

Bazı çıplak boyunlu köy tavuğu kongenik populasyonlarında mikrosatelit DNA polimorfizmi

Levent MERCAN¹, Ahmet OKUMUŞ¹

¹Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, SAMSUN

Alınış tarihi: 08 Mart 2016, Kabul tarihi: 24 Ağustos 2016

Sorumlu yazar: Levent MERCAN, e-posta: lmercan@omu.edu.tr

Öz

Bu çalışmada Samsun, Ordu ve Amasya'da çıplak boyunlu köy tavuklarının bulunduğu tespit edilen köylerdeki tavuklardan oluşturulan 7 kongenik populasyon ile referans olarak kullanılan bir Gerze tavuk populasyonunun 28 mikrosatelit lokusunda allelik polimorfizm durumlarının ve genetik ilişkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışılan 28 lokusta elde edilen allel sayısı 2-15 arasında değişmektedir. En az allel LEI0192 lokusunda, en çok allel ise LEI0234 lokusunda tespit edilmiştir. Bu lokuslar aynı zamanda polimorfizm bilgi içeriği (PIC) değeri sırasıyla en düşük (0,375) ve en yüksek (0,918) olan lokuslardır. Populasyonlar arasında genetik benzerlik katsayısı 0,000-0,177 arasında değişmektedir. Tüm lokuslar bakımından allel sayısı en az olan populasyon 32 allel ile SVNN, en çok olan ise 38 allel içeren ASNN02 ve SANN02'dir. Kümeleme analizleri sonucunda oluşturulan dendogramda populasyonların yetiştirildikleri bölgelere göre gruplandıkları görülmüştür. Filogenetik ağaç topolojisinde Samsun ve Amasya populasyonları ile Gerze populasyonu aynı grupta yer almış, Ordu populasyonları ise ayrı bir grup oluşturmuştur. Bulgular, populasyonların moleküler olarak özgün genetik değer taşıdığını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Çıplak boyunlu tavuk, mikrosatelitler, genetik polimorfizm

Microsatellite DNA polymorphism in some congenic naked neck village chicken populations

Abstract

In this study, we aimed to determine of allelic polymorphisms and genetic relationships among 7 populations generated from congenic village naked neck chicken in Samsun, Ordu and Amasya with Gerze chicken population used as a reference, by 28 microsatellite loci. The number of alleles obtained from all loci was 2 to 15. Minimum and maximum number of alleles was determined in LEI0196 and LEI0234 microsatellite loci, respectively. Besides, these loci have the lowest (0.375) and the highest (0.918) polymorphism information content (PIC) values. Genetic similarity coefficients ranged from 0.000 to 0.177 among all populations. In terms of all loci, the least number of alleles was seen in SVNN population with 32 alleles and the most number of alleles were seen in ASNN02 and SANN02 populations with 38 alleles. Clustering analysis based phylogenetic dendrogram showed that the populations were mainly grouped according to their regions. Samsun, Amasya and Gerze populations were took place in the same group, while Ordu populations were in a separated group in the phylogenetic tree topology. The findings suggest that populations have had unique genetic richness at the molecular level.

Key words: Naked neck chicken, microsatellites, genetic polymorphism

Giriş

Çıplak boyunluluk geni (Na) kalitatif kriterler ile tanımlanabilen majör etkili bir gendir. Bu gene sahip tavukların diğer tavuklardan en belirgin farkı büyük çoğunluğu boyunlarında olmakla birlikte vücutlarındaki tüy oranının heterozigotlarda % 20-30, homologlarda % 40 kadar daha az olmasıdır. Çıplak boyunluluk geni taşıyan tavukların özellikle yüksek sıcaklık stresi altında; yem tüketimi, bazı verim özellikleri ve yaşama gücü oranları daha iyi bulunmuştur. (Yalçın ve ark., 1997; Singh ve ark., 2001; Tixier-Boichard, 2002; Cemal ve Karaca, 2001; Alkan ve ark., 2003; Islam ve Nishibori, 2009).

