

NKUBAP.00.24.AR.14.27

**EMBRYONAL GELİŞİM VE EMBRYONAL DÖNEMDE CİNSİYET TAYİNİ
AMACIYLA GÖRÜNTÜ İŞLEME TEKNİĞİNİN KULLANIMI ÜZERİNE BİR
ARAŞTIRMA**

Yürütücü: Doç.Dr.İlker H .ÇELEN

Araştırmacı: Prof.Dr.Banur BOYNUKARA

Doç.Dr.Timur GÜRHAN

Araş.Gör.Eray ÖNLER

2016

ÖNSÖZ

Dünyada her yıl milyarlarca civciv üretimi yapılmaktadır. Sadece dişi olan civcivler yumurta üretiminde kullanıldığı için bu civcivlerin cinsiyetlerine göre ayrılması ve erkek olan civcivlerin iskartaya çıkarılması gerekmektedir. Ancak erkek civcivlerin iskartaya ayrılması hem hayvan sağlığı hemde kaynakların israfı yönünden ciddi bir problemdir (G. Steiner ve ark., 2011). Bu nedenle dişi ve erkek civcivlerin yumurta içerisindeyken sınıflandırılması ekonomik açıdan önemlidir.

Bu sınıflandırma problemini çözebilmek için bir makine öğrenimi algoritması oluşturulmuştur. Bu algoritma iki kısımdan oluşmaktadır. Birinci kısımda girdi olarak kullanılan ultrasonografik görüntülerden faydalanılarak yumurtanın döllü olup olmadığına karar verilmektedir. Döllü olan yumurtalar daha sonra cinsiyet ayırımına yardımcı olacak ikinci sınıflandırma işlemine sokulmaktadırlar.

Bu çalışmada sınıflandırma yapmak amacıyla Lojistik Regresyon Algoritması tercih edilmiştir.

Projemize desteklerinden ötürü NKU Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi' ne teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

Önsöz	i
Şekiln Listesi	ii
Çizelge Listesi	iii
Özet	iv
Abstract	v
1.Giriş	1
1.1.Kanatlı embriyosunu inceleme teknikleri	1
2.Gereç ve Yöntem	10
2.1.Lojistik Regresyon	13
3.Araştırma Bulguları	14
3.1.Lojistik Regresyon	17
4.Sonuç	18
5.Kaynaklar	19

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Ultrason ölçüm noktaları	10
Şekil 2. Ultrason ölçüm düzeneği	11
Şekil 3. Döllenmiş yumurta iç yapısı	11
Şekil 4. Phased probe ve tarama alanı	12
Şekil 5. Standart logit fonksiyonu $\sigma(t)$; bütün t , ler için $\sigma(t) \in (0, 1)$	13
Şekil 6. Yumurta kontrol lambasında görüntüler	14
Şekil 7. Yumurtanın farklı gelişim günlerine ait ultrason görüntüleri	15
Şekil 8. Sistemin genel akış diyagramı	15

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 1. Döllü/Dölsüz Lojistik regrasyon sınıflandırma	17
Çizelge 1. Erkek/Dişi Lojistik regrasyon sınıflandırma	17

ÖZET

Bu araştırmada, tavuk yumurtalarının erken embriyonal gelişiminin takip edilmesi ve cinsiyet tahmininin ultrason yöntemi ile çözümlenip çözülemeyeceğinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu amaçla embriyolar, yumurta kabuğuna zarar vermeden, proje kapsamında geliştirilen görüntüleme sistemi ile izlenmiştir. Yumurtalardan alınan görüntüler döllü/dölsüz ayırımı, cinsiyet tayini açısından değerlendirilmiştir. Ultrasonografi yöntemi kullanılarak yapılan incelemelerde alınan görüntüler, bilgisayar ortamına aktararak, döllü yada dölsüz olması ve embriyonel dönemdeki yaşam sorunlarının çözümünde kullanıma olanak verecek bir yazılım geliştirilmiştir. Yazılım yardımıyla yumurtanın döllenip döllenmediği konusunda karar verilebilmiştir. Ancak yeterli kaliteli görüntünün alınmaması sebebiyle yazılımda erkek/dişi ayırımı yapılamamıştır. Eğer görüntü kalitesi artırılarak organ tipi belirlenebilirse program yeteneği de artırılabilir ve erkek/dişi ayırımı ortaya konabilecektir.

ABSTRACT

In this research, monitoring of early embryonic development of chicken eggs and possibility of gender prediction is intended to be solved by using the ultrasound method. For this purpose, an ultrasonography imaging system, which is developed at the project, monitored embryo. Images taken from eggs are evaluated for fertilized / infertile distinction and in terms of sex determination respectively. A software has been developed for making these determinations on ultrasonography images. The distinction of fertilized / infertile eggs can be decided by software successfully. However, images qualities are not sufficient to make sex determination. Designed software can be improved in the future by rely on quality enhancement at images.

1.GİRİŞ

Dünya çapında, yumurta tavukçuluğunda her yıl milyarlarca civciv üretilmektedir. Civcivlerin kuluçkadan sonra cinsiyet tayini yapılarak dişi ve erkek olarak ayrılması gerekmektedir. Dişi civcivler yumurta üretimi için ayrılırken, erkek olanlar elden çıkartılmaktadır. Kanatlı hayvanlarda cinsiyet ayrımında kullanılan davranışların izlenmesi, morfometrik özelliklerdeki farklılıklar, akustik cinsiyet ayrımı, laparoskopi, laparotomi, kloakal inceleme, dışkı steroid hormonlarına bakılarak cinsiyet tayini ve sitogenetik analiz gibi geleneksel metotların zaman alıcı, pahalı ve bazen zarar verici olduğuna dikkat çekilmektedir (Morinha ve ark. 2012).

Günlük civcivlerde cinsiyet ayrımı, 1920'li yıllardan beri kloakanın birinci ve ikinci kıvrımlarının tipik özelliklerine göre yapılmaktadır. Doğru yapıldığında etkili bir teknik olarak görülmektedir. Ancak, hayvanların manipulasyonları sırasında ölümler ve enfeksiyöz etkenlerin bulaştırılması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Kloakal cinsiyet ayrımındaki bazı yetersizlikler nedeniyle, günlük civcivlerin fenotipik görüntülerinden faydalanılarak yapılan cinsiyet ayrımı tercih edilmektedir. Bu amaçla kanat tüylerinin gelişim hızına bakılmaktadır.

Klasik yöntemlerin dezavantajlarından kaçınmak için kanatlı hayvanlarda cinsiyet ayrımı amacıyla moleküler teknikler geliştirilmiştir. DNA temelli metotlar kromozom spesifik markerleri inceleyerek sonuca gitmektedir (Kulesa, 2014).

Yumurtanın iç kalitesini incelemek için yumurtalara zarar vermeyen alet ve yöntemlerin kullanıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaların çoğunda tüketime sunulan yumurtalardaki kan lekeleri veya diğer iç bozukluklar dikkate alınmıştır (Patel ve ark. 1996; Patel ve ark.1998; Schovenberg ve ark. 2003).

1.1.Kanatlı embriyosunu inceleme teknikleri

Kuluçkalanacak yumurtaların döller olup olmadıklarının önceden veya inkübasyonun erken aşamasında tespiti önemlidir. Embriyo gelişimini izlemek için ultrasonografi, manyetik rezonans görüntüleme, akustik rezonans sıklığı ve ultrason gibi ticari olmayan araştırma metotları kullanılmaktadır (Coucke ve ark. 1997; Klein ve ark. 2002, Smith ve ark. 2008).

Ultrasonografik teknikler sürekli gelişmeye açıktır. Güncel gelişmelerden bir tanesi ultrason biyomikroskopi olarak isimlendirilen ve çok yüksek çözünürlükte *in vivo* mikro incelemeye olanak sağlayan tekniktir.

