

Bölüm 6

KÜMES HAYVANLARI ve DİĞER KANATLI TÜRLERİNDE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE EŞEY TAYİNİ

Demir ÖZDEMİR¹

1. GİRİŞ

Kanatlı hayvanlarda bireylerin cinsiyetinin bilinmesi ekoloji, evrimsel biyoloji, ıslah ve koruma çalışmaları için oldukça önem taşımaktadır (Fridolfsson & Ellegren, 1999). Benzer bir biçimde ticari kümes hayvanı yetiştiriciliğinde de sürü yönetimi ve ilgili çiftleştirme planlamalarının yapılabilmesi, koruma sürülerinde elde tutulacak erkek ve dişi sayısının planlaması veya risk altında bulunan sınırlı sayıdaki popülasyonların eşey dengesinin takibi bakımından oldukça önemlidir. Eşeyssel olgunlukta morfolojik ayrım gösteren (dimorfik) kanatlı türlerinde cinsiyet ayrımı yapmak oldukça kolaydır. Ancak bazı kanatlı türlerinde eşeyssel olgunluk yaşına kadar, bazılarında ise eşeyssel olgunluk sonrasında dahi eşeyler monomorfik özellikte olup erkek ve dişi bireyler arasında belirgin bir morfolojik fark gözlenememektedir. Nitekim dünya üzerindeki kuş türlerinin %50'sinin seksüel bakımdan monomorfik karakterde olduğu bilinmektedir (Griffits & ark., 1998)

Kümes hayvanlarının cinsiyetleri hakkında eşeyssel olgunluk yaşından önce bilgi sahibi olunabilmesi işletme maliyeti bakımından oldukça önemlidir. Özellikle ticari yumurta tavuğu yetiştiriciliğinde tek bir eşeyde yapılan yumurta üretiminde kuluçka sonrası erkek civcivlerin erken dönemde saptanması ve üretim prosesinden çıkarılması harcanan zaman, tükettirilecek yem, bakım ve yönetim masrafları bakımından önemli kazançlar sağlamaktadır. Bunun yanında son yıllarda popüleritesi giderek artan hobi ve süs kuşlarının yetiştiriciliğinde de cinsiyetin erken dönemde belirlenmesi damızlığa ayrılacak bireylerin belirlenmesi için oldukça önemlidir. Yine benzer bir şekilde doğadaki popülasyonların erkek/dişi oranlarının takibi veya nesli tükenmekte olan türler için elde bırakılacak familyaların erkek ve dişi sayısına göre planlanması bakımından cinsiyet tayini çok önemlidir. Bu kapsamda fenotipik olarak seksüel fark göstermeyen ve ekonomik

¹ Dr.Öğr.Üyesi, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, dozdemir@akdeniz.edu.tr

önem taşıyan kanatlı türlerinin erken yaş döneminde cinsiyet ayırımına olanak sağlayan moleküler yöntemler tartışılacaktır

2. KANATLILARDA CİNSİYET AYRIMI YÖNTEMLERİ

Taşıdığı önem sebebiyle kanatlı hayvanların cinsiyetlerinin eşeyssel olgunluk döneminden önce tespiti için bugüne kadar birçok yöntem geliştirilmiştir. Elde edilen civcivlerin hızlı ve yavaş tüylenme hızına göre yapılan otosex yöntemi (Tie-mao & Xiangpin, 1989), çapraz kalıtım esasına dayalı tüy rengine göre eşey tayini yöntemi, eşey organlarını inceleyerek yapılan vent/kloaka yöntemi (Homma & ark., 1966), dişi ve erkeklerin çıkardıkları ses ayırımına göre cinsiyet tayini yöntemi (Volodin & ark., 2009) gibi geleneksel yöntemler konusunda uzman personele ihtiyaç duyulması ve yüksek hata payı sebebiyle pek ekonomik tercihler değildir. Geleneksel yöntemler dışında ayrıca yüksek eğitimli personeller tarafından uygulanabilen ultrasonografi, flowsitometri, kızıl ötesi spektroskopik görüntüleme ve laparoskopik görüntüleme gibi cinsiyet ayırım yöntemleri de bulunmaktadır (Dhanasekaran & ark., 2016). Tüm bu yöntemlere alternatif olarak moleküler genetikte kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tabanlı tek iplikli konformasyon polimorfizmi (SSCP), restriksiyon enzimleri kullanılarak yapılan fragment büyüklük analizi (RFLP), polimorfik DNA'nın şansa bağlı amplifikasyonu (RAPD), amplifikasyon refrakter mutasyon sistemi (ARMS), cinsiyete spesifik metilasyon deseni, SYBR Green ve TaqMan prob temelli gerçek zamanlı PCR yöntemleri de kanatlılarda cinsiyet tayini amacıyla kullanılmaktadır (Rosenthal & ark., 2010); Chen & ark., 2012; Morinha, 2012). PCR tabanlı cinsiyet ayırımı yöntemleri kanatlıların cinsiyet kromozomları üzerinde yer alan genlerin farklılıklarının saptanmasına dayanan yöntemlerdir.