Moleküler markörler, DNA üzerindeki çeşitli bölgeler arasındaki farklılıkları ortaya koyan belirteçlerdir. Çiftlik hayvanlarında kullanılan ilk markörler, belirli bir lokusun kodladığı farklı proteinlerin varlığına dayalı olan allozimlerdir. Allozimler, sayılarının az ve polimorfizm düzeylerinin de düşük olması nedeniyle kullanımları sınırlı olan markörlerdir. Günümüzde genetik teknolojilerin gelişmesi ile birlikte DNA düzeyindeki markörler genetik araştırmalarda hızlı

bir şekilde allozimlerin yerini almışlardır (Toro ve ark., 2009). Önemli DNA markörlerinden biri ökaryotik organizmaların genomlarında 1-6 nükleotidlik ardışık tekrarlardan oluşan lokuslar olan mikrosatelitlerdir. Bu bölgelerdeki dizi tekrarı sayılarının farklılığı genotipler arasındaki varyasyonun belirlenmesini sağlar. Mikrosatelitler, polimorfik DNA yapısının en önemli belirteçlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Goldstein ve ark., 1995; Selkoe ve Toonen, 2006; Kaplan ve ark., 2015). Mikrosatelit markörlerin, PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonları) temelinde kolayca belirlenebilmeleri, lokusa özgü olmaları, tüm genom boyunca dağılmış, polimorfizm düzeylerinin ve tekrarlanabilirliklerinin yüksek olması, kodominant kalıtım göstermeleri diğer markör yöntemlerine göre önemli avantajlarından biridir (Powell ve ark., 1996; Korzun, 2003).

Orta Karadeniz bölgesinde daha önce yapılan bir çalışmada (Mercan ve Okumuş, 2015) genetik çeşitlilik durumları araştırılan 445 köy tavuğu arasında fenotipik çıplak boyunlu tavukların var olduğu görülmüştür (Şekil 1).



Şekil 1. Çıplak boyunlu köy tavuğu örneği (Amasya/Suluova/Alakadı Köyü)

Fenotipik olarak dikkate değer bir farklılığı işaret eden bu durum, böyle genotiplerin genetik çeşitlilik açısından özgün bir allelik zenginlik kaynağı olarak değerlendirilip değerlendirilemeyeceği sorusunu gündeme getirmiştir. Bu bağlamda çalışmanın amacı çeşitli düzeylerde çıplak boyunluluk fenotipi gösteren bu özgün genotiplerin buldukları kümeslerden alınan kongenik örnekler ile oluşturulan farklı bölgesel populasyonların, çıplak boyunluluk bakımından hiçbir fenotipik benzerlik göstermeyen referans bir Gerze tavuğu populasyonu ile genetik benzerlik ve mesafe durumlarının moleküler düzeyde incelenmesi olmuştur.

Materyal ve Yöntem

Çalışmanın hayvan materyalini oluşturmak üzere benzer genetik özgeçmişe sahip oldukları düşünüldüğünden, fenotipik çıplak boyunlu tavuk örneklerinin bulunduğu 7 farklı köydeki kümeslerden, populasyon başına örnek sayısı en az 30 olacak şekilde 7 populasyon oluşturulmuş, bu amaçla toplam 237 tavuktan kan örneği alınmıştır. Karşılaştırma yapabilmek amacıyla referans populasyon olarak fenotipik çıplak boyunlu hiç bir bireyin bulunmadığı Gerze Gıda Tarım ve Hayvancılık İlçe Müdürlüğü bünyesindeki özgün Gerze tavuğu populasyonuna ait 43 bireyin DNA'sı kullanılmıştır.

Kan örnekleri enjektör yardımıyla, kanat altı toplardamarından (Vena cutanea ulnaris) alınmış, antikoagülant içeren 2 ml'lik tüpler içerisinde soğuk zincirde muhafaza edilmiştir. DNA özütleme işlemi silika membranlı, kandan DNA özütleme kiti peqGOLD® (Peqlab, Almanya) yardımıyla kit protokolüne göre yapılmıştır. Kanatlı eritrositleri çekirdek içerdiğinden memeli kanından gerekli miktarın 1/10 hacmi kadar kullanılmıştır. Bireylere ait DNA örneklerinin miktar ve kaliteleri spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve 10 ng/µl olarak standardize edildikten sonra genotipleme maliyetini azaltmak için her bir populasyon için 30'ar bireyin DNA'sı bulunan 8 DNA havuzu oluşturulmuştur. Populasyonlara ait DNA havuzları, çalışma kolaylığı açısından ASNN01, ASNN02, OKNN, OUNN, SANN01, SANN02, SVNN ve GRZ_REF şeklinde kodlanmıştır. Bu kodlar sırasıyla; Amasya İli Suluova İlçesi Alakadı Köyü'nden, Amasya İli Suluova