Güncel bir çalışmada, 55 MHz'lik güç çeviriciye sahip (RMV 708) Vevo 770 sistemi (Visualsonics, Inc., Toronto, Canada) ile aksiyal (30 mm) ve lateral (75 mm) çözünürlükte tavuk embriyoları incelenmiştir (Oosterbaan, 2012). Çalışmada embriyonun kalpteki kan akışı detayına kadar görüntü alınabildiği bildirilmiştir. Embriyo gelişim aşamalarının incelenmesinde kullanılan bir diğer teknik ise kalp ritminin incelenmesidir.

Kalp ritminin ontogenezi ve gelişimi, empedans kardiyogram (ICG), akustokardiyogram (ACG), allantoik arteriyal kan basıncı ve elektrokardiyografi (ECG) yöntemleriyle ortaya konulabilmektedir (Andrewartha ve ark. 2011). Yumurtalardaki döllülük oranları ve embriyo gelişimini incelemek için, genellikle görüntüleme sistemi ve bilgisayar analizinin bir parçası olarak, geliştirilen ticari metotların esasını ışık transmisyonu ve spektral analiz oluşturmaktadır. Das ve Evans (1992a), makine görüş ve histogram analizini kullanarak, inkübasyonun 3. gününde %88-90 ve 4. gününde %96-100 doğrulukla döllu yumurta gelişimini izlemişlerdir. Araştırmacılar başka bir çalışmalarında (Das ve Evans, 1992b), aynı görüş sistemini kullanarak ancak sinir ağı sınıflandırma sistemi ile embriyo gelişimini, 2. günde %67, 3. ve 4. günde %93 doğrulukla tespit etmişlerdir. Bir başka görüntüleme sistemi ile 2 ışık dalga boyu kullanılarak inkübasyondan 4.5-5 gün sonra embriyo gelişimi belirlenmiştir (Bamelis ve ark. 2002). Kuluçka kabine transferi sırasında, inkübe edilen yumurtaların 18. gününde gelişimini saptamak için patentli bir görüntüleme sistemi geliştirilmiştir (Chalker ve ark. 2003). Yapılan bir ön çalışmada hiperspektral görüntüleme ile embriyo gelişiminin inkübasyonun 3. gününde izlenebileceği gösterilmiştir (Smith ve ark. 2005).

Kanatlı yumurtalarının döllülük oranları ve embriyo gelişimini incelemek için hiperspektral görüntüleme teknolojileri geliştirilmiştir (Smith ve ark. 2005; Smith ve ark. 2008; Liu ve ark. 2013; Liu ve ark. 2014). Bu görüntüleme sisteminin yumurtaları ve embriyoları toplamak için uygun olduğu bildirilmektedir. Ancak, PCA/ MD modelinin kuluçkalanmış broyler yumurtaların döllülük ve erken gelişimini belirlemeye uygun olmadığı rapor edilmiştir. İnkübasyon öncesinde erken gelişimi veya döllülük oranlarını saptamak için daha fazla tekniğe ihtiyaç duyulmaktadır (Smith ve ark. 2008).

Moleküler Teknikler

Kanatlı hayvanların cinsiyetleri genetik olarak seks kromozomlarınca belirlenmektedir (ZZ erkek ve ZW dişi). Embriyonik yaşam süresince cinsiyet farklılığı, bir veya her iki cinsiyet kromozomunu kontrol eden genlerce erkeklerde testis ve dişilerde ovaryum oluşumunu şekillendirmektedir. Z-ilişkili *DMRT-1*, erkeklerde cinsiyeti belirleyen en önemli gen olduğu ileri sürülmektedir. Dişilerde ise henüz tam olarak ortaya konulmasa da *Foxl2* ve *Rspo1* genlerinin ovaryumun şekillenmesinde önemli oldukları belirtilmektedir (Chue ve Smith, 2011). Dişilerde bulunan W kromozomu hedef alınarak cinsiyet belirlenmesi gerçekleştirilmektedir. Ayrıca gen haritaları, kopyalar ve proteinler genetik olarak incelenmektedir (Huang ve ark. 2011).

Tüy ve doku DNA örneklerinden kromo-helikaz-DNA bağlayıcı protein (*CHD*) geninin incelenmesiyle cinsiyet ayrımı gerçekleştirilebilmektedir. Erkek kanatlılarda iki *CHD-Z* geni (ZZ) bulunurken, dişilerde tek *CHD-Z* geni (ZW) bulunmaktadır (Chen ve ark. 2012). Bu amaçla yaygın olarak kullanılan diğer bir teknik ise yavaş tüylenme geninin (K) belirlenmesidir. Dişiler hızlı tüylenme geni, erkekler yavaş tüylenme geni taşıyorsa, günlük civcivlerin kanatlarındaki örtü ve primer tüyler incelenerek cinsiyet ayrımı yapılabilmektedir. Bu yöntem, kloakal yöntemle göre daha ucuzdur ve fazlaca bir uzmanlık gerektirmez. Bazı hatlardan gelen kanatlılarda tüy rengine göre cinsiyet ayrımı yapılabilmektedir. Döllü yumurtaların blastodermindeki Z ve W kromozomları incelenerek cinsiyet tayini yapılabilmektedir. Blastoderm noktası manyetik rezonans görüntüleme ya da ultrasonografi ile belirlendikten sonra örnekler alınabilmektedir. PCR ile cinsiyet belirlemede 4-400 hücre belirlenmiştir (Lawrence ve ark. 2006).

Yumurta içerisinde cinsiyet ayırma tekniği: Konuyla ilgili çalışmalarda kalp ritmi gibi fizyolojik özelliklerin değerlendirilmesi, PCR tekniğiyle dişilerdeki W kromozomunun belirlenmesi ve nükleer manyetik rezonans ile anatomik olarak yumurtalık veya testislerin farklılıklarına bakılması sonucunda cinsiyet ayrımı yapılabildiği bildirilmiştir (Schovenberg, 2003).

Hayali görüntüleme ve model tanıma yöntemleriyle cinsiyet ayrımı otomatik olarak yapılabilmektedir. Aynı renk kanat tüylerini ayırmak ve civcivlerin kanadındaki cinsiyet tüylerini saptamak amacıyla optik bir UW sistemi geliştirilmiştir. Kanat tüyü model analizi ile cinsiyeti belirleyebilmek için damla analizi ve kıvrım tanıma modelleri tasarlanmıştır. Görüntü işleme ve otomatik tüy bölüştürme sistemleri için net sinyaller oluşturan optik

sistemin verileri, kanat tüyleri arasında bariz farklılıklar tespit etmiştir. Kuluçkadan sonra 100 civciv üzerinde uygulanan testlerin sonucunda kıvrım tanıma ile dişilerde %93, erkeklerde %94 doğruluk oranında cinsiyet belirlenmesi yapılmıştır (Tiersch, 2003)

Akış sitometri tekniği ile Z ve X cinsiyet kromozomları arasındaki mesafe ölçülebilmektedir. Horoz kromozomları tavuklara göre %2 daha fazla bölme içermektedir. Farklı hat ve soylar, ortalama değeri farklı olan 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 (Nakamura ve ark. 1990).

Allantoik sıvı içerisindeki östrojenik bileşiklerin tespiti: Östrojenler, canlı organizmadaki çeşitli dokularca üretilen steroid hormonlardır. Östrojen, dişi memeli ve kanatlılarda normal üreme organların gelişmesi için gereklidir. Endüstride kullanılan pek çok kimyasal, östrojenik hormon özelliğine sahiptir ve çevresel östrojenler olarak isimlendirilmektedir. Çevresel östrojenler, kanatlı hayvanlarda üreme organlarının gelişimi ve fonksiyonları üzerine olumsuz etki etmektedir. Bisfenol A (BPA), plastik ürünlerde bulunan ve en iyi bilinen bir çevresel östrojendir. Konuyla ilgili bir araştırmada (Yiğit ve Dağlıoğlu, 2010), BPA ve sentetik östrojen dietilstilbesterol'ün tavuklarda *in ovo* uygulanmasının embriyonik gelişimi olumsuz etkilediği gösterilmiştir.

