazzo F, et al. Brazilian
506 Tables for Poultry and Swine: Composition of Foods and Nutritional Requirements. UFV,
507 Viçosa; 2017.
508
- 509 [22] Albino LFT, Barreto SLT. Criação de codornas para produção de ovos e carne: Aprenda
510 Fácil; 2003.
511
- 512 [23] Retes PL, das Neves DG, Bernardes LF, de Rezende Lima D, Ribeiro CB, de Castro
513 Gonçalves N, et al. Reproductive characteristics of male and female Japanese quails
514 (*Coturnix coturnix japonica*) fed diets with different levels of crude protein during the
515 growth and production phases. *Liv. Sci.* 2019;223:124-32.
516
- 517 [24] Grieser DdO, Marcato SM, Furlan AC, Zancanela V, Vesco APD, Batista E, et al.
518 Estimation of growth parameters of body weight and body nutrient deposition in males
519 and females of meat-and laying-type quail using the Gompertz model. *Braz J Anim Sci.*
520 2018;47.
521
- 522 [25] Oliveira NNPM, Félix MAR, Pereira TCS, Rocha LGP, Miranda JR, Zangeronimo MG,
523 et al. Sperm Quality and Testicular Histomorphometry of Wistar Rats Supplemented with
524 Extract and Fractions of Fruit of *Tribulus terrestris* L. *Braz Arch Biol Technol.*
525 2015;58:891-7.
526
- 527 [26] Bancroft JD, Floyd AD, Suvarna SK. Bancroft's Theory and Practice of Histological
528 Techniques. 2013.

- 529 [27] Nad P, Massanyi P, Skalicka M, Korenekova B, Cigankova V, Almasiova V. The effect
530 of cadmium in combination with zinc and selenium on ovarian structure in Japanese
531 quails. *J. Environ. Sci. Health Part A*. 2007;42:2017-22.
532
- 533 [28] Pizzolante C, Garcia EA, Saldanha E, Laganá C, Faitarone A, Souza H, et al. Beak
534 trimming methods and their effect on the performance and egg quality of Japanese quails
535 (*Coturnix japonica*) during lay. *Braz. J. Poult. Sci*. 2007;9:17-21.
536
- 537 [29] Das S, Biswas A, Neema R, Maity B. Effect of soybean meal substitution by different
538 concentrations of sunflower meal on egg quality traits of white and coloured dwarf dam
539 lines. *Br Poult Sci*. 2010;51:427-33.
540
- 541 [30] El-Tarabany MS. Effect of thermal stress on fertility and egg quality of Japanese quail. *J.*
542 *Thermal Biol*. 2016;61:38-43.
543
- 544 [31] Haugh R. The Haugh unit for measuring egg quality. *U.S. Egg and Poultr. Mag.*
545 1937;43:522-55.
546
- 547 [32] Yadav S, Chaturvedi C. Light colour and intensity alters reproductive/seasonal responses
548 in Japanese quail. *Physiol. Behav*. 2015;147:163-8.
549
- 550 [33] Burrows W, Quinn J. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey.
551 *Poult Sci*. 1937;16:19-24.
552
- 553 [34] Blom E. A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. *Fertil. Steril.*
554 1950;1:176-7.
555
- 556 [35] Abad M, Castelló JA, Carbajo E, Casanovas P, Dalmau A, García E, et al. Reproducción
557 e incubación en avicultura. *Real Escuela de Avicultura España*. 2003.
558
- 559 [36] Woods J, Thommes R. Ontogeny of hypothalamo-adenohypophyseal-gonadal (HAG)
560 interrelationships in the chick embryo. *J. Exp. Zool*. 1984;232:435-41.
561
- 562 [37] He B, Mi Y, Zhang C. Gonadotropins regulate ovarian germ cell mitosis/meiosis decision
563 in the embryonic chicken. *Mol. Cel. Endocrinol*. 2013;370:32-41.
564
- 565 [38] Johnson A. Reproduction in the female. *Sturkie's avian physiology: Elsevier*; 2015. p.
566 635-65.
567
- 568 [39] Harvey S, Scanes C, Phillips J. Avian Reproduction. In “Fundamentals of Comparative
569 Vertebrate Endocrinology”(I. Chester-Jones, PM Ingleton, and JG Phillips, Eds.).
570 Plenum, New York, NY; 1986.
571
- 572 [40] Baxter M, Joseph N, Osborne V, Bedecarrats G. Red light is necessary to activate the
573 reproductive axis in chickens independently of the retina of the eye. *Poult Sci*.
574 2014;93:1289-97.
575
- 576 [41] Bédécarrats G, McFarlane H, Maddineni S, Ramachandran R. Gonadotropin-inhibitory
577 hormone receptor signaling and its impact on reproduction in chickens. *Gen. Comp.*
578 *Endocrinol*. 2009;163:7-11.

