

Östrojen Seviyesinden Yararlanarak Yumurtadan Çıkmadan Önce Cıvcıvlerde Cinsiyetin Belirlenmesi

Hüseyin GÖGER¹

İsmail Durmuş¹

ÖZET: Tavukçuluk sektöründe, günlük cıvcıvlerin cinsiyeti genellikle kloakadan, tüy renginden veya kanat tüylenme hızından yararlanılarak belirlenebilmektedir. Bu yöntemler uygulamadaki bazı zorluklar nedeniyle yerini yeni teknolojilerin kullanıldığı sistemlere bırakmaktadır. Kanatlılarda genler ve DNA zinciri üzerinde oluşturulan ve nükleik asitlerin en gelişmiş analitik metodunu kullanan moleküler cinsiyet ayırma yöntemi, kanatlılarda; cinsiyet ayırımı, cinsiyet kromozomlarının gelişimi ve transgenik tavuklar gibi alanlarda çalışmayı kolaylaştırmaktadır. Bu makalede yeni geliştirilen bir cihazın çalışma sistemi üzerinde durulmuştur. Bu cihaz dışı embriyoların allantoik sıvılarında bulunan östrojen hormonu seviyesini tespit edebilmektedir. Bahsedilen yöntemle geç dönem embriyolarından allantoik sıvı örnekleri toplanarak, bu sıvılardaki östrojen hormonu seviyeleri belirlenmekte ve sınıflandırılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Kanatlı, kuluçka, cinsiyet ayırımı, östrojen

Sex Determination Of Birds In Embryo In The Egg Before They Hatch By Means Of The Estrogen Level

ABSTRACT: In present schemes of commercial poultry sector, newly-hatched birds are usually sexed by vent identification, by sex-linked genes for plumage colour and feathering alleles. These traditional methods of sexing, however, are not desirable ones, due to various limitations in sexing efficiency and application. The molecular sexing method in poultry, which is based on the essence of life the gene and DNA sequence, utilizes the most advanced analytical method of nucleic acid, will facilitates the study of poultry in the fields such as the sex allocation theory, the evolution of the sex chromosome, the libraries of sex chromosome and transgenic chickens. In this article working system of a newly developed machine was focused. The basis of the proposed automated method for sexing poultry eggs before hatching is the detection of estrogens in the allantoic fluid of female embryos. In this method, after obtaining allantoic fluid samples from late-stage embryos, estrogen levels in these samples were determined and classified.

Key Words: Poultry, hatchery, sex determination, estrogen

GİRİŞ

Yumurta tavukçuluğunda, Dünya'da her yıl milyarlarca cıvcıv üretilmektedir. Cıvcıvlerin kuluçkadan sonra erkek ve dişi olarak ayrılması gerekmektedir. Dişi cıvcıvler yumurta üretimi için büyütülürken, erkek cıvcıvler hayvan haklarına uygun bir şekilde elden çıkarılmaktadır. İstenmeyen erkek cıvcıvlerin elimine edilmesi konusunda hayvan haklarına ve israf konularına yer veren yayınlar bulunmaktadır (6).

Kloakadan cinsiyet ayırımının bir takım sakıncalarından dolayı, günlük cıvcıvlerin fenotipik görüntülerinden yararlanılarak cinsiyet ayırımı tercih edilmektedir. Bu amaçla kanat tüylerinin gelişme hızından yararlanılarak cinsiyet ayırımı yapılabilmektedir (1)

Moleküler biyolojinin kullandığı tekniklerle dışilerde bulunan W kromozomundan yararlanılarak cinsiyet ayırımı yapılabilmektedir. Bu teknikte gen haritalarından, kopyaların ve proteinlerin genetik yapılarından faydalanılmaktadır (5).

Döllü olarak yeni yumurtlanmış yumurtaların blastoderminde Z ve W kromozomlarından yararlanılarak cinsiyet ayırımı yapılabilmektedir. Blastodermin bulunduğu nokta manyetik rezonans görüntüleme veya ultrasonografi teknikleriyle belirlendikten sonra örnek alınmaktadır. A PCR ile cinsiyet belirlemede 4 ile 400 arasında hücre belirlenmiştir (3).