Kanatlılardaki cinsiyet belirleme mekanizmaları henüz tam anlamıyla bilinmemesine rağmen, deneysel olarak *in ovo* eksojen östrojen (ZZ-erkekçe dişileşme) veya aromatoz inhibitörleri (ZW-dişide erkekleşme) verilerek genetik seks tersine çevrilebilmektedir. Tavuk embriyolarında normal ve tersine çevrilmiş gonadal seks farklılaşması sırasında değişik testis ve ovaryum spesifik marker genleri incelenmekle birlikte, cinsiyet farklılaşmasında seks spesifik epigenetik markerlerin rolü detaylı bir şekilde bilinmemektedir.

Güncel bir çalışmada (Ellis ve ark. 2012), tavuk embriyo gonodlarının ovaryum östrojen biyosentezi ve dişileşmeyi belirleyen CYP19A1/aromatoz promotörü ile olumlu sonuçlar alınmıştır. Araştırmada, ZZ-erken tavuk embriyonik gonodların dişileştirilmesinde farklı gelişme aşamalarında yumurta sarısı içine direkt olarak verilen emulsifiye ethynylestradiol ile başarı sağlanmıştır.

Kalsiyum homestazisinde rol oynayan kalsitonin (CALCA) hormonunun üremeye ilişkili olduğu ve özellikle uterus embriyo implantasyonu için bir marker görevi üstlendiği gösterilmiştir. *Calca* geninin tavuk ovaryumunda ekspresyona edildiği ve bu ekspresyonun

folliküler olgunlaşmayı veya gonadal steroid yönetimini değiştirdiği ortaya konulmuştur (Krzysik-Walker ve ark. 2007).

Yumurta sarısındaki seks steroid hormonlarının cinsiyet ayrımında kullanılabileceği önceden beri bilinmektedir (Göger ve Durmus, 2005). Hormon seviyeleri farklı tekniklerle ölçülebilmektedir. Geliştirilen bir RIA ile testosteron seviyelerindeki farklılık ortaya konulmuştur (Schwabl, 1993).

Yumurta içine erken dönemlerde verilen aromatoz inhibitörleri ile testosteron hormonunun baskılandığı ve dişi civciv oranları arttırılabildiği bildirilmiştir. Konuyla ilgili gerçekleştirilen bir araştırmada selektif bir aromatoz inhibitörü olan vorozol'un kuluçkanın 6. gününde *in ovo* olarak uygulanması sonucunda başarılı sonuçlar alınmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen civcivlerde T3 ve büyüme hormonu seviyelerinde önemli düzeyde artış sağlanırken, kesim yaşlarına ulaşanlarda karın yağlarında azalma belirlenmiştir (Dewil ve ark. 1998).

Kuluçkanın ilk günlerinde yumurta sarısındaki steroidlerin incelenmesi ile cinsiyet ayrımının yapılamadığı bildirilmiştir. Ancak inkübasyonun 10. gününde alınan örneklerde steroid seviyelerinin erkek ve dişiler arasında fark gösterdiği ortaya konulmuştur. Dişilerin erkeklerle karşılaştırıldığında daha fazla östrojen seviyelerine sahip olduğu belirlenmiştir (Pilz ve ark. 2005).

Embrex'in geliştirdiği bir otomatik cinsiyet ayırma yönteminin esasını, yalnızca dişilerin allantoik sıvılarında bulunan östrojenik bileşiklerin tespiti oluşturmaktadır. Piyasada ticari olarak kullanılan RIA kitleri ile 17 günlük broyler embriyolarının allantoik sıvılarındaki östradiyol seviyesinin ölçülemediği veya 42 pg/ml'nin altında olduğu bildirilmiştir. Dişi embriyoların allantoik sıvılarındaki östradiyol seviyesi 113-830 pg/ml civarındadır. Bu değer, erkeklerde ölçülenin en az 3 katıdır. Konuyla ilgili gerçekleştirilen bir çalışmada, 490 allantoik sıvı örneği incelenmiş ve östrojen seviyesinin kanatlı hayvanlarda cinsiyet ayrımı için kullanılabilirliği ortaya konulmuştur (Phelps ve ark. 2003).

Allantoik sıvı içerisindeki östrojen, sülfat ve glukuronid bileşikleri halindedir. Östrojeni serbestleştirmek için, allantoik sıvı glukuronidaz enzimi veya sülfat ile muamele edilmektedir. Kuluçka koşulları, hat ve sürü yaşına bağlı olarak 13-18 günlük embriyoların allantoik sıvılarında östrojen varlığına göre dişi ve erkek ayrımı yapılabilmektedir.

Otomatik cinsiyet ayrımı için geliştirilen canlı sensor cihazı ile allantoik sıvı içerisindeki östrojenik bileşikler belirlenebilmektedir. Canlı sensor, *E. coli* beta-galaktosidaz ile östrojen elementlerinin bağlanmasını gerçekleştirmektedir. Cihaz insan östrojen reseptörü için belirleyici maya taşıyan, genetik olarak değiştirilmiş mayaları etkilemektedir. Maya hücreleri

aynı zamanda *E. coli* glukuronidaz enzimini açığa çıkarmakta ve salgılamaktadır (Bu enzim, östrojen-glukuronidaz bağlarını tutmaktadır). Allantoik sıvı içerisinde östrojen-glukuronidaz bileşiğinden gelen östrojen, glukuronidaz enzimi sayesinde serbestleşmektedir.

Östrojen varlığında; östrojen tutucular, östrojene tepki veren elementleri ve haberci genin kopyalamaya başlamaktadır. Allantoik sıvı içerisindeki östrojen yoğunluğu, haberci genlerin seviyesi ile ilgilidir. Haberci genin bir ürünü olan beta-galaktosidaz aktivitesi O-nitrofenil-beta-D-galaktofirinasid (ONPG) ile mayadan etkilenerek, sarı renkli sinyal veren ürünlerin ölçülmesine yardımcı olmaktadır. Canlı sensor, östrojen içerisindeki femtomol/pikomolar seviyelerini belirleyebilmektedir. Bu cihaz ile 4 ml allantoik sıvı kullanılarak, dişi ve erken embriyolar ayırt edilebilmektedir. Genellikle, ölçümlerde daha iyi sonuç alabilmek için, 20 ml allantoik sıvı kullanılmaktadır. Canlı sensor ile laboratuvar şartlarında gerçekleştirilen cinsiyet ayırımında %100 başarı elde edilmiştir (Liu ve Ngadi, 2013).

Allantoik sıvının alınması: Allantoik sıvı kanatlı embriyoları için azot metabolizmasında görev üstlenmektedir. Bu sıvı kuluçkanın 5. gününden itibaren oluşmaya başlamaktadır. Kuluçkanın 13. gününde en yüksek seviyelere ulaşmaktadır. Nem kaybına bağlı olarak hacmi azalmaktadır. Kuluçkanın 18. gününde yumurta kabuk iç zarı, dış zarı ve korioallantoik membran tarafından yayılan allantoik sıvının miktarı 1-2 ml olabilmektedir. Embriyolu yumurtada allantoik sıvı dış yüzey ile tamamen sarılmış olmakla birlikte, yumurtanın üst kısmındaki hava boşluğunun altında toplanmış olarak bulunmaktadır. Bu alandaki toplanma yerçekimine, yumurta sarısı ve embriyo ağırlığına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Hava boşluğunun yumurtalar arasında değişkenlik göstermesi nedeniyle, yumurta dik konumdayken doğru bir şekilde allantoik sıvı örneği almak zordur. Yerçekimi allantoik sıvının belirli bir bölgede birikmesini sağlamaktadır. Yumurta yan çevrildiğinde, allantoik sıvı aynı şekilde üst kısımda kabuğun hemen altında toplanmaktadır. Yumurta bu pozisyondayken canlı sensor ile 20 ml sıvı örneği alınabilmektedir. Embrex tarafından geliştirilen bir makine ile ticari broyler yumurtalarından otomatik olarak allantoik sıvı alınabilmektedir. Örnek alınacak bölümün uzunluğuna, derinliğine, iğnenin tipine ve vakum oranına bağlı olarak %96 oranında başarı ile optimum örnekleme yapılabilir (Phelps ve ark. 2003).

