



Sexaje in ovo con Imágenes Hiperespectrales (HSI): Un método no destructivo y no invasivo

In ovo sexing with Hyperspectral Imaging (HSI): A nondestructive and non-invasive method

Juan Ernesto Hernandez-Valdez¹; Daniel Castro-Salinas^{1, *}; Cesar Eduardo Honorio-Javes¹; Fredy Marcial Pajuelo-Risco²

¹ Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Trujillo. Av. Juan Pablo II s/n – Ciudad Universitaria, Trujillo, Perú.

² Instituto de Educación Superior Tecnológico Público Daniel Villar, Jr. Sucre N° 124 Caraz, Huaylas, Perú.

ORCID de los autores

J. E. Hernandez-Valdez: <https://orcid.org/0009-0000-0885-5458>

D. Castro-Salinas: <https://orcid.org/0000-0002-5949-9104>

C. E. Honorio-Javes: <https://orcid.org/0000-0002-8917-7085>

F. M. Pajuelo-Risco: <https://orcid.org/0000-0003-4135-6049>

RESUMEN

La avicultura a nivel mundial presenta un gran desarrollo; sin embargo, una de las grandes limitaciones es la determinación del sexo del embrión in ovo, debido a que en las granjas las aves son criadas con dos propósitos, producción de huevos o producción de carne, por lo que existe una preferencia de sexos. En la línea de producción de huevo comercial se prefieren a las hembras y los machos recién nacidos se descartan, siendo sacrificados millones de pollitos a nivel mundial, generando grandes pérdidas económicas; además representa un serio problema ético y de bienestar animal, es por ello países como Francia y Alemania han decretado nuevas normativas que regulen y prohíban el sacrificio de pollitos machos. Se han propuesto múltiples técnicas ópticas y no ópticas para el sexaje in ovo, pero aún no se ha logrado desarrollar a nivel industrial y comercial. De todas las técnicas disponibles, las imágenes hiperespectrales HSI se muestra como una técnica no invasiva y no destructiva viable para el sexaje in ovo, debido a que proporciona amplia información espectral de un huevo. En este contexto, se discuten los avances y enfoques de HSI respecto a su uso potencial en el sexaje in ovo. Las HSI han demostrado precisión considerable en el sexaje, sin embargo, presenta limitaciones como la complejidad en el procesamiento de datos y el tiempo de desarrollo embrionario.

Palabras clave: Avicultura; sexado in ovo; imágenes hiperespectrales; no invasivo; espectroscopía.

ABSTRACT

Poultry farming worldwide presents great development; however, one of the great limitations is the determination of the sex of the embryo in ovo, because on farms birds are raised for two purposes, egg production or meat production, so there is a sex preference. In the commercial egg production line, females are preferred, and newborn males are discarded, millions of chicks being sacrificed worldwide, generating great economic losses; it also represents a serious ethical and animal welfare problem, which is why countries like France and Germany have decreed new regulations that regulate and prohibit the slaughter of male chicks. Multiple optical and non-optical techniques have been proposed for in ovo sexing, but they have not yet been developed at an industrial and commercial level. Of all the available techniques, hyperspectral HSI imaging is shown to be a viable non-invasive and non-destructive technique for in ovo sexing, because it provides extensive spectral information about an egg. In this context, the advances, and approaches of HSI with respect to its potential use in in ovo sexing are discussed. HSIs have demonstrated considerable precision in sexing, however, they present limitations such as complexity in data processing and embryonic development time.

Keywords: Poultry; in ovo sexing; hyperspectral imaging; non-invasive; spectroscopy.

1. Introducción

El sector avícola sigue creciendo e industrializándose en muchas partes del mundo (Calle-Velásquez et al., 2017; Sporchia et al., 2023), esto se debe al incremento de la demanda de proteína de origen animal como la carne y el huevo (Bruijnjs et al., 2015; Schwean-Lardner, 2017), el huevo es una unidad biológica fundamental por su alto valor nutricional y accesibilidad para la alimentación del ser humano (Madrigal-Portilla et al., 2023), especialmente de aquellos sectores de bajos recursos económicos (Corion et al., 2023). Esto conlleva un gran desarrollo tecnológico en este sector; partiendo de las instalaciones, mejoramiento genético, alimentación, nutrición, sanidad “vacunación in ovo” e incubación (Weissmann et al., 2013).

Las aves de granja son criados con dos propósitos, producción de huevos o producción de carne, donde existe una preferencia de sexos (Bayer et al., 2023); en la producción de pollos de engorde se prefieren machos debido a su mayor precocidad y mejores parámetros productivos que las hembras (Steiner et al., 2011), por el contrario en las gallinas de postura comercial se prefieren a las hembras debido a los machos no son viables para producción de huevos ni para carne (Alin et al., 2019; Preuße et al., 2023).

Los pollitos que nacen con el sexo no deseado son sacrificados dentro de las 72 horas posteriores a su nacimiento mediante trituración o

exposición al gas (Aleynikov & Osipenko, 2023; Kaleta & Redmann, 2008), y son utilizados con otros fines, por ejemplo, como alimento de otras especies (Göhler et al., 2017; Gremmen et al., 2018). Se estima que anualmente a nivel mundial se sacrifican aproximadamente siete mil millones de pollitos machos recién nacidos, especialmente en el sector de producción de huevo comercial (Alin et al., 2019; Krautwald-Junghanns et al., 2018; Rutt & Jakobsen, 2022). Esto no solo genera grandes pérdidas económicas, sino que es uno de los grandes problemas éticos y de bienestar animal (Fragoso et al., 2023; Galli et al., 2017; Souza et al., 2015). Por tal motivo, países como Francia, Alemania, e Italia están incorporando normativas que regulen este problema. En Alemania por ley desde el 2022 se prohíbe el sacrificio de pollitos, especificando que el sacrificio de embriones de pollo puede realizarse en un estado temprano, pero no mayor del día 7 de incubación (Bundestag, 2021).

La solución más lógica, pero compleja, es el sexado in ovo, que consiste en la utilización de diferentes métodos para la determinación del sexo del embrión antes de su eclosión (Reithmayer et al., 2020). En este contexto, se reconoce el esfuerzo de la comunidad científica que lidera importantes investigaciones para solucionar este problema, lo cual se refleja en las múltiples investigaciones y patentes publicadas a lo largo de los años (Figura 1).

