

Kekerabatan Genetik Ayam Kampung, Pelung, Sentul dan Kedu Hitam dengan Menggunakan Penanda DNA Mikrosatelit: I. Grup Pemetaan pada Makro Kromosom

TIKE SARTIKA¹, S. ISKANDAR¹, L. H. PRASETYO¹, H. TAKAHASHI² and M. MITSURU²

¹Balai Penelitian Ternak, PO Box 221, Bogor 16002

²National Institute of Agribiological Sciences (NIAS), Tsukuba, Ibaraki, Japan

(Diterima dewan redaksi 19 Agustus 2004)

ABSTRACT

SARTIKA, T., S. ISKANDAR, L. H. PRASETYO, H. TAKAHASHI and M. MITSURU. 2004. Genetic relationships of Kampung, Pelung, Sentul and Black Kedu Chicken using Microsatellite DNA Markers: I. Linkage group of macro chromosome. *JITV* 9(2): 81-86.

Genetic relationships of Kampung, Pelung, Sentul and Black Kedu chickens were studied on the basis of microsatellite DNA polymorphism. DNA samples were analyzed using nine microsatellite markers which chosen from linkage group of macrochromosome (chromosome 1-8) such as, locus ABR 258, ABR359, ABR 297, ABR 339, ABR 75, ABR 209, ABR 28, ABR 419 and ABR 604. Analyses of amplified DNA fragments were performed using Gene Mapper 2.0 software (PE, Applied Biosystems). The allele frequencies in each breed estimated by direct counting. Since all nine microsatellite markers were polymorphic, genetic distance between the breeds could be calculated based on the frequencies of alleles of the microsatellite. Genetic relationships between the breeds could be constructed. The results indicated that a total of 73 allele were detected while typing all the four breeds of local chicken and one breed of White Leghorn as outgroup breed acrossed nine loci. The number of alleles was observed in all of the breed ranged 3-17 alleles according to the microsatellite under scrutiny. Highest observed number of alleles was found in Kampung Chicken 60 alleles (82.2%). The UPGMA method for dendrogram based on Nei genetic distances indicated that the local chickens have the same of ancestor, while Kampung and Sentul chicken have the same cluster followed by Black Kedu and Pelung Chicken.

Key words: Local chicken, microsatellite, macrochromosome, genetic distance

ABSTRAK

SARTIKA, T., S. ISKANDAR, L. H. PRASETYO, H. TAKAHASHI and M. MITSURU. 2004. Kekerabatan genetik ayam kampung, Pelung, Sentul dan Kedu Hitam dengan menggunakan penanda DNA mikrosatelit: I. Grup pemetaan pada makro kromosom. *JITV* 9(2): 81-86.

Kekerabatan genetik ayam Kampung, Pelung, Sentul dan Kedu Hitam telah dipelajari berdasarkan polimorfisme DNA mikrosatelit. Sampel DNA dianalisa dengan menggunakan sembilan *marker* mikrosatelit yang dipilih dari grup pemetaan makrokromosom (kromosom 1-8) yaitu lokus ABR 258, ABR 359, ABR 297, ABR 339, ABR 75, ABR 209, ABR 28, ABR 419 dan ABR 604. Penentuan alel dari fragmen DNA teramplifikasi dianalisa dengan *software Gene Mapper 2.0 (PE, Applied Biosystems)*. Frekuensi alel dari masing-masing *breed* dapat dihitung. Jarak genetik dari beberapa *breed* ayam lokal ditentukan berdasarkan perhitungan frekuensi alel polimorfisme *marker* mikrosatelit. Hubungan kekerabatan dari beberapa ayam lokal tersebut dapat digambarkan dengan dendrogram. Hasil penelitian menunjukkan terdapat 73 alel dari sembilan lokus mikrosatelit, yang terdeteksi dari empat *breed* ayam lokal dan satu *breed* ayam White Leghorn sebagai outgrup. Jumlah alel tersebut berkisar 3-17 alel dari mikrosatelit terpilih. Alel terbanyak diperoleh pada ayam Kampung yaitu sebesar 60 alel (82,2%). Dendrogram dengan metode UPGMA yang dibuat berdasarkan jarak genetik Nei, menunjukkan bahwa keempat *breed* ayam lokal mempunyai nenek moyang yang sama. Ayam Kampung dan ayam Sentul mempunyai hubungan kekerabatan yang paling dekat (satu kelompok) diikuti ayam Kedu Hitam dan ayam Pelung.

Kata kunci: Ayam lokal, mikrosatelit, makro kromosom, jarak genetik

PENDAHULUAN

Indonesia dikenal kaya akan sumber daya genetik, tetapi keberadaannya belum digali secara optimal. Salah satu potensi sumber daya genetik peternakan adalah ayam lokal yang diketahui mempunyai variasi genetik cukup tinggi. Telah dikemukakan NATAAMIJAYA (2000) terdapat 32 *breed* ayam lokal yang berbeda berdasarkan penampilan fenotipnya. Perbedaan tampilan fenotip tersebut diduga karena adanya diferensiasi genetik dari suatu populasi yang disebabkan

migrasi demografi. Oleh karena itu, terbentuknya *breed* ayam lokal di Indonesia kebanyakan berdasarkan perbedaan demografi yang secara genetik perlu dipelajari lebih lanjut.

Dalam penelitian ini *marker* mikrosatelit yang digunakan dipilih berdasarkan lokasi pemetaannya (*consensus linkage group*) yaitu yang terletak pada makrokromosom. Diketahui bahwa berdasarkan pemetaan karyotype (SMITH *et al.*, 2000), kromosom ayam ada sebanyak 39 pasang yang terdiri dari dua struktur genom yang kompleks dibagi atas dua sub tipe

kromosom yaitu makrokromosom (kromosom 1-8, dan kromosom sex Z dan W) dan 30 pasang mikrokromosom. Dikemukakan oleh SMITH (2000) bahwa jumlah gen pada mikrokromosom 1,3-2,4 lebih banyak dibandingkan pada makrokromosom. Pada makrokromosom setiap 22 kb terdapat satu gen, sedangkan pada mikrokromosom setiap 17 kb. Dikemukakan pula bahwa 75% dari total gen ayam terletak pada mikrokromosom. Oleh karena itu daerah mikrokromosom merupakan daerah konservatif, sehingga pemilihan mikrosatelit pada makrokromosom merupakan pilihan yang tepat.

Pada dasarnya mikrosatelit merupakan marker DNA bukan gen, menyebar pada seluruh genom baik pada makro maupun mikrokromosom. *Marker* mikrosatelit banyak digunakan untuk menganalisa keragaman genetik, karena *marker* tersebut mempunyai derajat polimorfisme yang tinggi (*Highly polymorphic*), profil pola pita yang tampak dapat diinterpretasikan dengan mudah yaitu sebagai alel dalam suatu lokus, merupakan kodominan alel, sangat akurat karena ukuran alelnya dapat dibedakan sampai derajat satu pasang basa (1 bp). Selain itu mikrosatelit banyak digunakan untuk pembuatan peta genetik. Pembuatan peta genetik pada ayam sangat berkembang, hasil terbaru yang dikemukakan GROENEN *et al.* (2000) telah dipetakan sebanyak 1889 lokus, 480 lokus telah merupakan *framework map* pada 50 *linkage group*. Penggunaan *marker* DNA mikrosatelit untuk bidang pemuliaan menjadi topik menarik terutama untuk pemetaan QTL (*Quantitative Trait Loci*). Pada ayam telah dilakukan untuk sifat pengaruh pertumbuhan, efisiensi pakan, sifat karkas, resistensi salmonella dan penyakit mareks (ZHU *et al.*, 2001).

Ayam Kampung, Pelung, Kedu Hitam dan Sentul merupakan *breed* ayam lokal yang mempunyai ciri fenotip tersendiri. Ayam tersebut mempunyai potensi untuk dikembangkan, baik sebagai penghasil telur maupun daging. Berdasarkan latar belakang genetiknya ayam lokal tersebut belum banyak diketahui. Untuk itu dalam penelitian ini penanda DNA mikrosatelit digunakan untuk mengetahui keragaman genetik, dan hubungan kekerabatan dari ayam lokal tersebut.

MATERI DAN METODE

Dalam penelitian ini digunakan sampel darah yang diambil pada bagian vena sayap (*vena ulnaris*) sebanyak 300-500 μ l. Sampel tersebut berasal dari empat galur ayam lokal dewasa yang tidak berkerabat dan satu galur ayam White Leghorn sebagai outgrup. Jumlah sampel yang dianalisa adalah 48 sampel darah ayam Kampung, 24 sampel darah ayam Pelung, 24 sampel darah ayam Sentul, 25 sampel darah ayam Kedu Hitam dan 48 sampel darah ayam White Leghorn.

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan SEPAGENE kit (*Sancko-Junyaku* Co, Ltd, Tokyo, Japan). Konsentrasi DNA dihitung dengan menggunakan spektrofotometer otomatis *Gene Quant*, *template* DNA sebanyak 10 ng/ μ l disiapkan untuk dilakukan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) yaitu fragmen DNA diamplifikasi dengan *marker* mikrosatelit. Untuk menghasilkan fragmen DNA tersebut dibuat larutan (*cocktail*) yang terdiri atas 10x *buffer*, 2 mM dNTP, 25 mM MgSO₄, primer mikrosatelit (*forward* dan *reverse* primer, 200 pmol/ μ l), enzim polimerase KOD plus dan air. Amplifikasi dilakukan dengan alat termosiklus Gene Amp, PCR *system* 9700, PE *Applied Biosystems*. Kondisi PCR diprogram yaitu denaturasi pada 94°C selama 1 menit 15 detik, penempelan (*annealing*) dibuat 3 tipe: 10 siklus (15 detik pada 94°C, 30 detik pada 60°C, 1 menit pada 68°C), 10 siklus (15 detik pada 94°C, 30 detik pada 55°C, 1 menit pada 68°C) dan 10 siklus (15 detik pada 94°C, 30 detik pada 50°C, 1 menit pada 68°C) dan elongasi selama 9 menit pada 68°C. Setelah siklus berakhir diteruskan dengan *hold* temperatur penyimpanan pada 4°C. Primer yang digunakan tertera pada Tabel 1.

Fragmen DNA hasil PCR digunakan sebagai *template* DNA untuk *genotyping*, dicampur dengan larutan *deionized formamide* dan *GeneScan standard size*. Sampel DNA didenaturasi pada temperatur 90°C selama 2 menit, kemudian dirunning menggunakan alat sekuenser otomatis ABIPRISM 3100. Data dianalisa menggunakan *software Gene Mapper 2.0* (PE, *applied Biosystem*), penentuan alel berdasarkan puncak kurva tertinggi. Data ditransfer ke dalam *file excel*.

Frekuensi alel-alel polimorfik dari setiap lokus dapat dihitung. Jarak genetik diprediksi berdasarkan rumus NEI (1987) sebagai berikut:

$$D = -\ln\left(\frac{\sum_m \sum_i p_{1mi} p_{2mi}}{(\sum_m \sum_i p_{1mi}^2)^{1/2} (\sum_m \sum_i p_{2mi}^2)^{1/2}}\right),$$

keterangan:

m = jumlah lokus.

i = jumlah alel pada lokus ke m

p_{1mi} = frekuensi alel ke i lokus ke m pada populasi 1

p_{2mi} = frekuensi alel ke i lokus ke m pada populasi 2

Untuk memudahkan perhitungan jarak genetik digunakan *software* komputer PHYLIP, Gendist (FELSENSTEIN, 1993). Dendogram dengan metode UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic means*) dapat digambarkan dengan bantuan program MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (KUMAR *et al.*, 1993). Jarak genetik diuji dengan *Restricted Maximum Likelihood Estimation* (REML) (FELSENSTEIN, 1993).

Tabel 1. Marker mikrosatelit yang digunakan dalam penelitian

Kelompok kromosom	Marker	Pewarna	Forward primer (5'→3') Reverse primer (5'→3')
Chr.1 + W29	ABR 258	FAM	GCATGACAGAAATGCCAATA GATCAGAACTTAACCTCCCT
Chr.2	ABR 359	FAM	TCTGACTGTACATATCACCCAG TATAGGCAGCAGCTCATTTT
Chr.3	ABR 339	HEX	GCAGTAAATGGCTCCCTCAC TTATTTCCCAACCAAAAACC
Chr.3	ABR 297	NED	ATGTTCCCTTCATTTCAGAG GGTATCCATAGCAAGTTAGT
Chr.4 + W34	ABR 75	FAM	CATGAAGACCACAGCAAAGGG CAGAAGTGAACAAATTCCAGAG
Chr.5	ABR 209	FAM	CTGCCAAACATCAGGAACCG AGCGCATGACGTGTAGAAAA
Chr.6	ABR 28	NED	GTGCGAGGGCTTCGGATGTG TGTGCTTGGGCTGCCGTTGG
Chr.7	ABR 419	NED	TTAAACTGGAGAATATTTAACAGC TGCTTATTTCCATTACCAA
Chr.8	ABR 604	HEX	ATTAACAAATCTACACGTTTTCC CACTAACAACTCGTTTATGGG

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari sembilan lokus mikrosatelit yang digunakan untuk menguji keragaman genetik keempat *breed* ayam lokal tersebut semuanya polimorfik, artinya setiap lokus mikrosatelit mempunyai alel lebih dari satu. Dalam penelitian ini jumlah alel teramplifikasi berkisar 3-17 alel (Tabel 2). Pada ayam lokal Jepang, dengan menggunakan delapan *marker* mikrosatelit mendapatkan jumlah alel teramplifikasi sebanyak 2-10 alel (TAKAHASHI *et al.*, 1998), sementara itu, WEIGEND *et al.* (2000) melaporkan bahwa dengan menggunakan 21 *marker* mikrosatelit pada 43 populasi ayam mendapatkan jumlah alel teramplifikasi sebanyak 3-23 alel. Hal tersebut mencerminkan bahwa mikrosatelit merupakan *marker* yang 'highly polymorphic' sebagaimana dikemukakan CROOIJMANS *et al.* (1993); CHENG dan CRITTENDEN (1994); dan TAKAHASHI *et al.* (1998). Ayam Kampung mempunyai variasi alel cukup tinggi, terlihat bahwa jumlah alel teramplifikasi dari seluruh lokus mikrosatelit paling banyak (60 alel atau 82,2%) dibandingkan dengan ayam lokal lainnya. Namun demikian variasi alel ayam lokal lainnya pun cukup tinggi. Hal tersebut dapat dilihat dari jumlah alel teramplifikasi pada ayam-ayam lokal lebih dari 70%

dari total alel. Berbeda dengan ayam White Leghorn yang telah terseleksi (*selected breed*) hanya mempunyai 18 alel teramplifikasi atau hanya sebesar 24,66%. Dari hasil tersebut dapat diketahui bahwa pada ayam lokal baik ayam Kampung, Pelung, Sentul maupun Kedu Hitam mempunyai keragaman genetik cukup tinggi yang diperlihatkan dari variasi alel teramplifikasi cukup tinggi, akan tetapi dari keempat *breed* ayam lokal tersebut tidak menunjukkan adanya alel dominan. Artinya keempat *breed* ayam Lokal tersebut belum menunjukkan adanya alel spesifik yang dapat mencirikan suatu *breed* tertentu. Berbeda dengan ayam White Leghorn jumlah alel teramplifikasinya rendah akan tetapi jumlah alel setiap lokusnya dominan. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada ayam White Leghorn merupakan ayam yang telah terseleksi, sedangkan pada ayam lokal masih menunjukkan variasi alel cukup tinggi. Perbedaan *breed* pada ayam lokal baru tercermin dari tampilan fenotipnya saja, sedangkan berdasarkan genetiknya masih perlu dilakukan seleksi lebih lanjut agar dapat diperoleh *breed* ayam lokal yang mantap. Variasi alel dari masing-masing *breed* ayam lokal dapat dilihat secara jelas dari frekuensi alel setiap lokus mikrosatelit (Tabel 3).

Tabel 2. Jumlah alel mikrosatelit teramplifikasi pada masing-masing lokus

Lokus mikrosatelit	Kisaran alel teramplifikasi (pb)	Jumlah alel teramplifikasi pada berbagai <i>breed</i>					Total alel teramplifikasi
		Kampung	Pelung	Sentul	Kedu Hitam	White Leghorn	
ABR 258	114-145	14	13	12	12	2	17
ABR 359	204-214	4	3	5	4	1	5
ABR 297	161-167	4	4	3	4	2	4
ABR 339	80-84	3	2	3	3	1	3
ABR 75	158-180	6	8	7	6	3	8
ABR 209	176-212	10	7	10	9	3	14
ABR 28	207-221	5	4	5	4	3	5
ABR 419	339-361	7	4	5	3	1	7
ABR 604	215-233	7	7	7	7	2	10
Total Alel		60	52	57	52	18	73
(%)		82,20	71,23	78,08	71,23	24,66	

Tabel 3. Frekuensi alel lokus mikrosatelit dari beberapa *breed* ayam lokal (%)

Lokus mikrosatelit	Ukuran alel (pb)	<i>Breed</i> ayam lokal				White Leghorn
		Kampung	Pelung	Sentul	Kedu Hitam	
ABR 359	204	63,8	75	67,4	48	0
	206	20,2	4,2	8,7	20	0
	208	8,5	20,8	10,9	24	0
	210	7,4	0	10,9	8	100
	214	0	0	2,2	0	0
ABR 297	161	5,8	17,5	10	10,9	0
	163	25,6	17,5	15	23,9	78,9
	165	66,3	55	75	58,7	21,1
	167	2,3	10	0	6,5	0
ABR 339	80	3,3	2,1	4,4	4,4	0
	82	76,7	97,9	82,6	89,1	100
	84	20	0	13	6,5	0
ABR 28	207	7,4	20,8	6,3	2	41,7
	215	39,4	35,4	45,8	50	43,8
	217	3,2	0	4,2	6	14,6
	219	30,9	18,8	20,8	34	0
	221	19,1	25	22,9	8	0

Frekuensi alel lokus mikrosatelit merupakan contoh lokus mikrosatelit yang mempunyai alel lebih kecil dari lima alel yaitu ABR 359, ABR 297, ABR 339 dan ABR 28. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada *breed* ayam lokal tidak menunjukkan adanya alel spesifik

yang membedakan *breed* tersebut. Sebagai contoh pada lokus ABR 359, semua *breed* ayam lokal mendominasi alel 204 pb yaitu untuk ayam Kampung, Pelung, Sentul dan Kedu Hitam masing-masing mempunyai alel 204 pb sebesar 63,8; 75; 67,4 dan 48%, berbeda dengan

ayam White Leghorn pada lokus ABR 359 ditandai oleh adanya alel 210 pb sebanyak 100%. Demikian halnya pada lokus mikrosatelit ABR 297, untuk ayam lokal semua *breed* mendominasi alel 165 pb, masing-masing sebesar 66,3; 55; 75 dan 58,7% untuk ayam Kampung, Pelung, Sentul dan Kedu Hitam, sedangkan untuk ayam White Leghorn mendominasi alel 163 pb yaitu sebanyak 78,9%. Pada lokus mikrosatelit ABR 339 semua *breed* ayam lokal maupun ayam White Leghorn mendominasi alel dengan ukuran 82 pb, demikian halnya pada lokus ABR 28 semua *breed* ayam lokal maupun ayam White Leghorn mendominasi alel dengan ukuran 215 pb. Walaupun demikian, pada ayam lokal jumlah alel teramplifikasinya lebih banyak, hal tersebut mengindikasikan bahwa pada *breed* ayam lokal masih mempunyai ragam genetik yang tinggi, sehingga untuk memantapkan suatu *breed* dari ayam lokal masih diperlukan seleksi lebih lanjut.

Dari frekuensi alel yang diperoleh pada setiap *breed* ayam lokal maka hubungan kekerabatan dari beberapa ayam lokal dapat diketahui dengan menghitung jarak genetik NEI (1987) (Tabel 4). Jarak genetik tersebut diasumsikan untuk model mutasi isoalel yang tidak terbatas. Dengan kata lain semua lokus mempunyai kecepatan mutasi netral yang sama dan setiap mutan didefinisikan sebagai alel baru. Diasumsikan pula bahwa keragaman genetik pada suatu populasi berada

pada keseimbangan (*equilibrium*) diantara mutasi dan 'genetic drift' dengan ukuran populasi efektif pada setiap populasi konstan.

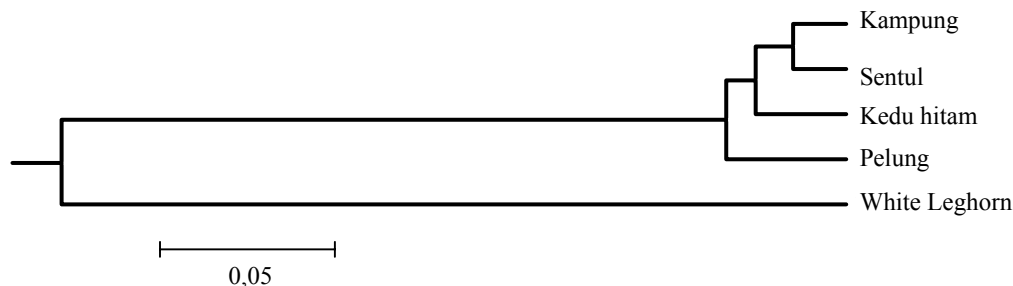
Dari perhitungan jarak genetik berdasarkan NEI (1987) bahwa ayam Kampung mempunyai jarak genetik yang paling dekat dengan ayam Sentul, diikuti Kedu Hitam dan Pelung (Tabel 4). Uji Statistik berdasarkan metode REML (*Restricted Maximum Likelihood estimation*) juga menyatakan bahwa ayam Kampung dan Ayam Sentul mempunyai jarak genetik yang tidak berbeda nyata, demikian pula untuk ayam Pelung dan White Leghorn (Gambar 1).

Pohon filogenik (dendogram) dibuat berdasarkan metode UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means*). Pada mulanya metode UPGMA digunakan untuk tujuan taksonomi, akan tetapi sering pula digunakan untuk pembentukan pohon filogenik dengan asumsi bahwa kecepatan mutasi nukleotida atau substitusi asam amino mempunyai laju evolusi yang sama pada setiap garis keturunannya (KUMAR *et al.*, 1993). Sehingga pohon filogenik berdasarkan metode UPGMA menghasilkan akar pohon. Selain itu mudah dalam interpretasi dan aplikasinya serta mengurangi kesalahan-kesalahan stokastik akibat estimasi jarak genetik. Dari hasil penelitian ini terlihat bahwa ayam Kampung, Pelung, Sentul dan Kedu Hitam berasal dari

Tabel 4. Matriks jarak genetik antara ayam Kampung, Pelung, Sentul, Kedu Hitam dan White Leghorn berdasarkan 9 lokus mikrosatelit

Jenis ayam	Kampung	Pelung	Sentul	Kedu Hitam	White Leghorn
Kampung	0,000	*	ns	*	*
Pelung	0,068	0,000	*	*	ns
Sentul	0,031	0,069	0,000	*	*
Kedu Hitam	0,044	0,070	0,062	0,000	*
White Leghorn	0,471	0,431	0,457	0,445	0,000

* Uji Statistik berdasarkan metode REML (*Restricted Maximum Likelihood estimation*) dengan selang kepercayaan 96%



Gambar 1. Dendogram berdasarkan metode UPGMA

satu rumpun (satu nenek moyang), berbeda dengan ayam White Leghorn berasal dari rumpun terpisah. Gambar dendrogram menunjukkan bahwa ayam Kampung dan ayam Sentul mempunyai hubungan kekerabatan terdekat, diikuti ayam Kedu Hitam dan ayam Pelung. Namun demikian dendrogram pohon filogenik dapat berubah, karena sangat tergantung pada substitusi nukleotida atau asam amino yang merupakan subyek dari kesalahan stokastik. Pohon filogenik sangat dipengaruhi oleh jumlah sampel yang berpengaruh terhadap polimorfisme alel pada suatu populasi (NEI, 1986; NEIGEL and AVISE, 1986). Namun demikian hasil dendrogram pohon filogenik pada penelitian ini telah sesuai dengan yang diharapkan, karena berdasarkan fenotipnya ayam Kampung banyak kesamaannya dengan ayam Sentul, dibandingkan dengan ayam Kedu Hitam maupun ayam Pelung.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa keragaman genetik ayam lokal masih cukup tinggi yang diperlihatkan oleh variasi alel yang dihasilkan sangat polimorfik. Pada ayam Kampung, Pelung, Sentul maupun Kedu Hitam tidak diperoleh alel spesifik yang membedakan *breed* tersebut, sehingga diperlukan seleksi untuk mendapatkan *breed* yang mantap. Berdasarkan penanda DNA mikrosatelit ayam Kampung, Pelung, Sentul dan Kedu Hitam berasal dari rumpun atau nenek moyang yang sama. Ayam Kampung mempunyai jarak genetik yang paling dekat dengan ayam Sentul, kemudian diikuti ayam Kedu Hitam dan ayam Pelung.

DAFTAR PUSTAKA

- CHENG, H.H and L.B. CRITTENDEN. 1994. Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poult. Sci.* 73: 539-546.
- CROOIJMANS, R.P.M.A., A.J.A. VAN KAMPEN, J.J. VAN DER POEL dan M. A. M. GROENEN. 1993. Highly polymorphic microsatellite markers in poultry. *Anim. Genet.* 24: 441-443.
- FELSENSTEIN, J. 1993. Phylogeny Inference Package (PHYLIP). Version 3.5. University of Washington, Seattle.
- GROENEN, M.A.M., H.H. CHENG, N. BUMSTEAD, B.F. BENKEL, W.E. BRILES, T. BURKE, D.W. BURT, L.B. CRITTENDEN, J. DODGSON, J. HILLEL, S. LAMONT, A.P. DE LEON, M. SOLLER, H. TAKAHASHI and A. VIGNAL. 2000. A Consensus linkage map of the chicken Genome. *Genome Res.* 10 (1): 137-147.
- KUMAR, S., K. TAMURA and M. NEI. 1993. MEGA, Molecular Evolutionary Genetics Analysis. Institute of Molecular Evolutionary Genetics. The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802, USA.
- NATAAMIJAYA, A. G. 2000. The native chicken of Indonesia. *Bulletin Plasma Nufah* 6(1): 1-6.
- NEI, M. 1986. Stochastic errors in DNA evolution and molecular phylogeny. *In: Evolutionary Perspectives and the New Genetics.* H. GERSHOWITZ, D.L. RUCKNAGEL and R.E. TASHIAN (Eds.). Alan R. Liss, New York. pp. 133-147.
- NEI, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.
- NEIGEL, J.E. and A.C. AVISE. 1986. Phylogenetic relationships of mitochondrial DNA under various demographic models of speciation. *In: Evolutionary Processes and Theory.* S. KARLIN and E. NEVO (Eds.). pp. 515-534.
- SMITH J., V. FILLON, R.P.M.A. CROOIJMANS and D.W. BURT. 2000. Integration of the genetic and physical maps of the chicken macrochromosomes. *In: First report on chicken Genes and chromosomes 2000. Cytogenet. Cell. Genet.* 90: 169-218.
- SMITH, J. 2000. Differences in gene density on chicken macrochromosomes and micro-chromosomes. *In: First report on chicken Genes and chromosomes 2000. Cytogenet. Cell. Genet.* 90: 169-218.
- TAKAHASHI, H., K. NIRASAWA, Y. NAGAMINE, M. TSUDZUKI and Y. YAMAMOTO. 1998. Genetic Relationships among Japanese native breeds of chicken based on microsatellite DNA polymorphisms. *J. Heredit.* 89 (6): 543-546.
- WEIGEND, S., M. TIXIER-BOICHARD, J. HILLEL, A. VIGNAL, M.A.M. GROENEN, K. WIMMERS, T. BURKE and A. MAKI-TANILA. 2000. Assessment of biodiversity in chickens. *In: First report on chicken genes and chromosomes 2000. Cytogenet. Cell. Genet.* 90: 169-218.
- ZHU, J.J., H.S. LILLEHOJ, H.H. CHENG, D. POLLOCK, M. SADJADI and M.G. EMARA. 2001. Screening for highly heterozygous chicken in outbred commercial broiler lines to increase detection power for mapping quantitative trait loci. *Poult. Sci.* 80: 6-12.