

JRL	Vol.5	No.3	Hal. 209 - 217	Jakarta, November 2009	ISSN : 0216.7735, No169/Akred-LIPI/P2MBI/07/2009
-----	-------	------	----------------	---------------------------	---

KERAGAMAN GENETIK INDUK UDANG WINDU DI PERAIRAN SELATAN PANGANDARAN DAN BINUANGEUN, JAWABARAT

Ratu Siti Aliah

Deputi Bidang Teknologi Agroindustri dan Bioteknologi

Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT)

E-mail : r_sitialiah@yahoo.com

Abstract

*An evaluation of the Black Tiger Brood Stock (*Penaeus monodon*) genetic diversity of Pangandaran and Binuangeun was conducted by using the mtDNA diversity of two gene locus of CO I and 12S rRNA to understand their population genetic diversity. The result show that the brood stock of Pangandaran has 17 haplotipe, while from Binuangeun has 13 haplotipe. The result indicated that the genetic diversity of the Black Tiger brood stock of Pangandaran was higher than that Binuangeun.*

Key words : Genetic diversity, Black Tiger brood stock, Pangandaran, Binuangeun

1. Pendahuluan

Udang windu (*Penaeus monodon*) merupakan komoditas penting dalam budidaya udang Indonesia dan pernah mengalami masa kejayaannya selama lebih dari satu dasawarsa sekitar periode 1980-1990 (Gambar 1). Pada saat itu komoditas udang windu telah mengangkat Indonesia menjadi salah satu negara eksportir udang terbesar dunia. Namun dalam dekade terakhir ini, komoditas udang windu dirasakan banyak mengalami hambatan dalam pengembangannya baik dalam pembudidayaan maupun pemasarannya. Selain masalah lingkungan dan penyakit yang sampai saat ini belum sepenuhnya dapat terpecahkan, ketersediaan benih udang windu dengan kualitas prima, tahan penyakit dan dapat dengan mudah beradaptasi terhadap berbagai kondisi lingkungan masih sangat terbatas. Untuk mengembalikan kejayaan udang windu, selain perbaikan sistem dan teknik budidaya, pengendalian lingkungan dan penyakit, tidak kalah pentingnya juga penyediaan benih yang sehat dan berkualitas baik. Ketersediaan benih yang berkualitas prima tidak terlepas dari ketersediaan induk yang berkualitas baik.

Induk dan calon induk udang yang baik secara alami harus diperoleh dari perairan yang kualitasnya juga relatif lebih baik. Perairan selatan Jawa secara alami memiliki kualitas perairan yang jauh lebih baik dibandingkan dengan perairan utara Jawa dimana banyak aliran sungai yang membawa limbah organik dan limbah industri yang bermuara ke pantai utara Jawa. Sementara kegiatan budidaya laut dan tambak di perairan selatan Jawa juga relative lebih sedikit dibandingkan dengan di utara Jawa, sehingga kualitas perairan selatan Jawa diperkirakan jauh lebih baik dibandingkan dengan utara Jawa, apalagi perairan selatan Jawa berhadapan langsung dengan laut terbuka Samudera Hindia yang tidak banyak dipengaruhi lingkungan darat seperti perairan di utara Jawa. Sehingga kualitas perairannya akan lebih terjaga dan diharapkan induk-induk yang diperoleh dari habitat alami yang masih baik dapat menghasilkan calon induk dan benih yang berkualitas baik. Untuk mendukung pengembangan budidaya udang windu yang saat ini tepuruk, maka diperlukan ketersediaan induk-induk udang windu berkualitas yang diperlukan untuk pengembangan usaha pembenihannya. Salah satu cara untuk mengetahui sumber induk yang baik, dapat dilakukan melalui analisa

keragaman genetik (Bartley, 1992; Pulin, 1996; Bert and Tringali, 1999; Mustafa, 1999) yang dalam penelitian ini difokuskan diperairan selatan Jawa Bagian Barat, yaitu disekitar perairan pantai Pangandaran di sebelah timur dan perairan Binuangeun di sebelah barat Jawa Barat, karena didaerah tersebut sampai dengan saat ini sudah dikenal sebagai daerah penangkapan induk udang windu di perairan selatan Jawa Barat dan belum diketahui keragaman genetiknya.