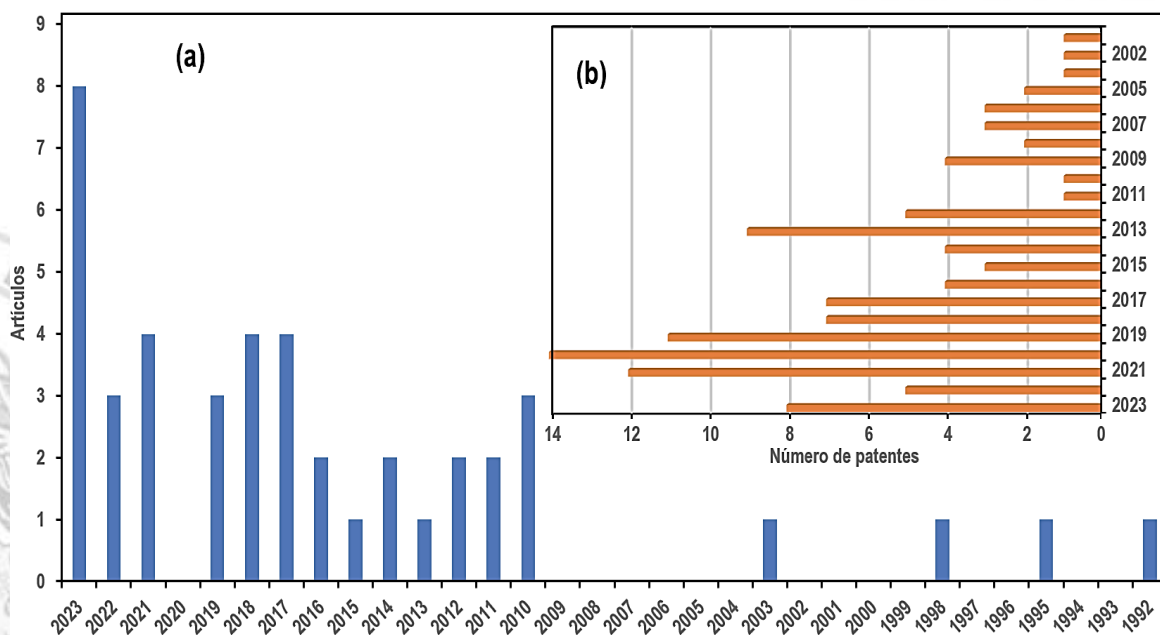


Figura 1. (a) Crecimiento acumulado de publicación de artículos científicos. (b) Patentes sobre sexaje in ovo hasta el 2023; datos obtenidos de la base de datos Scopus y base de datos de patentes PATSTAT, en total se registraron 47 artículos científicos y 108 patentes.

Múltiples investigaciones proponen diferentes técnicas y tecnologías, sin embargo, aún no se desarrollan a nivel industrial (Corion et al., 2023). Se dividen en 2 grupos complejos; métodos de sexado in ovo no ópticos que está constituido por: Análisis de ADN (Bozkaya et al., 2013; Clinton et al., 2016; He et al., 2019), inmunodetección (Qasimi et al., 2018; Tanabe et al., 1979), compuestos orgánicos volátiles (Costanzo et al., 2016; Webster et al., 2015), ingeniería genética, edición y modificación genética (Ellegren, 2009), espectrometría de movilidad iónica y espectrometría de masas (Arce et al., 2015).

Por la otra parte se encuentran los métodos de sexado in ovo ópticos que incluye a: Espectroscopía Raman y de fluorescencia (Galli et al., 2018), espectroscopía de infrarrojos y terahercios (Steiner et al., 2011), espectroscopía del infrarrojo cercano visible (VIS-NIR) (Ketelaere et al., 2004), espectroscopía de resonancia magnética nuclear y de radiofrecuencia (Steiner et al., 2010), estudios morfométricos (Kayadan & Uzun, 2023; Rutkowska et al., 2014), minería de datos, SPME/GC-MS acoplado con quimiometría, marcadores individuales e imágenes hiperespectrales (Doran et al., 2018; Khwatenge & Nahashon, 2021).

Si embargo, para lograr una aplicación eficaz de estos métodos y lograr una aceptación por la industria y la sociedad, estos deben tener ciertas características como, tener una alta precisión (superiores al 98,5%), identificación de sexo temprano (antes de los 7 días de incubación o antes de la aparición de dolor del embrión), alto rendimiento (procesar más huevos en menor tiempo), no ser invasiva, ser barata, tener la facilidad de trabajar con cualquier tipo de huevo (color, tamaño y especie) (Brujnis et al., 2015). De todas estas técnicas propuesta y disponibles, aún no se han desarrollado a nivel industrial y comercial (Gautron et al., 2021).

Las imágenes hiperespectrales HSI es una técnica no invasiva y no destructiva viable para el sexaje in ovo debido a su riqueza de información única como características geométricas, físicas, composición química, mediante el análisis espectral del huevo se podría identificar el sexo del embrión. Este estudio tiene como objetivo seleccionar los estudios más importantes sobre la aplicación de imágenes hiperespectrales (HSI) en el sexado in ovo de embriones de pollo, partiendo en los fundamentos de esta tecnología, luego detallando su aplicación como método no invasivo

en el sexado in ovo y finalmente evaluar las tendencias de las investigaciones de sexaje in ovo a lo largo de los años.

2. Fundamentos de Imágenes hiperespectrales

La técnica de imágenes hiperespectrales (HSI) también conocida como espectrometría de imágenes o imágenes espectroscópicas; consiste en la adquisición de datos en bandas estrechas de longitud de onda (Amigo et al., 2015; Lodhi et al., 2019), brindando las características geométricas, físicas, composición química mediante el análisis espectral de una muestra (Kamruzzaman & Sun, 2016), el término "Hiper" hace referencia a la cantidad de bandas de longitud de onda adquiridas al momento de la toma de las imágenes (Cozzolino et al., 2023), es así que existen 4 técnicas de imágenes espectrales, las imágenes multiespectrales, superespectrales, ultraespectrales y hiperespectrales, cada una se diferencia por su número de bandas espectrales, la resolución espectral y el perfil del espectro, (Lodhi et al., 2019; Yokoya et al., 2016, 2017).

En términos generales, cuando menor sea el ancho de cada banda, mucho mejor será la resolución espectral, debido a que los espectros de reflectancia son más continuos (Lodhi et al., 2019; Siche et al., 2016) (Tabla 1), las imágenes ultraespectrales tienen una resolución de espectro más fina en comparación con el resto, también las imágenes hiperespectrales proporciona cientos de bandas espectrales contiguas, mientras que las multiespectrales proporcionan menor a diez bandas espectrales (Khan et al., 2018).

Una imagen hiperespectral está constituido por datos tridimensionales (3D) dos dimensiones espaciales (X e Y) y una dimensión espectral (λ) es decir la longitud de onda, a todo esto, se le conoce como hiper cubo, esto se muestra en la cada longitud de onda o espectro (X, Y, λ) en cada posición espacial, lo que los elementos de imagen de los datos hiperespectrales se le conoce como "vóxel", mientras que para una imagen bidimensional se le conoce como "píxel". Como muestra la Figura 2, los valores de absorbancia y reflectancia será distinto de la onda de luz reflejada por la muestra, esto se debe a la diferencia de la estructura física y la composición química de la muestra, entonces al muestreo de reflectancia o absorbancia con respecto a la longitud se le conoce como huella digital espectral (Kamruzzaman & Sun, 2016; Lodhi et al., 2019).