Kanatlılarda cinsiyet tayininin PCR tabanlı primerler kullanarak cinsiyet kromozomları üzerinde bulunan korunmuş bazı gen bölgelerini çoğaltmak için kaliteli DNA örneklerine ihtiyaç bulunmaktadır. Birçok hayvan türünde olduğu gibi kanatlılarda da kandan DNA izolasyonu en yaygın yöntemler arasındadır. Kanatlı eritrositlerinin çekirdeğe sahip olması elde edilecek DNA miktarını da artırmaktadır. Ancak erken dönemde yapılacak cinsiyet tayinlerinde günlük civcivlerden veya embriyolardan kan almak pek tercih edilmeyen bir yöntemdir. Bu gibi durumlarda yumurta kabuğuna bulaşık amniyon sıvısı veya kan pıhtısından, tırnak parçasından, bukkal sıvılardan veya tüyden DNA izolasyonu tercih edilmekte ve genomik DNA kaynağına göre DNA izolasyon yöntemleri farklılık göstermektedir. İzolasyon yöntemlerinde genomik DNA kaynağına spesifik olarak hazırlanan özel izolasyon kitleleri, geleneksel izolasyon yöntemleri olan fenol-kloroform yöntemi (Sambrook & ark., 1989) ve Chelex yöntemine (Walsh & ark., 1991) göre daha maliyetli yöntemlerdir.

3. KANATLILARDA CİNSİYET KROMOZOMLARI VE KORUNMUŞ GENLER

Genellikle bir bireyin cinsiyeti genetik olarak sahip olduğu cinsiyet kromozomlarındaki genlerin kontrolündedir. Cinsiyet kromozomlarının yapılarının incelendiği karyotip analizleri sonucunda kanatlıların sahip olduğu kromozomal yapılarının memelilerden çok farklı olduğu saptanmıştır. Bu bilgiler ışığında kuşlarda (kanatlılar) memelilerin tersine dişi bireyin heterogametetik yapıda olduğu ve yine memelilerden (X ve Y kromozomları) farklı olarak dişilerin W ve Z kromozomuna sahip olduğu erkek bireylerin ise Z ve Z kromozomlarına sahip homogametetik yapıda olduğu saptanmıştır (Kagami & ark., 1990; Kawai & ark., 2007). Kanatlıların cinsiyet kromozomları bir çift otozomdan evrimleşmiştir. Bu işlem sırasında W kromozomu üzerindeki birçok gen kaybolmuştur ve bu nedenden ötürü W kromozomu evrimsel süreçte gen içeriğini kaybetmeyen Z kromozomuna göre daha küçüktür (Fridolfsson & ark., 1998). Z kromozomu makrokromozomlar olarak adlandırılan büyük kromozom grubuna girer ve genellikle kromozom 4 ve 5 gibi büyük kromozomlarla karıştırılabilir. Ola adı verilen ve genellikle 4 ve 5 kromozomları ile karşılaştırılabilir. W kromozomu ise mikrokromozomlar olarak adlandırılan küçük kromozomları temsil etmektedir. Evrimsel süreçte korunmuş bir yapıya sahip olan Z kromozomuna karşın W kromozomu üzerindeki gen bölgelerinin evrimsel süreçte uğradığı tahribat kanatlı türleri arasında varyasyon göstermektedir (Zhou & ark., 2014). Bu nedenle kanatlı türlerinde cinsiyet kromozomları üzerindeki gen bölgeleri için tasarlanan primerler bazı kanatlı türlerinde cinsiyetin belirlenmesine olanak tanırken bazı türlerde başarısız olmaktadır.