Gambar 1. Induk udang windu yang dari sekitar pantai (kiri) dan dari lepas pantai (kanan)

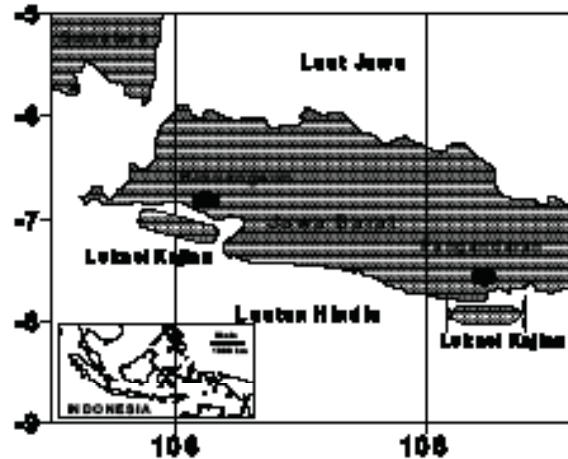


2. Metoda Penelitian

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Kegiatan penelitian ini dilaksanakan selama 4 bulan dari bulan Juli hingga Oktober 2005. Sedangkan lokasinya adalah perairan selatan Jawa bagian Barat yang difokuskan pada dua lokasi yang diduga merupakan daerah potensial penangkapan induk udang windu di kawasan ini. Kedua daerah tersebut yaitu perairan sekitar Pangandaran dan Binuangeun. Secara ekologis, hidrologis dan oceanografis kedua daerah tersebut memenuhi syarat sebagai habitat udang windu, mengingat perairannya mirip dengan perairan estuaria yang sedikit banyak dipengaruhi perairan tawar dari sungai yang mengalir disekitar dua lokasi tersebut, sehingga perairannya dapat bersalinitas rendah atau bersifat payau (Gambar 2).

Gambar 2. Peta lokasi pengambilan sampel induk udang di Perairan Selatan Pangandaran dan Binuangeun, Jawa Barat



2.2 Pengambilan Sampel dan Analisa Data

Sampel DNA untuk analisa keragaman genetik udang windu (*Peneaeus monodon*) di Pangandaran dan Binuangeun diambil dari pleopod (kaki renang)nya. Ekstraksi DNA kemudian dilakukan dengan menggunakan Fast DNA kit produk Q-Biogen. Untuk mendapatkan jumlah DNA yang lebih banyak, sampel DNA dihancurkan dengan menambahkan nitrogen cair dan ditumbuk seperlunya. Selanjutnya, lokus gen COI dan 12S rRNA udang windu dari masing-masing lokasi dipilih untuk dideteksi keragaman haplotipenya. Amplifikasi lokus COI dan 12S rRNA digunakan primer-primer yang didesain sendiri dengan berpatokan kepada urutan basa DNA dari GeneBank dengan nomor accession : AF217843. Setelah desain ditentukan, kemudian dilakukan optimasi PCR untuk menentukan suhu annealing yang sesuai. Selanjutnya dilakukan sequencing dengan menggunakan mesin sequenser AB 3130 Genetic Analyser, keluaran Applied Biosystems Co.

Analisa keragaman DNA dari 2 populasi induk udang windu (*Penaeus monodon*) asal Pangandaran dan Binuangeun dilakukan untuk melihat keragaman genetiknya. Untuk itu dihitung keragaman haplotipenya (*haplotype diversity*) yang perhitungannya didasarkan kepada persamaan Nei dan Tajima (1981), dan Nei (1989) :

$$h = 2n (1 - \sum xi^2) / (2n - 1)$$

Keterangan :

- h = diversitas haplotipe
 n = ukuran sampel
 xi = frekwensi haplotipe sample ke-i.

Dari perhitungan tersebut, individu induk udang windu kemudian dikelompokkan berdasarkan kedekatan susunan haplotipenya dengan menggunakan analisa bootstrap dari PHYLIPS. Hasil pengelompokan individu kemudian disajikan dalam bentuk *cladogram rectangular*.