Tabla 1

Tipos de imágenes espectrales

	Multiespectral	Superespectral	Hiperespectral	Ultraespectral
Resolución espectral ($\Delta\lambda$)	≈ 1000	≈ 50	≈ 10	≈ 1
Número de bandas espectrales	1 -10	10 - 100	100 - 1000	>1000

Nota: Adaptado de Masary & Sun (2010) y Siche et al. (2016).

La firma espectral o espectro de huella digital, es la curva resultante de la reflectancia (energía electromagnética que rebota) frente a la longitud de onda de una muestra (Kamruzzaman & Sun, 2016), los componentes de la muestra independientemente tienen su propia firma espectral el cual puede ser utilizado para identificar su composición química, estructura física o cualquier otro componente de la muestra (Siche et al., 2016; Wang et al., 2023). Es así como las HSI se vienen utilizando en diferentes áreas como la producción farmacéutica (Masary & Sun, 2010; Lodhi et al., 2019), evaluación de calidad de los alimentos y calidad de agua (Zhang et al., 2023), bioquímica y biomedicina (Carrasco et al., 2003), medicina forense (Kuula et al., 2012), agricultura de precisión (Ferrari et al., 2023), conservación de arte y arqueología (Liang, 2012), mapeo mineralógico de la superficie terrestre, etc. (Wang et al., 2023; Zhang et al., 2019).

3. Procesamiento de datos

Los datos hiperespectrales debido a su riqueza de información única como características geométricas, físicas, composición química y la distribución espacial de las muestras por lo general son grandes y difíciles de procesar (Cozzolino et al., 2023), es así como las

imágenes adquiridas antes de ser aplicadas pasan por un procesamiento (Plaza et al., 2009), por lo que la exactitud y la confiabilidad de los resultados dependerá de la técnica aplicada en el procesamiento (Kamruzzaman & Sun, 2016; Wang et al., 2023), de esta manera se da una mayor solidez para su posterior análisis exploratorio, la calibración y desarrollo del modelo (Cozzolino et al., 2023; Saha & Manickavasagan, 2021).

4. Preprocesamiento espectral

El preprocesamiento o pretratamiento de datos espectrales consiste en eliminar o disminuir diferentes interferencias como ruido o iluminación desigual que fueron captados durante la obtención de los datos (Amigo et al., 2015; Ferrari et al., 2023). Existen varias técnicas, entre ellas están, la variación normal estándar (SNV), el suavizado, derivadas (Savitzky Golay), corrección de dispersión multiplicativa (MSC) y normalización (Kamruzzaman & Sun, 2016; Saha y Manickavasagan, 2021; Stefan, 2010), mejorando la resolución, corrección geométrica, corrección espectral, independientemente con su propia función (Cozzolino et al., 2023). El método de preprocesamiento debe producir un modelo sólido para su modelamiento (Wang et al., 2023).

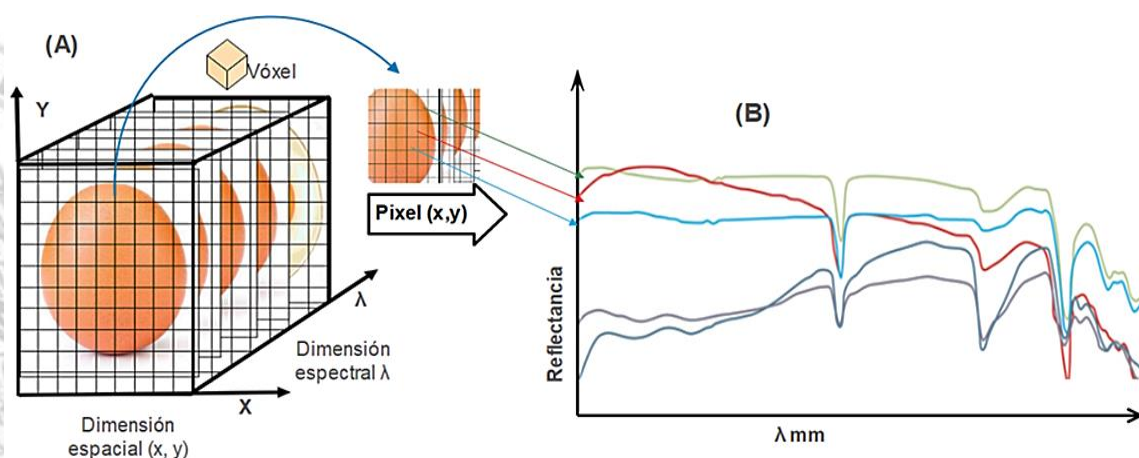


Figura 2. (A) Hipercubo de imagen hiperespectral. (B) Firmas espectrales de los datos hiperespectrales representados en (X, Y).

5. Desarrollo del modelo

Las HSI para que puedan ser aplicadas se debe desarrollar un modelo de calibración multivariable. El objetivo del modelo es la predicción precisa de las características de una nueva muestra a partir de los espectros de una muestra base (Burger & Geladi, 2005). Por lo que para lograr un óptimo modelo se debe utilizar muestras que contenga todas las variaciones físicas y químicas que intervienen en el muestreo de rutina. Por otra parte, se debe asegurar que las nuevas muestras sean similares a las muestras que fueron utilizadas en la calibración (Vidal & Amigo, 2012).

Existen 2 tipos de modelos de calibración, los modelos cuantitativos y los cualitativos (Calin et al., 2023). Los modelos cuantitativos consisten en la relación matemática de los espectros y los valores de referencia, como las características físicas, químicas u otras que han sido identificadas en laboratorio. Como modelos de análisis cuantitativos están, la regresión multineal (MLR), y la regresión de mínimos cuadrados parciales (PLSR) (Kamruzzaman & Sun, 2016).

Por otro lado, los modelos cualitativos son los que comparan los espectros para buscar similitudes o diferencias dentro de otros espectros (Amigo et al., 2015). Dividiéndose en 2 grupos, supervisados y no supervisados. Dentro de la categoría de los no supervisados se encuentra la técnica más utilizada Principal Component Analysis (PCA) y dentro de la categoría de los supervisados están, el modelado independiente suave de analogía de clase (SIMCA), el análisis discriminante de Fisher (FDA), el análisis discriminante lineal (LDA) (Ferrari et al., 2023; Stefan, 2010; Zhang et al., 2019), cabe recalcar que el análisis cualitativo es útil para la búsqueda de similitud o relaciones entre muestras.

6. Validación del modelo

Una vez el modelo de calibración ha sido desarrollado, es de crucial importancia comprobar su rendimiento mediante la predicción de muestras nuevas, de esta manera nos podemos asegurar que el modelo funcione correctamente, y así poder aplicar en nuevas y similares muestras (Burger & Gowen, 2011). Existe muchos métodos de validación de modelos, sin embargo, la mejor validación es probar en un conjunto completamente independiente constituida por muestras de

diferentes realidades tomadas en diferentes veces. Por otro lado, también depende de la estadística de calibración y predicción (Pu et al., 2023).