Otomatik Cinsiyet Ayırma Modeli

Embrex tarafından geliştirilen cihaz ile saatte yaklaşık 5000 yumurtanın cinsiyet ayrımı yapılabilir. Makine bilgisayar ağına bağlı üç bölümden oluşmaktadır. Birinci bölümde

allantoik sıvı örneği alınmaktadır. Kuluçkanın 15-21. günlerinde kuluçka makinesinden elle toplanan yumurtalar, taşıyıcı bantlara aktarılmaktadır. Optik sensor ile döllü yumurtalar belirlendikten sonra, yumurta yerleştiriciler vakumlu tutucular ile yumurtaları yan olarak yerleştirmektedir. Sonra, iğneler yumurtanın orta noktasından ve uygun derinlikten 20 ml allantoik sıvı örneğini almaktadır. Alınan sıvı örnekleri barkotlu plastik bölmelere aktarılmaktadır. Her bölmede yaklaşık 2500 örnek işlenebilmektedir. Her bölmedeki kısımlar yumurta tablaları ile aynı barkod numaralarına sahiptir. İğneler, örnek alınmasından sonra temizlenmektedir. Yumurtalar, barkotlu yumurta tablalarına tekrar yerleştirilmektedir. Alınan allantoik sıvı örnek numaraları ile yumurta tablalarındaki barkod numaraları bilgisayarda eşleştirilerek analiz edilmektedir (Klein ve ark. 2002; Chalker ve ark. 2003; Phelps ve ark. 2003).

İkinci kısımda otomatik tahliller yapılmaktadır. Örnekler bir taşıyıcı sistemle dağıtıcı baş altına yerleştirilmektedir. Dağıtıcı baş her bölümün içerisine 30 ml canlı sensor belirleyici eklemektedir. Belirleyici ekleme süresi her bölüm için yaklaşık 5-6 dakika sürmektedir. Sonra, bölmeler ilerleyerek kontrollü odalarda yaklaşık 4 saat beklemeye bırakılmaktadır. Bütün bölümlere otomatik olarak ONPG eklenerek renk oluşumu için 30 dakika beklenmektedir. ACCD algılayıcı, tüm bölümleri tarayarak erkek ve dişileri belirlemektedir. Alınan bilgiler yumurta tablalarına gönderilmektedir. Taşıyıcılardaki örnekler otomatik olarak temizlenmekte ve dezenfekte edilerek tekrar kullanıma sokulmaktadır. Üçüncü bölümde yumurtalar cinsiyetlerine göre sıralanmakta, erkek civcivli olanlar ayıklanıp ve boşalan yerlere dişi civcivli yumurtalar yerleştirilmektedir. Dişi yumurtalar bar kodlanarak, bilgiler bilgisayara aktarılmaktadır (Chalker ve ark. 2003; Phelps ve ark. 2003).

Kuluçkaya Etkisi

Otomatik cinsiyet ayırma işleminin kuluçka ve civciv performansına etkisini incelemek amacıyla araştırmalar gerçekleştirilmiştir. İşlemler sırasında, allantoik sıvı alınırken ve inokulum yapılırken olmak üzere, yumurtalarda iki delik açılmaktadır. Bu işlemlerin kuluçkaya etkilerini araştıran çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

İlk çalışmalarda, alınan yumurta örneklerindeki delik kapatılmıştır. Ticari broyler sürülerinde yapılan çalışmada, yumurtalar kuluçkanın 16. gününde delinerek tekrar kuluçka makinesine konulmuştur. 19. günde ise inovoject sistem ile yumurtaya inokulasyon yapılmıştır. Bu iki deneme sonuçlarına göre 16. günde açılan delik, kuluçka sonuçlarında yaklaşık %2'lik bir

azalma oluşturmuştur. Deliđin kapatılması kuluća sonuçlarının iyileşmesi üzerinde bir etki yapmamıştır (Phelps ve ark. 2003; Chue ve Smith 2011).

Son çalışmalarda ticari kuluća sistemlerinde, yumurtanın örnek almak amacıyla delinen kısmının dezenfeksiyonu üzerinde durulmaktadır. Bu kısmın dezenfeksiyonu sonucu, kulućkanın 16. gününde yumurtada açılan deliğin kuluća sonuçlarını olumsuz yönde etkilemediği saptanmıştır (Chalker ve ark. 2003; Phelps ve ark. 2003).

Saha alışmalarında, Embrex sisteminin embriyolarda otomatik cinsiyet belirleme işlemini başarılı bir şekilde yapabileceği gösterilmiştir. Sistemde karşılaşılan en önemli sorun, allantoik sıvı alınırken, yumurta büyüklüğü ve şekline göre ayırım yapılamamasıdır. Ticari olarak kuluća randımanı ve civciv performansına etkisi göz ardı edilebilmektedir. Otomatik cinsiyet ayırma makinesi ve canlı sensor ile kulućkadaki civcivlerin cinsiyet ayırımı güvenilir bir şekilde yapılabilir. Bu sistemin geliştirilmesiyle saatte 20.000-30.000 adet yumurtanın cinsiyet ayırımı yapılabilir. Böylece, günlük erkek civcivlerin imha edilmesi yönünde yumurtacı işletmelere yapılan, hayvan haklarıyla ilgili olumsuz eleştirilerin önüne geçilebilecektir (Chalker ve ark. 2003).

Yumurtadan cinsiyet tayininin avantajları belirli başlıklarda toplanabilir:

- Kulućkada civcivlerin çođunluđu ayrıldıđı için zaman kazanılabilir.
- Kloakadan cinsiyet ayırımına göre civcivler daha az strese girerler.
- Cinsiyet belirleme işlemleri sırasında şekillenebilecek horizontal bulaşmalar nlenebilir.
- Embriyonal hayattaki gelişim daha kolay takip edilerek, var olan patolojik durumlara erken dönemde müdahale edilebilir.

Embriyonal dönemde erkek ve dişi ayırımı yapılabildiği takdirde, yumurtacı sürülerde sadece dişi hayvanların yumurtadan çıkması sağlanabilir.

İnkübasyondan önce dölsüz yumurtaların tespiti ve uzaklaştırılması, kulućkahane için maliyet verimliliği, daha iyi civciv kalitesi ve civcivlerin daha düşük patojen kontaminasyonu açısından önem arz etmektedir. İşçilik maliyetlerinde artış ve kulućkalanabilirlikte düşüş nedeniyle pratik olmamasına rağmen, inkübasyonun ilk 3 günü boyunca dölsüz, erken ölmüş veya cansız embriyoların uzaklaştırılması inkübasyon öncesi yumurtaları eksport eden özel

kuluçkahanelere bazı yararlar sağlayabilmektedir. Bazı organların ya da değişimin gözlenmesi bazı uygulamaları kolaylaştıracak hem maliyeti düşürecek hem de işlem hızını arttıracaktır.

Bu projenin amacı kanatlı hayvanlarda embriyonal gelişimin farklı aşamalarının incelenmesinde ve cinsiyet tayininde kullanılmak üzere bir görüntü işleme tekniği geliştirmektir. Bu amaçla ultrason görüntüleri elde edilerek embriyonal gelişim evre evre ortaya konacak ve bazı organların belirlenebilirliği ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bunu ortaya koyarken bir yazılım ile sonraki çalışmalara veri toplanacaktır.

2.GEREÇ VE YÖNTEM

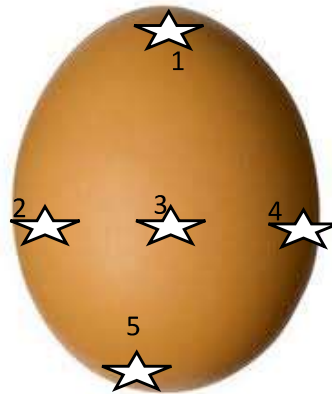
Embriyolu yumurtaların içindeki embriyonun gelişimini gözlemek ,belirli bölge ve organları tanımlamak amacıyla ovoskop yardımıyla gözleizleme ve ultrason görüntü işleme tekniği kullanılmıştır.-r.

