

Swab Bukal Sebagai Bahan Sexing Piyikan Burung Kenari (Serinus canaria) dan Burung Merpati (Columba livia)

Buccal Swabs as Sexing Material of Young Nestlings Canary Bird (Serinus canaria) and Pigeon (Columba livia)

Afif Muhammad Akrom¹, Soedarmanto Indarjulianto^{2*}, Yanuartono², Trini Susmiati³, Alfarisa Nururrozi², Slamet Raharjo², Rief Ghulam Satria Permana⁴, Yeremia Yobelanno Sitompul⁵

¹Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

²Departemen Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

³Departemen Biokimia, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

⁴Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Jl. Fauna No 2. Karangmalang, Yogyakarta 55281, Indonesia

⁵Departemen Klinik, Reproduksi, Patologi, dan Nutrisi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Nusa Cendana, Kupang, Jl. Adisucipto Penfui No 85001, Kupang, Nusa Tenggara Timur, Indonesia

*Email: indarjulianto@ugm.ac.id

Naskah diterima: 28 Agustus 2019, direvisi: 03 September 2019, disetujui: 30 Desember 2019

Abstract

Molecular sexing for bird with polymerase chain reaction-based method have been developed, but the samples used as a sources of DNA are blood and feathers which are considerably invasive. The aim of this study was to study the efficiency of buccal swabs as a resource of DNA for sexing canary bird and pigeon. This study used 10 canaries (*Serinus canaria*) consisting of 6 adult canaries (3 males and 3 females) and 4 young nestling canaries (14 - to 18-day old) and 6 adults (3 males and 3 females) pigeons (*Columba livia*) and 7 young nestling pigeons (14- to 25-day-old). All birds were taken their buccal swab samples, then DNA were extracted, mixed with PCR-mix to be amplified for sexing genes with CHD1F/CHD1R primer pairs. The amplification results showed that all of adult male birds produced single band (± 500 bp), whereas all of adult female birds produced double bands (± 500 bp and ± 300 bp). The PCR method for nestling canaries showed 2 males and 2 females. whereas nestling pigeons 6 males and 1 female. Based on this study it can be concluded that buccal swabs are efficient as a source of DNA for birds sexing especially young nestling birds.

Key words: sexing; PCR; buccal swab; pigeon, canary

Abstrak

Teknik *sexing* pada burung secara molekuler dengan metode PCR telah banyak dikembangkan, namun masih menggunakan sampel darah dan bulu. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari efisiensi sampel *swab* bukal sebagai sumber DNA dalam *sexing* dengan metode PCR. Penelitian ini menggunakan 10 ekor burung kenari (*Serinus canaria*) yang terdiri dari 6 ekor burung dewasa (3 jantan dan 3 betina) dan 4 ekor kenari *piyikan* (umur 14 – 18 hari) yang belum diketahui jenis kelaminnya serta 6 ekor merpati (*Columba livia*) dewasa (3

jantan dan 3 betina) dan 7 ekor merpati *piyikan* (umur 14 – 25 hari) yang belum diketahui jenis kelaminnya. Semua burung diambil sampel *swab* bukal-nya, diekstraksi DNA-nya, kemudian dicampur dengan PCR-mix untuk diamplifikasi dengan pasangan primer CHD1F/CHD1R. Hasil visualisasi produk PCR menunjukkan semua burung jantan dewasa menghasilkan satu *band* (± 500 bp), sedangkan burung betina dewasa menghasilkan dua *band* (± 500 bp dan ± 300 bp). Amplifikasi gen dari swab bukal burung kenari muda didapatkan 2 ekor jantan dan 2 ekor betina, sedangkan dari swab bukal burung merpati muda didapatkan 6 ekor jantan dan 1 ekor betina. Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa sampel *swab* bukal terbukti dapat digunakan sebagai sumber DNA alternatif dalam *sexing* burung pada burung *piyikan*.