3. Hasil Dan Pembahasan

Keragaman genetik suatu populasi organisma dapat dideteksi melalui pengamatan polimorfisme tingkat DNA nya. Mitochondrial DNA atau mtDNA adalah DNA dari mitochondrion, yaitu satu struktur DNA yang berada dalam cytoplasma dari sel dan tidak terdapat dalam nucleus. Mitochondrial DNA ini bersifat maternal inheritance, artinya hanya diwariskan melalui garis "ibu", karenanya keturunan dari suatu populasi akan memiliki mtDNA yang sama dengan ibunya. Hal ini juga berarti bahwa perubahan mtDNA dari generasi ke generasi akan lebih kecil dibandingkan dengan nuclear DNA yaitu 50% setiap generasinya. Sejak kecepatan mutasi (*mutation rate*) mudah diukur, mtDNA merupakan instrumen yang tepat untuk menelusuri garis silsilah famili (*family lineage*). Mitochondrial DNA juga sangat potensial digunakan sebagai sistem untuk pengamatan hubungan genetik antar spesies maupun di dalam spesies (intra spesies yang memiliki hubungan dekat). Mitochondrial DNA memiliki derajat polimorfisme yang tinggi sehingga sangat efektif untuk digunakan dalam studi keragaman genetik suatu organisme.

Keragaman genetik dari populasi induk udang windu (*Penaeus monodon*) asal Binuangeun dan Pangandaran dilakukan dengan menggunakan teknik PCR-RFLP. Keragaman haplotipenya diamati pada lokus gen cytochrome oxidase I (COI) dan lokus gen 12S rRNA. Kedua lokus ini dipilih karena merupakan lokus relatif tidak stabil atau mudah mengalami mutasi, sehingga keragaman haplotipenya cukup tinggi. Sampel DNA diperoleh dari pleopod (kaki renang) setiap individu udang windu (*Penaeus monodon*). Kualitas DNA yang dihasilkan diperiksa dengan elektroforesis gel agarose 2% (Gambar 3).

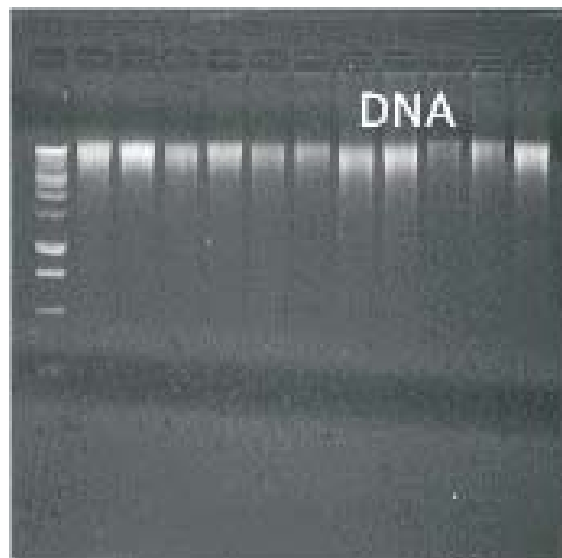
Primer untuk lokus gen COI dan gen 12S rRNA didesain berdasarkan urutan basa DNA dari GeneBank dengan nomor accession : AF217843. Setelah desain ditentukan, dilakukan optimasi PCR untuk menentukan suhu annealing yang cocok. Primer yang didesain untuk lokus gen COI adalah:

- 1) 5'-GTCTATCGCCTATAACTCAGCC-3' (*forward*)
- 2) 5'-CCGTGTAATGTTCTAGTCAGC-3' (*reverse*),

Sedangkan primer yang didesain untuk lokus gen 12S rRNA adalah :

- 1) 5'-CTTCTTGGCCCTCAACTTAC-3' (*forward*)
- 2) 5'-

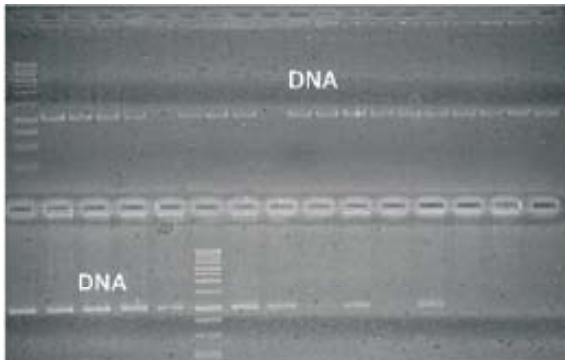
Gambar 3. Pemeriksaan kualitas DNA



Amplifikasi sekuense COI dan 12s dilakukan dengan menggunakan primer-primer tersebut di atas. Pengamplifikasian terhadap gen COI dan 12S rRNA ini dilakukan masing-masing dengan mesin PCR dalam kondisi 1 siklus denaturasi awal pada suhu 95 °C selama 5 menit, 33 siklus yang setiap siklusnya terdiri dari denaturasi pada suhu 95 °C selama 30 detik, annealing pada suhu 50 °C selama 30 detik dan ekstensi pada suhu 72 °C selama 30 detik dan diakhiri dengan 1 siklus elongasi pada suhu 72 °C selama 5 menit. Hasil

PCR tersebut, kembali dicek dengan elektroforesis gel agarose 2% (Gambar 4).