Cinsiyet kromozomları üzerinde bulunan bazı korunmuş homolog gen bölgeleri için tasarlanmış PCR tabanlı primerlerin kullanılması ile kanatlılarda eşeyssel olgunluk dönemi öncesinde hızlı, güvenilir ve ekonomik bir biçimde cinsiyet tayini yapmak mümkündür. Kanatlı hayvanların cinsiyet kromozomları üzerinde bulunan CHD (Kromo helikaz bağlayıcı protein geni), ATP5A1 (ATP syntase), GHR (büyüme hormonu reseptörü), NTRK2 (nörotropik tyrozin kinaz reseptörü), PCKI (protein kinaz C inhibitörü), RPS6 (ribozomal protein S6), SPIN (spindlin), TMOD (tropomodulin), ACO1/IREBP (çözülebilir akonitaz/demir elementi bağlayıcı protein) ve UBAP2 genlerine ilişkin olügonükleotid primerler kanatlılarda cinsiyet ayırımında kullanılmaktadır (Tsuda & ark., 2007, Romanov & ark., 2019) (Çizelge 1).

Çizelge 1. Kanatlılarda cinsiyet kromozomları ile ilişkili genler ve bu gen bölgelerinin tespitinde kullanılan primerler.

İlgili Gen	İleri Primer (5'-3') Dizisi	Geri Primer (5'-3') Dizisi
ATP5A1	GAARACTGGCACHGCWGARRTRTC-CTC	GGCAATBGADGTTT-TSCCMGTCTGYCT-GTC
	CCATTGGYCGKGGYCAGCRTGAGCT-SATYA	GCRGACACATCACC-MGCCTGYGTTTC
	CGYCTKCTGGARAGAGCAGCBAA-RATG	CTGKTCWGAGATYT-TSCCMTCAGWCCTG
CHD1		
P2/P3	TCTGCATCGCTAAATCCTTT	AGATATTCTGGATCT-GATAGTGA
P2/P8	TCTGCATCGCTAAATCCTTT	CTCCAAGGATGAG-RAAYTG
2550F/2718R	GTTACTGATTCGTCTACGAGA	ATTGAAATGATCCA-GTGCTTG
1237L/1272H	GAGAAACTGTGCAAAACAG	TCCAGAATATCTTCT-GCTCC
GHR	ATGGATCTTCGGCAKCTGYTGYYTGA	ACTTCTTTGTACTG-CAATTCATACTCCAG
	CCCCCTGTSCAYCTTAACTGGACTCT-GC	AGATCTGGGTCA-ATCCCTTAAATCTT-TGGA
	TGAGTTTATTGAGYTGAYATWGAY-GA	GCTAHGGCAK-GATTTTGTTCAGT-TGG
NTRK2	ATYCCWGTCA TYGARAAYCCMCAGTA	TGYTGKGANGCCAG-GTAVACCATDCC
	GABGAYTCWGCCAGYCCHCTSCAYCA	TGYTGKGANGCCAG-GTAVACCATDCC
	GGBGAYCCMCTCATCATGGTYTTTGA	GGYTCYCKYTGC-CARCANCCCAG-CATST
PKCI	CACSATCTTYGSAAGATYATCCGCA	CCAGGAGGCCARYB-CAWYTGVCGACC
RPS6	GAAGCTHAAYATCTCTTTCCCWGCCA	GGCCTCCTTCATT-CTCTTTG
	CACTGGCTGCCAGAAGCTCAT	GGCCTCCTTCATT-CTCTTTG
SPIN	GCAGAATACAGCATGGATGG	TCTAGGATGTYTT-CACCAARTCRTAGAC
TMOD	CTRGAGAAATAYCGDGACCTGGATG	CTCTTCCTCACWAG-GTCRTTGTTRTTC