Kata kunci: *sexing*; PCR; *swab* bukal; burung kenari, burung merpati

Pendahuluan

Pemeliharaan burung telah lama ada di Indonesia, dan burung yang banyak dipelihara adalah burung berkicau (Passeriformes) hingga burung *anggungan* (Columbiformes) (Jepson, 2010). Sebanyak 60% Passeriformes memiliki monomorfisme seksual sehingga sulit untuk dibedakan melalui ciri fenotipnya (Price and Birch, 1996; Bostwick, 2016). Penentuan jenis kelamin pada burung merupakan hal yang penting untuk konservasi, manajemen pemeliharaan, pengembangan populasi, studi perilaku dan ekologi (Morinha et al., 2012). Di Indonesia penentuan jenis kelamin pada burung merupakan hal yang penting karena burung jantan khususnya burung berkicau (Passeriformes) dan burung *anggungan* (Columbiformes) memiliki nilai ekonomi yang lebih tinggi dibandingkan dengan burung betina. Oleh karena itu teknik *sexing* burung yang akurat dan dapat dilakukan sedini mungkin perlu dikembangkan.

Teknik penentuan jenis kelamin (*sexing*) burung secara molekuler telah banyak dikembangkan yaitu dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR). Pengembangan metode tersebut didasari oleh perbedaan kromosom kelamin pada burung. Burung jantan memiliki dua kromosom Z sedangkan burung betina memiliki satu kromosom Z dan satu kromosom W (Brubacker et al., 2011; Vucicevic et al., 2012). Sampel yang umum digunakan untuk *sexing* pada burung adalah darah dan bulu (Wellbrock et al., 2012). Penggunaan kedua teknik *sampling* tersebut dianggap berbahaya dan memiliki dampak buruk pada kelangsungan hidup burung (Voss et al., 2010; McDonald and Griffith, 2011). Penggunaan sampel darah dapat berakibat buruk bagi burung dan

dianggap sebagai tindakan yang invasif serta tidak dapat dilakukan pada burung muda yang masih diasuh oleh induknya (*piyikan*) (Asawakarn et al., 2018). Menurut penelitian yang dilakukan Brown dan Brown (2009) pengambilan sampel darah pada burung walet tebing (*Petrochelidon pyrrhonota*) menyebabkan penurunan kelangsungan hidup sebesar 21-33 % pada burung dewasa. Selain itu pada burung *piyikan* pengambilan sampel darah akan mengancam kelangsungan hidup karena ukuran tubuhnya yang masih kecil (Wellbrock et al., 2012). Metode menggunakan sampel bulu pada burung dianggap sebagai tindakan yang invasif karena membutuhkan manipulasi burung, sehingga pengambilan sampel bulu pada burung *piyikan* juga tidak dimungkinkan. Burung yang masih di dalam sarang (*piyikan*) memiliki bulu yang masih dalam pertumbuhan (*pin feathers*) dan belum sempurna sehingga pengambilan sampel bulu tidak dapat dilakukan. Menurut McDonald dan Griffith (2011) penggunaan sampel bulu untuk mendapatkan DNA merupakan hal yang berbahaya bagi burung selain itu sampel bulu memberikan DNA dengan kualitas yang kurang baik.

Salah satu alternatif pengambilan lainnya adalah *swab* bukal, sampel ini dapat digunakan sebagai sumber DNA telah berhasil digunakan untuk mendapatkan DNA genom pada manusia untuk studi forensik dan epidemiologi serta telah berhasil juga untuk studi dalam bidang veteriner dan laboratorium pada mamalia non-manusia (Brooks et al., 2003; Meldgaard et al., 2004). Selain pada manusia dan mamalia non-manusia penggunaan sampel *swab* bukal pada burung juga telah banyak dilakukan (Brubacker et al., 2011; Yannic et al., 2011). Beberapa studi tentang *sexing* pada burung menggunakan sumber DNA

yang berasal dari *swab* bukal telah dilaporkan (Arima and Ohnishi, 2006; Wellbrock *et al.*, 2012; Asawakarn *et al.*, 2018), namun *sexing* menggunakan sampel *swab* bukal pada burung merpati dan kenari menggunakan pasangan primer CHD1F/CHD1R belum dilaporkan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mempelajari penggunaan sel bukal burung sebagai sumber DNA untuk *sexing* secara molekuler pada burung kenari dan merpati terutama pada burung *piyikan*.