Gambar 4. Pemeriksaan hasil PCR



Sebelum dilakukan sequencing, sampel-sampel hasil PCR tersebut dimurnikan atau dipurifikasi untuk menghilangkan primer forward atau reversenya serta membersihkan template-template lainnya yang mengganggu proses sequencing. Proses sequencing (membaca urutan basa) dilakukan oleh mesin sequenser AB 3130 Genetic Analyser, keluaran Applied Biosystems Co. Dari analisa sekuens terlihat bahwa pada gen COI menunjukkan situs restriksi untuk enzim restriksi Mae I, Mae II, Mae III, dan Taq I. Pada gen 12S rRNA, hasil sekuensing menunjukkan situs restriksi untuk enzim AsnI, MaeI, Mae III, Mbo I, NlaIII, PaeI, dan SspI.

Produk restriksi dari enzim-enzim restriksi tersebut menunjukkan perbedaan dalam jumlah dan ukuran fragmen restriksi (restriction fragment) beserta situs restriksinya (restriction sites). Pada lokus gen COI, berdasarkan pola restriksi dari kelima enzim yang digunakan, enzim MaeI yang mengenali situs pemotongan 4 basa (CTAG) memberikan 4- 12 pola pemotongan DNA, enzim MaeII yang mengenali situs pemotongan 4 basa (ACGT) memberikan 4 pola pemotongan DNA, enzim MaeIII yang mengenal situs pemotongan 5 basa (GTNAC) memberikan 9 pola pemotongan DNA, enzim Mbo I mengenal situs pemotongan 4 basa (GATC) memberikan 17 pola pemotongan DNA, dan enzim Taq I mengenal situs pemotongan 4 basa (TCGA) memberikan 14 pola pemotongan DNA. Sedangkan pada lokus gen 12S rRNA, berdasarkan pola restriksi dari ke tujuh enzim restriksi yang digunakan, enzim AsnI yang mengenali situs pemotongan 6 basa (ATTAAT) memberikan 4 pola pemotongan DNA, enzim MaeI yang mengenali situs pemotongan 4 basa (CTAG)

memberikan 4 pola pemotongan DNA, enzim Mae III yang mengenali situs pemotongan 5 basa (GTNAC) memberikan 4 pola pemotongan DNA, enzim MboI yang mengenali situs pemotongan 4 basa (GATC) memberikan 3 pola pemotongan DNA, enzim Nla III yang mengenali situs pemotongan 4 basa (CATG) memberikan 3 pola pemotongan DNA, enzim PaeI yang mengenali situs pemotongan 8 basa (TTAATTA) memberikan 2 pola pemotongan DNA, serta enzim SspI yang mengenali situs pemotongan 6 basa (AATATT) memberikan 6 pola pemotongan DNA.

Variasi situs dan ukuran panjang fragmen hasil restriksi dengan menggunakan enzim yang sama, dimungkinkan terjadi akibat substitusi, insersi atau delesi basa pada urutan sekuens yang sama, sehingga terjadi pergeseran dalam pemotongan (situs).

Hasil pemotongan DNA yang menunjukkan ukuran panjang fragmen berbeda akan memberikan tipe pemotongan (haplotipe) yang berbeda pula. Penggunaan 5 enzim restriksi pada lokus gen COI dan 7 enzim restriksi pada lokus gen 12S rRNA dalam analisa ini diperuntukkan guna mengukur keragaman genetik suatu populasi yang telah menunjukkan suatu variabilitas

Analisa keragaman DNA kemudian dilakukan untuk melihat variasi genetik udang windu (*Penaeus monodon*) dari 2 populasi yang berbeda, yaitu Pangandaran dan Binuangeun. Untuk mengetahui keragaman haplotipe (*haplotype diversity*) dalam suatu populasi, dilakukan perhitungan dengan menggunakan persamaan Nei dan Tajima (1981) :

$$h = 2n (1 - \sum xi^2) / (2n - 1)$$

Keterangan

:h = diversitas haplotipe

n = ukuran sampel

xi = frekwensi haplotipe sample ke-i.

Berdasarkan pola pemotongan hasil restriksi pada locus gen COI, diperoleh 29 haplotipe, masing-masing 13 haplotipe pada populasi Binuangeun dan 17 haplotipe pada populasi Pangandaran (Tabel 1). Dari 29 haplotipe tersebut hanya haplotipe 11 (CACGB) yang ditemukan baik pada populasi udang windu asal Binuangeun maupun Pangandaran dengan frekuensi yang sama dan cukup tinggi,

yaitu sebesar 0,400. Selanjutnya haplotipe 16 (CAGHC), hanya ditemukan pada populasi Binuangeun dengan frekuensi cukup tinggi, yaitu sebesar 0,200. Frekuensi haplotipe terendah yaitu sebesar 0,040 ditemukan pada haplotipe 27 dan haplotipe 11 dari populasi induk udang windu asal Binuangeun serta haplotipe 16 dari populasi asal Pangandaran. Keragaman haplotipe populasi induk udang windu asal Pangandaran lebih tinggi dibandingkan dengan keragaman haplotipe populasi asal Binuangeun, yaitu masing-masing sebesar 0,8310 dan 0,7984.

Namun demikian, secara umum keragaman genetik di kedua lokasi tersebut cukup tinggi. Berdasarkan jumlah haplotipe yang terdeteksi, diketahui bahwa populasi induk udang windu asal Pangandaran memiliki 17 haplotipe dan asal Binuangeun, 13 haplotipe. Apabila jumlah sampel induk udang windu yang dianalisa lebih banyak lagi, maka kemungkinan besar jumlah haplotipe yang ditemukan akan lebih banyak lagi. Untuk itu agar data dan informasi keragaman genetik dari populasi induk udang windu dari suatu lokasi yang diteliti lebih lengkap dan mewakili, maka perlu lebih banyak lagi sampel yang dianalisanya. Pada lokus gen 12S rRNA pola pemotongan oleh 7 enzim restriksi yaitu *AsnI*, *MaeI*, *MaeIII*, *MboI*, *NotI*, *PacI* dan *SspI* menghasilkan 23 haplotipe pada 2 populasi udang windu yang diamati, masing-masing 14 haplotipe pada populasi udang windu Binuangeun dan 14 haplotipe pada populasi udang windu asal Pangandaran (Tabel 2).

Tabel 1. Variasi genetik dari populasi udang windu (*Penaeus monodon*) asal Binuangeun dan Pangandaran berdasarkan frekuensi haplotipe dari lokus gen COI yang direstriksi dengan 5 enzim restriksi (MaeI, MaeII, MaeIII, MboI dan TaqI)

No.	Haplotipe	Populasi (Jumlah Sampel)	
		Binuangeun	Pangandaran
1.	AAAGQ	0,040 (1)	
2.	BABAM		0,040 (1)
3.	CAAGG	0,040 (1)	
4.	CABLB	0,040 (1)	
5.	CABBI		0,040 (1)
6.	CABGB		0,040 (1)
7.	CABLB	0,040 (1)	
8.	CABPD		0,040 (1)
9.	CABIH		0,040 (1)
10.	CACGA		0,040 (1)
11.	CACGB	0,400 (10)	0,400 (10)
12.	CACJB		0,040 (1)
13.	CACMD	0,040 (1)	
14.	CAEGB	0,040 (1)	
15.	CAGFC	0,040 (1)	
16.	CAGHC	0,200 (5)	
17.	CDIKF	0,040 (1)	
18.	DACGB	0,040 (1)	
19.	DADQF	0,040 (1)	
20.	EABBF		0,040 (1)
21.	FABGA		0,040 (1)
22.	FBBNE		0,040 (1)
23.	GABCE		0,040 (1)
24.	GABOJ		0,040 (1)
25.	HABER		0,040 (1)
26.	ICHBK		0,040 (1)
27.	JAFDL		0,040 (1)
28.	KAGJB		0,040 (1)
29.	LACGB	0,0400 (1)	
	Jumlah Sampel	25	25
	Jumlah haplotipe	13	17
	Keragaman haplotipe	0,7984	0,8310

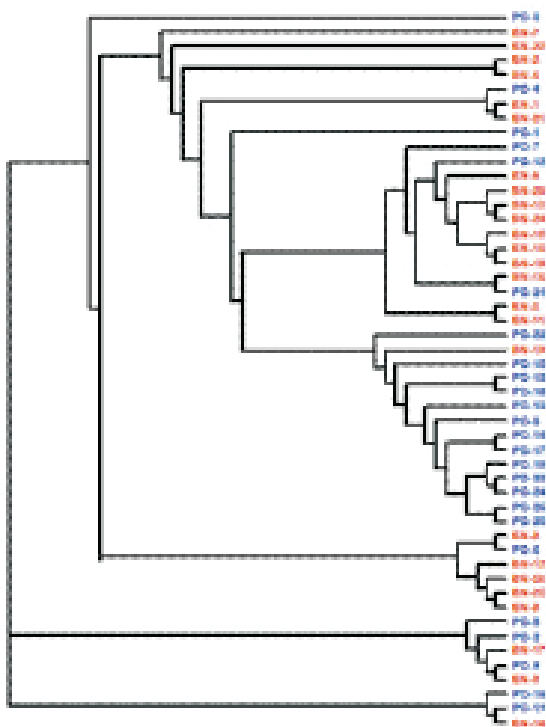
Tabel 2. Variasi genetik dari populasi udang windu (*Penaeus monodon*) asal Binuangeun dan Pangandaran berdasarkan frekuensi haplotipe dari lokus gen 12S rRNA yang direstriksi dengan 5 enzim restriksi(AsnI, Mael, MboI, NlaIII, PaeI dan SspI)

No.	Haplotipe	Populasi (Jumlah Sampel)	
		Binuangeun	Pangandaran
1.	ACBBAAC	0,040 (1)	
2.	ADBBAAB		0,040 (1)
3.	BBABAAC	0,080 (2)	
4.	BBBBAAC	0,040 (1)	
5.	BBBBCAC		0,040 (1)
6.	BBCBAAD	0,080 (2)	0,040 (1)
7.	BBCBAAF	0,040 (1)	0,080 (2)
8.	BBCBABD	0,080 (2)	
9.	BCCABF		0,040 (1)
10.	BBDBAAB		0,040 (1)
11.	BBDBAAE		0,040 (1)
12.	BBDBAAD	0,040 (1)	
13.	BBDBABF	0,040 (1)	
14.	BDABAAC	0,040 (1)	
15.	BDABABC	0,040 (1)	
16.	BDABAAB	0,280 (7)	0,080 (2)
17.	BDBBAAB	0,120 (3)	0,240 (6)
18.	BDBBAAC	0,040 (1)	0,120 (3)
19.	BDBBAAG		0,040 (1)
20.	BDCBAAC		0,120 (3)
21.	BDDBAAB		0,040 (1)
22.	CABABAA	0,080 (2)	
23.	DBDBAAF		0,04 (1)
	Jumlah sampel	25	25
	Jumlah haplotipe	14	14
	Keragaman Haplotipe	0,8865	0,9045

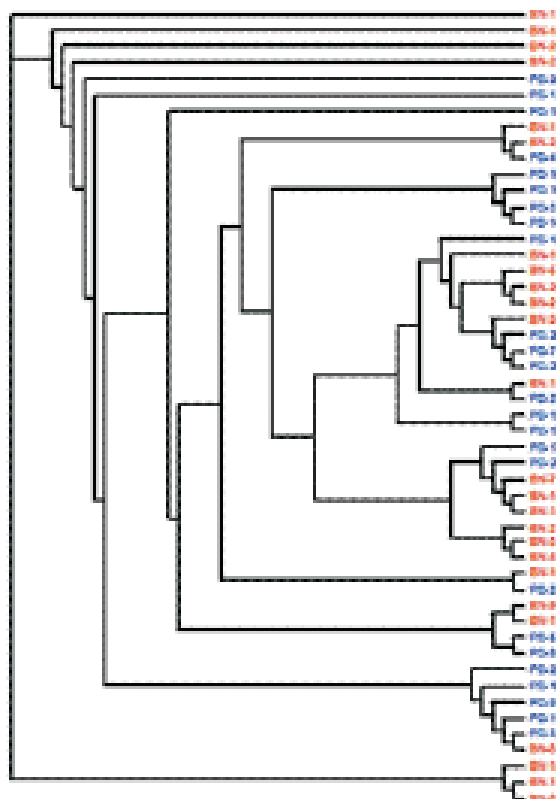
Dari 23 haplotipe tersebut, 5 haplotipe yaitu haplotipe 6, 7, 16, 17, dan 18 ditemukan baik pada populasi induk udang windu asal Binuangeun maupun Pangandaran. Frekuensi tertinggi sebesar 0,280 ditemukan pada haplotipe 16 (BDABAAB) dari populasi induk udang windu asal Binuangeun, sedangkan frekuensi terendah yaitu 0,040 ditemukan pada haplotipe 8 dari populasi Binuangeun dan haplotipe 9 populasi Pangandaran. Haplotipe 17 (BDBBAAB) juga ditemukan dalam frekuensi yang cukup tinggi yaitu 0,240 pada populasi udang windu asal Pangandaran. Nilai ini merupakan frekuensi tertinggi untuk populasi Pangandaran.