- 579 [42] Bruggeman V, Van As P, Decuypere E. Developmental endocrinology of the reproductive
580 axis in the chicken embryo. *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integrat.*
581 *Physiol.* 2002;131:839-46.
582
- 583 [43] Intarapat S, Satayalai O. Microanatomical study of embryonic gonadal development in
584 Japanese Quail (*Coturnix japonica*). *Anat. Res. Int.* 2014;2014:1-9.
585
- 586 [44] Haldar C, Fukada Y, Araki M. Effects of gonadal steroids on pineal morphogenesis and
587 cell differentiation of the embryonic quail studied under cell culture conditions. *Develop.*
588 *Brain Res.* 2003;145:71-9.
589
- 590 [45] Zeman M, Gwinner E. Ontogeny of the rhythmic melatonin production in a precocial and
591 an altricial bird, the Japanese quail and the European starling. *J. Comp. Physiol. A.*
592 1993;172:333-8.
593
- 594 [46] Lamošová D, Zeman M, Mackova M, Gwinner E. Development of rhythmic melatonin
595 synthesis in cultured pineal glands and pineal cells isolated from chick embryo.
596 *Experientia.* 1995;51:970-5.
597
- 598 [47] Macková M, Lamošová D, Zeman M. Regulation of rhythmic melatonin production in
599 pineal cells of chick embryo by cyclic AMP. *Cel. Mol. Life Sci. CMLS.* 1998;54:461-6.
600
- 601 [48] Rozenboim I, El Halawani M, Kashash Y, Piestun Y, Halevy O. The effect of
602 monochromatic photostimulation on growth and development of broiler birds. *Gen.*
603 *Comp. Endocrinol.* 2013;190:214-9.
604
- 605 [49] Zhang L, Zhang H, Qiao X, Yue H, Wu S, Yao J, et al. Effect of monochromatic light
606 stimuli during embryogenesis on muscular growth, chemical composition, and meat
607 quality of breast muscle in male broilers. *Poult. Sci.* 2012;91:1026-31.
608
- 609 [50] Lewis P, Morris T. *Poultry lighting: the theory and practice*: Northcot; 2006.
610
- 611 [51] Retes P, Espósito M, das Neves D, Viana A, Coelho L, Bobadilla-Mendez M, et al.
612 Influence of different types of lamps on the reproductive development of male Japanese
613 quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Theriogenology.* 2017;94:59-63.
614
- 615 [52] Vizcarra J, Alan R, Kirby J. *Reproduction in male birds. Sturkie's avian physiology*:
616 Elsevier; 2015. p. 667-93.
617
- 618 [53] Lake P. Recent progress in poultry reproduction. *W. Poult. Sci. J.* 1989;45:53-9.
619
- 620 [54] Shafey T, Al-Mohsen T. Embryonic growth, hatching time and hatchability performance
621 of meat breeder eggs incubated under continuous green light. *Asian-Austral. J. Anim Sci.*
622 2002;15:1702-7.
623
- 624 [55] Shafey T, Ghannam M, Al-Batshan H, Al-Ayed M. Effect of pigment intensity and region
625 of eggshell on the spectral transmission of light that passes the eggshell of chickens. *Int.*
626 *J. Poult. Sci.* 2004;3:228-33.
627