7. Software de análisis de datos de imágenes hiperespectrales

El uso de software juega un rol muy importante en la adquisición de imágenes, extracción, preprocesamiento y procesamiento de datos espectrales, análisis de datos multivariados, modelamiento y validación (Burger & Gowen, 2011). Para lograr estas operaciones aún no se han logrado desarrollar herramientas que estén integradas en un solo paquete de software. Existe en el mercado varios paquetes de software, cada uno con propio o el mismo lenguaje de programación, entre ellos están los más conocidos: MATrix LABoratory (MATLAB), Unscrambler y ENVI (ENvironment for Visualizing Images), el software que permite el procesamiento de imágenes hiperespectrales con mayor flexibilidad es MATLAB (Kamruzzaman & Sun, 2016).

8. Imágenes hiperespectrales (HSI) como método no destructivo para el sexado in ovo

El huevo fértil de gallinas muy aparte de contener al embrión está constituido por otras sustancias que son indispensables para la supervivencia del embrión, entonces teniendo en consideración que los componentes de la muestra independientemente tienen su propia firma espectral el cual puede ser utilizado para identificar su composición química, estructura física o cualquier otro componente de la muestra (Burger & Gowen, 2011; Calin et al., 2023; Vidal & Amigo, 2012; Siche et al., 2016) (Figura 3), mediante la toma y análisis de HSI a escala de "vóxel" se puede identificar particularidades para cada sexo del embrión, de esta manera lograr un sexaje in ovo a pocos días de incubación.

Dado la viabilidad del uso de las HSI en el sexaje in ovo (Tabla 2) investigaciones originales reportan que los resultados tienen mayor precisión cuando mayor es el tiempo de incubación del huevo, sin embargo, esto es un inconveniente dado que se busca la detección del sexo lo más temprano posible, o antes de que el embrión perciba dolor (menor a los 7 días de incubación), por lo consiguiente los huevos con sexo no deseado puedan darse otro uso, logrando una mayor aceptación por parte de la industria y la sociedad (Corion et al., 2023).

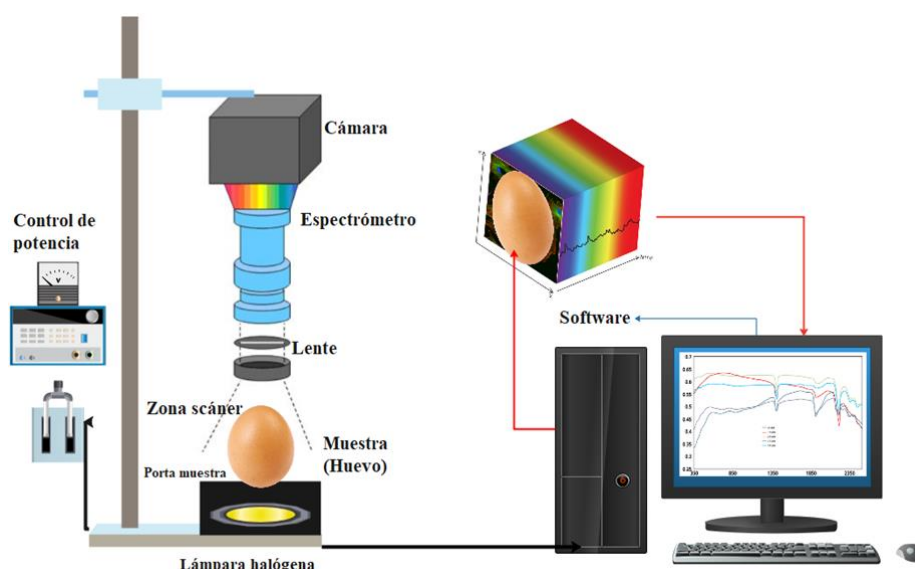


Figura 3. Sistema de imágenes hiperespectrales para la recolección de datos de huevos.

Tabla 2

Principales investigaciones de sexaje in ovo con imágenes hiperespectrales (HSI)

Muestra	Región de interés (ROI)	Rango espectral	Algoritmo y modelo	Precisión del modelo	Tiempo de detección	Resultado	Referencia
n =94 huevos incubables	Polo inferior y superior, la parte media del huevo	400 a 1000 nm	PLSDA	75%	10 días	Todos los modelos tienen mayor precisión en el décimo día, con ROI en la parte media del huevo	(Pan et al., 2016)
			SVM	75%			
			ANN	82.86 %			
Huevos de gallinas Lohmann Tierzucht GmbH	No específica	400 a 1000 nm	PCA y LDA	97 %	14 días	LDA obtiene una precisión general del 97%	(Göhler et al., 2017)

Algoritmo y modelo: PLSDA (análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales), SVM (máquina de vector de soporte), ANN (red neuronal artificial), PCA (análisis de componentes principales), LDA (análisis discriminante lineal).

9. Avances recientes para el sexado in ovo

El avance científico y tecnológico cada vez es mayor, es así como a lo largo de los años se han venido desarrollando diferentes métodos para lograr determinar el sexo in ovo (Busse et al., 2019; Xiang et al., 2022), diferentes estudios reportan dos grandes grupos de técnicas; los métodos ópticos y los no ópticos. Dentro de los métodos ópticos se encuentran: Las imágenes hiperespectrales (Pan et al., 2016; Zhu et al., 2021), espectroscopia Vis-NIR (Göhler et al., 2017), espectroscopia de infrarrojos y terahercios (Zhang et al., 2013), espectroscopia Raman (Galli et al., 2017; 2018), espectroscopia de fluorescencia (Preuß et al., 2023), minería

de datos, SPME/GC-MS acoplado con quimiometría, visión de máquina, espectroscopia de resonancia magnética nuclear y de radiofrecuencia (Nageswara, 2015), y estudios morfométricos (Zhu et al., 2021).

Dentro de las técnicas no ópticas están: Edición y modificación genética, análisis de ADN, inmunodetección (Aslam et al., 2013), compuestos orgánicos volátiles (Webster et al., 2015) espectrometría de movilidad iónica y espectrometría de masas (Bruijn et al., 2015), ingeniería genética (Corion et al., 2022). Todos estos métodos buscan su aplicabilidad a nivel industrial. Sin embargo, se enfrentan a una serie de exigencias y limitaciones por la industria y la sociedad: Lograr una alta precisión mayor a 98,5% (Alin et al., 2019; Corion et al., 2023), lograr identificar el sexo lo más temprano posible (antes de los 7 días de incubación o antes de la aparición de dolor del embrión) (Busse et al., 2019), alto rendimiento (procesar más huevos en menor tiempo) (Busse et al.,

2019), no invasiva, ser barata y tener la facilidad de trabajar con cualquier tipo de huevo (color, tamaño y especie) (Haas et al., 2021; Galli et al., 2018).