Materi dan Metode

Penelitian ini menggunakan 10 ekor burung kenari yang terdiri dari 6 ekor burung kenari dewasa (3 jantan dan 3 betina) dan 4 ekor burung kenari *piyikan* (umur 14 – 18 hari) yang belum diketahui jenis kelaminnya serta 13 ekor burung merpati yang terdiri dari 6 ekor burung merpati dewasa (3 jantan dan 3 betina) dan 7 ekor burung merpati *piyikan* (umur 14 – 25 hari) yang belum diketahui jenis kelaminnya. Burung kenari didapatkan dari peternakan burung kenari Derajat Family Yogyakarta sedangkan burung merpati didapat dari peternakan burung merpati RIIL Sleman, Yogyakarta. Analisis sampel dilakukan di Laboratorium Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Hewan Univeritas Gadjah Mada.

Pengambilan sampel *swab* bukal dilakukan dengan mengoleskan *swab* steril pada *cavum oris*. Sampel yang didapatkan dimasukkan ke dalam *microtube* yang berisi 1 ml *phosphate buffer saline* (PBS), kemudian disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 14.000 *rotation per minute* (rpm). Bagian *supernatant* dibuang kemudian isolasi DNA dilakukan dengan mengikuti protokol dari pabrik gSYNC™ DNA Extraction Kit, Cat. No. GB100 (Geneaid, Taiwan), seperti yang telah dikerjakan sebelumnya.

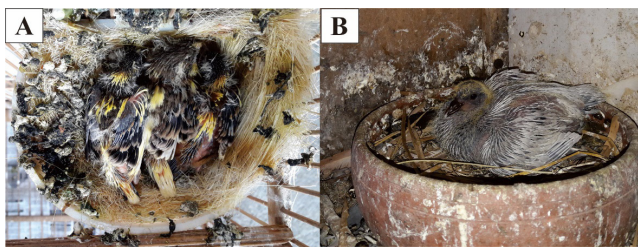
Hasil isolasi DNA kemudian diamplifikasi menggunakan pasangan primer CHD1F (5'-TAT CGT CAG TTT CCT TTT CAG GT-3') dan CHD1R (5'-CCT TTT ATT GAT CCA TCA AGC CT-3') dengan metode seperti yang telah dilakukan sebelumnya (Lee *et al.*, 2010). Sebanyak 5 µl sampel DNA dicampur dengan 12,5 µl *master mix* (Bioline, Kanada); 1 µl 10 pmol primwe CHD1F dan 1 µl 10 pmol primer CHD1R; serta 5,5 µl ddH₂O sehingga volumenya menjadi

25 µl, kemudian diamplifikasi menggunakan mesin *thermocycler* (Primus 25 advance[®], Peqlab, Jerman). Amplifikasi dilakukan dengan suhu predenaturasi 94°C selama 5 menit, setelah itu diikuti 32 siklus denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* 48,3°C selama 1 menit serta *elongasi* 72°C selama 1 menit. Setelah siklus terakhir kemudian diikuti *post-elongasi* pada suhu 72°C selama 5 menit. Hasil amplifikasi kemudian dielektroforesis pada gel agarose 1,5% (1st Base, Singapura) dengan tegangan 70 volt selama 35 menit, divisualisasi dengan UV *transilumnator* dan panjang amplicon dibandingkan dengan marker standar (1st Base, Singapura).