- 628 [56] Maurer G, Portugal S, Hauber M, Mikšik I, Russell D, Cassey P. First light for avian
629 embryos: eggshell thickness and pigmentation mediate variation in development and UV
630 exposure in wild bird eggs. *Funct. Ecol.* 2015;29:209-18.
631
- 632 [57] Coleman MA, McNabb RA. Photoacceleration of embryonic development in depigmented
633 Japanese quail eggs. *Poult Sci.* 1975;54:1849-55.
634
- 635 [58] Khalil HA. Productive and physiological responses of japanese quail embryos to light
636 regime during incubation period. *Sl. J. Anim. Sci.* 2009;42:79-86.
637
- 638 [59] Farghly M, Mahrose K, Abou-Kassem D. Pre and post hatch performance of different
639 japanese quail egg colors incubated under photostimulation. 2015.

640 Table 1. Hatching characteristics and embriodiagnosis of Japanese quail eggs incubated under
 641 different colors of light.

Variable	Light in the incubation				SE	P =
	Dark	White LED	Green LED	Red LED		
Hatchability (%) ¹	82.6 a	78.5 b	80.3 b	84.8 a	1.34	0.03
Hatched eggs (%) ²	72.68	76.98	77.17	73.43	-	0.12*
Non-fertile eggs (%)	7.85	7.51	6.12	6.99	-	0.99*
Incubation time (h)	391	400	404	403	5.07	0.35
Birth window (h)	32.6	33.1	29.5	27.1	4.48	0.77
Weight of birds at hatching (g)	7.80	7.68	7.92	7.88	0.08	0.20
Embryonic death						
Until 6 days (%)	4.47	3.45	5.58	5.37	-	0.29*
Until 12 days (%)	0.42	1.56	0.98	1.58	-	0.95*
Until 18 days (%)	14.58	10.48	10.17	12.63	-	0.22*

642 SE: Standard error.

643 ¹ Number of hatched eggs/number of fertile eggs.

644 ² Number of hatched eggs/number of total eggs.

645 ^{a,b} Averages followed by different letters differ by the Scott-Knott test (P<0.05).

646 *Not significant to the Friedman test (P>0.05).

647

648 Table 2. Productive characteristics of female Japanese quails hatched from eggs incubated

649

under different colors of light.

Variable	Light in the incubation				SE	P =
	Dark	White LED	Green LED	Red LED		
Growth characteristics (Gompertz)						
Weight to maturity (g)	188.0	183.0	175.0	177.0	4.50	0.27
Growth rate	0.063	0.065	0.071	0.067	0.003	0.42
Maximum growth age (days)	20.1a	20.2a	17.5b	18.9b	0.55	0.04
Age at first egg (d)	42.7	42.9	42.2	42.7	0.63	0.84
Age at 80% laying (d)	50.4	49.9	49.9	49.4	1.40	0.96
Laying intensity at 60 d of age (%)	93.1	89.4	91.5	95.3	-	0.51*
Egg weight at 60 d of age (g)	10.6	10.8	10.6	10.5	0.18	0.71
Shape index	79.8	78.4	92.6	78.6	6.78	0.42
Yolk (%)	28.4	27.8	28.4	28.0	0.31	0.43
Shell (%)	8.12	8.00	8.11	8.10	0.13	0.90
Albumen (%)	63.5	64.2	63.5	63.9	0.36	0.42
Albumen height (mm)	4.34	4.81	4.86	4.62	0.14	0.10
Yolk height (mm)	11.2	11.1	11.2	11.1	0.09	0.69
Shell thickness (mm)	0.26	0.24	0.24	0.25	<0.01	0.12
Haugh unit	89.3	91.5	92.0	90.9	0.66	0.08
Egg density (g/cm ³)	1.066	1.067	1.067	1.066	<0.01	0.41

650

SE: Standard error.

651

^{a,b} Averages followed by different letters differ by the Scott-Knott test (P<0.05).

652

* Not significant to Friedman test (P>0.05).

653 Table 3. Ovary and oviduct characteristics of Japanese quail hatched from eggs incubated under different colors of light.