10. Tendencias de publicaciones y patentes de sexaje in ovo a lo largo del tiempo

El sacrificio de pollitos machos recién nacidos es un tema cada vez más debatido, se espera que el sexado in ovo sea una solución eficaz (Steiner et al., 2011; Weissmann et al., 2013). La Figura 1 es una representación cuantitativa de la evolución en el tiempo del sexaje in ovo mediante publicaciones de artículos científicos y patentes. Desde la primera publicación científica en 1992 hasta 2009 hubo pocas publicaciones de artículos científicos, pero a partir del 2010 al 2023 existe un crecimiento constante, haciendo un total de (n = 43) artículos científicos, de los cuales solo (n = 4) artículos estudian las imágenes hiperespectrales en el sexaje in ovo. Por otra parte, se observa un mayor número de patentes (n = 108) con crecimiento contante a partir del 2002. Muchos investigadores buscan proteger su descubrimiento a través de una patente, antes que publicarlo en un artículo científico. Esto porque las técnicas propuestas guardan un alto valor económico, industrial e impacto social.

La Figura 4 muestra la distribución demográfica de producción de artículos científicos de las diferentes técnicas de sexado in ovo. Se observa que Alemania es el principal país con más artículos publicados hasta el 2023 (n = 19) incluido (n = 1) artículo referente a imágenes hiperespectrales, esto se debe a que Alemania fue el primer

país que por decreto de ley prohíbe el sacrificio de pollitos (Bundestag, 2021), esto conlleva que haya mayor interés en la búsqueda de alternativas para contrarrestar esta problemática. También está los EE. UU. (n = 8), China (n = 4), Bélgica (n = 3), esto puede deberse a que estos países tienen un desarrollo tecnológico mayor, así como también al grado de exigencia de sus normativas sobre bienestar animal.

11. Desafíos actuales y futuros

La utilización de las HSI como método no destructivo en el sexado in ovo de embriones de pollo es una tecnología en proceso de prueba (Jia et al., 2023) tiene bastante potencial; sin embargo, este método incorpora procesamiento de datos con softwares especializados de los datos obtenidos, esto demanda de bastante tiempo (Veganzones & Graña, 2019), convirtiéndolo en un método por el momento poco práctico para su desarrollo a nivel industrial.

Con base en las figuras 1 y 4, el sexaje in ovo presenta grandes desafíos actuales y futuros, tanto a nivel social, industrial, ambiental y científico (Zumbrink et al., 2020; Nakaguchi & Ahamed, 2022), cada desafío tiene diferente grado de complejidad, es por ello que las HSI como método no destructivo en el sexado in ovo debe de ser amigables con el medio ambiente, barato, con una alta precisión, capaz de determinar el sexo en menor tiempo de incubación sin generar dolor y ser sustentable (Göhler et al., 2017; Pan et al., 2016), de esta manera pueda lograr una aceptación por parte de la industria y sociedad.

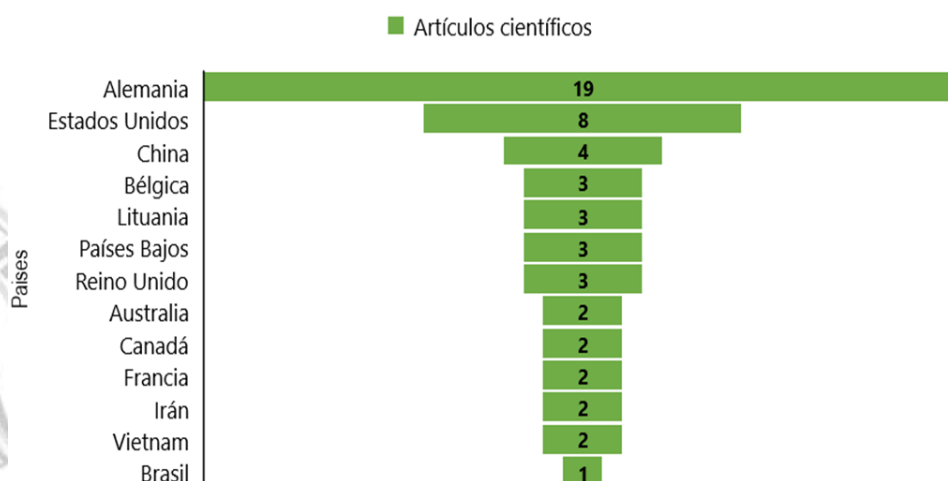


Figura 4. Distribución geográfica de publicaciones científicas sobre sexaje in ovo hasta el 2023. Los otros países como Irak, Italia, Rusia, Serbia, Suiza, Taiwan y Ucrania solo registran 1 publicación. Datos obtenidos de la base de datos Scopus, con criterios de búsqueda: título del artículo, resumen, y palabras clave "sex and egg OR sex in egg OR in ovo sex".

Tabla 3

Desafío actuales y futuros de la HSI en el sexaje in ovo

Nivel	Desafíos actuales	Desafíos futuros
Sociedad	Cumplir con los estándares de bienestar animal con los huevos fértiles y los pollitos que son utilizados en las investigaciones	Erradicar el sacrificio de pollitos recién nacidos
Industria avícola	Que el método o equipo propuesto sea de bajo costo y un alto rendimiento	Que el método o equipo propuesto sea de bajo costo y un alto rendimiento
Ambiente	En el desarrollo de las investigaciones se logre un menor impacto ambiental (en la incubación, toma de muestra y validación)	Que el método o equipo propuesto sea sustentable y sostenible
Comunidad científica	Validar modelos de predicción de sexaje in ovo antes de que el embrión perciba dolor y tener una alta precisión	Desarrollar y validar modelos de predicción de sexaje in ovo para cualquier tipo de huevo (color, tamaño y especie)

12. Conclusiones

Con el transcurso de los años se vienen proponiendo múltiples técnicas y métodos de sexaje in ovo, sin embargo, aún no se logran desarrollar a nivel industrial, aún existen diferentes limitaciones. Las imágenes hiperespectrales HSI es una técnica viable para el sexaje in ovo debido a su riqueza de información única, pero presenta limitaciones en la obtención, extracción y procesamiento de datos, para ello se necesita de softwares, quimiometría y algoritmos especializados, convirtiéndolo en una técnica compleja y sobre todo que demanda de bastante tiempo, pero se podría incorporar algoritmos de autoaprendizaje que es un subdominio de la inteligencia artificial (IA), que pueden acelerar y facilitar el proceso.

Otra limitación es el tiempo de incubación en que es detectado el sexo del embrión; dado que la exigencia es lograr sexar al embrión antes de que perciba dolor, con HSI se ha logrado sexar a partir del día 10 en adelante. Esto conlleva a la necesidad de que se siga investigando y perfeccionando la técnica de HSI como método no invasivo y destructivo en el sexaje in ovo.