Hasil dan Pembahasan

Metode *sexing* secara molekuler menggunakan *swab* bukal merupakan metode alternatif yang diharapkan tidak melukai dan tidak terlalu membuat stres burung. Pada penelitian ini *swab* bukal telah berhasil dikoleksi dari semua sampel burung, baik yang dewasa maupun yang masih muda/*piyikan* (Gambar 1). Penggunaan burung dewasa pada penelitian ini adalah sebagai acuan dalam melihat hasil PCR. Burung dewasa yang digunakan adalah burung yang sudah pernah bereproduksi sehingga sudah jelas jenis kelaminnya. Hasil amplifikasi DNA *swab* bukal semua sampel burung dewasa menggunakan pasangan primer CHD1F/CHD1R didapatkan bahwa semua burung jantan menghasilkan satu *band* pada sekitar 500 *base pair* (bp) sedangkan semua burung betina menghasilkan dua *band* pada sekitar 300 bp dan 500 bp (Gambar 2). Hasil ini menunjukkan bahwa *sexing* molekuler dengan PCR menggunakan primer CHD1F/CHD1R hasilnya sama dengan *sexing* fenotip, sehingga metode ini dapat diaplikasikan untuk *sexing* burung kenari dan juga burung merpati dewasa (Tabel 1). Pasangan primer yang digunakan dalam studi peneliti lain adalah 2550F/2718R (Brubacker *et al.*, 2011; Bosnjak *et al.*, 2013; Asawakarn *et al.*, 2018) dan P2/P8 (Wellbrock *et al.*, 2012) sedangkan pada penelitian ini menggunakan pasangan primer CHD1F/CHD1R.

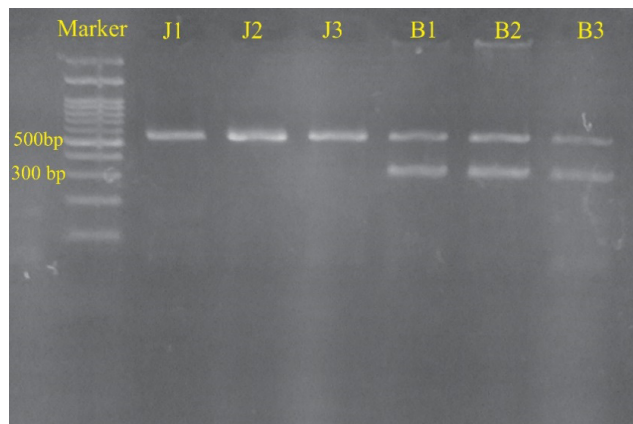
Perbedaan kromosom pada burung betina dan jantan memungkinkan *sexing* secara molekuler dengan metode PCR, dimana burung betina mempunyai kromosom kelamin heterogenik yaitu



Gambar 1. (A) Piyikan kenari (*Serinus canaria*) umur 14 hari. (B) Piyikan merpati (*Columba livia*) umur 16 hari.

Z dan W, sedangkan burung jantan mempunyai 2 kromosom kelamin homogenik yaitu kromosom Z (Brubacker *et al.*, 2011; Vucicevic *et al.*, 2012). Gen *chromodomain helicase DNA binding* (CHD) terletak pada kromosom Z dan kromosom W, dimana gen CHD yang berada pada kromosom Z disebut CHD-Z sedangkan homolognya terletak pada kromosom W disebut CHD-W (Cakmak *et al.*, 2017). Panjang gen CHD pada kromosom Z dan kromosom W berbeda, sehingga menyebabkan perbedaan ukuran intron pada kedua gen tersebut. Oleh karena itu pada saat visualisasi hasil amplifikasi, burung betina akan menghasilkan dua *band* dengan ukuran yang berbeda yang masing-masing berasal dari fragmen CHD-Z dan CHD-W, sedangkan burung jantan menghasilkan dua salinan fragmen dengan ukuran sama, sehingga menghasilkan satu *band* (Vucicevic *et al.*, 2012; Cakmak *et al.*, 2017).