654

Variable	Light in the incubation				SE	P =
	Dark	White LED	Green LED	Red LED		
<i>- 35 days -</i>						
Bird weight (g)	117.0	116.2	115.6	116.2	2.66	0.97
Number of birds with preovulatory follicle (%)	20	11	20	20	-	-
Ovary weight (%)	0.63	0.11	0.20	0.51	1.08*	0.10
Oviduct weight (%)	0.74	0.15	0.84	0.86	0.56*	0.10
Oviduct length (mm)	97.45	91.71	102.54	94.75	0.01*	0.87
Number of primary follicles ¹	111.50	74.90	91.20	92.25	-	0.46
Number of growing follicles ¹	6.80	11.50	7.90	8.00	-	0.88
Number of pre-ovulatory follicles ¹	1.10	0.10	0.50	0.58	-	0.67
<i>- 60 days -</i>						
Bird weight (g)	159.2	156.0	157.6	159.7	2.44	0.47
Weight of the largest follicle (g)	2.76	2.55	2.80	2.80	0.03*	0.09
Ovarian stromal weight (%)	0.35	0.51	0.36	0.36	0.35	0.15
Ovary weight (%)	3.82	3.80	4.31	4.10	0.15	0.53
Oviduct weight (%)	4.15	4.23	4.42	4.19	0.21	0.61
Oviduct length (mm)	313	342	328	343	18.16	0.37
Number of primary follicles	100.3	129.0	107.5	89.0	-	0.29**
Number of growing follicles	15.00	10.88	8.70	15.80	-	0.10**
Number of pre-ovulatory follicles	5.00	4.80	5.25	4.75	-	0.79**

655 SE: Standard error.

656 * Transformed variable (transformation option: Box Cox).

657 ** Not significant to the Friedman test (P<0.05).

658 Table 4. Visceras characteristics of female Japanese quail hatched from eggs incubated under
 659 different colors of light

Variable	Light in the incubation				SE	P =
	Dark	White LED	Green LED	Red LED		
<i>- 35 days -</i>						
Bird weight (g)	117.0	116.2	115.6	116.2	2.66	0.97
Liver (%)	2.32	2.30	2.45	2.27	0.05*	0.75
Gizzard (%)	2.81	2.86	2.93	2.86	0.17	0.93
Heart (%)	0.83 b	0.89 b	0.98 a	0.98 a	0.05	0.02
Duodenum (%)	0.87	0.80	0.90	0.73	0.07	0.08
Jejunum / ileum (%)	1.71	1.57	1.70	1.48	0.09	0.07
Large intestine (%)	0.70	0.77	0.94	0.81	0.06*	0.12
<i>- 60 days -</i>						
Bird weight (g)	159.2	156.0	157.6	159.7	2.44	0.47
Liver (%)	3.19	2.88	2.81	2.91	0.20	0.31
Gizzard (%)	2.22	2.25	2.17	2.29	0.12	0.78
Heart (%)	0.75	0.85	0.79	0.78	0.04	0.17
Duodenum (%)	0.92	0.89	0.90	0.81	0.07	0.51
Jejunum / ileum (%)	1.79	1.65	1.97	1.75	0.05	0.15
Large intestine (%)	0.89	0.93	0.96	0.96	0.07	0.71

660 SE: Standard error.

661 * Transformed variable (transformation option: Box Cox).

662 Table 5. Testicles characteristics of Japanese quails hatched from eggs incubated under
 663 different colors of light