13. Referencias bibliográficas

Aleynikov, A., & Osipenko, I. (2023). Information technology for culling poultry eggs before incubation based on gender. *E3S Web of Conferences*, 390, 03005. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202339003005>

Alin, K., Fujitani, S., Kashimori, A., Suzuki, T., Ogawa, Y., & Kondo, N. (2019). Non-invasive broiler chick embryo sexing based on opacity value of incubated eggs. *Computers and Electronics in Agriculture*, 158, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2019.01.029>

Amigo, J. M., Babamoradi, H., % Elcoroaristizabal, S. (2015). Hyperspectral image analysis. A tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 896, 34–51. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.09.030>

Arce, L., Gallegos, J., Garrido-Delgado, R., Medina, L. M., Sielemann, S., & Wortelmann, T. (2015). Ion Mobility Spectrometry a Versatile Analytical Tool for Metabolomics Applications in Food Science. *Current Metabolomics*, 2(4), 264–271. <https://doi.org/10.2174/2213235X03999150212102944>

Aslam, M. A., Hulst, M., Hoving-Bolink, R. A. H., Smits, M. A., de Vries, B., Weites, I., Groothuis, T. G. G., & Woelders, H. (2013). Yolk concentrations of hormones and glucose and egg weight and egg dimensions in unincubated chicken eggs, in relation to egg sex and hen body weight. *General and Comparative Endocrinology*, 187, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.02.045>

Bayer, E., von Meyer-Höfer, M., & Kühl, S. (2023). Hotspot analysis for organic laying hen husbandry—identification of sustainability problems as potential risk points to lose consumers' trust. *Organic Agriculture*, 13(2), 261–292. <https://doi.org/10.1007/s13165-023-00426-5>

Bozkaya, F., Gürler, Ş., Yertürk, M., & Aydllek, N. (2013). Isolation of DNA from embryo and chorio-allantoic membranes and sexing by PCR in Japanese quail. *British Poultry Science*, 54(1), 106–111. <https://doi.org/10.1080/00071668.2012.760035>

Brujinis, M. R. N., Blok, V., Stassen, E. N., & Gremmen, H. G. J. (2015). Moral "Lock-In" in Responsible Innovation: The Ethical and Social Aspects of Killing Day-Old Chicks and Its Alternatives. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 28(5), 939–960. <https://doi.org/10.1007/s10806-015-9566-7>

Bundestag. (2021). Entwurf eines Gesetzes zur Änderung des Tierschutzgesetzes – Verbot des Kükenötens (Alemán). <https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/DE/Glaesem-Gesetze/Kabinettfassung/aenderung-tierschutzgesetz-kueken.html>

Burger, J., & Geladi, P. (2005). Hyperspectral NIR image regression part I: calibration and correction. *Journal of Chemometrics*, 19(5–7), 355–363. <https://doi.org/10.1002/cem.938>

Burger, J., & Gowen, A. (2011). Data handling in hyperspectral image analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 108(1), 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2011.04.001>

Busse, M., Kernecker, M. L., Zscheischler, J., Zoll, F., & Siebert, R. (2019). Ethical Concerns in Poultry Production: A German Consumer Survey About Dual Purpose Chickens. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 32(5–6), 905–925. <https://doi.org/10.1007/s10806-019-09806-y>

Calin, M. A., Piticescu, R. R., & Parasca, S. V. (2023). Comparative analysis of denoising techniques in burn depth discrimination from burn hyperspectral images. *Journal of Biophotonics*, 16(7). <https://doi.org/10.1002/jbio.202200374>

Calle-Velásquez, C. A., Estrada Pareja, M. M., & Restrepo-Betancur, L. F. (2017). Evolución de la relación entre el consumo de huevo de gallina en el mundo (*Gallus gallus domesticus*) y los principales alimentos entre 1961 y 2009. *Perspectivas Nutrición Humana*, 18(1), 37–48. <https://doi.org/10.17533/udea.penh.v18n1a04>

Carrasco, O., Gomez, R. B., Chainani, A., & Roper, W. E. (2003). Hyperspectral imaging applied to medical diagnoses and food safety (N. L. Faust & W. E. Roper, Eds.; p. 215). <https://doi.org/10.1117/12.502589>

Clinton, M., Nandi, S., Zhao, D., Olson, S., Peterson, P., Burdon, T., & McBride, D. (2016). Real-Time Sexing of Chicken Embryos

- and Compatibility with in ovo Protocols. *Sexual Development*, 10(4), 210–216. <https://doi.org/10.1159/000448502>
- Corion, M., Keresztes, J., De Ketelaere, B., & Saeys, W. (2022). In ovo sexing of eggs from brown breeds with a gender-specific color using visible-near-infrared spectroscopy: effect of incubation day and measurement configuration. *Poultry Science*, 101(5). <https://doi.org/10.1016/J.PSJ.2022.101782>
- Corion, M., Santos, S., De Ketelaere, B., Spasic, D., Hertog, M., & Lammertyn, J. (2023). Trends in in ovo sexing technologies: insights and interpretation from papers and patents. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 14(1), 102. <https://doi.org/10.1186/s40104-023-00898-1>
- Costanzo, A., Panseri, S., Giorgi, A., Romano, A., Caprioli, M., & Saino, N. (2016). The Odour of Sex: Sex-Related Differences in Volatile Compound Composition among Barn Swallow Eggs Carrying Embryos of Either Sex. *PLOS ONE*, 11(11), e0165055. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165055>
- Cozzolino, D., Williams, P. J., & Hoffman, L. C. (2023). An overview of pre-processing methods available for hyperspectral imaging applications. *Microchemical Journal*, 193, 109129. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109129>
- Doran, T. J., Morris, K. R., Wise, T. G., O'Neil, T. E., Cooper, C. A., Jenkins, K. A., & Tizard, M. L. v. (2018). Sex selection in layer chickens. *Animal Production Science*, 58(3), 476. <https://doi.org/10.1071/AN16785>
- Ellegren, H. (2009). Sex Determination: Two Copies for One Cock. *Current Biology*, 19(19), R909–R910. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.09.001>
- Ferrari, V., Calvini, R., Boom, B., Menozzi, C., Rangarajan, A. K., Maistrello, L., Offermans, P., & Ulrici, A. (2023). Evaluation of the potential of near infrared hyperspectral imaging for monitoring the invasive brown marmorated stink bug. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 234, 104751. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2023.104751>
- Fragoso, A. A. H., Capilé, K., Taconeli, C. A., de Almeida, G. C., de Freitas, P. P., & Molento, C. F. M. (2023). Animal Welfare Science: Why and for Whom? *Animals*, 13(11), 1833. <https://doi.org/10.3390/ani13111833>
- Galli, R., Preusse, G., Schnabel, C., Bartels, T., Cramer, K., Krautwald-Junghanns, M.-E., Koch, E., & Steiner, G. (2018). Sexing of chicken eggs by fluorescence and Raman spectroscopy through the shell membrane. *PLOS ONE*, 13(2), e0192554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192554>
- Galli, R., Preusse, G., Uckermann, O., Bartels, T., Krautwald-Junghanns, M.-E., Koch, E., & Steiner, G. (2017). In ovo sexing of chicken eggs by fluorescence spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(5), 1185–1194. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-0116-6>
- Gautron, J., Réhault-Godbert, S., van de Braak, T. G. H., & Dunn, I. C. (2021). Review: What are the challenges facing the table egg industry in the next decades and what can be done to address them? *Animal*, 15. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100282>
- Göhler, D., Fischer, B., & Meissner, S. (2017). In-ovo sexing of 14-day-old chicken embryos by pattern analysis in hyperspectral images (VIS/NIR spectra): A non-destructive method for layer lines with gender-specific down feather color. *Poultry Science*, 96(1), 1–4. <https://doi.org/10.3382/PS/PEW282>
- Gremmen, B., Bruijnijns, M. R. N., Blok, V., & Stassen, E. N. (2018). A Public Survey on Handling Male Chicks in the Dutch Egg Sector. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 31(1), 93–107. <https://doi.org/10.1007/s10806-018-9712-0>
- Haas, E. N., Oliemans, E., & van Gerwen, M. A. A. M. (2021). The Need for an Alternative to Culling Day-Old Male Layer Chicks: A Survey on Awareness, Alternatives, and the Willingness to Pay for Alternatives in a Selected Population of Dutch Citizens. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.662197>
- He, L., Martins, P., Huguenin, J., Van, T.-N.-N., Manso, T., Galindo, T., Gregoire, F., Catherinot, L., Molina, F., & Espeut, J. (2019). Simple, sensitive and robust chicken specific sexing assays, compliant with large scale analysis. *PLOS ONE*, 14(3), e0213033. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213033>
- Jia, N., Li, B., Zhu, J., Wang, H., Zhao, Y., & Zhao, W. (2023). A Review of Key Techniques for in Ovo Sexing of Chicken Eggs. *Agriculture*, 13(3), 677. <https://doi.org/10.3390/agriculture13030677>
- Kaletka, E. F., & Redmann, T. (2008). Approaches to determine the sex prior to and after incubation of chicken eggs and of day-old chicks. *World's Poultry Science Journal*, 64(3), 391–399. <https://doi.org/10.1017/S0043933908000111>
- Kamruzzaman, M., & Sun, D.-W. (2016). Introduction to Hyperspectral Imaging Technology. In *Computer Vision Technology for Food Quality Evaluation* (pp. 111–139). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802232-0.00005-0>
- Kayadan, M., & Uzun, Y. (2023). High accuracy gender determination using the egg shape index. *Scientific Reports*, 13(1), 504. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-27772-4>
- Ketelaere, B., Bamelis, F., Kempes, B., Decuyper, E., & De Baerdemaeker, J. (2004). Non-destructive measurements of the egg quality. *World's Poultry Science Journal*, 60(3), 289–302. <https://doi.org/10.1079/WPS200417>
- Khan, M. J., Khan, H. S., Yousaf, A., Khurshid, K., & Abbas, A. (2018). Modern Trends in Hyperspectral Image Analysis: A Review. *IEEE Access*, 6, 14118–14129. <https://doi.org/10.1109/ACCESS.2018.2812999>
- Khwatenge, C. N., & Nahashon, S. N. (2021). Recent Advances in the Application of CRISPR/Cas9 Gene Editing System in Poultry Species. *Frontiers in Genetics*, 12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.627714>
- Krautwald-Junghanns, M.-E., Cramer, K., Fischer, B., Förster, A., Galli, R., Kremer, F., Mapesa, E. U., Meissner, S., Preisinger, R., Preusse, G., Schnabel, C., Steiner, G., & Bartels, T. (2018). Current approaches to avoid the culling of day-old male chicks in the layer industry, with special reference to spectroscopic methods. *Poultry Science*, 97(3), 749–757. <https://doi.org/10.3382/ps/pex389>
- Kuula, J., Pölonen, I., Puupponen, H.-H., Selander, T., Reinikainen, T., Kalenius, T., & Saari, H. (2012). Using VIS/NIR and IR spectral cameras for detecting and separating crime scene details (E. M. Carapezza, Ed.; pp. 83590P-83590P – 11). <https://doi.org/10.1117/12.918555>
- Liang, H. (2012). Advances in multispectral and hyperspectral imaging for archaeology and art conservation. *Applied Physics A: Materials Science and Processing*, 106(2), 309–323. <https://doi.org/10.1007/S00339-011-6689-1/METRICS>
- Lodhi, V., Chakravarty, D., & Mitra, P. (2019). Hyperspectral Imaging System: Development Aspects and Recent Trends. *Sensing and Imaging*, 20(1), 35. <https://doi.org/10.1007/s11220-019-0257-8>
- Madrigal-Portilla, J., Salas-Durán, C., & Macaya-Quirós, S. (2023). Efecto de temperatura y tiempo de almacenamiento sobre la calidad del huevo de gallinas. *Agronomía Mesoamericana*, 51223. <https://doi.org/10.15517/am.v34i2.51223>
- Masary, G., & Sun, D.W. (2010). Principles of Hyperspectral Imaging Technology. In *Hyperspectral Imaging for Food Quality Analysis and Control* (pp. 3–43). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374753-2.10001-2>
- Nageswara, R. B. D. (2015). Nuclear magnetic resonance. *Resonance*, 20(11), 969–985. <https://doi.org/10.1007/s12045-015-0265-5>
- Nakaguchi, V. M., & Ahamed, T. (2022). Development of an Early Embryo Detection Methodology for Quail Eggs Using a Thermal Micro Camera and the YOLO Deep Learning Algorithm. *Sensors*, 22(15), 5820. <https://doi.org/10.3390/s22155820>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAOSTAT. (2021). Cultivos y productos de ganadería. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>
- Pan, L., Zhang, W., Yu, M., Sun, Y., Gu, X., Ma, L., Li, Z., Hu, P., & Tu, K. (2016). Gender determination of early chicken hatching eggs embryos by hyperspectral imaging. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 32(1), 181–186. <https://doi.org/10.11975/j.issn.1002-6819.2016.01.025>
- Plaza, A., Benediktsson, J. A., Boardman, J. W., Brazile, J., Bruzzone, L., Camps-Valls, G., Chanussot, J., Fauvel, M., Gamba, P., Gualtieri, A., Marconcini, M., Tilton, J. C., & Trianni, G. (2009). Recent advances in techniques for hyperspectral image processing. *Remote Sensing of Environment*, 113, S110–S122. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2007.07.028>