Penggunaan sampel *swab* bukal sebagai sumber DNA untuk penentuan jenis kelamin merupakan alternatif *sampling* yang less-invasif. Penggunaan sampel darah dan bulu dapat memberi dampak yang buruk terhadap burung serta tidak



Gambar 2. Hasil visualisasi amplifikasi gen CHD pada burung kenari dewasa. Kenari jantan (J1, J2, J3) menghasilkan satu *band* sekitar 500 bp, sedangkan burung betina (B1, B2, B3) menghasilkan dua *band* pada sekitar 300 bp dan 500 bp.

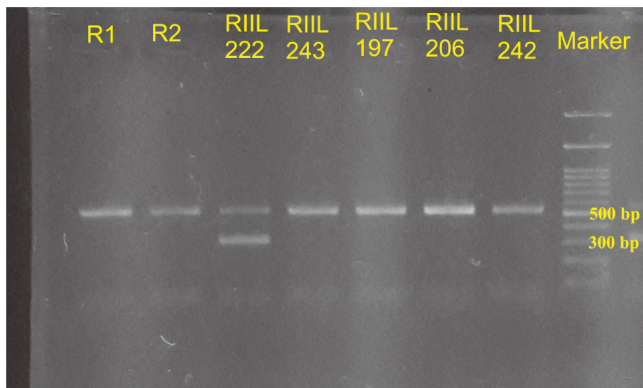
dapat diterapkan pada burung *piyikan* (Asawakarn *et al.*, 2018; Vilstrup *et al.*, 2018; Brown and Brown, 2009; Voss *et al.*, 2010; McDonald and Griffith, 2011; Wellbrock *et al.*, 2012). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa sel epitel bukal dari burung dapat digunakan secara efektif sebagai sumber DNA genom dalam studi molekuler khususnya *sexing* secara molekuler.

Berdasarkan hasil PCR pada burung dewasa, maka semua sampel burung muda diidentifikasi secara molekuler dengan metode yang telah dilakukan untuk burung dewasa (Tabel 1). Visualisasi hasil PCR DNA bukal burung *piyikan* didapatkan 2 grup, yaitu grup ke 1 menghasilkan satu *band* pada sekitar 500 bp sedangkan grup ke 2 menghasilkan dua *band* pada sekitar 300 bp dan 500 bp (Gambar 3). Berdasarkan hasil PCR tersebut dan sesuai dengan hasil *sexing* burung

Tabel 1. Hasil *sexing* burung kenari dan merpati dengan sampel *swab* bukal menggunakan pasangan primer CHD1F/CHD1R

Jenis burung dan umur	Jumlah	Sexing phenotip	Hasil PCR		Interpretasi <i>sexing</i> hasil PCR
			1 band*	2 band**	
Kenari dewasa	3	Jantan	3	0	Jantan
Kenari dewasa	3	Betina	0	3	Betina
Kenari piyikan	2	Tidak tahu	2	0	Jantan
Kenari piyikan	2	Tidak tahu	0	2	Betina
Merpati dewasa	3	Jantan	3	0	Jantan
Merpati dewasa	3	Betina	0	3	Betina
Merpati piyikan	6	Tidak tahu	6	0	Jantan
Merpati piyikan	1	Tidak tahu	0	1	Betina

* = 500 bp; ** = 300 bp dan 500 bp



Gambar 3. Hasil visualisasi amplifikasi gen CHD pada burung *piyikan* merpati. Dari 6 sampel terdapat 1 ekor betina (RIL 222) sedangkan 5 lainnya berjenis kelamin jantan.

dewasa, maka dapat diidentifikasi bahwa burung *piyikan* grup 1 (2 ekor burung kenari dan 6 ekor burung merpati) adalah berjenis kelamin jantan dan grup ke 2 (2 ekor burung kenari dan 1 ekor burung merpati) berjenis kelamin betina (Tabel 1 dan Gambar 3).