Variable	Light color in the incubation				SE	P =
	Dark	White LED	Red LED	Green LED		
<i>- 35 days -</i>						
Bird weight (g)	112.0	112.6	112.8	108.3	1.87	0.32
Gonadosomatic index	1.11	0.90	0.76	0.73	-	0.55*
Right testicle volume (cm^3)	0.51	0.40	0.34	0.34	-	0.39*
Left testicle volume (cm^3)	0.51	0.49	0.43	0.54	-	0.87*
Tubules diameter (μm)	80.5a	73.7a	63.1b	64.1b	4.63	0.05
Epithelial height (μm)	24.8	25.0	21.1	21.1	1.58	0.18
% Interstitial compartment	9.44	8.92	8.77	8.32	0.72	0.78
% Tubular lumen	16.1	13.9	11.7	14.0	2.51	0.71
% Germinal epithelium	74.5	77.2	79.5	77.7	2.46	0.59
<i>- 60 days -</i>						
Bird weight (g)	134.6	130.4	134.7	131.2	1.89	0.30
Gonadosomatic index	4.11	4.47	4.00	4.08	0.22	0.55
Right testicle volume (cm^3)	1.59	1.90	1.68	1.64	0.16	0.61
Left testicle volume (cm^3)	1.74	2.22	1.75	2.05	0.05	0.42
Tubules diameter (μm)	133.4	132.1	133.5	134.0	2.78	0.97
Epithelial height (μm)	35.9	36.0	36.6	37.0	0.87	0.84
% Interstitial compartment	5.89	5.44	5.92	5.36	0.52	0.82
% Tubular lumen	33.3	29.4	32.4	32.3	1.74	0.52
% Germinal epithelium	60.9	65.1	61.7	62.3	1.84	0.48

664 SE: Standard error.

665 ^{a,b} Means followed by different letters differ by the Scott-Knott test ($P < 0.05$).

666 * Not significant to the Friedman test ($P > 0.05$).

667 Table 6. Seminal characteristics of Japanese quail hatched from eggs incubated under different
 668 colors of light

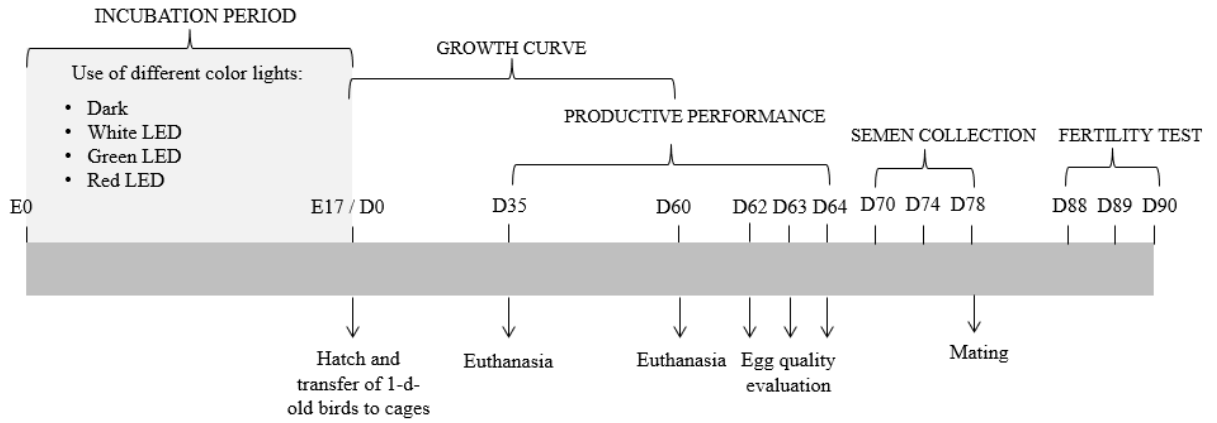
Variable	Light color in the incubation				SE	P =
	Dark	White LED	Red LED	Green LED		
Semen volume (mL)	1.57	1.70	1.71	1.53	0.16	0.81
Sperm motility (%)	79.6b	86.0a	83.4a	86.9a	1.42	0.02
Intensity of movement	3.93	4.21	4.69	4.30	-	0.21*
Sperm concentration ($\times 10^6$ sptz/ μ l)	1.88	1.99	2.25	2.08	-	0.50*
Sperm viability (%)	95.7	95.2	95.5	95.6	0.25	0.64
Abnormal sperm cells (%)	5.68	5.93	5.59	5.39	-	0.91*
Amount of foam (g)	0.022	0.027	0.020	0.026	-	0.17*
Fertility rate (%)	99.0	98.9	96.5	98.3	1.42	0.61

669 SE: Standard error.

670 ^{a,b} Means followed by different letters differ by the Scott-Knott test ($P < 0.05$).