Yumurta içerisinde cinsiyet belirlemenin avantajları şu şekilde özetlenebilir;

- Kuluçkada cıvcıvlerin yarısı elden geçtiği için zamandan kazanç sağlanır,
- Kloakadan cinsiyet ayırımına göre cıvcıvler daha az strese girer,
- Cinsiyet ayırımı sırasında oluşabilecek horizontal infeksiyonlar önlenir,
- Daha iyi cıvcıv kalitesi sağlanır ve üreticilere daha hızlı bir şekilde ulaştırılır (7).

Yeni tekniklerle günlük cıvcıvlerde cinsiyet ayırımı yerine, yumurta içerisindeki embriyoda cinsiyet ayırımı yapılabilmekte ve cıvcıvlerde elle yapılan cinsiyet ayırımı sırasında oluşan stres faktörleri de ortadan kalkmaktadır. Cıvcıvler hızlı bir şekilde işlemlerden geçirildiği için daha erken su ve yem tüketebilmektedirler.

Klasik Cinsiyet Ayırma Metotları

Günlük cıvcıvlerde cinsiyet ayırımı, 1920'li yıllarda kloakanın birinci veya ikinci kıvrımların keşfedilmesiyle birlikte bu çizgiler ve kıvrımların tipik özelliklerinden yararlanılarak yapılmaktadır. Kloakadan cinsiyet ayırımı, çok dikkat ve tecrübe isteyen bir sanattır. Cinsiyet ayırımı hızı artırıldığında, cıvcıvler daha hızlı bir şekilde yakalanır ve cinsiyetleri belirlenerek sınıflandırılır. Ayırımı hızı %1.4-1.8 arasında arttığında, elle yapılan işlemlerde cıvcıv verilen zarardan dolayı erken dönem cıvcıv ölümleri %0.5 ile %1.0 oranında artmaktadır.

Cinsiyet ayırımında yaygın olarak kullanılan diğer bir özellik ise yavaş tüylenme geni (K)'dir. Dişiler hızlı tüylenme geni, erkekler yavaş tüylenme geni taşıyorsa, günlük cıvcıvlerin kanatlarındaki örtü ve primer tüyler incelenerek cinsiyet ayırımı yapılabilir. Kanat tüylenme hızına göre cinsiyet ayırımı, kloakadan ayırma göre daha ucuzdur ve fazla bir uzmanlık gerektirmez. Yavaş tüylenme geni endogeneous virüsü ile yakından ilgilidir (12). Bu virüs damızlık stürülerdeki lymphoid leucosis'i immünolojik olarak tolare etmektedir (2). Bazı hatlarda tüy renginden faydalanılarak cinsiyet ayırımı yapılabilmektedir (11).

Cıvcıvlerde cinsiyet ayırımının maliyeti bir kişinin bir saatte ayırabileceği cıvcıv sayısına ve bir saatlik ücretine bağlı olarak değişmektedir. Cinsiyet ayırımının cıvcıv başına yaklaşık maliyeti çizelge 1'de üç farklı seviyede verilmiştir (8).

Yeni teknikler ile bu maliyetlerin kuluçkadaki makinelerde yapılırsa %86, kuluçkadan önce yapılırsa %50 azalacağı tahmin edilmektedir (8).

¹ Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü - Ankara

Çizelge 1: Cinsiyet Ayırma Maliyetleri

| Metot | Civciv Ayırma Ücreti | | |
|------------|--|-----------|-----------|
| | 20 €/Saat | 25 €/Saat | 30 €/Saat |
| | Ücretlere Göre Bir Civcivin Ayırma Maliyeti (Sent) | | |
| Kloaka | 2.5 | 3.1 | 3.8 |
| Kanat | | | |
| Tüylenmesi | 1.0 | 1.3 | 1.5 |
| Tüy Rengi | 0.6 | 0.7 | 0.8 |

Yumurta İçerisinde Cinsiyet Ayırma Metodunun Temeli

Yapılan araştırmalarda;

- Kalbin atım sayısı gibi fizyolojik özelliklere bakılarak,
- PCR yöntemiyle dişilerde bulunan W kromozomunu tespit ederek,
- Nükleer manyetik rezonans ile yumurtalık veya erbezlerinin anatomik olarak olup olmadığına bakılarak, cinsiyet ayrımı yapılabilmektedir.