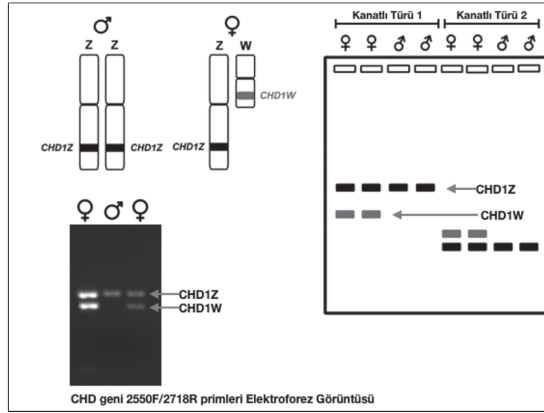
	CTRGAGAAATAYCGDGACCTGGATG	CATGCCMAGRATVG-CWGCAATGTCACA
	GGCATGCACACSYTSATGAGYAACCA-GC	CTCTTCCTCACWAG-GTCRTTGTRTTC
ACO1/IREBP	GACAGYTTRCARAAGAATCARGAY	CCYTTRAATCCTTG-CTTNGYTCC
	GTGCTCACYRTNACNAAGCACCT	AGGTCTCCCTGNGT-DATNGCYTC
UBAP2		
166F/279R	GGTGTACCGCCCTTGTTG	CATTGGCAGCCTG-GATTGAA
815F/906R	CCTGATATCAGTGGCTCTGTCTA	GAGGGCATGCTGAA-AGGAGGTG

4. KANATLILARDA CHD GENİ VE CİNSİYET AYRIMI

Dünya üzerinde yaklaşık 10000 kanatlı türünün yaşadığı bilinmektedir. Bu türlerin sahip oldukları cinsiyet kromozomu farklılıkları, bazı türler için türe spesifik farklı gen primerlerinin dizayn edilmesini gerektirmektedir. CHD (Kromo helikaz bağlayıcı protein geni), evrimsel süreç boyunca çoğu kanatlı türünde cinsiyet kromozomları üzerinde korunmuş bir vaziyette bulunmaktadır. Çok sayıda kanatlı türünün cinsiyet kromozomlarında bulunması nedeniyle kanatlıların moleküler cinsiyet tayini için üzerinde en çok tercih edilen genlerden birisi CHD genidir. CHD geni ilk olarak Griffiths & Tiwari (1995) tarafından W kromozomu üzerinde keşfedilirken, bu genin Z kromozomu üzerindeki bir başka kopyası (CHD1) daha sonra Griffiths & Korn (1997) tarafından keşfedilmiştir. Kanatlılara ait CHD1 genleri, bir kromatin organizasyon değiştirici (chromo) alanı, bir SNF2 ilişkili helikaz/ATPase alanı ve bir DNA bağlayıcı domainden oluşan bir aileye aittir; bu nedenle gen ismi CHD olarak kısaltılmıştır (Fridolson & Ellegren, 2000).

CHD1 genleri kanatlılarda PCR tabanlı cinsiyet tayininde farklı kanatlı türlerinde başarılı bir biçimde sonuç vermesi nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Kanatlıların moleküler cinsiyet tayininde kullanılan P2/P3, P2/P8, 1237L/1272H ve 2550F/2718R CHD1 primerleri, CHD1 geninin intron bölgesini monitörlmek için dizayn edilmiş spesifik primelerdir (Çizelge 1). CHD1 geni primerleri kullanılarak PCR işlemiyle çoğaltılan CHD geninin Z (CHD1-Z) ve W (CHD1-W) allellere ait PCR ürünleri jel elektroforezinde ayrışabilmekte ve bu farklılıklara göre cinsiyet tayini yapılabilmektedir (Şekil 1). Teorik olarak, amplifiye edilen CHD gen bölgesi ZZ homogametik yapıdaki erkek bireylere ait PCR ürünleri jel görüntüsünde tek bant oluştururken, dişi bireylere ait örneklerde çift bant görün-