Bu amaçla temin edilen embriyolu yumurtalar 38 de %70 nem altında kuluçka makinesinde tutulmuştur. Her uygulamada her yöntem için 3 er tekerrür yumurta toplamda 9 yumurtaya kullanılmıştır. . Tüm denemeler için ise 189 yumurta kullanılmıştır.r. Bu 189 yumurtadan toplam 1000 adet ultrason görüntüsü alınmıştır.

Ovoskopla kontrol sırasında gerekli durumlarda(gelişme geriliği olan embriyolar gibi) yumurtalar kırılarak embriyonun gelişimi hakkında rapor tutulmuş ve süreç boyunca fotoğrafları kaydedilmiştir..

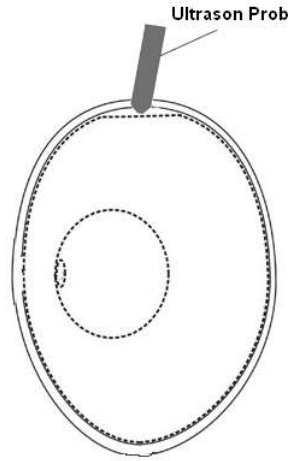
Embriyolumurtaların görüntüleri ultrason cihazına takılmış prob yardımıyla bilgisayar ortamına alınmıştır

Problar incelenen bölgeye ultrasonik ses dalgaları yollarlar. Bu ses dalgaları dokular arasından geçerek derinlere kadar ilerler. Dokunun özelliklerine göre ses dalgalarının ilerlediği derinlik farklıdır. Ses dalgası ilerleyebileceği en uç noktaya çarptığında geri döner. Bu dönüş ultrasonun ana biriminde algılanır ve buraya geri dönen ses dalgaları topluca işlenerek eşzamanlı bir görüntü ortaya çıkar, bu da monitörde izlenebilmektedir. Bu görüntüye ultrason görüntüsü adı verilir. Ultrason sabit görüntüsü printer vasıtasıyla kağıda aktarılabilir, ya da tüm eşzamanlı görüntüler bilgisayar veya video gibi kayıt sistemlerine aktarılabilir.Bu paragrafa burada ihtiyaç yok gibi. Bunu konuşalım.



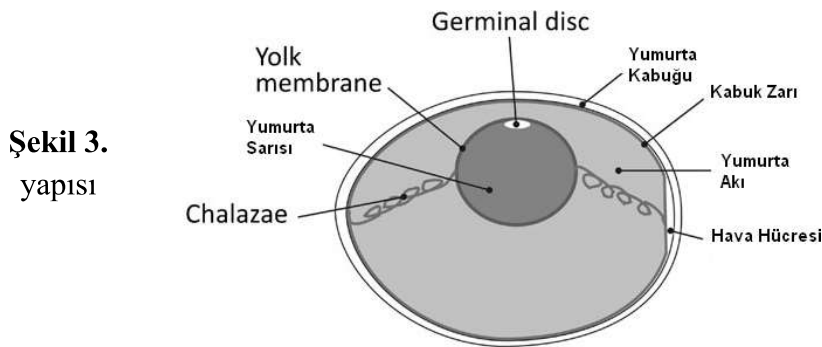
Şekil 1.Ultrason ölçüm noktaları

Bu amaçla portatif bir ultrason cihazı ve buna bağlı olan phased probdan kullanılmıştır (Şekil 4). Ölçümler 3-10 MHz arasında yapılmıştır. Yumurtanın farklı noktalarından (6 noktadan) görüntü alınmaya çalışılmıştır. Ancak ultrason sinyalleri kalsiyum yüzeyi geçemediği için, yumurta içerisinde hava boşluğunun olduğu bölge ovoskop yardımıyla tespit edilerek dışarıdan kalemle işaretlenmiş burada yumurtaya zarar vermeden ultrason probunun girebileceği kadar bir delik açılmış ve ölçüm gerçekleştirilmiştir (Şekil 2). Ölçüm gerçekleştirildikten sonra bu açık kısım steril bir bantla kapatılarak yumurtalar tekrar kuluçka makinasına konulmuş embriyoların devam eden süreçte zarar gelişimini sürdürmesi sağlanmıştır. (Steiner ve ark. 2011).



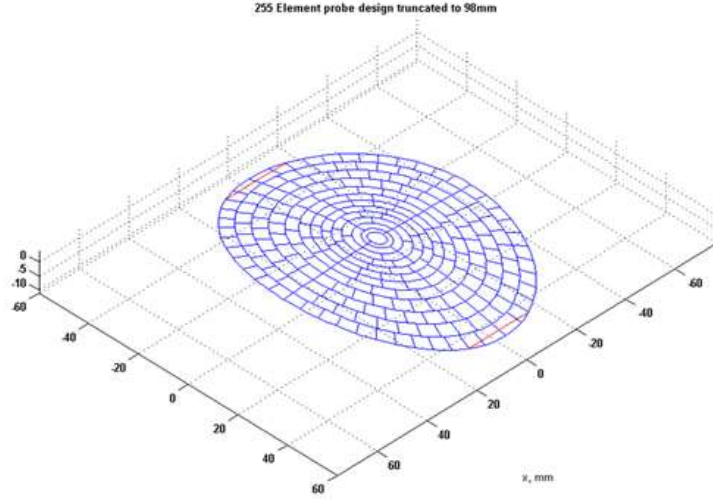
Şekil 2. Ultrason ölçüm düzeneği

Döllenmiş yumurta Şekil 3' teki yapıya sahiptir.



Şekil 3.
yapısı

Döllenmiş yumurta iç



Şekil 4. Phased probe ve tarama alanı

Elde edilen bilgisayar görüntüleri bilgisayar programına aktarılmıştır. Görüntüler bilgisayarda değerlendirilmiştir. Tüm görüntüler aynı döneme ait yumurtalardan elde edilmiştir. Makine öğrenimi algoritmasında kullanılmak üzere aynı döneme ait yumurtalardan alınan 1000 adet ultrasonografik görüntü 32x32 piksele (her bir resim 1024 pikselden oluşmaktadır.) düşürülerek oluşturulan programda kullanılmıştır.

Her bir resim, oluştuğu 1024 piksel üzerinde, herhangi bir işlem yapılmaksızın doğrudan sınıflandırma algoritmasına girdi olarak kullanılmıştır.

Bu sınıflandırma problemini çözebilmek için bir makine öğrenimi algoritması oluşturulmuştur. Bu algoritma iki kısımdan oluşmaktadır. Birinci kısımda girdi olarak kullanılan ultrasonografik görüntülerden faydalanılarak yumurtanın döllü olup olmadığına

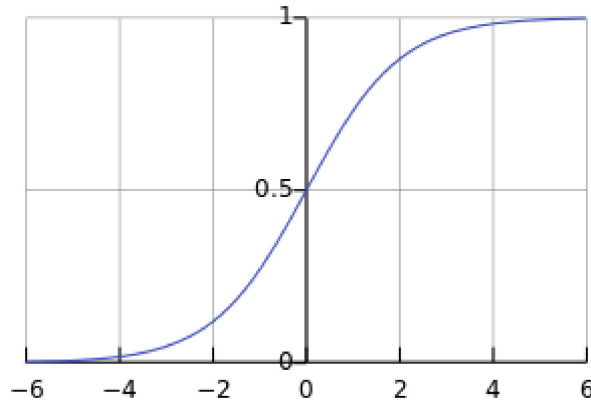
karar verilmektedir. Döllü olan yumurtalar daha sonra cinsiyet ayırımına yardımcı olacak ikinci sınıflandırma işlemine sokulmaktadırlar.

Bu çalışmada sınıflandırma yapmak amacıyla Lojistik Regresyon Algoritması tercih edilmiştir.