Pemilihan burung kenari dan merpati pada penelitian ini adalah sebagai wakil dari ordo Passeriformes dan Columbiformes. Kedua ordo tersebut banyak dipelihara oleh masyarakat di Indonesia. Penentuan jenis kelamin pada kedua ordo tersebut sangat penting karena berkaitan dengan manajemen, *breeding*, serta tujuan pemeliharaan dari kedua ordo tersebut. Pada sebagian besar Passeriformes dan Columbiformes tujuan peliharaannya adalah dinikmati kicauan, *anggunan*-nya dan sebagian besar Passeriformes yang memiliki kemampuan berkicau hanya burung jantan saja. Begitu juga dengan ordo Columbiformes yang memiliki suara bagus adalah burung jantan. Kedua ordo tersebut merupakan burung *altricial* yang berarti saat burung tersebut menetas belum memiliki bulu dan belum memiliki kemampuan menghasilkan panas yang cukup untuk termoregulasi (Birchard dan Deeming, 2015; Winkler, 2016). Pengambilan sampel bulu maupun darah pada *piyikan* burung altricial tidak dimungkinkan karena dapat menimbulkan risiko kematian pada burung. Menurut Eiben *et al.* (2017) dan Vilstrup *et al.* (2018) teknik *sampling swab* bukal merupakan teknik yang cepat dan *less-invasif* yang meminimalisasi cedera pada *piyikan* yang bulunya belum sempurna. *Swab* bukal merupakan sumber DNA yang andal dan memiliki

hasil yang sama jika dibandingkan dengan sumber dari sampel darah dan bulu (Bosnjak *et al.*, 2013). Hal tersebut sama dengan hasil penelitian ini, dimana pengambilan sampel *swab* bukal terbukti *less-invasif* (burung tidak menunjukkan kesakitan) serta andal dan efektif sebagai sumber DNA dalam studi molekuler khususnya *sexing* burung *piyikan*.

Kesimpulan

Sampel *swab* bukal terbukti dapat digunakan sebagai sumber DNA untuk *sexing* secara molekuler *piyikan* burung kenari dan merpati dengan menggunakan pasangan primer CHD1F/CHD1R.

Ucapan Terimakasih

Terimakasih kepada Program Studi Sain Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada yang telah mendanai Penelitian ini Melalui skim Penelitian Kompetitif Multidisiplin dengan nomor kontrak 1584/J01.1.22/HK4/2018

Daftar Pustaka

- Arima, H. and Ohnishi, N. (2006). Usefulness of avian buccal cells for molecular sexing. *Ornithol Sci.* 5: 139 – 143.
- Asawakarn, S., Teeranuwat, I., Watcharaprapapong, N., Siriwatchaiporn, N., Somsai, P., Kuldee, M., Suriyaphol, G., and Dhitavat, S. (2018). Comparison of Dried Blood Spot, Buccal Swab, Cloacal Swab and Feces as DNA Sources to Identify Avia Sexes by PCR. *Thai J Vet Med.* 48 (3): 325 – 330.
- Birchard, G.F. and Deeming, D.C. (2015). Egg Allometry: Influences of phylogeny and the Altricial-Precocial Continuum. In *Nests, Eggs, & Incubation New Ideas About Avian Reproduction*. Deeming, D.C. and Reynolds, S.J. (Ed). Oxford University Press. Oxford
- Bosnjak, J., Stevanov-Paviovic, M., Vucicevic, M., Stevanovic, J., Simeunovic, P., Resanovic, R. and Stanimirovic, Z. (2013). Feasibility of non-invasive molecular method for sexing of parrots. *Pakistan J. Zool* 45: 715 – 720