tüsü izlenebilmektedir (Şekil 1). CHD gen bölgesinin W kromozomu üzerindeki intron bölgesinin dizi uzunluğu kuş türlerinde farklılık gösterebilmektedir. Bu nedenle PCR ürünlerinin jel elektroforezinde fragman uzunluklarından kaynaklanan bant farklılıkları gözlenebilir (Şekil 1). Genellikle Z ve W kromozomuna özgü fragman boyut farkları 2550F/2718R için 150-250 baz çifti, P2/P8 için ise 10-80 baz çifti olarak belirtilmiştir (Jensen & ark., 2003). Birçok kanatlı türünde CHD1 geninin intron farklılıklarına göre başarılı bir biçimde cinsiyet ayrımı yapılabılırken ördeklerde, turnalarda, çulluklarda, doğangillerde ve atmacagillerde 2550F/2718R primerleri hem erkekte hem de dişide tek bant görüntüsü verebilmektedir (Dubiec & ark., 2006). CHD geni ile yapılan PCR analizi sonrası Z ve W kromozomları arasındaki fragmanlarda boyut olarak bir fark görülmez ancak nükleotid dizisine göre heterojen bir durum söz konusu ise bu gibi durumlarda seçilecek restriksiyon enzimlerinin elde edilen PCR ürünlerine uygulanması sonucunda erkek ve dişiye özgü bant görüntüleri elde edilebilir. Örneğin Avrasya çulluğunda CHD1 geninin P2/P8 primerleri fargman farklılığı göstermemektedir. Bu durumda W kromozomunda bir ayrılma bölgesini tanıyan, spesifik bir kesim enzimi olan BshNI'nin PCR ürünlerine uygulanması dişilerde 3 erkeklerde 1 bant görüntülenmesine olanak tanır.



Şekil 1. CHD1 genine ait PCR tabanlı primerlerin kanatlılarda cinsiyet ayrımında kullanılması (Morinho & ark., 2012'den uyarlanmıştır)

Birçok kuş türünde W kromozomu (CHD1-W) ve Z kromozomu (CHD1-Z) üzerinde korunmuş vaziyette bulunan CHD1 homolog geni bazı kanatlı türlerinde (örneğin uçamayan kanatlılar: devekuşu, emu vb.) sadece W kromozomu bulunmaktadır (Griffiths & Korn, 1997; Ellergen, 1996). Bu durumda uçamayan kanatlılarda CHD1 geni ile cinsiyet ayrımı yapmak pek mümkün değildir. Buna

rağmen CHD genleri birçok kanatlı türüne uygulanabilmesi, düşük maliyetli oluşu, düşük konsantrasyonlardaki DNA örneklerinde bile kesin sonuç verebilmesi gibi avantajları nedeniyle en etkili moleküler cinsiyet tayini yöntemleri olarak gösterilmektedir.

5. SONUÇ

Kanatlı hayvanların cinsiyet ayrımının erken dönemde yapılabilmesi kümes hayvanı yetiştiriciliğinde, Kanarya ve papağan gibi ötücü kuşların yetiştiriciliğinde, hayvanat bahçesinde yetiştirilen sınırlı sayıdaki nadir kuş türlerinde oldukça önemlidir. Geleneksel cinsiyet ayırım yöntemlerine göre büyük avantajlar sağlayan moleküler cinsiyet tayini yöntemleri son on beş yılda moleküler genetikte kullanılan yöntemlerin geliştirilmesi çok çeşitli kuş türlerinde cinsiyet tespitindeki zorlukların üstesinden gelmesine olanak sağlamıştır. Özellikle PCR tabanlı teknolojilerdeki gelişmeler, basit, hızlı, hassas ve uygun maliyetli protokollerin geliştirilmesine olanak sağlamıştır.

Bu bölümde kanatlı hayvanların moleküler yöntemler ile kanatlılar için cinsiyet tayininde evrensel bir belirteç olarak gösterilen CHD geni irdelenmiştir. Özellikle devekuşu ve emu gibi uçamayan büyük kuş türlerinde cinsiyet ayrımı CHD geni kullanılarak yapılamasa da yakın gelecekte yeni nesil dizileme teknolojisinin yaygınlaşması ve daha ekonomik hale gelmesi ile birlikte birçok kuş türünün genom analizleri tamamlanması ön görülmektedir. Bu çalışmalar neticesinde tüm kuş taksonunu kapsayacak gen bölgelerinin analizi ve bu analizler doğrultusunda daha geniş kapsamlı gen primerlerinin dizayn edilmesi mümkün olacaktır. Böylece yeni nesil dizileme teknolojisiyle geliştirilecek basit, hassas ve büyük ölçekli moleküler cinsiyet ayrımı uygulamaları, üreme ve koruma biyolojisi çalışmaları, popülasyon genetiği, ekoloji ve evrimsel biyoloji gibi konularda kanatlılar üzerinde yapılacak çalışmalarda büyük kolaylıklar sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Chen CC, Liu YS, Cheng CC, Wang CL, Liao MH, Tseng CN, Chang, H.W. High-throughput sex identification by melting curve analysis in blue-breasted quail and chicken. *Theriogenology*; 2012;77:1951– 8.
- Dhanasekaran, S., Raj, G. D., Vignesh, et. Gender identification in Chicken (*Gallus gallus*) by PCR using whole blood and dried blood spot on filter paper as template: without prior DNA isolation. *bioRxiv*, 2016;046888.
- Dubiec, A., & Zagalska-Neubauer, M. Molecular techniques for sex identification in birds. *Biological Letters*, 2006;43(1), 3-12.
- Ellergren, H. First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 1996;263(1377), 1635-1641.