2.1. Lojistik Regresyon

İstatistikte lojistik regresyon, ayrıca logit regresyon, logit model olarak ta bilinmektedir (Freedman, 2009). Bağımlı değişkenin kategorik olduğu durumlarda kullanılan bir regresyon modelidir.

Lojistik regresyon 1958 yılında istatistikçi David Cox tarafından geliştirilmiştir (Walker ve Duncan, 1962; Cox, 1958). İkilik lojistik modeli bir veya birden fazla bağımlı değişkene göre ikili kategorik çıkışın olasılığını (örn. döllü/dölsüz ve erkek/dişi vb.) bulmak amacıyla kullanılmaktadır. Lojistik regresyon kategorik bağımlı değişken ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi lojistik fonksiyonunu kullanarak bulmaktadır (Şekil 5).



Şekil 5. Standart logit fonksiyonu $\sigma(t)$; bütün t , ler için $\sigma(t) \in (0, 1)$

(1)

Yukarıdaki formül, standart logit fonksiyonu olarak isimlendirilmektedir. t bağımsız değişkenine göre, 0 ile 1 arasında bir olasılık değeri üretmektedir.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

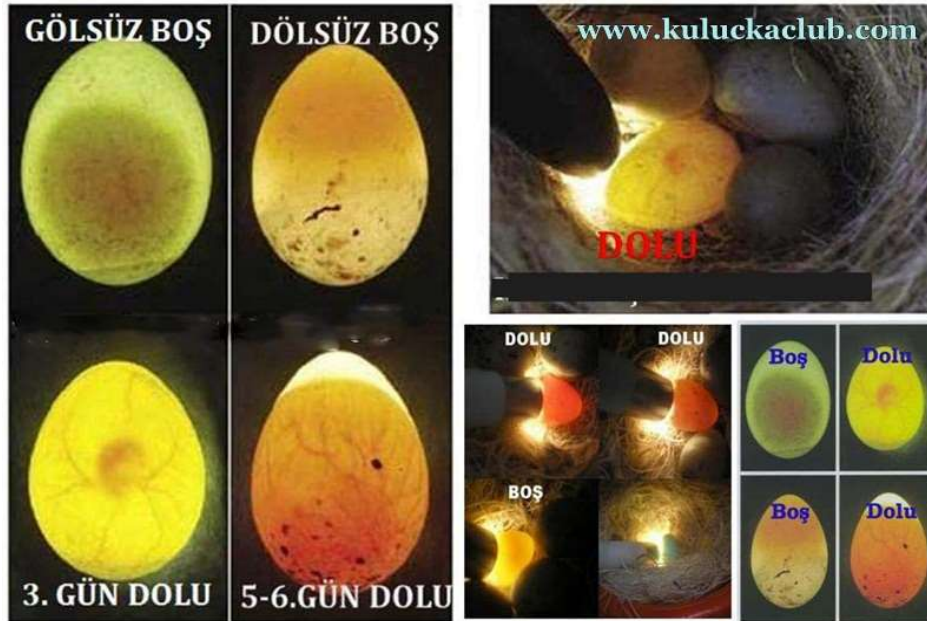
Yumurtaların içerisinde yer alan embriyonun gelişimini gözlemleyebilmek ve belirli bölge ve organların tanımlanabilmesi amacıyla yumurtalar ovoskop yardımıyla gözle, (Şekil 6) ve ultrason yöntemi (Şekil 7) ile görüntü işleme tekniği kullanılmıştır.

3.1. Lojistik Regrasyon

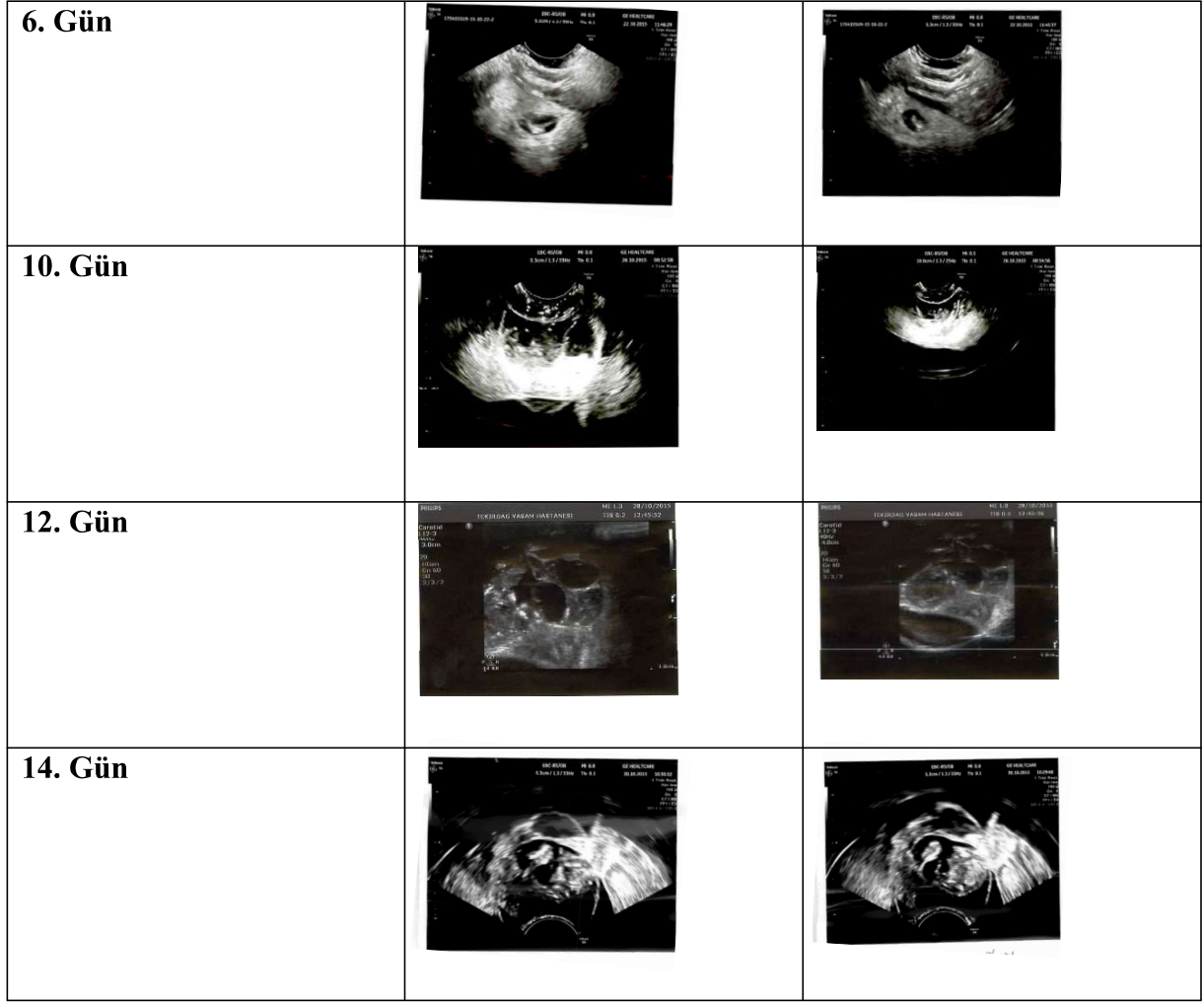
Yapılacak sınıflandırmada hazırlanan sisteme ait akış Şekil 8 de görülmektedir.

Kullanılacak toplam 1000 adet ultrason görüntüsünün %80' i eğitim setinde %20' si test setinde kullanılmak üzere bölünmüştür. Eğitim setinde kullanılacak görüntüler öncelikle döllü ve dölsüz daha sonra ise dişi ve erkek ayrımını yapan iki adet lojistik regresyonla sınıflandırma işlemine tabi tutulmuşlardır. Sistemin başarısı hata matrisi ile ortaya konulmuştur (Şekil 8).