- Preuße, G., Porstmann, V., Bartels, T., Schnabel, C., Galli, R., Koch, E., Oelschlägel, M., Uckermann, O., & Steiner, G. (2023). Highly sensitive and quick in ovo sexing of domestic chicken eggs by two-wavelength fluorescence spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 415(4), 603–613. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04446-0>
- Pu, H., Wei, Q., & Sun, D.-W. (2023). Recent advances in muscle food safety evaluation: Hyperspectral imaging analyses and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(10), 1297–1313. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2121805>
- Qasimi, M. I., Mohibbi, H., Nagaoka, K., & Watanabe, G. (2018). Accumulation of steroid hormones in the eggshells of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *General and Comparative Endocrinology*, 259, 161–164. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.11.020>
- Reithmayer, C., Mußhoff, O., & Danne, M. (2020). Alternatives to culling male chicks – the consumer perspective. *British Food Journal*, 122(3), 753–765. <https://doi.org/10.1108/BFJ-05-2019-0356>
- Rutkowska, J., Dubiec, A., & Nakagawa, S. (2014). All eggs are made equal: meta-analysis of egg sexual size dimorphism in birds. *Journal of Evolutionary Biology*, 27(1), 153–160. <https://doi.org/10.1111/jeb.12282>
- Rutt, R. L., & Jakobsen, J. (2022). The 'brother layer problem': Routine killing, biotechnology and the pursuit of 'ethical sustainability' in industrial poultry. *Environment and Planning E: Nature and Space*, 25148486221131195. <https://doi.org/10.1177/25148486221131195>
- Saha, D., & Manickavasagan, A. (2021). Machine learning techniques for analysis of hyperspectral images to determine quality of food products: A review. *Current Research in Food Science*, 4, 28–44. <https://doi.org/10.1016/j.crf.2021.01.002>
- Schwean-Lardner, K. (2017). The effects of hatchery practices on the welfare of poultry. In *Advances in Poultry Welfare*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100915-4.00002-6>
- Siche, R., Vejarano, R., Aredo, V., Velasquez, L., Saldaña, E., & Quevedo, R. (2016). Evaluation of Food Quality and Safety with Hyperspectral Imaging (HSI). *Food Engineering Reviews*, 8(3), 306–322. <https://doi.org/10.1007/s12393-015-9137-8>
- Souza, A., de Oliveira Sans, E., Müller, B., & Molento, C. (2015). Broiler chicken welfare assessment in GLOBALGAP® certified and non-certified farms in Brazil. *Animal Welfare*, 24(1), 45–54. <https://doi.org/10.7120/09627286.24.1.045>
- Sporchia, F., Galli, A., Kastner, T., Pulselli, F. M., & Caro, D. (2023). The environmental footprints of the feeds used by the EU chicken meat industry. *Science of The Total Environment*, 886, 163960. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163960>
- Stefan, A. R. (2010). Band reduction for hyperspectral imagery processing (C. A. Bouman, I. Pollak, & P. J. Wolfe, Eds.; p. 75330W). <https://doi.org/10.1117/12.837953>
- Steiner, G., Bartels, T., Krautwald-Junghanns, M.-E., & Koch, E. (2010). Bird sexing by Fourier transform infrared spectroscopy (A. Mahadevan-Jansen & W. Petrich, Eds.; p. 75600D). <https://doi.org/10.1117/12.841627>
- Steiner, G., Bartels, T., Stelling, A., Krautwald-Junghanns, M. E., Fuhrmann, H., Sablinskas, V., & Koch, E. (2011). Gender determination of fertilized unincubated chicken eggs by infrared spectroscopic imaging. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400(9), 2775–2782. <https://doi.org/10.1007/S00216-011-4941-3>
- Tanabe, Y., Nakamura, T., Fujjoka, K., & Doi, O. (1979). Production and secretion of sex steroid hormones by the testes, the ovary, and the adrenal glands of embryonic and young chickens (*Gallus domesticus*). *General and Comparative Endocrinology*, 39(1), 26–33. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(79\)90189-8](https://doi.org/10.1016/0016-6480(79)90189-8)
- Veganzones, M. A., & Graña, M. (2019). A Research: Hyperspectral Image Processing Techniques. *International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering*, 8(9S2), 577–581. <https://doi.org/10.35940/ijitee.I1120.0789S219>
- Vidal, M., & Amigo, J. M. (2012). Pre-processing of hyperspectral images. Essential steps before image analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 117, 138–148. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2012.05.009>
- Wang, X., Liu, J., Chi, W., Wang, W., & Ni, Y. (2023). Advances in Hyperspectral Image Classification Methods with Small Samples: A Review. *Remote Sensing*, 15(15), 3795. <https://doi.org/10.3390/rs15153795>
- Wang, X., Liu, J., Wang, W., Chi, W., & Feng, R. (2023). Weakly Supervised Hyperspectral Image Classification with Few Samples Based on Intradomain Sample Expansion. *IEEE Journal of Selected Topics in Applied Earth Observations and Remote Sensing*, 16, 5769–5781. <https://doi.org/10.1109/JSTARS.2023.3283862>
- Webster, B., Hayes, W., & Pike, T. W. (2015). Avian Egg Odour Encodes Information on Embryo Sex, Fertility and Development. *PLOS ONE*, 10(1), e0116345. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116345>
- Weissmann, A., Reitemeier, S., Hahn, A., Gottschalk, J., & Einspanier, A. (2013). Sexing domestic chicken before hatch: A new method for in ovo gender identification. *Theriogenology*, 80(3), 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.04.014>
- Xiang, X., Hu, G., Jin, Y., Jin, G., & Ma, M. (2022). Nondestructive characterization gender of chicken eggs by odor using SPME/GC-MS coupled with chemometrics. *Poultry Science*, 101(3), 101619. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.10.1619>
- Yokoya, N., Chan, J., & Segl, K. (2016). Potential of Resolution-Enhanced Hyperspectral Data for Mineral Mapping Using Simulated EnMAP and Sentinel-2 Images. *Remote Sensing*, 8(3), 172. <https://doi.org/10.3390/rs8030172>
- Yokoya, N., Grohnfeldt, C., & Chanussot, J. (2017). Hyperspectral and Multispectral Data Fusion: A comparative review of the recent literature. *IEEE Geoscience and Remote Sensing Magazine*, 5(2), 29–56. <https://doi.org/10.1109/MGRS.2016.2637824>
- Zhang, M., Wang, L., Zhang, L., & Huang, H. (2019). Compressive hyperspectral imaging with non-zero mean noise. *Optics Express*, 27(13), 17449. <https://doi.org/10.1364/OE.27.017449>
- Zhang, W., Brown, E. R., Rahman, M., & Norton, M. L. (2013). Observation of terahertz absorption signatures in microliter DNA solutions. *Applied Physics Letters*, 102(2). <https://doi.org/10.1063/1.4775696>
- Zhang, Y., Kong, X., Deng, L., & Liu, Y. (2023). Monitor water quality through retrieving water quality parameters from hyperspectral images using graph convolution network with superposition of multi-point effect: A case study in Maozhou River. *Journal of Environmental Management*, 342, 118283. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118283>
- Zhu, Z. H., Ye, Z. F., & Tang, Y. (2021). Nondestructive identification for gender of chicken eggs based on GA-BPNN with double hidden layers. *Journal of Applied Poultry Research*, 30(4), 100203. <https://doi.org/10.1016/j.japr.2021.100203>
- Zumbrink, L. B., Brenig, A., Foerster, J., Hurlin, & M. von Wenzlawowicz. (2020). Electrical anaesthesia of male chicken embryos in the second third of the incubation period in compliance with animal welfare. *European Poultry Science (EPS)*, 84. <https://doi.org/10.1399/eps.2020.315>