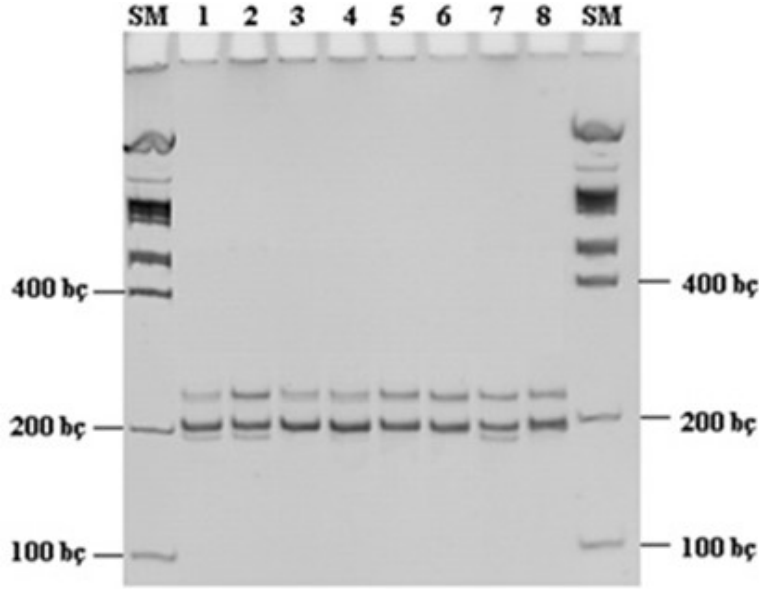
İlçesi Yüzbeyli Köyü'nden, Ordu İli Kumru İlçesi Kıran Köyü'nden, Ordu İli Ünye İlçesi Yenikent Beldesi'nden, Samsun İli Asarcık İlçesi Gökgöl Köyü'nden, Samsun İli Asarcık İlçesi Uluköy Köyü'nden, Samsun İli Vezirköprü İlçesi Boğazkoru Köyü'nden alınan populasyonları ve Gerze tavuk ırkı populasyonunu temsil etmektedir. Araştırmada tavuklarda genetik çeşitlilik çalışmalarında en sık kullanılan mikrosatelit lokusları arasında yer alan ve Orta Karadeniz Bölgesi'ndeki köy tavukları üzerinde daha önce de çalışılan (Mercan ve Okumuş, 2015) 28 mikrosatelit lokusu kullanılmıştır. Bu lokuslar otozomal kromozomlar üzerinde bulunan, yüksek düzeyde polimorfizm gösteren ve bağlı olmayan lokuslardır (Romanov ve Weigend, 2001; Rosenberg ve ark., 2001; Hillel ve ark., 2003).

Polimeraz Zincir Reaksiyonları işlemleri PEQLAB Primus 96 Gradient PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. PZR işlemleri için reaktifler; 94°C'de 5 dakikalık ilk denatürasyonu takiben 30 döngü boyunca; denatürasyon için 30 saniye 94°C, primerlerin bağlanması için 30 saniye 58-60°C ve uzama için 30 saniye 72°C'de tutulmuştur. Döngüler tamamlandıktan sonra son uzama (final extension) için 5 dakika 72°C'de bekletilmiştir.

Elektroforetik ayrımlamalar, poliakrilamid jel kullanılarak dikey elektroforez cihazında yapılmış (20x20cm, 200 Volt, 2 saat 30 dakika), jel daha sonra ethidyum bromür ile boyandıktan sonra SYNGENE marka jel dokümantasyon cihazı ile görüntülenmiş, SYNGENE GeneTools programı yardımıyla elde edilen amplifikasyon ürünlerinin skorlanması işlemi tamamlanmıştır. Genotipler arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacıyla NTSYSpc V2.11 (Rohlf, 2000) programı yardımıyla genetik benzerlik değerlerinin UPGMA (Unweighted pair-group method using arithmetic averages- Aritmetik ortalamaları kullanan tartışız eş-grup metodu) yöntemine göre kümeleme (clustering) işlemi gerçekleştirilmiş ve sonuçlar dendogram şeklinde görselleştirilmiştir.