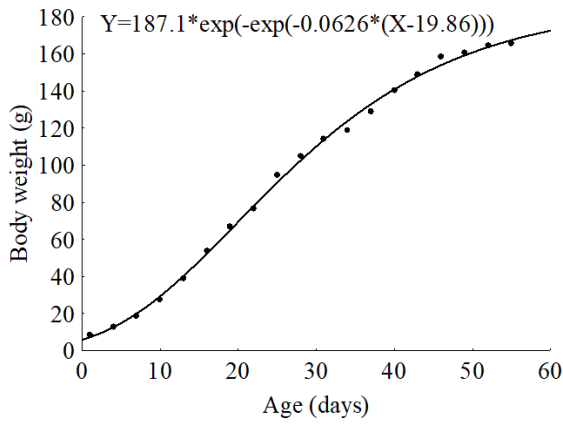
671 * Not significant to the Kruskal-Wallis test ($P > 0.05$).

672 Figure 1. Timeline of experimental period and sample collection

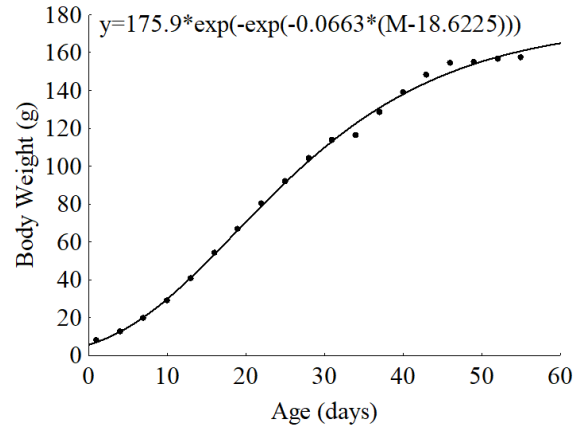


673

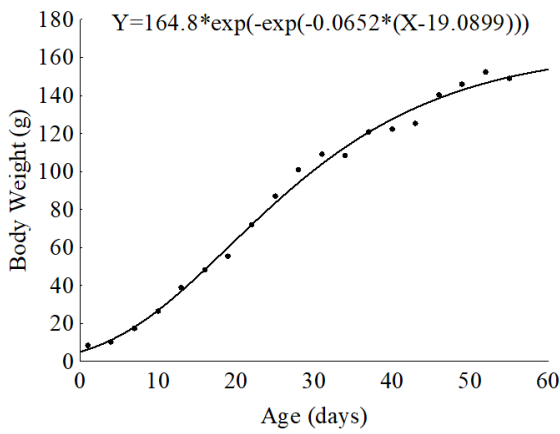
674 Figure 2. Growth curve of female Japanese quails from eggs incubated under different colors
675 of light.