- Bostwick, K. (2016). Feathers and Plumage. In *Handbook of Bird Biology*. Lovette, I.J. and Fitzpatrick, J.W. (Ed). 3rd ed. Cornell University, Oxford.
- Brown, M.B., and Brown, C.R. (2009). Blood sampling reduces annual survival in Cliff Swallows (*Petrochelidon pyrrhonota*). *The Auk* 126:853–861.
- Brooks, R., Williamson, J., Hensley, A., Butler, E., Touchton, G. and Smith, E. (2003). Buccal Cells as a Source of DNA for Comparative Animal Genomic Analysis. *Biotechnol Lett*. 25: 451 – 454.
- Brubacker, J.L., Karouna-Renier, N.K., Chen, Y., Jenko, K., Sprague, D.T. and Henry, P.F.P. (2011). A Noninvasive, Direct Real-Time PCR Method for Sex Determination in Multiple Avian Species. *Molecular Ecology Resources*. 11: 415 – 417.
- Cakmak, E., Peksen, C.A. and Bilgin, C.C. (2017). Comparison of Three Different Primer Sets for Sexing Birds. *J Vet Diag Invest*. 29: 59-63
- Eiben, K., Fay, R., Jung, A., Rasmussen, A., and Russell, J. (2017). Sex Determination of The Boreal Owl (*Aegolius funereus*) Using Buccal Swabs and Improved Molecular Techniques. *J. Raptor Res*. 51 (1): 68 – 71.
- Jepson, P. (2010). Towards and Indonesian Bird Conservation Ethos: Reflections From a Study of Birds-keeping in The Cities of Java and Bali. In *Ethno-ornithology: Birds, Indigenous People, Culture and Society*. Tidemann, S. and Gosler, A. (Ed). Earthscan, London.
- Lee, J.C., Tsai, L., Hwa, P., Chan, C., Huang, A., Chin, S., Wang, L., Lin, J., Linacre, A. and Hsies, H. (2010). A Novel Strategy for Avian Species and Gender Identification using the CHD Gene. *Moleccular and Cellular Probes*. 24: 27 – 31.
- McDonald, P. and Griffith, S.C. (2011) To Pluck or not Pluck: The Hidden Ethical and Scientific Cost of Relying on Feathers as a Primary Source of DNA. *J. Avian Biol*. 42: 197 – 203.
- Meldgaard, M., Bollen, P.J.A. and Finsen, B. (2004). Non-invasive Method for Sampling and Extraction of Mouse DNA for PCR. *Lab Anim*. 38: 413 – 417.
- Morinha, F., Cabral, J.A. and Bastos, E. (2012). Molecular sexing of birds: a comparative review of polymerase chain reaction (PCR)-based methods. *Theriogenology*. 78: 703–714.
- Price, T. and Birch, G.L. (1996). Repeated Evolution Of Sexual Color Dimorphism in Passerine Birds. *The Auk*. 113: 842–848.
- Vilstrup, J.T., Mullins, T.D., Miller, M.P., Mc Dearman, D., Jeffrey, R., Walters, J.R., Haig, S.M. (2018). A simplified field protocol for genetic sampling of birds using buccal swabs. *The Wilson J. of Ornithology*, 130 (1): 326-334.
- Voss, M., Shutler, D. and Werner, J. (2010) A Hard Look at Blood Sampling of Birds. *The Auk*. 127 (3): 704 – 708.
- Vucicevic, M., Stevanov-Pavlovic, M., Stevanovic, J., Bosnjak, J., Gajic, B., Aleksic, N. and Stanimirovic, Z. (2012). Sex Dtermination in 58 Bird Species and Evaluation of CHD Gene as a Universal Molecular Marker in Bird Sexing. *Zoo Biology: 1-13*
- Wellbrock AH, Bauch C, Rozman J. and Witte K. (2012) Buccal swabs as a reliable source of DNA for sexing young and adult Common Swift (*Apus apus*). *J Ornithol*. 153: 991 – 994.
- Winkler, D.W. (2016). Breeding Biology of Birds. In *Handbook of Bird Biology*. Lovette, I.J. and Fitzpatrick, J.W. (Ed). 3rd ed. Cornell University, Oxford.
- Yannic, G., Sermier, R., Aebischer, A., Gavriilo, M.v., Gilg, O., Miljeteig, C., Sabard, B., Strom, H., Pouive, E. and Broquet, T. (2011). Description of Microsatellite Marker and Genotyping Performances using Feathers and Buccal Swabs fo Ivory Gull (*Pagophila eburnean*). *Mol Ecol Resour*. 11: 877 – 889.