- Fridolfsson, A. K., & Ellegren, H. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of avian biology*, 1999; 116-121.
- Fridolfsson A.K., Ellegren H. Molecular evolution of the avian CHD1 genes on the Z and W chromosomes. *Genetics*, 2000;155: 1903– 1912.
- Fridolfsson A.K., Cheng H., Copeland N. G., et al. Evolution of the avian sex chromosomes from an ancestral pair of autosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998;95: 8147-8152.
- Griffiths R, Tiwari B. Sex of the last wild Spix's macaw. *Nature*, 1995; 375: 454.
- Griffiths, R., & Korn, R. M. A CHD1 gene is Z chromosome linked in the chicken *Gallus domesticus*. *Gene*, 1997;197(1-2), 225-229.
- Homma, K., Siopes, T. D., Wilson, W. O., et al., Identification of sex of day-old quail (*Coturnix coturnix japonica*) by cloacal examination. *Poultry Science*, 1966; 45(3), 469-472.
- Jensen T., Pernasetti F. M., Durrant B. Conditions for rapid sex determination in 47 avian species by PCR of genomic DNA from blood, shell-membrane blood vessels, and feathers. *Zoo Biology*, 2003; 22: 561-571
- Kagami, H., Nakamura, H. & Tomita, T., Sex identification in chickens by means of the presence of the W chromosome specific repetitive DNA units, *Jpn. Poult. Sci.*, 1990; vol. 27, no. 5, pp. 379–384.
- Kawai, A., Nishida-Umehara, C., Ishijima, J., et al., Different origins of bird and reptile sex chromosomes inferred from comparative mapping of chicken Z-linked genes. *Cytogenetic and genome research*, 2007;117(1-4), 92-102.
- Morinha F, Cabral J.A. & Bastos E. Molecular sexing of birds: A comparative review of polymerase chain reaction (PCR)-based methods. *Theriogenology*. 2012;1:78(4):703-14.
- Romanov, M. N., Betuel, A. M., Chemnick, L. G., et al. Widely applicable PCR markers for sex identification in birds. *Russian Journal of Genetics*, 2019; 55(2), 220-231.
- Rosenthal, N. F., Ellis, H., Shioda, K., et al. High-throughput applicable genomic sex typing of chicken by TaqMan real-time quantitative polymerase chain reaction. *Poultry science*, 2010; 89: 1451–1456.
- Sambrook J, Fritsch E. F. & Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Tiema, Z., & Xiangpin, Q. Study on early growth of rapid-and slow-feathering pure lines in white plumage chickens and their autosexing hybrids. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 1989; 1.
- Volodin, I., Kaiser, M., Matrosova, V., et al. The technique of noninvasive distant sexing for four monomorphic *Dendrocygna* whistling duck species by their loud whistles. *Bioacoustics*, 2009;18(3), 277-290.
- Tsuda, Y., Nishida-Umehara, C., Ishijima, J. et al. Comparison of the Z and W sex chromosomal architectures in elegant crested tinamou (*Eudromia elegans*) and ostrich (*Struthio camelus*) and the process of sex chromosome differentiation in palaeognathous birds. *Chromosoma*, 2007; 116(2), 159-173.
- Walsh P. S., Metzger D. A. & Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 1991;10: 506-13.
- Zhou, Q., Zhang, J., Bachtrog, D., et al. Complex evolutionary trajectories of sex chromosomes across bird taxa. *Science*, 2014;346(6215), 1246338.