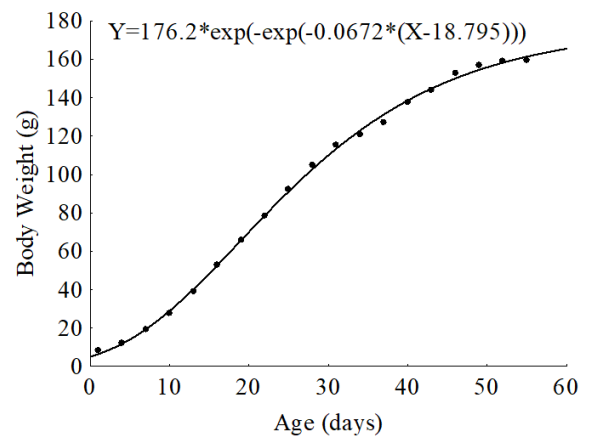
Dark



White LED



Green LED

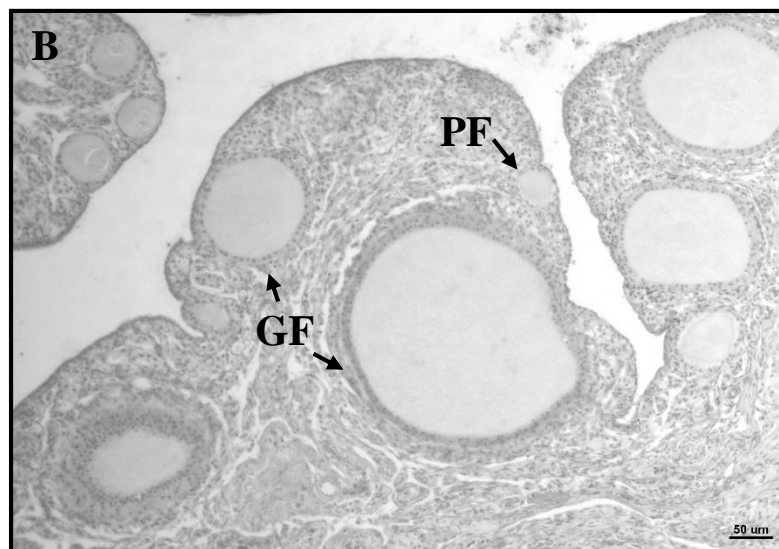
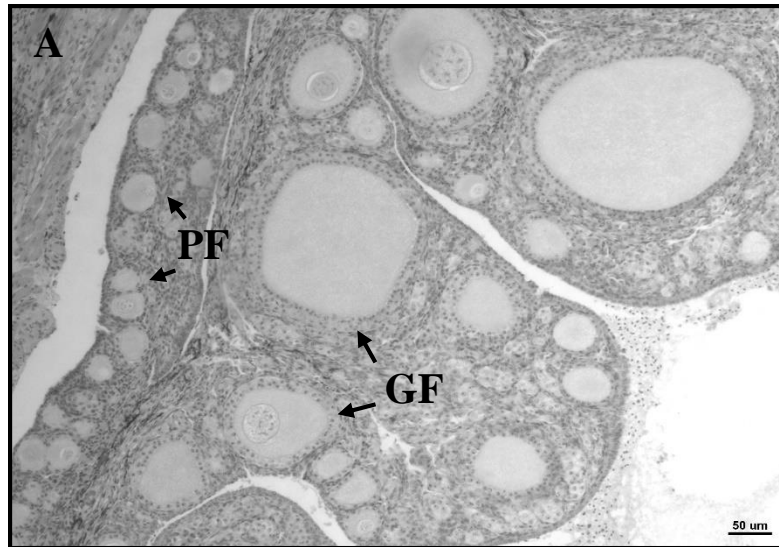