Bulgular

Populasyonların tamamında, çalışılan mikrosatelit lokuslarında en az 2 (LEI0192), en çok 15 (LEI0234) allel gözlenmiştir. Şekil 2'de MCW0104 lokusunda elde edilen örnek bir poliakrilamid jel görüntüsü verilmiştir.



Şekil 2. MCW00104 mikrosatellit lokusuna ait örnek poliakrilamid jel görüntüsü

Çalışılan mikrosatellit lokuslarının kromozomal konumları ve tüm populasyonlarda tespit edilen allellerin büyüklükleri ve sayıları ile lokusların polimorfizm bilgi içeriği (PIC) değerleri Çizelge 1’de verilmiştir.

Çizelge 1. Kullanılan mikrosatellit lokuslarının konumu (Hillel ve ark., 2003), bu lokuslarda tespit edilen allel büyüklükleri, allel sayıları ve PIC değerleri

Lokus	Konum		Allel Büyüklükleri (baz çifti)	Toplam Allel Sayısı	PIC değeri
	Kromozom	Harita Bölgesi			
ADL 0112	10	19	122-124-128-132-134-140-142	7	0,844
ADL 0268	1	288	98-100-102-104-106-108-110	7	0,844
ADL 0278	8	94	106-114-118-120-124-126-128	7	0,816
LEI 0094	4	153	235-249-251-259-261-263-265-269	8	0,859
LEI 0166	3	300	360-366-378-384-390-394	6	0,758
LEI0192	6	114	350-358	2	0,375
LEI0234	2	50	256-268-272-276-304-312-324-336-340 348-352-360-364-368-372	15	0,918
MCW 0014	6	50	188-190-192-194-196	5	0,781
MCW0016	3	247	134-136-140-144-146-162-166-170-172	9	0,852
MCW0034	2	233	220-222-226-228-230-242	6	0,688
MCW0037	3	317	146-150-152-154-156-158	6	0,813
MCW 0067	10	59	176-178-182-188	4	0,656
MCW 0069	26	47	148-154-156-158-162-164-170-172-180	9	0,883
MCW 0078	5	93	135-141-143-145-147	5	0,742
MCW 0080	15	49	286-288-292-296-300-304-306-310	8	0,875
MCW0081	15	49	112-114-116-118-124-126-133-135-137-139	10	0,870
MCW 0098	4	217	285-289-291-293-295	5	0,688
MCW 0103	3	201	276-278-280-282	4	0,719
MCW0104	6	50	186-190-196-200-206-214-218-226	8	0,797
MCW 0111	1	118	96-98-102-104-106-114	6	0,641
MCW 0123	14	45	82-88-90-92	4	0,656
MCW 0183	7	86	290-292-296-298-300-308	6	0,852
MCW 0206	2	104	229-233-235-243-245	5	0,781
MCW0216	13	47	145-147-149-151	4	0,735
MCW 0222	3	85	220-224-226-228	4	0,656
MCW 0248	1	19	205-207-209-213-215-221	6	0,813
MCW0295	4	75	88-90-96-98-100	5	0,805
MCW330	17	41	260-262-272-274-276-278-280-282-284-288-290-292	12	0,883
Ortalama allel sayısı:				6,536±0,513	

Çizelge 2’de her bir populasyonda çalışılan tüm lokuslarda gözlenen ortalama allel sayıları verilmiştir. Lokus başına ortalama allel sayıları 1,143 ile 1.357 arasında değişmiştir. Yapılan ki-kare

analizine göre populasyonlar arasında lokus başına ortalama allel sayıları bakımından farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$).

Çizelge 2. Çalışılan tüm mikrosatelit lokusları bakımından populasyonlarda gözlenen allel sayıları ve ortalamaları

Populasyon	Allel sayısı	Lokus başına ortalama allel sayısı
OUNN	36	1,286
OKNN	37	1,321
ASNN01	35	1,250
ASNN02	38	1,357
SANN02	38	1,357
SANN01	35	1,250
SVNN	32	1,143
GRZ_REF	34	1,214

Populasyonlar arasındaki genetik benzerliğin oldukça düşük olduğu, genetik benzerlik katsayılarının 0 ile 0.177 arasında değiştiği belirlenmiştir.

Populasyonlar arasındaki genetik benzerlik durumlarını gösteren matris Çizelge 3’de verilmiştir.

Çizelge 3. Populasyonlar arası genetik benzerlik matrisi

Populasyonlar	OUNN	OKNN	ASNN01	ASNN02	SANN02	SANN01	SVNN	GRZ_REF
OUNN	1							
OKNN	0,177	1						
ASNN01	0,076	0,141	1					
ASNN02	0,057	0,000	0,159	1				
SANN02	0,074	0,071	0,074	0,169	1			
SANN01	0,060	0,059	0,094	0,090	0,177	1		
SVNN	0,030	0,015	0,063	0,129	0,111	0,081	1	
GRZ_REF	0,111	0,029	0,131	0,091	0,075	0,078	0,065	1

Birbirine en yakın populasyonlar; OUNN ve OKNN ile SANN01 ve SANN02 olup, birbirine en uzak populasyonlar ise; OKNN ve ASNN02 olarak tespit edilmiştir.

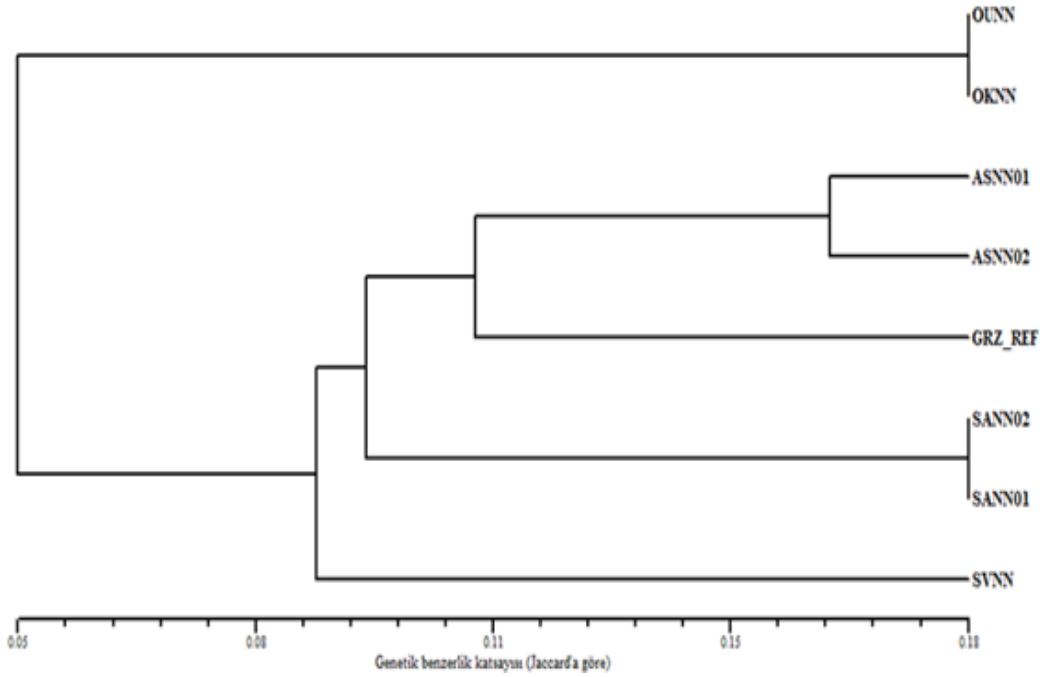
OKNN ve ASNN02 populasyonları arasında çalışılan hiçbir lokusta allel paylaşımının olmadığı görülmüştür. Genetik benzerlik matrisi temel alınarak yapılan kümeleme analizi sonuçlarına göre oluşturulan dendrogram Şekil 3’de verilmiştir.

Çalışılan 28 lokustan sadece 13’ünde heterozigot genotipler tespit edilmiş olup, heterozigotluğun populasyon içinde çok düşük olduğu görülmüştür.

İşlemler tekrarlanmasına rağmen, MCW0183 lokusunda amplifikasyon gerçekleşmediği tespit edilmiştir.

Sonuçlar ve Tartışma

Kalitatif bir özellik olan çıplak boyunluluğu determine eden majör etkili geni (Na) taşıdıkları için seçilen fenotipik çıplak boyunlu genotiplerin ve kongenik akrabalarının bulunduğu populasyonların moleküler karakterizasyonunda önemli allelik polimorfizmin varlığı saptanmıştır.



Şekil 3. UPGMA yöntemine göre populasyonlar arası filogenetik dendrogram

Çizelge 1 incelendiğinde çalışmada elde edilen allel sayılarının Mercan ve Okumuş'un (2015), Orta Karadeniz Bölgesi'nde yapmış oldukları çalışmada aynı lokuslarda elde ettikleri 6-28 allelden az olduğu görülmüştür. Bununla birlikte çalışılan tüm lokuslar bakımından polimorfizm durumu en düşük olan lokusun LEI0192, en yüksek olanın ise LEI0234 olduğunu, bu lokusların aynı zamanda PIC değeri bakımından da en düşük ve en yüksek değere sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu bakımdan elde edilen sonuçlar, araştırma bulguları ile uyum içerisindedir.

Çizelge 2'de çalışılan mikrosatelit lokusların yüksek polimorfizm gösteren lokuslar olduğu bildirilmesine rağmen (Romanov ve Weigend, 2001; Hillel ve ark., 2003; Mercan ve Okumuş, 2015) lokus başına allel sayısının düşük olduğu görülmektedir.

Bunun nedeninin, populasyonları oluşturan bireyler arasındaki akrabalık derecesinin yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Genetik çeşitlilik durumlarının belirlenmesi konusunda yapılan çalışmalarda alınan örneklerin birbiriyle ilişkisiz genotiplerden oluşmasına dikkat edilmektedir. Oysa bu çalışmada özellikle ortak gen havuzundan örnek

alınmıştır. Bu durumun allel çeşitliliğini azaltması olağandır.

Populasyonlar arasındaki genetik benzerlik durumlarını gösteren Çizelge 3 incelendiğinde populasyonların birbirlerinden oldukça farklı oldukları görülmektedir. Ortak allel paylaşımının azlığı, populasyonların genetik açıdan birbirlerine göre özgün yapılara sahip olduklarını göstermektedir.

Fenotipik benzerliğe sahip genotip grupları arasındaki ilişki filogenetik kümelenme boyutunda dendrogram yardımıyla incelendiğinde populasyonların yetiştirildikleri bölgelere göre kümelendikleri dikkati çekmektedir. Ayrıca, Ordu populasyonlarının; Samsun, Amasya ve Gerze populasyonlarından ayrı gruplandığı görülmektedir. Bu daha önce bölgede yapılan çalışmadaki (Mercan ve Okumuş, 2015) bulgular ile örtüşmektedir. Örnek toplama aşamasında Ordu populasyonlarını oluşturan tavukların dış görünüş bakımından da farklı oldukları özellikle dikkati çekmiştir. Bölgedeki bu farklılığı gösteren örnek resimleri mahfuzdur.

Çıplak boyunluluk geni bakımından heterozigot olan bireylerin boyunlarında birkaç düzine tüy olduğu bildirilmektedir (Cemal ve Karaca, 2001). Yapılan çalışmada fenotipik olarak boyun bölgesi tamamen tüsüz tavuk tespit edilmemiştir. Bu

nedenle çalışılan populasyonlardaki çıplak boyunlu tavukların bu gen bakımından heterozigot olduğu söylenebilir.

Genomda mikrosatelit lokusunu çevreleyen/kuşatan bölgeler (flanking regions) aynı zamanda primerlerin bağlanma bölgeleridir. PZR'de kullanılacak primerler bu bölgelerde yer alan dizilere göre dizayn edildiklerinden primer bağlanma bölgesinde gerçekleşen mutasyonlar amplifikasyonun gerçekleşmesini olumsuz etkiler (Chapuis ve Estoup, 2007). Bu durum, çalışılan bazı örneklerde meydana gelen amplifikasyon sorunlarının böyle bir mutasyon sonucu gerçekleşmiş olabileceğini düşündürmüştür. Populasyonlar arası genetik benzerlik düzeylerinin düşük olması bu populasyonların özgün genetik niteliğinin bir belirteci olarak değerlendirilmelidir.

Moleküler analizlerin her bir genotip için teker teker yapılması da populasyon içi tanımlayıcı istatistikler ile populasyonlar arası genetik ilişkinin daha hassas bir şekilde belirlenmesi bakımından uygun olacaktır. Genetik kaynaklarda meydana gelen kayıpların geri dönüşsüz olması, yerel genetik zenginliklerimizin korunmasına yönelik çabaların desteklenmesini gerektirmektedir.

Kaynaklar

Alkan, S., Mutaf, S., Şeber, N., 2003. Antalya İli Yaz Koşullarının Farklı Genotiplerdeki Etlik Piliçlerin Vücut Sıcaklıklarına ve Kan Gazlarına Etkisi. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 16(2), 135-142.

Cemal, İ., Karaca, O., 2001. Tavuklarda Major Genler. I. Doğu Anadolu Kanatlı Yetiştiriciliği Sempozyumu, 21-24 Mayıs 2001, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van.

Chapuis, M.P., Estoup, A., 2007. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24(3), 621-631.

Goldstein, D.B., Linares, A.R., Cavalli-Sforza, L.L., Fedman, M.W., 1995. An Evaluation of Genetic Distances for Use with Microsatellite Loci. *Genetics*, 139, 463-471.

Hillel, J., Groenen, M.A.M., Tixier-Boichard, M., Korol, A.B., David, L., Kirzhner, V.M., Burke, T., Barre-Dirie, A., Crooijmans, R.P.M.A., Elo, K., Feldman, M.W., Freidlin, P.J., Maki-Tanila, A., Oortwijn, M., Thomson, P., Vignal, A., Wimmers, K., Weigend, S., 2003. Biodiversity of 52 chicken populations

assessed by microsatellite typing of DNA pools. *Genetics Selection Evolution*, 35, 533-557.

Islam, M.A., Nishibori, M., 2009. Indigenous naked neck chicken, a valuable genetic resource for Bangladesh. *World's Poultry Science Journal*, 65, 125-138.

Kaplan, S., Boztepe, S., Arıkoğlu, H., 2015. The Potential of Microarray Databases to Identify Tissue Specific Genes, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 22, 29-35.

Korzun, V., 2003. Molecular markers and their applications in cereals breeding. Available from URL:<http://www.fao.org/Biotech/docs/Korzun.pdf> / [Erişim:10 Ocak 2016].

Mercan, L., Okumuş, A. 2015. Genetic diversity of village chickens in Central Black Sea Region and commercial chickens in Turkey by using microsatellite markers. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 39, 134-140.

Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., Rafalski, A., 1996. Comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2, 225-238.

Rohlf, F.J., 2000. NTSYSpc Version 2.11 Numeric Taxonomy System. Exeter Software, NY, USA.

Romanov, M.N., Weigend, S., 2001. Analysis of Genetic Relationships Between Various Populations of Domestic and Jungle Fowl Using Microsatellite Markers. *Poultry Science*, 80, 1057-1063.

Rosenberg, N.A., Burke, T., Elo, K., Feldman, M.W., Freidlin P.J., Groenen, M.A.M., Hillel, J., Maki-Tanila, A., Tixier-Boichard, M., Vignal, A., Wimmers, K., Weigend, S., 2001. Empirical Evaluation of Genetic Clustering Methods Using Multilocus Genotypes from 20 Chicken Breeds. *Genetics*, 159, 699-713.

Selkoe, K.A., Toonen, R.J., 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9, 615-629.

Singh, C.V., Kumar, D., Singh, Y.P., 2001. Potential usefulness of the plumage reducing Naked Neck (Na) gene in poultry production at normal and high ambient temperatures. *World's Poultry Science Journal*, 57(2), 139-156.

Tixier-Boichard, M., 2002. From phenotype to genotype: major genes in chickens. *World's Poultry Science Journal*, 58(1), 65-75.

Toro, M.A., Fernandez, J., Caballero, A., 2009. Molecular characterization of breeds and its use in conservation. *Livestock Science*, 120, 174-195.

Yalçın, S., Testik, A., Ozkan, S., Settar, P., Çelen, F., Cahaner, A., 1997. Performance of Naked Neck and Normal

Broilers in Hot, Warm and Temperate Climates. Poultry Science, 76, 930-937.