Spectral imaging ve pattern recognition yöntemleri kullanılarak otomatik cinsiyet ayrımı yapılabilmektedir. Aynı renk kanat tüylerini ayırarak ve civcivlerin kanadındaki cinsiyet tüyleri belirleyebilmek amacıyla optik bir UW sistemi geliştirilmiştir. Kanat tüyü model analizi ile cinsiyeti belirleyebilmek için blob analyzing ve curvefitting modelleri geliştirilmiştir. Image processing ve automated feather allocation sistemleri için net sinyaller oluşturan optik sistemin sonuçları, kanat tüyleri arasında bariz bir fark olduğunu ortaya koymaktadır. Kuluçkadan sonra 100 civciv üzerinde uygulanan testlerin sonucunda curvefitting ile dişilerde %93, erkeklerde %94 doğruluk oranı ile cinsiyet belirlenmiştir (10).

Flow cytometry yöntemiyle Z ve W cinsiyet kromozomları arasındaki mesafe ölçülebilmektedir. Horoz kromozomları tavuklara göre %2 daha fazla segment içermektedir. Farklı hat ve soylar ortalama değeri farklı DNA ve farklı miktarda Z ve W kromozomuna sahiptir. Çok sayıda örnek üzerinde çalışıldığında her hat ve soy için ortalama bir genetik yapı ve cinsiyet belirlenebilmektedir. Bununla ilgili veriler çizelge 2'de verilmiştir (4).

Çizelge 2 : Dört Soyda Hesaplanan Genom Ölçüleri İle Erkek Ve Dişiler Arasındaki Farklılık (%)

| Soy | Erkek | Dişi | Fark (%) |
|--------------------------------|-----------|-----------|----------|
| Rhode Island Red x Barred Rock | 2.50 | 2.44 | 2.7 |
| 500 New Hampshire | 2.50 | 2.45 | 2.3 |
| SC White Leghorn | 2.45 | 2.40 | 1.9 |
| Rhode Island Red | 2.44 | 2.40 | 1.5 |
| Ortlama±SD | 2.47±0.03 | 2.42±0.03 | 2.1±0.5 |

Embrex'in geliştirdiği bu otomatik cinsiyet ayırma yönteminin temelini yalnızca dişilerin allantoik sıvılarında bulunan östrojenik bileşiklerin bulunması oluşturmaktadır. Ticari olarak piyasada bulunan RIA kiti kullanılarak 17 günlük broiler embriyolarının allantoik sıvılarında estradiyol seviyesi ölçülemez düzeydedir veya 42 pg/ml 'nin altındadır. Dişi embriyoların allantoik sıvılarındaki öströdiyal seviyesi 113 ile 830 pg/ml arasındadır. Bu miktar erkeklerde ölçülebilen miktarın en az 3 katıdır. 490 adet allantoik sıvı örneği üzerinde yapılan bir çalışmada östrojen seviyesinin kanatlılarda cinsiyet ayrımı için kullanılabilecek çok iyi bir madde olduğu görülmüştür. Allantoik sıvı içerisindeki östrojen, sülfat veya glucuronide bileşikler halinde. Östrojeni serbest hale getirebilmek amacıyla allantoik sıvı; glucuronidase veya sülfat ile muamele edilir. Kuluçka koşulları, hat ve sürü yaşına bağlı olarak 13-18 günlük embriyoların allantoik sıvılarında östrojen olup olmasına göre erkek ve dişiler belirlenebilmektedir. Bu metodun detayları şu şekilde özetlenebilir (6).

Allantoik Sıvı İçerisindeki Östrojenik Bileşiklerin Belirlenmesi

Otomatik cinsiyet ayrımı için geliştirilen Live sensor cihazı allantoik sıvı içerisindeki östrojenik bileşikler belirlenmektedir. Live sensör E.coli β galaktosidase ile östrojen elementlerinin bağlanmasını sağlamaktadır. Cihaz insan östrojen reseptörü için belirleyici maya taşıyan, genetik olarak değiştirilmiş mayaları etkilemektedir. Maya hücreleri aynı zamanda E.coli glukononidaz açığa çıkarır ve salgılar. (Bu enzim, östrojen-glukononidaz bağlarını tutar). Allantoik sıvı içerisinde östrojen-glukononidaz bileşiminden gelen östrojen glukononidaz enzimi ile serbest hale gelir. Glukononidaz maya tarafından salgılanmış veya maya içerisine ilave edilmiş olabilir. Östrojenin olması durumunda; östrojen tutucular, östrojene tepki veren elementleri ve haberci genin kopyasını yapmaya başlar. Allantoik sıvının içerisindeki östrojenin yoğunluğu haberci genlerin seviyesi ile ilgilidir. Haberci genin bir ürünü olan β -galaktosidazın aktivitesi O-nitrophenyl-beta-D-glaktosifranaside (ONPG) ile mayadan etkilenerek, sarı kolorimetrik sinyal veren ürünlerin ölçülmesi sağlanır. Live sensör östrojen içerisindeki femtemolor picomolar seviyelerini belirleyebilir. Live sensör mayanın cinsini fırıncılıkta yaygın olarak kullanılan maya cinsleri (Sacc. cerevisiae) ile karşılaştırır. Live sensör 4 UL allantoik sıvı kullanarak erkek ve dişi embriyoları ayırt edebilir. Otomatik ayırıcı cinsiyet ayırmanın daha isabetli olması için 20 UL sıvı kullanılmaktadır. Live sensör ile laboratuvar şartlarında yapılan cinsiyet ayrımında %100 başarı sağlanmıştır (6).

Allantoik Sıvının Alınması

Allantoik sıvı kanatlı embriyolarında azotlu metabolizma için orta derecede salgi çıkaran bir sıvıdır. Allantoik sıvı kuluçkanın 5. gününden itibaren oluşmaya başlar. Kuluçkanın 13. gününde maksimum seviyeye ulaşır. Nem kaybına bağlı olarak hacim azalır. Kuluçkanın 18. gününde yumurta kabuk iç zarı, dış zarı ve chorioallantoik zarı tarafından yayılan allantoik sıvının miktarı 1-2 ml ye ulaşır. Embriyolu yumurtada allantoik sıvı dış yüzey ile tamamen sarılmış olmasına rağmen yumurtanın üst kısmında yer alan hava kesesinin altında toplanmış durumdadır. Buradaki toplanma verçekimine, yumurta sarısı ve embriyonun ağırlığına bağlı olarak değişmektedir. Yumurta dik durumdayken doğru bir şekilde allantoik sıvı örneği almak, hava kesesi durumu yumurtadan yumurtaya değiştiği için zordur. Yer çekimi allantoik sıvının belirli bir bölgede birikmesini sağlar. Yumurta yan çevrildiğinde allantoik sıvı yine üst kısımda kabuğun hemen altında toplanmaktadır. Yumurta bu pozisyonda iken live sensör ile 20 UL sıvı örneği almak çok kolaydır. Embrex ticari broiler yumurtalarında otomatik olarak allantoik sıvı alabilen bir makine geliştirmiştir. Optimum örnek almanın %96'sı, örnek alınacak kısmın uzunluğuna, derinliğine, iğnenin tipine ve vakum oranına bağlıdır (6).

Otomatik Cinsiyet Ayırma Modeli

Embrex şu anda testleri yapılan, saatte 5000 yumurta işleyebilen ticari bir makine geliştirmiştir. Bu makine, bilgisayar ağına bağlı 3 bağımsız bölümden oluşmuştur. Allantoik sıvı örneğini birinci bölüm alır. Kuluçkanın 15 ile 21 günleri arasında kuluçka makinesinden elle alınan yumurtalar, taşıyıcı bantlar üzerine konur. Optik sensör ile dömlü yumurtaları belirledikten sonra, yumurta yerleştiriciler vakumlu tutucu ile yumurtaları yerleştirir. Yumurta yerleştiriciler yumurtaları yan olarak bırakır. Daha sonra iğneler, yumurtanın orta noktasından ve uygun derinlikten 20 UL allantoik sıvı örneği alırlar. Alman sıvı örnekler iyi sıkıştırılmış ve ısıtılmış barkotlu plastik şablonlara aktarılır. Her şablon yaklaşık 2500 adet bölüm içerir. Bu bölümler yumurta tablaları ile aynı barkot numarasını içerirler. İğneler, her yumurtadan örnek alındıktan sonra temizlenir. Yumurtalar, barkotlu yumurta tablalarına tekrar yerleştirilir. Tahli şablonları düzgün bir şekilde raf taşıma arabalarına aktarılır. Allantoik sıvı taşıyan örneklerle yumurta tablalarındaki barkot numaraları bilgisayarda eşleştirilir (6).