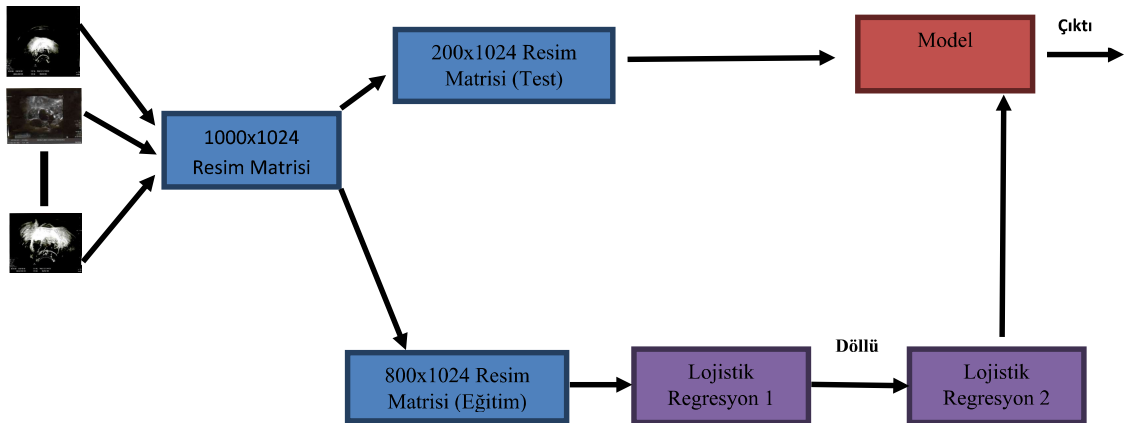
Makina öğrenim ve sınıflandırma işlemi için Python programlama dili ve scikit-learn kütüphanesi kullanılmıştır (Pedregosa ve ark. 2011). Aşağıda kullanılan jenerik program görülmektedir.



Şekil 6. Ovoskopla elde edilen görüntüler



Şekil 7. Yumurtanın farklı gelişim günlerine ait ultrason görüntüleri



Şekil 8. Sistemin genel akış diyagramı

//Öncelikle ihtiyaç duyulacak kütüphaneler çalışma ortamına çağrılmıştır.

```
from IPython.display import Image
from sklearn import datasets
from sklearn.linear_model import LogisticRegression
from sklearn import metrics
from sklearn.cross_validation import train_test_split
```

//32x32 boyutunda 1000 adet ultrason görüntüsü kullanılmıştır.

```
X, y = datasets.make_classification(n_samples=1000, n_features=1024)
```

//Ultrason görüntüleri 0.8 eğitim ve 0.2 test veri seti olarak ayrılmıştır.

```
X_train, X_test, y_train, y_test = train_test_split(X, y, test_size=0.8, random_state=4)
```

//Lojistik regresyon modeli oluşturulmuş ve elde bulunan verilerle eğitimi sağlanmıştır.

```
Logistic_model = LogisticRegression()
```

```
expected = y_test
```

```
Logistic_model.fit(X_train, y_train)
```

//Oluşturulan lojistik regresyon modeli ile test veri seti üzerinde deneme yapılmıştır.

```
predicted = Logistic_model.predict(X_test)
accuracy_score = metrics.accuracy_score(expected, predicted)
print "Model accuracy score is {}".format(accuracy_score)
print metrics.confusion_matrix(expected, predicted)
```

Yumurtanın döllü veya dölsüz olduğunu bulmak amacıyla yapılan lojistik regresyon sınıflandırmasında aşağıdaki hata matrisi bulunmuştur (Çizelge 1).

Çizelge 1. Döllü/Dölsüz Lojistik regrasyon sınıflandırma

		Tahmin Edilen Sınıf	
		Döllü	Dölsüz
Gerçek Sınıf	Döllü	350	50
	Dölsüz	56	344

Yukarıdaki hata matrisine göre 350 döllü görüntü ve 344 dölsüz görüntü doğru olarak tahmin edilmiş; 56 görüntü dölsüz olmasına rağmen döllü, 50 görüntü ise döllü olmasına rağmen dölsüz olarak yanlış işaretlenmiştir. Model başarısı 0.8675 olarak elde edilmiştir.

Görüntünün döllü veya dölsüz olduğu bulunduktan sonra döllü olarak işaretlenen görüntüler ikinci bir lojistik regresyon modeline sokularak dişi veya erkek olduğuna karar verilmeye çalışılmıştır (Çizelge 2).

Çizelge 1. Erkek/Dişi Lojistik regrasyon sınıflandırma

		Tahmin Edilen Sınıf	
		Erkek	Dişi
Gerçek Sınıf	Erkek	202	148
	Dişi	256	194

Yukarıdaki hata matrisine göre 202 erkek görüntü ve 194 dişi görüntü doğru olarak tahmin edilmiş; 256 görüntü dişi olmasına rağmen erkek, 148 görüntü ise erkek olmasına rağmen dişi olarak yanlış işaretlenmiştir. Model başarısı 0.495 olarak elde edilmiştir. Tahmin işlemi rastgele olarak yapıldığında bu başarı baz olarak 0.5 olarak bulunacağı için elde edilen sonuç başarısız olarak kabul edilmektedir.

4.SONUÇ

Bu çalışmada yumurtalar ışık altında ovoskop yardımıyla gözle döllü olup olmadıkları ve ilerleyen günlerde embriyonun gelişimi incelenmiştir. Aynı süreçte koordineli olarak ultrason tekniği kullanılarak yumurta iç yapısı ve embriyonun gelişimi de takip edilmiş ve elde edilen görüntüler karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Ancak

ultrason tarafından oluşturulan dalgaların yumurta kabuğunu kıramaması faydalı görüntülerin alınmasını engellemiştir. Bu sorunu giderebilmek amacıyla birinci ultrasonla bakarken ovoskop yardımıyla dışarıdan ışık desteği alınmıştır. Bu katkı yumurtanın iç yapısı hakkında bir bilgi verse de yeterli olmamıştır. Bu sebeple ikinci aşamada yumurta hava kesesinden kırılmış ve ultrason görüntüleri alınmaya çalışılmıştır.

Elde edilen görüntülerde döllenenip döllenenmediği konusunda karar verilebilirken ilerleyen dönemlerde gerek probumuzun yetersizliği gerekse görüntü kalitesi vb sebeplerle daha ileriye gidilememiştir.

Sonuç olarak bu yöntem yumurtada embriyonun gelişimini takip ve embriyonal dönemde cinsiyet tespiti açısından olumlu bir sonuç vermemiştir. Bunun nedenleri;

- Kullanılan ultrason probunun yumurta boyutlarına uygun olmaması
- Yumurta içerisindeki civcivin hareketli olması sebebiyle uygun ve sağlıklı görüntünün elde edilememiş olması
- Elde edilen görüntülerde dişi ve erkek arasında ayırım oluşturacak organların embriyonal hayatın geç döneminde oluşması ve bu dönemde de ultrason tekniği ile görüntü almanın mümkün olmaması olarak değerlendirilmiştir/gösterilebilir.

Ancak yapılan lojistik sınıflandırma sonucu geliştirilen yazılım ile ultrason görüntülerine bakılarak bir yazılım geliştirilmiştir. Yazılım yardımıyla yumurtanın döllenenip döllenenmediği konusunda karar verilebilmiştir. Ancak yeterli kaliteli görüntünün alınamaması sebebiyle yazılımda erkek/dişi ayırımı yapılamamıştır.

Eğer görüntü kalitesi arttırılarak organ tipi belirlenebilirse program yeteneği de arttırılabilecek ve erkek/dişi ayırımı ortaya konabilecektir. Bunun için daha ileri teknik çalışmaların yapılması düşünülmektedir/planlanmaktadır.

5. KAYNAKLAR

1. Andrewartha, S.J., Tazawa, H., Burggren, W.W., “Embryonic control of heart rate: Examining developmental patterns and temperature and oxygenation influences using embryonic avian models” *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 178: 84-96, (2011).
2. Bamelis, F.R., Tona, K. De Baerdemaeker, J.G., Decuypere, E.M., “Detection of early embryonic development in chicken eggs using visible light transmission” *Br Poult Sci*, 43: 204-212, (2002).
3. Chalker, B.A., Hutchins, J.E., “Methods and apparatus for non-invasively identifying conditions of eggs via multi-wavelength spectral comparison”. Embrex, Inc., assignee. US Pat. No. 6,535,277, (2003).
4. Chen, C.C., Liu, Y.S., Cheng, C.C., Wang, C.L., Liao, M.H., Tseng, C.N., Chang, H.W., “High-throughput sex identification by melting curve analysis in blue-breasted quail and chicken” *Theriogenology*, 77: 1951-1958, (2012).
5. Chue, J., Smith, C.A., “Sex determination and sexual differentiation in the avian model” *FEBS Journal*, 278: 1027-1034, (2011).
6. Coucke, P.M., Room, G.M., Decuypere E.M., De Baerdemaeker, J.G., “Monitoring embryo development in chicken eggs using acoustic resonance analysis” *Biotechnol Prog*, 13: 474-478, (1997).
7. Das, K. Evans, M.D., “Detecting fertility of hatching eggs using machine vision: I. Histogram characterization method” *Trans ASAE*, 35: 1335- 1341, (1992a).
8. Das, K. Evans, M.D., “Detecting fertility of hatching eggs using machine vision: II. Neural network classifiers” *Trans ASAE*, 35: 2035-2041, (1992b).
9. Dewil, E., Buyse, J. Veldhuis, J.D., Mast, J. De Coster, R., Decuypere, E., “In ovo treatment with an aromatase inhibitor masculinizes post postnatal hormone levels, abdominal fat pad content, and GH pulsatility in broiler chickens” *Domes Anim Endocrinol*, 15(2): 115-127, (1998).
10. Ellis, H.L., Shioda, K., Rosenthal, N.F., Coser, K.R., Shioda, T., “Masculine epigenetic sex marks of the *CYP19A1/Aromatase* promoter in genetically male chicken embryonic gonads are resistant to estrogen-induced phenotypic sex conversion” *Biol Reprod*, 87(1): 23, 1-12, (2012).

11. Göger, H., Durmuş, İ., “Östrojen seviyesinden yararlanılarak yumurtadan çıkmadan önce civcivlerde cinsiyetin belirlenmesi” *Tavukçuluk Araştırma Dergisi*, 6(1): 61-63, (2005).
12. Huang, H.W., Su, Y.F., Yao, C.T., Hung, Y.C., Chen, C.C., Cheng, C.C., Li, S.S.L., Chang, H.W., “High-throughput gender identification of three Columbidae species using melting curve analysis” *Theriogenology*, 75: 73-79, (2011).
13. Klein, S., Rokitta, M., Baulain, U., Thielebein, A., Haase, A., Ellendorf, F., “Localization of the fertilized germinal disc in the chicken egg before incubation” *Poult Sci*, 81: 529-536, (2002).
14. Krzysik-Walker, S.M., Oco’N-Grove, O.M., Maddineni, S.B., Hendricks, G.L., Ramachandran, R., “Identification of calcitonin expression in the chicken ovary: Influence of follicular maturation and ovarian steroids” *Biol Reprod*, 77: 626-635, (2007).
15. Kulesa, P.M., “Developmental imaging: Insights into the avian embryo” *Birth Def Res*, 72: 260- 266, (2004).
16. Lawrence, K.C., Smith, D.P., Windham, W.R., Heitschmidt, G.W. Park, B., “Egg embryo development detection with hyperspectral imaging. *Int J Poult Sci*, 5(10): 964-969, (2006).
17. Liu, L., Ngadi, M.O., “Detection of fertility and early embryo development of chicken eggs using near-infrared hyperspectral imaging” *Food Bioprocess Technol*, 6: 2503-2513, (2013).
18. Liu, L., Ngadi, M.O., “Detection of chicken egg fertility and early embryo development using hyperspectral imaging” <http://www.icef11.org/content/papers/mcf/MCF894.pdf>. (2014, In Press).
19. Morinha, F., Cabral, J.A., Bastos, E., “Molecular sexing of birds: A comparative review of polymerase chain reaction (PCR)-based methods” *Theriogenology*, 78: 703-714, (2012).
20. Nakamura D., Tiersch, Rt., Douglass, M., Chandler, R.W., “Rapid identification of sex in birds by flow cytometry” *Cytogenetics and Cell Genetics*, 53: 201-205, (1990).
21. Oosterbaan, A.M., “Hemodynamics and vascular development in the chicken embryo and the effects of homocysteine and folic acid treatment, PhD Thesis, Erasmus University Rotterdam, The Netherlands, (2012).
22. Patel, V.C., McClendon, R.W., Goodrum, J.W., “Detection of blood spots and dirt stains in eggs using computer vision and neural networks” *Appl Eng Ag*, 12: 253-258, (1996).
23. Patel, V.C., McClendon, R.W., Goodrum, J.W., “Color computer vision and artificial neural networks for the detection of defects in poultry eggs” *Artif Intell Rev*, 12: 163-176, (1998).

24. Phelps, P., Bhutada, A., Bryan, S., Chalker, A., Ferbell, B., Neuman, S., Ricks, C., Tran, H., Butt, T., "Automated identification of male layer chicks prior to hatch" *World's Poul Sci J*, 59(1): 33-38, (2003).
25. Pilz, K.M., Regan, E.A., Schwabl, H., "No sex difference in yolk steroid concentrations of avian eggs at laying" *Biol Lett*, 1: 318-321, (2005).
26. Schellpfeffer, M.A., Kuhlmann, R.S., Bolender, D.L., Ruffolo, C.G., Kolesari, G.L., "Preliminary investigation of the use of high frequency ultrasound imaging in the chick embryo" *Birth Def Res*, 73: 39-49, (2005).
27. Schouenberg, K.O.P., "Method and device for detecting undesired matter in eggs" *FPS Food Proc. Sys. B.V.*, assignee. US Pat. No. 6,504,603, (2003).
28. Schwabl, H., "Yolk is a source of maternal testosterone for developing birds" *Proc Natl Acad Sci, USA*. 90: 11446-11450, (1993).
29. Smith, D.P., Mauldin, J.M., Lawrence, K.C., Park B., Heitschmidt, G.W., "Detection of fertility and early development of hatching eggs with hyperspectral imaging" *Proc. 11th Europ. Symp. Qual. Eggs and Egg Prod. Doorwerth, The Netherlands*, (2005).
30. Smith, D.P., Lawrence K.C., Heitschmidt, G.W., "Fertility and embryo development of broiler hatching eggs evaluated with a hyperspectral imaging and predictive modeling system" *Int J Poul Sci*, 7 (10): 1001-1004, (2008).
31. Tiersch, T.R., "Identification of sex in chickens by flow cytometry" *World's Poul Sci J*, 59(1): 25- 32, (2003).
32. Yiğit, F., Dağlıoğlu, S., "Histological changes in the uterus of the hens after embryonic exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol" *Protoplasma*, 247: 57-63, (2010).
33. Boynukara B. ve Gulhan T., "Kanatlı hayvanlarda embriyonal dönem cinsiyet tayini", *Tabiat ve İnsan Dergisi*, 49(3): 17-26, 2015.
34. Steiner, G., Bartels T., Stelling, A., Junghans, M.E.K., Fuhrmann, H., Sablinskas, V., Koch, E., "Gender determination of fertilized unincubated chicken eggs by infrared spectroscopic imaging". *Anal Bional Chem*, 400: 2775-2782, (2011).
35. Freedman, D.A., *Statistical Models: Theory and Practice*. Cambridge University Press. p. 128. (2009).
36. Walker, S.H., Duncan, D.B., "Estimation of the probability of an event as a function of several independent variables" *Biometrika* 54: 167-178, (1967).

37. Cox, D.R., "The regression analysis of binary sequences (with discussion)" J Roy Stat Soc B 20: 215-242, (1958).