



MAKÜ FEBED
ISSN Online: 1309-2243
<http://dergipark.ulakbim.gov.tr/makufebed>

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 8(2): 142-147 (2017)
The Journal of Graduate School of Natural and Applied Sciences of Mehmet Akif Ersoy University 8(2): 142-147 (2017)

Derleme Makale / Review Paper

Ötücü Kuşlarda (Passeriformes) Moleküler Cinsiyet Tayini ve Önemi

Bekir KABASAKAL¹, Tamer ALBAYRAK^{2*}

¹ Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya

² Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Burdur

Geliş Tarihi (Received): 14.02.2017, Kabul Tarihi (Accepted): 01.06.2017

✉ Sorumlu Yazar (Corresponding author)*: albayraktamer@gmail.com

☎ +90 248 2133034 📠 +90 248 2133099

ÖZ

Birçok ötücü kuş türünün yetişkinleri eşeyssel dimorfizm (yapısal farklılıklar) ve eşeyssel dikromatizm (renk farklılığı) göstermemektedir. Bu nedenle morfolojiye dayalı eşey tayini her zaman mümkün değildir. Bununla birlikte geleneksel eşey tayini yöntemleri genellikle üreme dönemindeki yetişkin bireyler için kullanılmakta olup cinsiyeti morfolojik olarak anlaşılamayan yavru kuşlar için kullanılamamaktadır. Moleküler eşey tayini yöntemleri ise geleneksel yöntemlere göre daha kolay ve bireyi öldürmeyen bir seçenek sunmaktadır. Cinsiyet bilgisi davranış ekolojisi, koruma biyolojisi ve populasyon biyolojisi konulu pek çok çalışma için önem arz etmektedir. Bu çalışmanın amacı CHD genleri kullanılarak uygulanan moleküler eşey tayini yöntemi hakkında bilgi vermek, dikkat edilmesi gereken hususları belirtmek ve konunun önemini vurgulamaktır.

Anahtar Kelimeler: Moleküler eşey tayini, CHD genleri, Eşey kromozomları, Passeriformes

Molecular Sexing in Songbirds (Passeriformes) and its Importance

ABSTRACT

In many passerine species, adults do not show sexual dimorphism and sexual dichromatism. For this reason, external morphology is not often used for sex determination. Furthermore, traditional sexing methods are often used for adults in reproductive period and cannot be used for nestlings. Molecular sex determination provides an alternative method which is easier than the traditional methods. In this manner, it is very important for many studies on behavioural ecology, conservation biology and population biology. The purpose of this study is to provide information about the molecular sex determination method using CHD genes, to specify matters to be considered and to emphasize the importance of the issue.

Keywords: Molecular sexing, CHD genes, Sex chromosomes, Passeriformes

GİRİŞ

Bir populasyondaki bireylerin cinsiyetlerinin bilinmesi davranış ekolojisi, koruma biyolojisi ve populasyon biyolojisi konulu pek çok çalışma için gereklidir. Morfolojik farklılıklar eşeylerin tanımlanmasına olanak sağlar ancak birçok ötücü kuş türünün yetişkinleri eşeyssel

dimorfizm (yapısal farklılıklar) ve eşeyssel dikromatizm (renk farklılığı) göstermez ve bu nedenle cinsiyetlerin belirlenmesi zordur (Gosler, 2004, Jensen vd., 2003, Price and Birch, 1996). Eşeyssel dimorfizm ve dikromatizm gösteren hemen her ötücü kuş türünde eşeyssel farklılıklar türe özgü olduğu için incelenen türün iyi tanınması ve arazi tecrübesi gerekmektedir. Dişilerde

kuluçka izinin olması, davranışsal farklılıklar, kloak bölgesinin incelenmesi, laparoskopi ve laparotomi yöntemleri ile gonadların incelenmesi ve eşey kromozomlarının incelenmesi eşeylerin belirlenmesinde kullanılan diğer yöntemlerdir (Dubiec and Zagalska-Neubauer 2006, Ralph vd., 1993). Laparoskopi ve laparotomi gibi cerrahi yöntemlerin kullanılması ve kloak bölgesinin incelenmesi sadece yetişkin kuşlara uygulanabilmekte ve daha çok üreme dönemindeki bireylerden doğru sonuç alınabilmektedir (Smith, 2010). Bu işlemlerin uygulanması uzman personel gerektirmekte olup küçük vücut kütlelerine sahip ötücü kuşlarda ise bireylerin telef olmasına sebep olunabilmektedir. Benzer şekilde davranışsal farklar, morfolojik özelliklerin farklılığı ve dişilerdeki kuluçka izi de üreme dönemindeki yetişkin kuşlar için kullanılan yöntemlerdir. Yavrularda ise morfolojik olarak eşey belirlenmesi oldukça zordur. Ötücü kuşların büyük çoğunluğunda yavrular yumurtadan çıktıkları yıl üremezler ancak ikinci yıllarında üreme potansiyeline sahip olurlar ve eşey farklılıkları ortaya çıkar (Gill, 2007). Bu yüzden erişkinliğe ulaşmamış ve üreme döneminde olmayan kuşlarda yukarıda bahsedilen yöntemler eşey tayininde kullanılamamaktadır. Bu çalışmanın amacı Kromo helikaz DNA bağlayıcı protein genleri (CHD) kullanılarak ötücü kuşlarda (Passeriformes) uygulanan moleküler eşey tayini yöntemi hakkında bilgi vermek, dikkat edilmesi gereken hususları belirtmek ve konunun önemini vurgulamaktır.

MOLEKÜLER EŞEY TAYİNİ

Kuşlar, memelilere benzer biçimde iki eşey kromozomu taşırlar ancak memelilerin tersine dişiler heterogametik olup ZW kromozomlarını, erkekler ise homogametik olup ZZ kromozomlarını taşırlar (Ellegren, 2001). Kromozom yapısı memeli kromozomlarına benzer biçimde metasentriktir, mayozla ayrılırlar ve uçlarında sinapsisi sağlayan sinaptomal komplekse sahiptirler. Ancak ZW ve ZZ kromozomları memelilerin eşey kromozomlarına homolog değildir ve evrimsel süreçleri farklıdır (Ellegren, 2000, Fridolfsson vd., 1998). Ratit (Struthioniformes) kuşlar haricinde bütün kuşlarda W ve Z kromozomları boyut bakımından farklılık göstermektedir. Z kromozomu makrokromozom yapısında uzun iken W kromozomu mikrokromozom yapısında ve kısadır (Tegelström and Rytman, 1981, Stiglec vd., 2007). Bu şekil farklılığı kültüre alınacak hücrelerde eşey kromozomlarının belirlenmesini ve böylelikle eşey tayinini mümkün kılar (Parker vd., 1991). Ancak eşey kromozomlarının kültürde tespiti kolay değildir ve popülasyon çalışmalarında örnek sayısı fazla olduğu için uygulanması uzun zaman alırken maliyeti de yüksektir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR; PCR) tabanlı uygulamaların ortaya çıkması kuşlarda eşey tayini için yeni metodların geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Kuşlarda

eşey tayini için RAPD, minisatlit, mikrosatlit, AFLP, RFLP ve CHD genlerinin amplifikasyonu gibi yöntemler kullanılmaktadır (Cerit and Avanus 2007a, Cerit and Avanus 2007b, Griffiths 2000a, Griffiths 2000b, Kim vd., 2015). Bu yöntemlerin her birinin kendine özgü avantaj ve dezavantajları olmakla birlikte uygulanabilirlikleri taksona göre farklılık gösterebilmektedir (Bozkaya vd., 2013, Kabasakal and Albayrak 2012, Turkyılmaz, vd., 2010). Moleküler yöntemlerin uygulanabilirliği, hızlı sonuç alınabilmesi ve çok sayıda taksonda uygulanabilmesi gibi avantajları nedeniyle araştırmacılara kolaylık sağlamaktadır (Griffiths, 2000b).

Kromo helikaz DNA bağlayıcı protein genleri (CHD) ile eşey tayini maliyetinin ucuz ve uygulanmasının kolay oluşu, az miktarda DNA örneğinden hızlı sonuç alınabilmesi, pek çok taksona uygulanabilmesi gibi avantajları nedeniyle oldukça kullanışlı bir belirteç olup moleküler eşey tayini yöntemleri arasında öne çıkmaktadır (Griffiths, 2000b). CHD geni W Kromozomu üzerinde (CHD-W) tespit edilen ilk gen olup daha sonra Z Kromozomu üzerinde (CHD-Z) de bulunduğu tespit edilmiştir (Griffiths vd., 1997, Griffiths and Tiwari 1995). Bu gen Ratit kuşlar (Struthioniformes) haricinde bütün kuşlarda hem W Kromozomu üzerinde hem de Z kromozomunda, ratitlerde ise sadece W kromozomu üzerinde bulunur (Fridolfsson vd., 1998). Fonksiyonel bir gen dir ve evrimsel olarak korunmuş (Fridolfsson ve Ellegren 2000) olmasından dolayı PZR tabanlı moleküler cinsiyet tayininde bu gen kullanılmaktadır.

ÖRNEK ALIMI VE DNA İZOLASYONU

Kuşların eritrositlerinin çekirdekli olması nedeniyle DNA örnekleri için genellikle kan dokusu yoğun olarak kullanılmaktadır (Albayrak vd., 2012). Bu sayede az miktarda kandan bile yüksek miktarda DNA örneği elde edilebilmektedir. Kuşlardan kan örneğinin alımı için genellikle kanat venası kullanılır. Genel olarak kan örneği almanın herhangi bir zarara neden olmadığı önceki çalışmalarda (Lubjuhn vd., 1998, Sheldon vd., 2008; Albayrak vd., 2012) belirtilmiş olmasına karşın özellikle vücut kütleleri küçük olan ötücü kuş türlerinden ve yavrulardan alınan kan oldukça düşük miktarda olmalı ve dikkatli davranılmazsa bireyin telef olmasına sebep olabilmektedir (Brown and Brown 2009). Bu nedenle özellikle yavru kuşlarla çalışırken kan örneği almak yerine yeni gelişen teleklerden DNA izolasyonu için örneklerinin alınması, bireylere verilecek zararı minimuma indirmektedir. Bununla birlikte kan örneğine göre telek örneklerini almak hem daha kolay hem de daha az zaman alır. Yavrulardan alınan telekler (özellikle kuyruk telekleri) gelişmekte olduğu için karyotip ya da DNA eldesi için oldukça fazla hücre içerir (Kabasakal, 2011). Yetişkinlerden alınan telekler ise yavrudan alınan ya da kan örneklerindeki kadar olmasa da yeterli

miktarda hücre içerir ve kullanışlıdır (Harvey vd., 2006, Balkiz vd., 2007). Alınan örnek miktarı sınırlı olduğu için örneklerin muhafazası ve örneklerden DNA eldesi için uygun yöntemlerin seçilmesi oldukça önemlidir (Taberlet vd., 1999).

Örneklerinin muhafazası için kullanılan en yaygın tamponlar % 96'lık etanol, EDTA ya da Arctander tamponu (% 10 EDTA, %1TrisBase, % 0.5 NaF, % 0.5 Timol: pH 7.5; Arctander, 1988) ve Queen lisis tamponu (10 mM Tris, 10 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% n-lauroylsarcosine: pH 7.5; Seutin ve ark., 1991) olduğu söylenebilir. Bunlardan EDTA tamponu kan, telek ve doku örneklerinin arazi koşullarında uzun süre muhafaza edilmesine olanak sağladığı için öne çıkmaktadır (Kabasakal, 2011, Albayrak vd., 2012, Marzal and Albayrak 2012). EDTA tamponu içerisindeki örnekler DNA izolasyonuna kadar laboratuvar ortamında +4 °C'de muhafaza edilebilir. Ancak uzun süre muhafaza edilecekse -20 °C'de tutulması daha uygun olacaktır. DNA izolasyonu için çeşitli firmalar tarafından üretilen DNA izolasyon kitleri (Thermo, Quigen, Fermentas vb.) kullanılabilir. Kit kullanımı, manuel yöntemlere göre daha hızlı sonuç vermesi, uygulanması daha kolay oluşu, toksik maddeler içermemesi gibi özellikleriyle araştırmacılara kolaylık sağlamakla birlikte manuel yöntemlere göre maliyeti daha yüksektir. Kit kullanımının bir diğer olumsuz yanı da elde edilen DNA miktarının manuel yöntemlere göre daha az oluşudur. Bu nedenle DNA elde edilecek materyale bağlı olarak yöntemin seçilmesi ve uzun süre saklanması planlanan DNA örnekleri için manuel yöntemlerin kullanılması daha

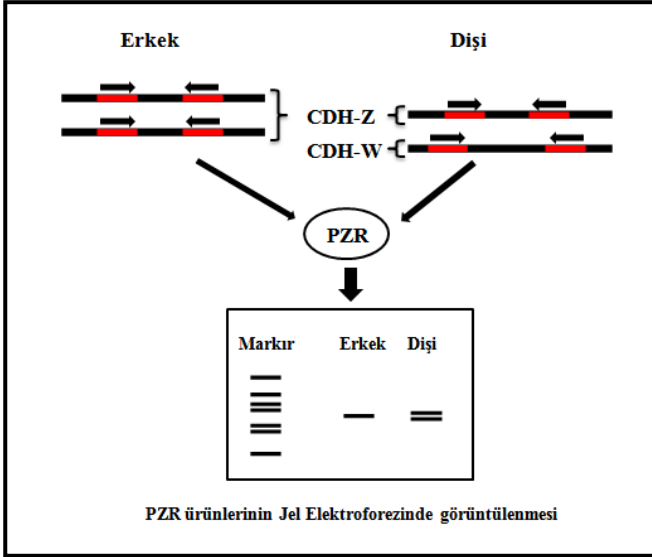
uygun olabilir. Manuel yöntemlerin en yaygın olarak kullanılanı standart Fenol/Kloroform yöntemi olduğu söylenebilir (Sambrook vd., 1989). Bununla birlikte tuzla çöktürme (Aljanabi and Martinez 1997) ve Chelex (Walsh vd., 1991) yöntemleri de kullanılabilir. DNA izolasyonu telek örneklerinden yapılacaksa, öncelikle telek üst göbek (superior umbilicus) kısmından kesilerek calamus kısmı bir havan içerisinde veya lamel üzerinde makas ya da bistüri yardımıyla mümkün olduğunca küçük parçalara ayrılmalıdır (Horvath vd., 2005). Bu işlemler esnasında birkaç damla B tamponu (25 mM EDTA, 75 mM NaCl ve 10 mM TrisBase; pH = 7,5) eklemek faydalı olacaktır (Kabasakal, 2011).

PZR VE DNA ELEKTROFOREZİ

Moleküler cinsiyet tayini yöntemi, CHD genlerinin uygun bir primer çifti kullanarak uygulanan PZR reaksiyonları ürünlerinin jel elektroforezi ile ayrılması prensibine dayanır (Kabasakal and Albayrak 2012, Griffiths vd., 1998). CHD genleri kullanılarak eşey tayini için tasarlanan primerler, genin kodlanmayan kısmı olan intron bölgesindeki özel dizilere yapışarak bir fragment sentezine olanak sağlayacak şekilde dizayn edilmiştir (Griffiths vd., 1998., Fridolfsson and Ellegren 1999, Kahn vd., 1998; Tablo 1) W ve Z kromozomu fragmentlerindeki boyut farklılığı nedeni (W intron bölgesi daha uzundur) ile jel elektroforezinde erkek bireylere ait örneklerde tek bant (Z fragmenti), dişilerinde ise çift (W ve Z fragmentleri) bant gözlenir (Griffiths, 2000a; Şekil 1).

Tablo 1. CHD genleri kullanılarak yapılan moleküler eşey tayini için tasarlanan primer çifti dizileri ve PZR ürünü uzunlukları.

Primerler	Nükleotit dizileri	PZR ürünü uzunluğu	Referans
P2	5'- TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3'	300 – 400 bç	Griffiths ve ark., 1998
P8	5'- CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3'		
1237L	5'- GAGAACTGTGCAAAACAG-3'	200 – 300 bç	Kahn ve ark., 1998
1272H	5'- TCCAGAATATCTTCTGCTCC-3'		
2550F	5'- GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3'	400 – 650 bç	Fridolfsson and Ellegren 1999
2718R	5'- ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3'		



Şekil 1. CHD geni kullanılarak uygulanan Moleküler Eşey Tayini Yöntemi'nin şematik gösterimi (Griffiths 2000a).

Ancak bazı istisnai durumlar da vardır. Örneğin 2550 F ve 2718 R primerlerini bazı türlerde hem erkek hem de dişi birey için jel elektroforezinde tek bant sonucunu verebilmektedir (Fridolfsson and Ellegren 1999). Benzer durum P2 ve P8 primerleri için de söz konusu olabilir. Bu durumda PZR ürünlerinin *HaeIII* gibi restriksiyon enzimleri ile muamele edilerek kesilmesi sorunu çözülebilmektedir (Whittingham ve Dunn, 2000). Bununla birlikte P2 ve P8 primerlerinin W ve Z kromozomu PZR ürünlerinin baz uzunluğu farkı 10-80 baz çifti kadar olduğundan Agoroz Jel'e göre daha yüksek çözünürlük sağlayan Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) kullanılması daha uygun olabilir (Griffiths vd., 1998). Ayrıca 1237L ve 1272H primerleri aynı intron bölgesini çoğalttığı için P2 ve P8 primerinin kontrol grubu olarak kullanılabilir (Dubiec and Zagalska-Neubauer 2006). PZR için uygulanacak protokolda öncelikle yazarların standart protokollerine uymakta fayda vardır. Daha sonra PZR ürünlerinin Jel elektroforezindeki durumlarına göre uzama sıcaklığının 1-3°C artırılıp ya da azaltılarak ve MgCl₂ konsantrasyonunu değiştirerek protokol standartlaştırılabilir (Griffiths ve ark., 1998). Kabasakal and Albayrak (2012) tarafından Büyük baştankara (*Parus major*) yavrularının cinsiyet oranlarının belirlenmesine yönelik çalışmada PZR yöntemi için P8 ve P2 primerleri CHD-W ve CHD-Z genleri için kullanılmış. PZR karışımı: 100 ile 200 ng/µl genomik DNA, 0.5 µl (1 unit) her bir primer (P2, P8), 0.2 µl (1 unit) Taq DNA Polimerase (Fermentas), 0.2 µl (1 unit) dNTP mix (Fermentas), 1 µl MgCl₂ (Fermentas), 2.5 µl 10X CL PCR Buffer (Invitrogen), 5 µl Q Solution (Invitrogen) ve total hacim 25 µl oluncaya kadar steril dH₂O. PZR programı; 95°C de 15 dakika ilkin denatürasyon, akabinde 45 döngü olacak şekilde 94°C'de 30 saniye (denatürasyon), 50°C'de 60

saniye (eşleşme) ve 72°C'de 60 saniye (uzama) ve döngü sonunda 72°C'de 10 dakika son uzama ve 4°C'de bekletme aşamalarından oluşmaktadır. PZR ürünü %3'lük agaroz jelde 80 V'ta 60 dakika yürütme ile görüntülenmektedir.

Klasik PZR uygulamalarının yanında Kantitatif PZR uygulamaları yardımıyla da eşey tayini yapmak mümkündür (Chang vd., 2008). Floresan boyalar kullanılarak uygulanan bu yöntem sayesinde Jel elektroforez işlemine gerek olmadığı için klasik PZR' una göre daha hızlı sonuç alınmaktadır. Ancak Kantitatif PZR, Klasik PZR'na göre maliyetinin daha yüksek olması nedeniyle örnek sayısı fazla olan çalışmalar için her zaman uygun olmayabilir.

EŞEY TAYİNİNİN ÖNEMİ

Bir populasyonda dört çeşit eşey oranı gözlenir. Bunlar: Birincil eşey oranı (döllenmeden sonra yumurtalardaki erkeklerin dişilere oranı), ikincil eşey oranı (yumurtadan çıkan erkeklerin dişilere oranı), üçüncül eşey oranı (juvenil erkeklerin dişilere oranı) ve dördüncül eşey oranı (yetişkinlerin erkeklerin dişilere oranı) olup bir popülasyonda eşey oranlarının simetrik (50:50) olması beklenir (Skalski ve ark., 2005). Eşey oranları üzerine doğal seçilimin nasıl etki ettiğini ise eşey dağılımları teorisi açıklamaktadır. Eşey dağılımları teorisine (sex allocation) göre erkek ve dişilerin üretilmesi için harcanan enerji ve zaman ile faydalarının farklı olduğu durumlarda asimetric eşey oranı gözlenebilir. Ancak asimetric (50:50' den farklı) eşey oranlarının anlamlı olabilmesi için uyumsal olması gerektiği belirtilmektedir (Komdeur, 2004). Eşey dağılımları teorisi, ebeveynler ne kadar erkek ve dişi yavru üretmelidir, ebeveynler erkek ve dişi yavrular için ne kadar kaynak sağlayabilir sorularının cevabını arar (Komdeur ve Pen, 2002). Bu bakımdan eşey dağılımları ebeveynlerin özelliklerinden ve çevresel etmenlerden etkilenmektedir (Sheldon, 1998). Ebeveyn özelliklerinin ve çevresel etmenlerin eşey oranlarını nasıl etkilediğini anlaşılması için birincil eşey oranlarının belirlenmesi gerekir ki bu da ancak moleküler eşey tayini yöntemi ile mümkün olur. Bu bakımdan birincil eşey oranlarının belirlenmesi davranış ekolojisi alanında oldukça büyük bir öneme sahiptir.

Bir populasyonun eşey oranları ve eşey dağılımlarının populasyonu nasıl etkilediğinin belirlenmesi ebeveynlerin üreme değerleri ve uyum güçleri, yavruların üretim potansiyeli, yavruların hayatta kalmasını etkileyen faktörlerin eşeye bağlı olarak belirlenmesi gibi birey seviyesindeki etmenlerin anlaşılmasını sağlarken; populasyon seviyesinde efektif populasyon büyüklüğünün belirlenmesi, populasyonun çevreye uyumu ve verimliliğinin anlaşılması açısından önemlidir (Skalski ve ark., 2005, Frank, 1990). Bu bakımdan bir populasyonun eşey

oranları, popülasyonun geleceğini ve bulunduğu ortama adaptasyonunu gösteren önemli göstergelerden birisidir ve koruma biyolojisi açısından, özellikle popülasyon yoğunluğu düşük ve tükenme tehlikesinde olan türler için oldukça önemlidir (Ewen ve ark., 2001, Wedekind, 2002, West, ve ark., 2000).

Eşey oranlarının koruma biyolojisinde kullanımına en çarpıcı örnek soyu tükenme tehlikesinde olan ve sadece 54 bireyi bulunan Yeni Zelanda'ya endemik Kakapo papağanı (*Strigops habroptila*) popülasyonudur. Türün yavrularının eşey oranları araştırmacılar tarafından belirlenmiş ve yavru erkeklerin dişilerden daha hızlı geliştikleri ve erginliğe ulaştıkları için eşey oranlarının giderek erkeklerden yöne olduğu belirlenmiştir. Türün korunması için dişi yavrular koruma görevlileri tarafından beslenerek eşey oranının sabit kalması ve türün neslinin devam etmesine katkı sağlanmıştır (Robertson, ve ark., 2006, Clout, ve ark., 2002).

SONUÇLAR

Ötücü kuşlarda moleküler cinsiyet tayini yöntemi için kullanılan CHD genleri ile cinsiyet tayini maliyetinin ucuz ve uygulanmasının kolay oluşu, az miktarda DNA örneğinden hızlı sonuç alınabilmesi gibi avantajları sayesinde kullanışlı bir belirteç olup eşey tayini gerektiren pek çok çalışma için araştırmacıların oldukça kolaylık sağlamaktadır. Yöntem için seçilecek primerler araştırılacak taksona uygunluğuna göre belirlenmesi ve gerektiğinde birden fazla primer çifti kullanılması sonuçların doğruluğu için önemli rol oynamaktadır. Moleküler eşey tayini özellikle açılmamış yumurtalar, yumurtadan yeni çıkmış yavrular, erişkinliğe ulaşmamış ve eşeye bağlı morfolojik farklılık göstermeyen türlerde bireyin cinsiyetinin belirlenmesine olanak sağladığından eşey oranlarının hesaplanmasına ve davranış ekolojisi, koruma biyolojisi ve popülasyon biyolojisi alanlarında oldukça kullanışlı bir yöntemdir. Ayrıca direkt canlıya temas edilmeden elde edilebilecek tüylerden DNA izolasyonunun yapılabilmesi önemli bir avantajdır. Moleküler Cinsiyet Tayini Yöntemi bir popülasyonun eşey oranlarının bilinmesine katkı sağlarken popülasyonun geçmişi, bugünü ve geleceğinin anlaşılmasına da katkı sağlamaktadır.

KAYNAKLAR

Albayrak, T., Gonzalez, J., Drovetski, S. V., Wink, M. (2012). Phylogeography and population structure of Kruper's Nuthatch *Sitta krueperi* from Turkey based on microsatellites and mitochondrial DNA. *Journal of Ornithology*, 153(2), 405–411.

Aljanabi, S.M., Martinez I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic acids research*, 25(22): 4692-4693.

Arctander, P., 1988. Comparative studies of avian DNA by restriction fragment length polymorphism analysis: Convenient procedures based on blood samples from live birds. *Journal of Ornithology*, 129(2): 205-216.

Balkiz, Ö., Dano, S., Barbraud, C., Tekin, S., Özesmi, U., Dündar, M., Béchet A. (2007). Sexing Greater flamingo chicks from feather bulb DNA. *Waterbirds*, 30(3): 450-453.

Bozkaya, F., Güler, Ş., Yertürk, M., Aydılek, 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.

Brown, M.B., Brown C.R. (2009). Blood sampling reduces annual survival in cliff swallows (*Petrochelidon pyrrhonota*). *The Auk*, 126(4): 853-861.

Cerit, H., Avanus, K. (2007a). Sex determination by CHDW and CHDZ genes of avian sex chromosomes in *Nymphicus hollandicus*. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 31(6): 371.

Cerit, H., Avanus, K. (2007b). Sex identification in avian species using DNA typing methods. *World's Poultry Science Journal*, 63(01): 91-100.

Chang, H.W., Cheng, C.A., Gu, D.L., Chang, C.C., Su, S.H., Wen, C.H., Chou, Y.C., Chou, T.C., Yao, T.C., Tsai C.L., Cheng, C.C. (2008). High-throughput avian molecular sexing by SYBR green-based real-time PCR combined with melting curve analysis. *BMC biotechnology*, 8(1): 12.

Clout, M.N., Clout, M.N. Elliott, G.P., Robertson, B.C. (2002). Effects of supplementary feeding on the offspring sex ratio of kakapo: a dilemma for the conservation of a polygynous parrot. *Biological Conservation*, 107(1): 13-18.

Dubiec, A., M Zagalska-Neubauer (2006). Molecular techniques for sex identification in birds. *Biological Letters*, 43(1): 3-12.

Ellegren, H., (2000). Evolution of the avian sex chromosomes and their role in sex determination. *Trends in Ecology & Evolution*, 15(5): 188-192.

Ellegren, H., (2001). Hens, cocks and avian sex determination. *EMBO reports* 2(3): 192–196.

Ewen, J.G., Clarke, R., Moysey, E., Boulton, R.L., Crozier, R.H., Clarke M.F. (2001). Primary sex ratio bias in an endangered cooperatively breeding bird, the black-eared miner, and its implications for conservation. *Biological conservation*, 101(2): 137-145.

Frank, S.A., (1990). Sex allocation theory for birds and mammals. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 21: 13-55.

Fridolfsson, A.-K., Cheng, H., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Liu, H.C., Raudsepp, T., Woodage, T., Chowdhary, B., Halverson, J., Ellegren, H. (1998). Evolution of the avian sex chromosomes from an ancestral pair of autosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(14): 8147-8152.

Fridolfsson, A.-K., Ellegren H. (2000). Molecular Evolution of the Avian CHD1 Genes on the Z and W Sex Chromosomes. *Genetics*, 155(4): 1903-1912.

Fridolfsson, A.K., Ellegren, H. (1999). A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology*, 30(1): 116-121.

Gill, F., B., (2007). *Ornithology*. 3rd edition edNew York: W. H. Freeman & Company Publishing. 758 p.

Gosler, A., (2004). Birds in the hand, in *Bird ecology and conservation: a handbook of techniques*, W.J. Sutherland,

- I. Newton, R. Green, Editors. Oxford University Press: Oxford. p. 85-119.
- Griffiths, R., (2000a). Sex Identification using DNA markers, in *Molecular Methods in Ecology*, A.J. Baker, Editor, Blackwell Science Ltd, Oxford, p. 295-322.
- Griffiths, R., (2000b). Sex identification in birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 9(1): 14-26.
- Griffiths, R., Tiwari B (1995). Sex of the last wild Spix's macaw. *Nature*, 375: 454-454.
- Griffiths, R., RM Korn (1997). A CHD1 gene is Z chromosome linked in the chicken *Gallus domesticus*. *Gene*, 197: 225-229.
- Griffiths, R., MIKE C. D., KATE O., ROBERT J.G.D. (1998). A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology*, 7(8): 1071-1075.
- Harvey, M.G., Bonter, D.N., Stenzler, L.M., Lovette, I.J. (2006). A comparison of plucked feathers versus blood samples as DNA sources for molecular sexing. *Journal of Field Ornithology*, 77(2): 136-140.
- Horvath, M.B., Martínez-Cruz, B., Negro, J.J., Kalmár, L., Godoy J.A. (2005). An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. *Journal of Avian Biology*, 36(1): 84-88.
- Jensen, T., Pernasetti, F.M., Durrant, B. (2003). Conditions for rapid sex determination in 47 avian species by PCR of genomic DNA from blood, shell membrane blood vessels, and feathers. *Zoo Biology*, 22(6): 561-571.
- Kabasakal, B., (2011). Antalya Lütfi Büyükyıldırım Araştırma Ormanı'nda Yaşayan Baştankara (*Parus, Aves*) Türlerinin Moleküler Cinsiyet Tayini Yöntemiyle Cinsiyete Bağlı Üreme Başarıları ve Ölüm Oranlarının Belirlenmesi, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kabasakal, B., Albayrak, T. (2012). Offspring sex ratios and breeding success of a population of the Great Tit, *Parus major* (Aves: Passeriformes). *Zoology in the Middle East*, 57(1), 27-34.
- Kahn, N.W., John, J., Quinn, T.W. (1998). Chromosome-specific intron size differences in the avian CHD gene provide an efficient method for sex identification in birds. *The Auk*: 1074-1078.
- Kim, S. W., Choi, J. S., Sharma, N., Ko, Y. G., Do, Y. J., Byun, M., Seong, H.H., Park, S.B., Jeong, D. K. (2015). A novel approach for determination of chicken sexing at an early stage of development by using loop-mediated isothermal amplification method. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 39(5), 583-588.
- Komdeur, J., (2004). Sex-ratio manipulation, in *Ecology and evolution of cooperative breeding in birds*, W.D. Koenig J.L. Dickinson, Editors. Cambridge University Press, New York, USA. 102-117 p.
- Komdeur, J., Pen, I. (2002). Adaptive sex allocation in birds: the complexities of linking theory and practice. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 357(1419): 373-380.
- Lubjuhn, T., Brün, J., Winkel, W., Muth, S. (1998). Effects of Blood Sampling in Great Tits (Efecto de Tomar Muestras de Sangre en Poecile major). *Journal of Field Ornithology*: 595-602.
- Marzal, A., Albayrak, T. (2012). Geographical variation of haemosporidian parasites in Turkish populations of Kruper's Nuthatch *Sitta krueperi*. *Journal of Ornithology*, 153(4), 1225-1231.
- Parker, J.S., Birkhead, TR. Joshua, SK., Taylor, S., Clark, ms. (1991). Sex ratio in a population of guillemots *Uria aalge* determined by chromosome analysis. *Ibis*, 133(4): 423-426.
- Price, T. Birch, G. L, (1996). Repeated Evolution of Sexual Color Dimorphism in Passerine Birds. *The Auk*, 113(4): 842-848.
- Ralph, C.J., Geupel, GR., Pyle, P., Martin, TE., DeSante, DF. (1993). *Handbook of field methods for monitoring landbirds.*: California, USA. 41 p.
- Robertson, B.C., Elliott, GP., Eason, DK., Clout, MN., Gemmell, NJ. (2006). Sex allocation theory aids species conservation. *Biology letters*, 2(2): 229.
- Sambrook, J., Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Seutin, G., White, BN., Boag, PT. (1991). Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology*, 69(1): 82-90.
- Sheldon, B.C., (1998). Recent studies of avian sex ratios. *Heredity*, 80(4): 397-402.
- Sheldon, L.D., Chin, EH., Gill, SA., Schmaltz, G., Newman, AM., Soma, KK. (2008). Effects of blood collection on wild birds: an update. *Journal of Avian Biology*, 39(4): 369-378.
- Skalski, J.R., Ryding, KE., Millspsugh JJ. (2005). *Wildlife demography: analysis of sex, age, and count data*: Academic Press.
- Smith, C.A., (2010). Sex determination in birds: a review. *EMU*, 110: 364-377.
- Stiglec, R., Ezaz T., Graves J.A.M. (2007). A new look at the evolution of avian sex chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 117(1-4): 103-109.
- Taberlet, P., Waits, LP., Luikart, G. (1999). Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology & Evolution*, 14(8): 323-327.
- Tegelström, H., Rytman, H. (1981). Chromosomes in birds (Aves): evolutionary implications of macro and microchromosome numbers and lengths. *Hereditas*, 94(2): 225-233.
- Turkylmaz, M. K., Karagenc, L., Fidan, E. (2010). Sexing of newly-hatched chicks using DNA isolated from chorio-allantoic membrane samples by polymerase chain reaction in Denizli chicken. *British poultry science*, 51(4), 525-529.
- Walsh, P.S., Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10(4): 506.
- Wedekind, C., (2002). Manipulating sex ratios for conservation: short term risks and long term benefits. *Animal Conservation*, 5(1): 13-20.
- West, S.A., Herre EA., Sheldon, B.C. (2000). The benefits of allocating sex. *Science*, 290: 288-290.
- Whittingham, L.A., Dunn, P.O. (2000). Offspring sex ratios in tree swallows: females in better condition produce more sons. *Molecular Ecology*, 9(8): 1123-1129.