İkinci kısım otomatik tablillerin yapıldığı kısımdır. Bir teknisyen tarafından örnekleri taşıyan araba, otomatik tahlil yapılan bölüme alınır. Arabalar bir taşıyıcı sistemle dağıtıcı başın altına giderler. Dağıtıcı baş her bölümün içerisine 30 UL live sensör belirteci ilave eder. Belirteç ilavesi her şablon için 5-6 dakika sürer. Daha sonra şablonlar ilerleyerek çevre kontrollü odalarda yaklaşık 4 saat inkübasyon için bekletilir. Mayadan etkilenen ONPG maddesi otomatik olarak bütün bölümlere ilave edilerek renk oluşumu için 30 dakika beklenmektedir. ACCD kamçı bütün bölümleri tarayarak erkek ve dişi olanları belirler. Bu bilgiler yumurta tablalarına gönderilecektir. Taşıyıcı arabaların üzerinde bulunan örnekler otomatik olarak temizlenir ve dezenfekte edilerek tekrar kullanıma hazır hale gelir. Üçüncü bölüm yumurtaları cinsiyetlerine göre sıralar, erkek civcivli yumurtaları ayırır, boşalan yerleri dişi civcivli yumurtalar ile doldurur. Dişi civcivli yumurtalar sonra in ovo aşılansarak çıkış tablalarına yerleştirilir. Bilgisayar hangi yumurtanın erkek civcivli olduğunu bilir. Barkotlu olanlar dişi olup, bu bilgiler bilgisayarda saklanır (6).

Kuluçkaya Etkisi

Otomatik cinsiyet ayırma işleminin kuluçka ve civciv performansına etkisini belirlemek amacıyla çalışmalar yapılmıştır. Bu işlem yumurtalarda iki delik oluşturmaktadır. Bunlardan bir tanesi sıvı örnek alınırken, diğeri aşı yapılırken oluşmaktadır. Bu işlemlerin kuluçkaya etkisini araştıran bir çok çalışma yapılmıştır. İlk çalışmalarda, alınan yumurta örneklerindeki delik kapatılmıştır. Ticari broiler yumurtaları kuluçkanın 16. gününde biz ile delinerek tekrar kuluçka makinesine konulmuştur. 19. günde de inovoject sistem uygulanmıştır. Bu iki deneme sonuçlarına göre 16. günde oluşan delik, kuluçka sonuçlarında yaklaşık %2'lik bir azalmaya neden olmuştur (Çizelge 3). Deligin kapatılması kuluçka sonuçlarının iyileşmesi yönünde bir etki yapmamıştır (6).

Çizelge 3: Otomatik Cinsiyet Ayırımında Açılan Deligin Kapatılmasının Kuluçka Sonuçlarına Etkisi

| Muamele | Deney 1 Kuluçkadaki Canlılık (%) | Deney 2 Kuluçkadaki Canlılık (%) | Ortalama | Toplam Yumurta (N) |
|---------------------------|--|--|----------|-----------------------|
| Kontrol | 95.8 A | 96.0 | 95.9 | 5145 (36) |
| Delinmiş | 93.7 B | 94.3 | 94.0 | 5145 (36) |
| Delinmiş ve Kapatılmış | 94.1 B | 93.8 | 94.0 | 5145 (36) |

*Farklı harflerle ifade edilen değerler arasında %5 oranında istatistiksel farklılık bulunmaktadır (P<0,05)

Son çalışmalarda ticari kuluçkacılıkta yumurtanın örnek almak amacıyla delinen kısmının dezenfeksiyonu üzerinde durulmuştur. Bu kısmın dezenfekte edilmesi sonucu, kuluçkanın 16. gününde yumurtada açılan deliğin kuluçka sonuçlarını olumsuz yönde etkilemediği belirlenmiştir (Çizelge 4) (6).