Red LED

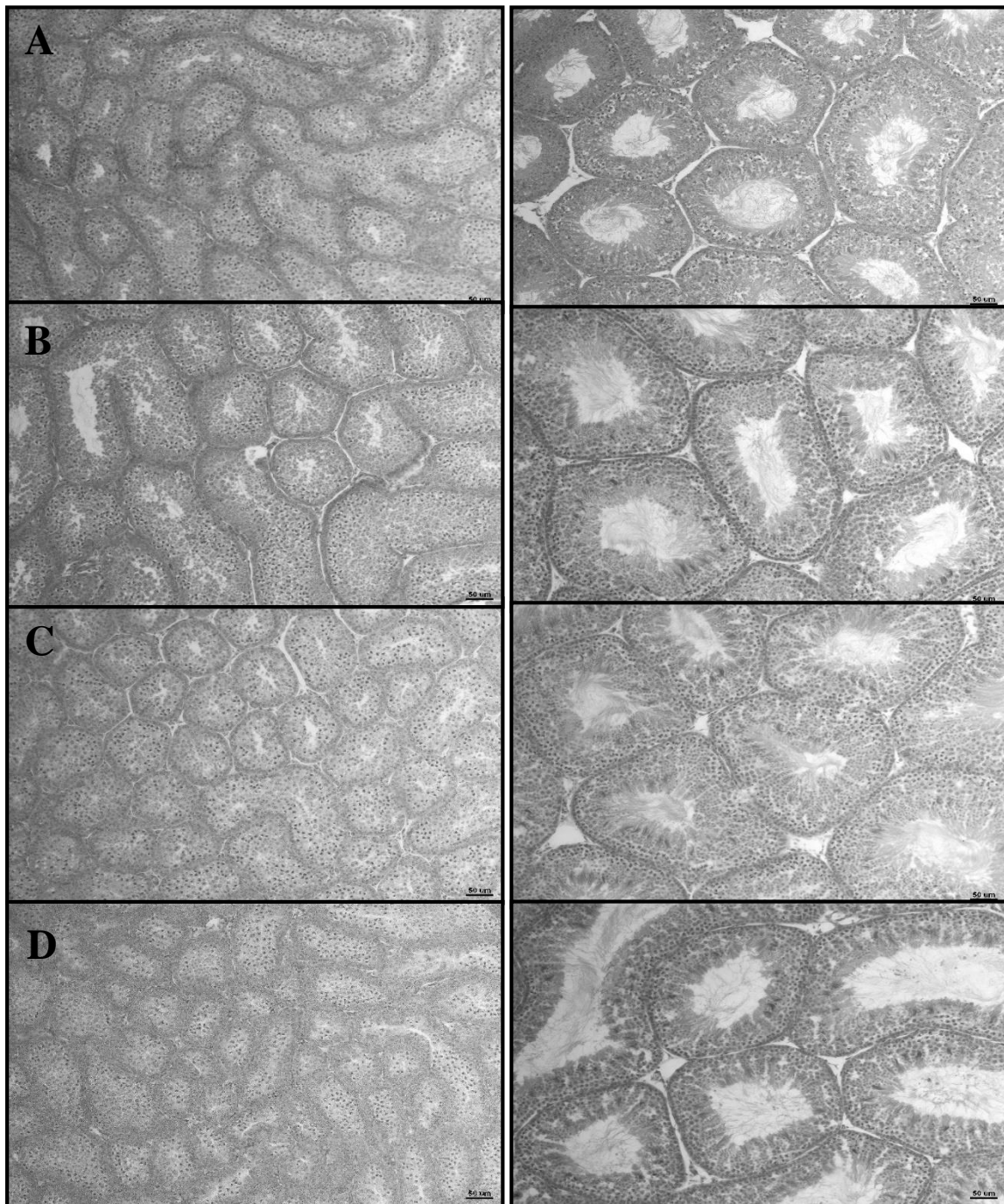
676

677 Figure 3. Optical microscopy of quail ovary at 35-d-old (A) and 60-d-old (B), kept in dark
678 conditions during embryonic development. The number of primary (PF) and growing
679 follicles (GF) were not influenced ($P>0.05$) by the white, red, and green LED
680 exposition during egg incubation.

681



682 Figure 4. Seminiferous tubules of quails at 35-d-old (left) and 60-d-old (right) exposed to
683 different light colors during embryonic development. (A) dark control (B) white LED
684 (C) red LED and (D) green LED. The diameter of the seminiferous tubules at 35-d-
685 old were larger ($P=0.05$) in birds from eggs incubated in the dark or under white
686 LED.



687

ANEXO

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Cx.P.3037 - Lavras – MG – 37200-000 – (35) 3829-5182 cba@nintec.ufla.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Influência de diferentes cores de luz e temperaturas de incubação dos ovos sobre as características reprodutivas de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*)", protocolo nº 020/18, sob a responsabilidade de Márcio Gilberto Zangeronimo, Juliano Vogas Peixoto, Pâmela Lacombe Retes, Renata Ribeiro Alvarenga e Danusa Gebin das Neves, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de ensino e/ou pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas edificadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Pró-Reitoria de Pesquisa/UFLA, em reunião de 03/05/2018.

Vigência da autorização: de 03/05/2018 a 30/04/2020

Finalidade: () Ensino (x) Pesquisa Científica

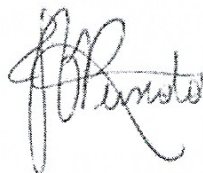
Espécie/linhagem/raça: Codorna japonesa / *Coturnix coturnix japonica*

Número de animais aprovados: 1710

Peso/Idade: 11g / ovos férteis

Sexo: macho e fêmea

Origem dos animais (documento apresentado pelo pesquisador responsável e arquivado pela CEUA): Aproveitamento de ovos produzidos pelas aves criadas para o experimento do projeto aprovado pela CEUA (prot. 057/17).



Prof. Juliano Vogas Peixoto
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA