

Civciv Cinsiyetini Kuluçkadan Çıkmadan Önce veya Günlük Yaşta Belirleme Yöntemleri

Hüseyin Göger^{1*}

ÖZ: Son yıllarda her alanda olduğu gibi tavukçuluk sektöründe de büyük gelişmeler olmuştur. Bütün gelişmelere rağmen tavukçulukta çözüm bekleyen sorunlardan biri de embriyo dönemindeki civcivlerde cinsiyetin ucuz ve yaygın olarak belirlenememesidir. Yumurta tavukçuluğunda günlük civcivler kuluçkahanelerde genel olarak tüylerine veya gerisine bakılarak cinsiyet ayırımı yapılmakta ve erkek civcivler itlaf edilmektedir. Her yıl 420 milyonu Avrupa'da olmak üzere Dünya'da milyarlarca erkek civciv öldürülmektedir. Etik baskılardan dolayı yumurta içerisindeki embriyolarda cinsiyetin belirlenmesi yöntemlerine olan talep hızla artmaktadır. Kuluçka süresi tamamlandıktan sonra yapılan cinsiyet ayırımı ekonomik kayıplara ve hayvan hakları yönünden baskılara neden olmaktadır. Sorunların aşılabilmesi amacıyla yumurtalar kuluçkaya koyulmadan önce ve kuluçka döneminde embriyonun cinsiyetini belirleyebilmek amacıyla çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Bu makalede kuluçkadan önce ve kuluçka sırasında embriyonun cinsiyetini belirleyebilmek amacıyla yapılan araştırmalar ve kuluçkadan sonra günlük civcivlerde cinsiyetin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan mevcut metotlar üzerinde durulmuştur.

Anahtar kelimeler: Cinsiyet ayırımı, embriyo, yumurta, yumurta tavukçuluğu

Geliş Tarihi: 27/02/2017

Kabul Tarihi: 19/07/2017

Sex Determination Methods of Chicks Before Hatching or Day-Old Age

ABSTRACT: In recent years, there have been great developments in the poultry sector as well as in all sectors. Despite all of the developments, one of the problems waiting for solution in poultry industry is not to be determined sex cheaply and widely in chicks at embryo stage. In the layer sector, one-day-old chicks in the hatcheries are generally sorted out by feather or vent sexing and male ones are killed. This procedure involves billions of chicks worldwide per year, of which 420 million in Europe. Under the pressure of the ethically, the demand for new methods of sex determination "in ovo" is rapidly growing. Gender discrimination after incubation period causes economic losses and pressures for animal rights. In order to overcome the problems, a lot of researches are conducted to sex determination during embrional period before alloting the eggs into the incubator and during incubation period. This article focused on researches for determining the sex of the chicken embryo prior and during incubation and the existing methods which are commonly used in determining the sex of the day-old chicks after incubation.

Key Words: Sex determination, embryo, egg, laying hens

GİRİŞ

Tavuk yumurtasındaki embriyolar incelendiğinde; erkek/dişi oranının birbirine yakın olduğu bildirilmektedir (33, 50, 52). Tavuklar, geçmişte hem yumurtası hem de eti için beslenirken, günümüzde hibrit genotipler yalnızca eti veya yumurtası için beslenmektedir (15, 25). İhtiyaç fazlası günlük yaşta yumurtacı erkek civcivlerin büyütülmesi ekonomik olmadığı için kedi köpek maması vs. amaçlarla kullanılmaktadır. Etik açıdan, bu civcivlerin ticari olarak değerlendirilmesi veya itlaf edilmesi konusu üreticileri ciddi bir ikilem içerisinde bırakmaktadır. Yumurtacı civcivlerde cinsiyet ayırımının mümkün olan en erken dönemde yapılabilmesi için geçmişte çok sayıda araştırma yapılmıştır, günümüzde de artarak devam etmektedir (8). Bu araştırmalar 3 safhada yapılmaktadır; 1. Yumurta kuluçkaya konulmadan önce 2. Yumurtalar kuluçkaya konulduktan sonra 3. Günlük civcivlerde. Araştırmacılar amaçlarına ulaşabilmek amacıyla morfolojik, enzimatik ve moleküler metotlar kullanmaktadır.

İn ova yöntemlerde ideal cinsiyet belirleme kriterleri (43):

- Yöntem, yumurtalar kuluçkaya konulmadan önce uygulanabilmelidir.
- Yumurta kabuğuna ve içine zarar vermemelidir.
- Erkek blastoderm hücreleri ancak mantıklı amaçlar için kullanılmalıdır.
- Embriyo gelişimine olumsuz etkide bulunmamalıdır.
- Kuluçka randımanını etkilememelidir.
- Kullanılacak ekipman kolay sağlanabilir ve ekonomik olmalıdır.
- Aynı anda çok sayıda yumurtaya uygulanabilmelidir.
- Cinsiyet ayırımı kısa sürede yapılabilmelidir.
- Dişi civcivler olumsuz yönde etkilenmemelidir.
- Elde edilen civcivlerde fiziksel ve davranım olarak değişim olmamalıdır.
- Etik olarak kabul edilebilir olmalıdır.

¹Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Şehit Cem Ersever Caddesi 9/11 Gayret Mahallesi Yenimahalle/Ankara, Türkiye

*Sorumlu yazar: Hüseyin Göger, e-mail: huseyin.goger@tarim.gov.tr

Kuluçkadan Önce Cinsiyetin Belirlenmesi

Döllü yumurtalarda kuluçkadan önce blastodermal hücrelerinin içerisindeki cinsiyet kromozomları veya yumurtaların allantoik sıvılarındaki hormon seviyesi belirlenerek cinsiyet tespit edilebilmektedir.

Blastoderm hücreleri içerisindeki cinsiyet genleri:

Yumurta sarısı içerisinde bulunan blastoderm en iyi nasıl gözlemlenebileceğini araştırmacılar tarafından belirlenmiştir (30). Bu konuda doğru sonuçların elde edilebilmesi için taze yumurtada blastoderm yerinin tam olarak belirlenmesi önemlidir (21). Bazı araştırmacılar tarafından döllü taze yumurtalarda blastoderm yaklaşık olarak 40-60 bin hücreden oluştuğunu bildirilirken, bu sayının 32000 ile 42000 arasında olabileceği ifade edilmektedir (33, 61). Ultrasonografi yöntemi blastoderm yerinin belirlenmesinde güvenilir sonuçlar vermemesine rağmen nuclear resonance imaging (MRI) ile çok küçük olan blastoderm yeri tam olarak belirlenebilmektedir (46). Gereken analizler için az miktarda blastoderm hücresi (yaklaşık 4 ile 400 hücre) alınarak, cinsiyete özgü tekrarlayan gen dizileri PCR ile belirlenebilmektedir (28, 45).

Bu metotta, blastoderm dış çevresinden yaklaşık olarak 400 hücre biopsi ile alınarak, hücrelerden DNA örnekleri elde edilir. Örneklerde W kromozomu üzerindeki cinsiyet geni polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldıktan sonra *Xho1* enzimi ile kesilir. Elde edilen ürün agaroz jel içerisine konularak, etidyum bromür ile kontrast oluşturularak görsel hale getirilir (46). ZW kromozomu ihtiva eden dişi hücreler bant oluştururken, erkekler bant oluşturmaz. Bu metot uzun zaman, fazla işçilik ve pahalı ekipman gerektirmesine rağmen, embriyonun yaşamı ve kuluçka sonuçlarına olumsuz etkisi yok denecek kadar azdır.

Flow cytometry yöntemi ile blastoderm dış yüzeyinden alınan hücrelerde DNA analizi: Flow (akım) sitometri yönteminin temeli, hücre veya partiküllerin akmakta olan bir akışkanın içindeyken karakteristiklerinin ölçülmesine dayanmaktadır. Akım sitometrisi ile bir süspansiyon halindeki hücre ya da partiküller, lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir; hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özellikleri olabileceği gibi; hücreye bağlanan çeşitli fluorokromlar da olabilir. Böylece hücre ya da partikülün immunfenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir (18, 34, 35).

Bu metotla cinsiyet kromozomunun DNA'sı analiz edilerek, Z veya W taşımasına göre cinsiyet belirlenmektedir. Erkeklerde bulunan ZZ kromozomu dişilerde bulunan ZW kromozomuna göre yaklaşık %2 daha büyüktür (56). Hücrelerden elde edilen DNA, florokrom propidyum iyodür ile boyandıktan sonra flow cytometry yöntemi ile nükleik asit miktarı ölçülür (82). Bu metodun doğru ve basit olduğu, çok sayıda yumurtaya uygulanabileceği belirtilmiştir. Bu metodun uygulandığı yumurtalarda embriyo gelişimi ve kuluçka sonuçlarının biyopsi yapılmamış embriyolarla aynı olduğu görülmüştür. Kullanılan ekipmanın pahalı ve çok özel olması nedeniyle uygulama alanının kısıtlı olduğu bildirilmiştir.

Infrared spektroskopi: Tavuk kan hücreleri, standart DNA içeriğinin belirlenmesi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Sitogenetik veriler Z cinsiyet kromozomunun W kromozomunun yaklaşık iki katı büyüklüğünde olduğunu, buna bağlı olarak erkeklerde

bulunan ZZ kromozomu ile dişilerde bulunan ZW kromozomlarının DNA içerikleri arasında da farklılıklar olduğunu göstermiştir. Bu gerçeğe rağmen tavuk kanları, tam genom boyutunun belirlenmesinde erkek ve dişi ayrımı gözetilmeden kullanılmaktadır. Beyaz yumurtacılar da görüntü sitometrisi ile hücre çekirdeği ve ZZ/ZW kromozomları çözülerek, erkek ve dişilerde DNA içeriğinin farklı olup olmadığının belirlenmesi amacıyla bir araştırma yapılmıştır (55). Araştırmacılar önce hücre çekirdeğinde Z ve W kromozomları hakkında sayısal veriler elde etmek amacıyla Feulgen boyama tekniği kullanmışlardır. Nükleer ölçümlerde erkeklerin 2C değerlerinin dişilere göre 0.09 pg daha fazla olduğunu belirlemişlerdir. Doğrudan kromozomlar üzerinde yaptıkları araştırmada ise Z kromozomunun W kromozomuna göre %2 daha fazla DNA içerdiğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar genomlar arasında çok az olan DNA farklılıklarını görüntü sitometrisinin çözünürlük gücünden yararlanarak açıkça ortaya koymuşlardır. Tavuk kanlarının karşılaştırılmasında 2C değerlerinin standart veri olarak karşılaştırmalı sitometrik analizlerde kullanılabileceğini ifade edilmiştir.

Yumurta şekil indeksi: Yumurtalar kuluçkaya koyulmadan önce morfolojik ölçümler yapılarak civcivlerde cinsiyeti belirlemenin mümkün olduğu, burada en belirleyici ölçümün şekil indeksi olduğu bildirilmiştir (35, 36, 64, 85). Bazı kanatlı türlerinde yumurta şekil indeksi ile civciv cinsiyeti arasında yüksek korelasyon olduğunu ifade edilmiştir (24, 51, 73, 83). Süper Nick beyaz yumurtacı damızlıklar üzerinde yapılan bir araştırmada şekil indeksi yüksek olan yumurtalardan dişi, düşük olanlardan erkek civciv elde edildiği bildirilmiştir (85). Bazı araştırmacılar tarafından yuvarlak uçlu yumurtalardan dişi, sivri uçlu yumurtalardan erkek civciv elde edildiği ifade edilirken (48, 49, 58), bazı araştırmacılar ise yumurta şekil indeksi ile civciv cinsiyeti arasında bir ilişkinin olmadığını vurgulamışlardır (1, 2, 12, 44, 47, 53). Kanada kazı (*Branta canadensis*) yumurtaları üzerinde yapılan bir araştırmada; yumurta şekil indeksi ile embriyo cinsiyeti arasında korelasyon olduğu belirlenmiştir (10).

Hormon analizi: Kanatlılarda anadan gelen hormonların embriyonun gelişimine olumlu etkide bulunduğu, hormonların erkek ve dişi embriyolarda farklı düzeylerde olduğu, bu farklılıktan yararlanılarak cinsiyet ayrımının yapılabileceği ifade edilmiştir (59). Araştırmacılar cinsiyet belirlemede tek başına yeterli olan yumurta sarısındaki androjen hormonu miktarının ananın sosyal sıralamasına göre değiştiğini bildirmişlerdir. Dominant tavukların, yumurta sarısına erkek embriyolar için dişi embriyolara göre önemli ölçüde fazla miktarda testosteron hormonu aktardığını belirtmişlerdir. Sosyal sıralaması düşük olan tavuklarda ise dominant tavuklardaki durumun aksine, dişi embriyo taşıyan yumurtalarda testosteron miktarının daha fazla olduğu ifade edilmiştir. Tavuk gibi çok eşli türlerde erkeklerin üreme başarısının tavuklardan daha değişken olduğu, tavukların sosyal sıralaması ile analık kapasitesinin negatif etki içerisinde olduğu belirtilmiştir.

Kuluçka Döneminde Cinsiyetin Belirlenmesi

Kuluçkaya koyulan döllü yumurtalardan DNA veya hormon örnekleri alınarak analizler yapılmakta ve embriyo safhasında civcivlerin cinsiyeti belirlenebilmektedir.

Östrojen hormonu seviyesi: Ovaryumda yumurtanın ilk oluşumu sırasında tavuktan yumurta sarısına östrojen hormonu geçmektedir (5, 6, 22, 65). Anadan gelen östrojen hormonu seviyesi embriyonun ilk gelişim

evresinde azalır ve bunun yerini cinsiyete ait hormonlar alır ve embriyo büyürken her cinsiyet kendi hormonunu üretir. Büyümekte olan dişi embriyolarda hormonlar farklılaşmaktadır (20). Kuluçkaya koyulan yumurtalardan (15-17 günler arasında) 20 µl allantoik sıvı alınarak, östrojen radio-immune yöntemi ile analiz edilerek cinsiyet belirlenebilmektedir. Bu metodun ticari olarak kullanılabilmesi amacıyla çalışmalar devam etmektedir. Döllü yumurtalar kuluçkaya koyulduktan 7 ile 14 gün sonra allantoik sıvıda cinsiyet hormonları belirli seviyelerde bulunmaya başlar ve miktarı ölçülebilir (31, 63). Erkek embriyoların allantoik sıvısındaki oestradiol seviyesi ölçülemez düzeydedir veya 42 pg/ml'nin altındadır. Dişi embriyolarda ise oestradiol seviyesi 113 ile 830 pg/ml arasındadır. Geliştirilen yöntemlerle allantoik sıvısında 40 pg/ml'nin altında oestradiol bulunan yumurtalar kuluçkanın geç dönemlerinde kolaylıkla belirlenerek, ayıklanabilir. Bu yöntemle saatte birkaç bin yumurtanın östrojen seviyesini ölçmek mümkündür. Yumurtalardan allantoik sıvı örnekleri almak amacıyla açılan deliklerin embriyo gelişimini ve kuluçka randımanını etkilemediği bildirilmiştir (21, 37, 63).

Embriyolarda cinsiyeti belirleyebilmek amacıyla kuluçkaya koyulan kahverengi yumurtalardan 7 ile 10. günler arasında allantoik sıvı örnekleri alınarak, östradiol, estron sülfat ve testosteron seviyelerini enzim immunoassay (ELISA) yöntemi ile belirlemek mümkündür (84). Araştırmacılar allantoik sıvı örneklerindeki estron sülfat seviyesinin dişilerde (1/4 0.312 ng/ml) erkeklere (1/4 0.110 ng/ml) göre önemli miktarda ($P<0.001$) fazla olduğunu ve cinsiyetin 9. günde güvenilir bir şekilde belirlenebileceği belirtilmiştir.

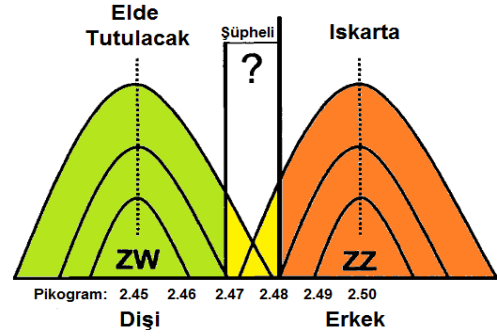
Kromozom hücrelerinde mikroskopik analiz: Tavuk kromozomları üzerinde yapılan ilk çalışmalarda; 39. çift kromozomun cinsiyet kromozomu olduğu, erkeklere eşit ölçüde geliştiğini (homogenetik, ZZ), dişilerde ise bunlardan bir tanesinin daha kısa olduğu belirlenerek, buna W kromozomu adı verilmiştir (heterogametik, ZW) (39). Kromozom hücrelerinin mikroskopik olarak analiz edildiği bu metotta, başlangıç materyali olarak canlı lökosit veya gelişmekte olan tüylerden alınan fibroblast hücreleri kullanılabilir (77, 80). Bu hücreler doku kültürleri içerisinde büyürken, colchisin ile metafaz safhasında hücre bölünmesi durdurulur. Hipotonik tuzlu su ile muamele edilerek, parçalanır ve buradan hücreler alınır ve hücreler boyandıktan sonra mikroskop altında cinsiyet kromozomları incelenir (9). Kromozom sayımı ve ölçümü embriyo hangi yaşta olursa olsun polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve endoskopi ile yapılabilir (41, 72). Eğer kromozomlarda anormallikler yok ise cinsiyet ayrımı doğru şekilde belirlenebilir (29, 74). Cytogenetic yöntemle cinsiyet ayırımında kullanılacak örneklerin bakteri ve mantar taşınamaması ve taze olması gerekmektedir. Ancak bu metodun pahalı olması, uzun zaman ve kültür tekniklerine ihtiyaç duyulması nedeniyle ticari olarak kullanım alanı yoktur. Metot embriyonun yaşı ve büyüklüğü ne olursa olsun uygulanabilir fakat kan örneklerinin alınması ve karmaşık işlemlerin uygulanması nedeniyle hantal görünmektedir (14).

Evcil tavuklarda (*Gallus gallus domesticus*) erkek (ZZ) cinsiyet kromozomlarının dişilere (ZW) göre %2 daha fazla ağırlıkta DNA hücresi içerdiği bildirilmiştir (60). Araştırmacılar farklı hat ve ırklarda da DNA hücre sayısının farklılıklar gösterdiğini, bu özelliklerden faydalanılarak hat ve ırkların belirlenmesinin mümkün olduğunu göstermişlerdir (Tablo 1).

Tablo 1 Dört farklı tavuk genotipinde erkek ve dişi genom ağırlıkları (pikogram) arasındaki farklılıklar (60)

	Erkek	Dişi	Farklılık(%)
R×B	2.50	2.44	2.70
NH	2.50	2.45	2.30
WL	2.45	2.40	1.90
RIR	2.44	2.40	1.50
X±Sx	2.47±0.03	2.42±0.03	2.10±0.5

R: Rhode Island Red, B: Barred Rock, NH: New Hampshire, WH: White Leghorn.



Şekil 1 Kromozom hücrelerinin ağırlığına göre cinsiyetin belirlenmesi

Ultrasonografi: Bu yöntemin temeli; kuluçka makinesine koyulmuş, döller yumurtalara uygulanan yüksek frekanslı ses dalgalarının (ultrason) farklı doku yüzeylerinden yansımalarının (eko) saptanmasına dayanmaktadır. Gerçek zamanlı B-mod ultrasonografi kullanarak yumurta içerisindeki embriyonun morfolojik yapısı ve gelişim safhası belirlenebilmektedir. Metodun başarısı ultrasonik dalgaların yumurta içerisine girebilmesine bağlıdır, bu nedenle yumurta kabuğu üzerine yapay akustik vitrin yapılmasına ihtiyaç vardır. Araştırmacılar uygulamış oldukları çalışmalarda yapay vitrin uygulamasında en iyi sonucu; yumurta kabuğunu diyaliz zarı, sıradan bant veya yumurta kabuğu allogreftleri ile kaplayarak elde ettiklerini bildirmişlerdir. Vitrin uygulamasının kuluçka sonuçlarına olumsuz bir etkide bulunmadığı vurgulanmıştır (68).

Embriyodaki kalp atım sayısı: Kalp atım sayısı yetişkin tavuklarda ve embriyoda cinsiyete göre farklılıklar göstermektedir (79). Kuluçkadaki yumurtaların embriyolarında 15. günden önce kalp seslerinin doğru olarak alınması oldukça zordur. Yetişkinlerde olduğu gibi, 15 ile 20 gün arasındaki embriyolarda da dişilerin kalp atım sayısı erkeklere göre daha fazladır. Yüksek kuluçka sıcaklığında (39.4°C'de 15-45 dakika) dakikada kalp atım sayısı her iki cinsiyette de artar bu durumda farklılığı tespit etmek mümkün değildir (32). Kalp atım sayısının bazen erkek ve dişilerde aynı olması nedeniyle, embriyoda cinsiyet ayrımı için pratik bir uygulama olmadığı bildirilmektedir.

Kuluçka döneminde ısı değişimi: Bazı sürüngenlerde, döllerin erkek veya dişi olarak gelişmesi ortam sıcaklığına bağlıdır (11). Kanatlı yumurtaları üzerinde yapılan benzer çalışmalarda kuluçka sıcaklığının 38°C'nin üzerine çıkarılması durumunda civcivlerin kafasında, eklemlerinde ve iç organlarında kusurlar oluştuğu, sıcaklığın 39°C'nin üzerine çıkarılması durumunda embriyonun öldüğü bildirilmiştir (3, 42, 70, 62). Kuluçka sıcaklığının normal değerlerden biraz düşürülmesi durumunda, kuluçka süresinin uzadığı, embriyolarda gözle

görülür bir değişimin olmadığı görülmektedir (71, 81). Sürüngenlerin tersine, kuluçka sıcaklığının normal değerlerin dışında tutulmasının suda ve tavuklarında da içinde bulunduğu karada yaşayan kanatlılarda her iki cinsiyette de oranları değiştirmedeği belirlenmiştir. Fakat Avustralya'da yaşayan brush-hindi (*Alecture latham*) kuluçkadaki yumurtalarını ısıtmak amacıyla çevresinde çürümekte olan bitkilerden çıkan ısı ve benzeri doğal ısı kaynaklarını kullanmaktadır. Kuluçka makinesine koyulan brush-hindi yumurtaları üzerinde yapılan bir araştırmada normal şartlarda erkek dişi oranı 1:1 iken, ısının düşmesi durumunda dişi embriyoları, yükselmesi durumunda erkek embriyolarda ölüm oranının arttığı belirlenmiştir (19).

Kan damarları: Almanya'nın Dresden Üniversitesi'nde veteriner hekim, kimyager, mühendis ve fizikçilerden oluşan araştırma ekibi spektroskopik teknikler kullanarak yumurta içerisindeki embriyonun kan damarlarını temel alan çalışmalarla cinsiyetin %95 oranında doğru olarak belirlenebildiğini bildirmişlerdir (23). Döllü yumurtalar kuluçkaya konulduktan üç gün sonra kan damarları oluşmaya başlamakta, fakat sinir hücreleri oluşmamaktadır. Araştırmacılar embriyonun acı hissetmeyeceğini kabul ederek, bu dönemde öldürülmesinin daha uygun olacağını düşünmüşlerdir. Yöntemde lazer ışını ile yumurtanın üst kısmında daire şeklinde küçük bir delik açılarak, yumurta sarısı üzerindeki kan damarları ve minyatür haldeki kalbin atışı izlenebilmektedir. Daha sonra yumurtalar spektrometre cihazına konularak, hızlı bir şekilde embriyo damarının biyokimyasal özellikleri görüntülenebilmektedir. Araştırmacılar erkek ve dişi embriyoların çıplak gözle ayırt edilmesinin mümkün olmadığını fakat bunun cinsiyet ayırımı yapabilmek amacıyla programlanmış bir bilgisayarda gözlenebildiğini ifade etmişlerdir. Birkaç dakika süren bir işlemle, erkek civciv içeren yumurtalar belirlenerek ayıklanmakta, dişi civciv içeren yumurtaların delikleri kapatılarak tekrar kuluçka makinesine konulmaktadır. Araştırmacılar istenmeyen embriyoların balık yemlerine veya şampuanlara katılarak değerlendirilebileceğini ifade etmişlerdir (17). Kuluçkadaki 3.5 günlük dömlü yumurtalarda embriyonun cinsiyeti Raman spektroskopisi kullanılarak belirlenebilmektedir (29). Araştırmacılar bu yöntemde embriyonun dış kısmındaki damarlarda dolaşan kanlarda spektrum analizi yaparak % 90 başarı ile cinsiyet ayırımı yapabildiklerini belirtmişlerdir. Bu yöntem ile erkek civcivlerin kuluçkadan çıkmadan önce, acı hissetmeden elemine edilebildiğini, yöntemin kuluçka sonuçlarına etkisinin yok denecek kadar az olduğunu ifade etmişlerdir.

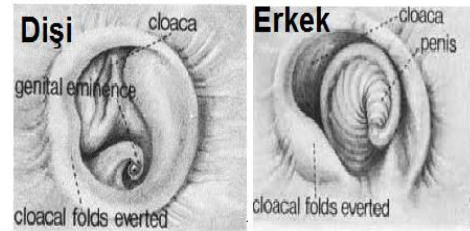
Dişi civciv üretimi için X-ray kullanılması: New Jersey Experiment Station (US)'de X-ray'in kuluçkadaki yumurtalar üzerine etkisini araştırmak amacıyla çalışmalar yapılmıştır (16). Bu araştırma sonuçlarına göre; kuluçkadaki dömlü yumurtalar uzun süre radyasyona maruz bırakıldığında civcivlerin %100'ü dişi olmakta ve bu dişi civcivlerin normal şartlarda elde edilenlerden daha hızlı büyüdüğü belirtilmiştir. Toplumda endişe ve çalışmalar konusunda olumsuz etki yapacağı göz önünde bulundurularak bu metotla başka bir araştırma yapılmadığı belirlenmiştir.

Kuluçkadan Sonra Cinsiyetin Belirlenmesi

Kuluçkadan yeni çıkmış civcivlerde cinsiyet ayırımı birkaç metotla yapılabilmektedir (75). En yaygın kullanılanlar; geriye (kloak), tüy rengine ve kanat telek tüylerinin uzunluğuna bakarak yapılan cinsiyet ayırma

yöntemleridir. Genetik çalışmalar, cinsiyete bağlı genlerin kısmen fenotipik özellikler ile ilişkili olduğunu göstermiştir (40). Ancak bu özellikler her zaman tam belirleyici olamaz, dolayısıyla morfolojik olarak cinsiyet ayırımında güvenilir markerler olarak değerlendirilemezler (76).

Kloak (vent) yöntemi: Bu yöntem ilk olarak Japon bilim adamları tarafından tanımlanmıştır (54). Günlük civcivlerde kloaka bakılarak cinsiyet ayırımının yapıldığı bu yöntem; Japon Yöntemi olarak ta bilinir. Kloakın iç kısmı bir alet ile görüntülenerek de bu işlem yapılabilmektedir. Erkek civcivlerde gelişmemiş penis; barsağın dışı açıldığı bölümün hemen altında, kloakın karına doğru olan kısmında koni biçiminde bir yükselti olarak görünürken (Şekil 1), dişi civcivlerin aynı bölgesinde yarım küre şeklinde bir oluşum vardır. Bu metot çok fazla deneyim ve beceri gerektirdiğinden, bazıları bu işi iyi yapanları sanatçı olarak kabul etmektedirler. Kloaktan cinsiyet ayırımının civcivlerde büyük strese neden olduğu bildirilmiştir (78). Yapılan bazı araştırmalarda, bu yöntemin erken dönem civciv ölümlerini %1.0 arttırdığı tespit edilmiştir (63). Kloakta yumurta ile bulaşan virüs veya bakteriler bulunabileceği için, mekonyum (ilk kaka) ile civcivden civcive mikrobiyal bulaşma olabilmektedir (13). Birçok sakıncalı yönü olmasına rağmen, günümüzde bu metodun kullanımı yaygın olarak devam etmektedir (21, 67).



Şekil 2 Kloak yönteminde belirleyici olan penisdir

Hızlı ve yavaş tüylenme özelliği: Günlük yaştaki civcivlerin kanatlarındaki telek ve örtü tüylerinin uzunluklarından yararlanılarak cinsiyet ayırımı yapılabilmektedir. Civcivler, örtü ve telek tüyleri aynı uzunlukta ise yavaş, farklı uzunlukta ise hızlı tüylenme özelliği göstermektedir (4, 7, 26, 76). Doğal olarak legorn hatların tamamı hızlı, Amerikan ve diğer ağır ırkların çoğu yavaş tüylenme özelliği göstermektedirler. Tüylenme hızını, cinsiyete bağlı genler belirlemektedir ve yavaş tüylenme hızlı tüylenmeye dominanttır (13). Günlük yaştaki civcivlerin kanat telekleri ve örtü tüyleri arasındaki uzunluk farkı kolaylıkla ayırt edilebilir. Bu özellikten faydalanılarak, çok sayıda ırkta cinsiyet ayırımı yaygın olarak yapılabilmektedir (66).

Tüy rengi: Kahverengi yumurtacı bazı hatların günlük hibrit civcivlerinde cinsiyete bağlı genlerden yararlanılarak, tüy rengine göre cinsiyet ayırımı yapılabilmektedir. Hibritlerin vücut tüy rengi, boyun, baş ve sırtlarındaki farklı lekeler bu amaç için kullanılmaktadır (13, 27, 76). Gümüş renkli tavuk ile altın renkli horoz çiftleştğinde; altın renkli dişi ve gümüş renkli erkek civcivler elde edilmektedir. Tavuk tüylerinde çubuk oluşturan genlerde cinsiyete bağlıdır ve dişilerde belirgin iken, erkeklerde belirgin değildir (57).

Bacak rengi: Barred Plymouth Rock ırkı civcivlerde cinsiyetin bacak rengine göre belirlenebildiği bildirilmiştir (69).

Günlük civcivlerde bacak rengi koyu olanlar dişi, açık olanlar erkektir (Şekil 2).



Şekil 3 Bacak rengi koyu olanlar dişi, açık olanlar erkek civciv olarak değerlendirilmektedir.

Dijital ölçek kullanarak: Günlük civcivlerin bacak ve ayak şekilleri bir ped üzerine üç boyutlu olarak yansıtılarak dijital yöntemlerle bir skala oluşturulmakta, erkek civcivlerde skala değeri dişilere göre daha yüksek olduğu için cinsiyetin belirlenmesi mümkün olmaktadır (38). Ancak bu yöntem beyaz yumurtacı Legorn hibritlerde istenen sonucu vermemiştir. Yöntem, hobi için tutulan tavuk hatlarının belirlenmesinde ve insanların parmak izinin analiz edilmesinde kullanılmaktadır.

Günlük civcivlerde ultrasonografi: Günlük civcivlerde gonadlar Transkutanöz ultrason yöntemi ile görüntülenerek cinsiyet tayini yapılabilmektedir (43). Gonadlar dorsa-ventral ve latero-lateral pozisyonda görüntülenmesi mümkün değildir. Testis ve yumurtalıklar çok küçük yapıda olduğu için ultrason görüntülenmesi oldukça zordur fakat trans-intestinal ultrasonography yöntemi ile daha net görüntü sağlanarak cinsiyet ayırımı daha isabetli yapılabilmektedir. Bu zahmetli metot büyük çaplı üretimler için uygun değildir ve cross- cotamination bakımından risk oluşturmaktadır.

SONUÇ

Civcivlerde cinsiyetin erken dönemde belirlenebilmesi amacıyla çok sayıda araştırmacının olması, bu konunun ne kadar önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Araştırmaların çoğunda çok başarılı sonuçlar elde edilmesine rağmen, pahalı veya zaman zaman alıcı olması nedeniyle sektörde uygulama alanı bulamamıştır. Belki de şu anda pahalı ve zaman alıcı dediğimiz yöntemlerden biri küçük değişikliklerle sektörün kurtarıcısı olacaktır. Bu konuda yapılan araştırmaların başarıya ulaşacağı ve mevcut metotların yerini alacağı günler yakındır. Döllü yumurtalar kuluçkaya konulmadan önce embriyoda cinsiyetin belirlenmesi durumunda; kuluçka işletmelerinin ekonomik kayıpları önemli ölçüde azalacak ve hayvan hakları yönünden tüketicilerin tavukçuluk sektörüne bakış açısı da olumlu yönde etkilenecektir.

KAYNAKLAR

1. Ahn, D. U., Kim, S. M., Shu, H., 1997. Effect of Egg Size and Age of Hens on the Solids Content of Chicken Eggs. *Poultry Sci.*, 76: 914-919.
2. Arias, J. L., Cataldo, M., Fernandez, M. S., Kessi, E., 1997. Effect of Beta-Aminopropionitrile on Eggshell Formation. *British Poultry Sci.*, 38: 349-354.
3. Baarendse, P. J. J., Debonne, M., Decuyper, E., Kemp, B., Van Den Brand, H., 2007. Ontogeny of Avian Thermoregulation from a Neural Point of View. *World's Poult Sci.*, 63 (02): 267-276.

4. Bacon, L. D., Smith, E., Crittenden, L. B., Havenstein, G. B., 1988. Association of Slow Feathering (K) and an Endogenous Viral (env21) Gene on the Z Chromosome of Chickens. *Poultry Sci.*, 67:191-197.
5. Badyaev, A. V., Acevedo Deaman, D., Navara, K. J., Hill, G. E., Mendoca, M.T., 2006. Evolution of Sex-Biased Maternal Effects in Birds: III. Adjustment of Ovulation Order Can Enable Sex-Specific Allocation of Hormones, Carotenoids, and Vitamins. *Journal of Evolutionary Biology*, 19: 1044-1057.
6. Bennovitz-Fredericks, Z. M., Kitaysky, A.S., Wingfield, J. C., 2005. Steroids in Allantoic Waste: An Integrated Measure of Steroid Exposure in Ovo. *Annales of the New York Academy of Sciences*, 1046: 204-213.
7. Bermudez, A. J., Steward-Brown, B., 2003. Disease Prevention and Diagnosis. In: Saif, Y. M., Barnes, H. J., Glisson, J. R., Fadly, A. M., Mcdougald, L. R., Swayne, D. E. (Eds) *Diseases of Poultry*, 11th ed. Iowa State Press, Ames, Iowa, USA, 17-55.
8. Bezzel, E., Prinzinger, R., 1990. *Ornithologie*, 2. Aufl. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, p. 325.
9. Bloom, S. E., 1969. A Current List of Chromosome Numbers and Variations for Species of the Avian Subclass Carinatae. *Journal of Heridity*, 60: 217-220.
10. Bönner, B. M., Lutz, W., Redmann, T., Jäger, S., Reinhardt, B., Wissing, J., Knickmeier, W., Kaleta, E. F., 2004. Morphometric and Allometric Studies on Eggshells and Embryos of Free-Living Canada Geese (*Branta Canadensis* Linnaeus, 1758). *European Journal of Wildlife Research*, 50: 179-186.
11. Booth, D. T., 2006. Influence of Incubation Temperature on Hatching Phenotype in Reptiles. *Physiology and Biochemistry in Zoology*, 79: 274-281.
12. Burnham, W., Sandfort, C., Belthoff, J. R., 2003. Peregrine Falcon Eggs: Egg Size, Hatching Sex, and Clutch Sex Ratios. *Condor*, 105:327-335.
13. Card, L. E., Nesheim, M. C., 1966. The Structure of the Chicken and the Formation of The Egg. In: Card, L. E., Nesheim, M. C. (Eds) *Poultry Production*, 10th ed., pp: 30-65.
14. Cerit, H., Avanus, K., 2007. Sex Identification in Avian Species Using DNA Typing Methods. *World's Poult Sci.*, 63: 91-99.
15. Chambers, J. R., 1990. Genetics of Growth and Meat Production in Chickens. In: Crawford (Ed) *Poultry Breeding and Genetics*, Elsevier, Amsterdam. pp: 599-643.
16. Collignon, P., 1928. Beeinflussung des Geschlechts des Keimes im Brutei. *Deutsche Landwirtschaftliche Geflügelzeitung*, 31: 937-938.
17. Davies, J., 2016. Commercial chick sexing machine in development. *World Poultry*, 7: 8-11.
18. Dunphy, C. H., 2004. Applications of Flow Cytometry and Immunohistochemistry to Diagnostic Hematopathology. *Arch., Pathol. Lab. Med.* 128: (9):1004-1022.
19. Eiby, Y. A., Wilmer, J. W., Booth, D. T., 2008. Temperature-Dependent Sex-Biased Embryo Mortality in a Bird. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 275 (1652): 2703-2706.

20. **Eising, C. M., Muller, W., Groothuis, T. G.,** 2006. Avian Mothers Create Different Phenotypes by Hormone Deposition in Their Eggs. *Biological Letters*, 2: 20-22.
21. **Ellendorff, F., Klein, S.,** 2003. Current Knowledge on Sex Determination and Sex Diagnosis: Potential Solutions. *World's Poult Sci.*, 59 (1): 7.
22. **Engelhardt, Von, N., Groothuis, T. G.,** 2005. Measuring Steroid Hormones in Avian Eggs. *Annales of the New York Academy of Sciences*, 1046: 181-192.
23. **Ernest, D.,** 2016. German scientists seek way to end live chick shredding. [www. Buzzcraycray.com/ 2016/07/13/german-scientists-seek](http://www.buzzcraycray.com/2016/07/13/german-scientists-seek).
24. **Fiala, K. L.,** 1981. Sex Ratio Constancy in the Red-Winged Blackbird. *Evolution*, 35: 898-910.
25. **Flock, D. K., Seemann, G.,** 1993. Limits to Genetic Improvements of Broiler Stocks? *Archiv für Geflügelkunde* 57: 107-112.
26. **Flock, D. K., Preisinger, R.,** 1996. Federsexbare LSL. *Deutsche Geflügelwirtschaft und Schweineproduktion* 48: 22-26.
27. **Flock, D.K.,** 1999. Entwicklung der Reziproken Rekurrenten Selektion (RRS) in der LTZ-Legehennenzucht (1969-1999). In: Anonym, 40 Years of Layer Breeding in Cuxhaven. Jubiläumstagung, Bremen, 07.-08. Juli 1999, pp. 83-99.
28. **Fridolfsson, A. K., Ellegren, H.,** 1999. A Simple and Universal Method of Molecular Sexing of Non-Ratite Birds. *Journal of Avian Biology*, 30: 116-121.
29. **Galli, R., Preusse, G., Uckermann, O., Bartels, T., Krautwald-Junghanns, M. E., Koch, E., Steiner, G.,** 2016. In Ovo Sexing Of Chicken Eggs By Fluorescence Spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chem.*, 1-10.
30. **Gerlach, L.,** 1882. Über ein Verfahren, bei Horizontal Gelagerten Hühnereiern den die Keimscheibe Überdeckenden Bezirk der Eischale möglichst genau zu Bestimmen. *Sitzungsberichte der Physikalischmedizinischen Societät, Erlangen*, Heft 14: 167-180.
31. **Gill, V., Robertson, H. A., Betz, T.W.,** 1983. In Vivo Estrogen Synthesis by the Developing Chicken (*Gallus gallus*) Embryo. *General Comparative Endocrinology*, 49: 176-186.
32. **Glahn, R. G., Mitsos, W. J., Wideman, R. F. J.,** 1987. Evaluation of Sex Differences in Embryonic Heart Rates. *Poult Sci.*, 66: 1398-1401.
33. **Goldsmith, J. B.,** 1928. The History of the Germ Cells in the Domestic Fowl. *Journal of Morphology and Physiology* 46; reviewed in *Archiv für Geflügelkunde*, (1929) 3: 90-91.
34. **Goth, A., Booth, D. T.,** 2005. Temperature-Dependent Sex Ratio in a Bird. *Biological Letters*, 1: 31-33.
35. **Grashorn, M.,** 1987. Geflügelzucht. In: Scholtyssek, S. (Ed) *Geflügel*. Ulmer Verlag, Stuttgart, pp: 176-215.
36. **Groebbels, F.,** 1937. Das Ei. In: Groebbels, F. (Ed) *Der Vogel, Geschlecht und Fort-pflanzung*. Gebrüder Bornträger, Berlin. Bd. 2, pp: 253-392.
37. **Göger, H., Durmuş, İ.,** 2005. Östrojen seviyesinden yararlanarak yumurtadan çıkmadan önce civcivlerde cinsiyetin belirlenmesi. *Journal of poultry research*, 6 (1): 61-63.
38. **Hampl, A.,** 1992. The Number of Digital Pad Scales – A New Sex Character in The Chick? *Acta Veterinaria, Brno* 61: 93-98.
39. **Hance, R. T.,** 1926. Sex and the Chromosomes in the Domestic Fowl (*Gallus domesticus*). *Journal of Morphology and Physiology* 43; reviewed in *Archiv für Geflügelkunde* (1927) 1: 177-178.
40. **Hays, F. A., Sambardo, A. H.,** 1926. Physical Characters in Eggs in Relation to Hatchability. *Poult Sci.*; reviewed in *Archiv für Geflügelkunde*, (1927) 1: 317.
41. **Hoffmann, B.,** 2005. Geschlechtsdiagnose bei Vögeln mit Hilfe der Polymerase-Ketten-reaktion (PCR). *Vet. Med. Dissertation, University of Giessen*.
42. **Hutt, F. B.,** 1927. Abnormal Embryos In Relation To Mortality During Incubation. *Harper Adams Utility Poultry Journal* 13; reviewed in *Archiv für Geflügelkunde*, (1929) 3: 54-55.
43. **Kaleta, 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 Poult. Sci.*, 64: 391-399.
44. **Kilner, R. M.,** 2006. The Evolution of Egg Colour and Patterning in Birds. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 81: 383-406.
45. **Klein, S., Ellendorff, F.,** 2000. Localization of Xho 1 Repetitive Sequences on Autosomes in Addition to the Chromosome in Chickens and Its Relevance for Sex Diagnosis. *Animal Genetics*, 31: 104-109.
46. **Klein, S., Baulain, U., Rottika, M., Marx, G., Thielenbein, J., Ellendorff, F.,** 2003. Sexing the Freshly Laid Egg – Development of Embryos After Manipulation; Analytical Approach And Localization of the Blastoderm in the Intact Egg. *World's Poult Sci.*, 59: 39-45.
47. **Kopec, S.,** 1927. [Some Data Referring to Size, Shape, and Weight of Eggs in the Domestic Fowl]. In Polish Language, Reviewed in *Archiv für Geflügelkunde*, 1: 376-377.
48. **Kosba, M. A., Eid, S.M.,** 1983. Phenotypic and Genetic Correlation Between Egg Characters and Embryo and Chick Weights of Alexandria and Fayoumi Chickens. *Beiträge zur Tropischen Landwirtschaft und Veterinärmedizin*, 21: 453-458.
49. **Kumar, J., Shingari, B. K.,** 1969. Relationship of Size and Shape of Egg With Hatchability in White Leghorn Birds. *Indian Veterinary Journal*, 46: 873-876.
50. **Lambert, W. V., Knox, C. W.,** 1926. Genetic Studies in Poultry. I. The Sex Ratio in Domestic Fowl. *Biological Bulletin*, 51: 225-236.
51. **Ligon, J. D., Ligon, S. H.,** 1978. The Communal Social System of The Green Woodhoopoe in Kenya. *Living Bird*, 17: 159-197.
52. **Ligon, J. D., Ligon, S. H.,** 1990. Female-Biased Sex Ratio at Hatching in the Green Woodhoopoe. *Auk*, 107: 765-771.
53. **Mao, K. M., Sultana, F., Howliger, M. A., Iwasawa, A., Yoshizaki, N.,** 2006. The Magnum-Isthmus Junction of The Fowl Oviduct Participates in the Formation of the Avian-Type Shell Membrane. *Zoological Sciences*, 23: 41-47.
54. **Masui, K., Hashimoto, J.,** 1933. Sexing Baby Chicks. In *Journal Printing Company, Vancouver B. C., Canada*, cited from Phelps et al., 2003.

55. **Mendonça, M. A. C., Carvalho, C. R., Clarindo, W. R.**, 2010. DNA Content Differences Between Male and Female Chicken (*Gallus gallus domesticus*) Nuclei and Z and W Chromosomes Resolved by Image Cytometry. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 58 (3): 229–235.
56. **Mirski, A. E., Ris, H.**, 1951. The Desoxyribonucleic Acid Content of Animal Cells and Its Evolutionary Significance. *Journal of General Physiology* 34: 451-463.
57. **Molyneux, H.M.**, 1929. Sex Determination at Hatching. *Harper Adams Utility Poultry Journal* 15; Reviewed in *Archiv für Geflügelkunde* (1930) 4: 129.
58. **Mulder, J., Wollan, O.**, 1974. How to Sex an Egg [WebMd]. *Mother Earth News*, 25: 01.
59. **Müller, W., Eising, C. M., Dijkstra, C., Groothuis, T. G.**, 2002. Sex Differences in Yolk Hormones Depend on Maternal Social Status in Leghorn Chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 269 (1506): 2249-2255.
60. **Nakamura, D., Tiersch, T. R., Douglass, M., Chandler, R. W.**, 1990. Rapid Identification of Sex in Birds by Flow Cytometry. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 53: 201-205.
61. **Nandi, S., McBride, D., Blanco, R., Clinton, M.**, 2003. Sex Diagnosis and Sex Determination. *World's Poult Sci.*, 59: 8-14.
62. **Nichelmann, M., Tzschenske, B.**, 2002. Ontogeny of Thermoregulation in Precocial Birds. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 131: 751-763.
63. **Phelps, P., Bhutada, A., Bryan, S., Chalker, A., Ferrell, B., Neuman, S., Ricks, C., Tran, H., Butt, T.**, 2003. Automated Identification of Male Layer Chicks Prior to Hatch. *World's Poult Sci.*, 59: 33-38.
64. **Pike, T. W., Petrie, M.**, 2003. Potential Mechanisms of Avian Sex Manipulation. *Biological Reviews*, 78: 553-574.
65. **Pilz, K. M., Adkins-Regan, E., Schwabl, H.**, 2005. No Sex Difference in Yolk Steroid Concentrations of Avian Eggs at Laying. *Biological Letters*, 1: 318-321.
66. **Preisinger, R., Kühne, W.**, 1999. Legehennenzucht an der Schwelle zum nächsten Jahrtausend. 40 Jahre Legehennenzucht in Cuxhaven. Vorträge der Jubiläumstagung am 7.-8. Juli, 1999, Cuxhaven, S: 116- 123.
67. **Preisinger, R.**, 2003. Sex Determination in Poultry – a Primary Breeder's View. *World's Poult. Sci.*, 59: 54-58.
68. **Pugh, C. R., Peebles, E. D., Pugh, N. P., Latour, A.A.**, 1993. Ultrasonography As a Tool for Monitoring in Ovo Chicken Development. 1. Technique and Morphological Findings. *Poult Sci.*, 72: 2236-2246.
69. **Quinn, J. P., Knox, C. W.**, 1939. Sex Identification of Barred Plymouth Rock Baby Chicks by Down, Shank, and Beak Characteristics. *Poult Sci.*, 18(4): 259-264.
70. **Romanoff, A.L.**, 1960. *The Avian Embryo, Structural and Functional Development.* The Macmillan Company, New York.
71. **Romanoff, A. L., Romanoff, A. J.**, 1972. *Pathogenesis of the Avian Embryo.* Wiley-Interscience, London.
72. **Rühle, D. M.**, 2006. Untersuchungen zur Endoskopie juveniler Psittaziden unter besonderer Berücksichtigung der Geschlechtsorgane und ausgewählter biometrischer Befunde. *Vet. Med. Dissertation University of Giessen.*
73. **Ryder, J. P.**, 1983. Sex Ratio and Egg Sequence in Ring-Billed Gulls. *Auk*, 100: 726–728.
74. **Saefudin, Saar, W., Schmutz, M., Preisinger, R., Schüller, L.**, 2005. Chromosomal Aberrations and Early Embryonic Mortality in Laying Hens. *Archiv für Geflügelkunde*, 69: 146-150.
75. **Seemann, G.**, 2003. Organisational Framework of Hatcheries. *World's Poultry Sci.*, 59 (1) : 59-61.
76. **Smyth, J. R.**, 1990. Genetics of Plumage, Skin and Eye Pigmentation. In: Crawford, R.D. (Ed) *Poultry Breeding and Genetics*, Elsevier, Amsterdam, pp: 109-167.
77. **Stefos, K., Arrighi, F. E.**, 1971. Heterochromatic Nature of W Chromosome in Birds. *Experimental Cell Research* 68: 228-231.
78. **Stichnoth, O. J.**, 1950. Anleitung zur Geschlechtsbestimmung der Eintagsküken nach der japanischen Methode. Verlag Fritz Pfennigstorff, Stuttgart und Berlin, pp: 7-9, 31, 33-72.
79. **Stromberg, J.**, 1975. *A Guide to Better Hatching.* Stromberg Publ. Co. Iowa, USA, pp: 8-25.
80. **Takagi, N., Sasaki, M.**, 1974. A phylogenetic study of bird karyotypes. *Chromosoma*, 46 (1): 91-120.
81. **Thompson, J. B., Wilson, H. R., Voitle, R. A.**, 1976. Influence of High Temperature Stress of 16 Day Embryos on Subsequent Hatchability. *Poult Sci.*, 55: 892-894.
82. **Tiersch, T. R.**, 2003. Identification of Sex in Chickens by Flow Cytometry. *World's Poult Sci.*, 59: 25-32.
83. **Weatherhead, P. J.**, 1985. Sex Ratios of Red-Winged Blackbirds by Egg Size and Laying Sequence. *Auk*, 102: 298–304.
84. **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.
85. **Yılmaz-Dikmen, B., Dikmen, S.**, 2013. A Morphometric Method of Sexing White Layer Eggs. *Rev. Bras. Cienc. Avic.*, 15 (3): 203-210