Çizelge 4: Cinsiyet ayırma işlemi sırasında yumurtadan Örnek alınan kısmın dezenfekte edilmesinin kuluçka Sonuçlarına etkisi

| Deney | % Canlı Civciv | Toplam Yumurta |
|-----------------------------------|----------------|----------------|
| Kontrol | 96.9 A | 5670 |
| Delinmiş | 95.7 B | 5670 |
| Delinmiş ve Dezenfekte Edilmiş | 96.6 A | 5670 |

*Farklı harflerle ifade edilen değerler arasında %5 oranında istatistiksel farklılık bulunmaktadır (P<0,05)

SONUÇ

Saha çalışmalarında, Embrex'in embriyolarda otomatik cinsiyet belirleme işlemini yapabileceği görülmektedir. En büyük teknik zorluk; çok sayıda yumurtanın büyüklüğünü ve şeklini göz ardı ederek allantoik sıvı alınmasıdır. Ticari olarak kuluçka randımanı ve civciv performansına etkisi göz ardı edilebilir. Otomatik cinsiyet ayırma makinesinin prototipi, sağlam ve güvenilir bir şekilde geliştirilmiştir. Live sensör ile kuluçkacılıkta sağlam ve doğru sonuçlar elde edilmiştir. Zamanla bu tekniğin zorlukları aşılabilecektir. Embrex saatte 20.000-30.000 adet yumurtada cinsiyet ayırımı yapabilecek ticari bir alet geliştirmeyi hedeflemektedir. Eğer başarılı olunursa, günlük erkek civcivlerin imhası konusunda yumurtacı işletmelere yöneltilen hayvan haklarıyla ilgili şikayetler azalacaktır.

KAYNAKLAR

1. Düzgüneş, O., Eliçin, A., Akman, N., 1996. *Hayvan Islahı. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları No: 1437, S:177-178, Ankara*
2. İraçlı-F; Smith-EJ., 1994. *Determination Of The Zygosity Of Ev21-K In Late-Feathering Male White Leghorns Using The Polymerase Chain Reaction, Agricultural Research Service, USDA, Avian Disease and Oncology Laboratory, 3606 East Mount Hope Road, East Lansing, MI 48823, USA.*
3. Klein, S., Baulain, U., Rokitta, M., Marx, G., Thielebein, J., Ellendorf, 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 Poultry Science Journal, 59;1, 39-45.*
4. Nakamura, D., Tiersch, Tr., Douglass, M., Chandler, R.W., 1990. *Rapid Identification Of Sex In Birds By Flow Cytometry, Cytogenetics And Cell Genetics 53:201-205.*
5. Nandi, S., McBride, D., Blanco, R., Clinton, M., 2003. *Sex Diagnosis and Sex Determination. World'S Poultry Science Journal, 59;1, 8-14.*
6. Phelps, P., Bhutada, A., Bryan, S., Chalker, A., Ferbell, B., Neuman, S., Ricks, C., Tran, H., Butt, T., 2003. *Automated Identification of Male Layer Chicks Prior to Hatch. World'S Poultry Science Journal, 59;1, 33-38.*
7. Preisner, R., 2003. *Sex Determination In Poultry-A Primary Breeder'S View. World'S Poultry Science Journal, 59;1, 54-58.*
8. Seemann, G., 2003. *Organisational Framework For Hatcheries. World'S Poultry Science Journal, 59;1, 59-61.*
9. Tao-Yang; Walker-J; Tao-Y., 2000. *Feather Imaging and Pattern Recognition Method for Sex Separation of Poultry Baby Chicks, Biological & Agriculture Engineering, University of Arkansas Fayetteville, AR 72701, USA.*
10. Tiersch T.R., 2003. *Identification of Sex In Chickens By Flow Cytometry. World'S Poultry Science Journal, 59;1, 25-32.*
11. Warren, D.C., 1976. *Renowned Poultry Geneticist Reminisces about Feather Sexing Chicks. Poultry Tribune February; 31-34*
12. Yan-HaiFeng., Xiao-BingNan., Trefil-P, Wu-XiaoLin., Yan-HE, Xiao-BN., Wu-XL., 2001. *Identification of Sex In Domestic Fowls, Acta-Veterinaria-Et-Zootechnica-Sinica., 28: 1, 49-51.*