Berdasarkan keragaman haplotipenya, kedua populasi induk udang windu memiliki frekuensi yang cukup tinggi, yaitu masing-masing 0,8865 dan 0,9045, untuk populasi asal Binuangeun dan Pangandaran. Dari hasil pengelompokan keragaman genetik dengan menggunakan cladogram rectangular, diketahui bahwa induk udang windu asal Binuangeun dan Pangandaran pada lokus gen COI dapat dikelompokkan kedalam 3 cluster besar seperti terlihat pada Gambar 5.

Gambar 5. Cladogram rectangular populasi Udang windu asal Binuangeun (BN) dan Pangandaran (PD) pada lokus gen COI



Gambar 6. Cladogram rectangular populasi Udang windu asal Binuangeun (BN) dan Pangandaran (PD) lokus gen 12S rRNA



Dari cladogram tersebut diketahui bahwa secara umum induk udang windu asal Pangandaran membentuk 1 sub kelompok, demikian halnya dengan induk udang windu asal Binuangeun. Dari gambar tersebut terlihat bahwa hanya beberapa sub cluster saja yang komposisinya terbentuk dari campuran individu asal Binuangeun dan Pangandaran. Hal serupa juga terlihat pada cladogram rectangular udang windu asal Binuangeun dan Pangandaran pada locus gen 12S rRNA (Gambar 6). Sub cluster yang terbentuk antara individu Binuangeun dan Pangandaran lebih sedikit dibandingkan dengan yang terdapat pada locus gen COI.

Dari hasil analisa terhadap jumlah haplotipe, keragaman haplotipe dan cladogram rectangular diketahui bahwa pada setiap lokus, keragamaman genetik masing-masing populasi induk udang windu cukup tinggi dimana populasi induk udang windu asal Binuangeun dan Pangandaran terbagi dalam sub cluster yang berlainan atau dengan perkataan lain jarak genetiknya cukup tinggi. Hal ini berarti bahwa sumber genetik induk udang windu asal Pangandaran berasal dari sumber genetik yang berbeda dengan induk udang windu Binuangeun. Induk-induk udang windu asal kedua lokasi tersebut dapat direkomendasikan untuk digunakan sebagai sumber induk untuk keperluan budidaya. Selanjutnya dapat disimpulkan bahwa kedua lokus ini, yaitu gen COI dan 12S rRNA cukup sesuai digunakan untuk studi phylogenetic, karena dapat mendeteksi keragaman genetik cukup tinggi.

4. Kesimpulan Dan Saran

Berdasarkan hasil analisa keragaman mtDNA yang diamati pada 2 lokus, yaitu lokus gene CO I dan lokus gene 12S rRNA diketahui bahwa pada lokus gene COI, dari kedua populasi induk udang windu yang diamati, terdeteksi 25 haplotipe. Populasi induk udang windu asal Pangandaran memiliki 17 haplotipe lebih tinggi dibandingkan dengan populasi udang asal Binuangen yang hanya memiliki 13 haplotipe. Keragaman haplotipe pada lokus gene CO I ini cukup tinggi yaitu masing-masing 0,8310 dan 0,7984 pada populasi asal Pangandaran dan Binuangen. Selanjutnya dari lokus gene 12S rRNA, terdeteksi 25 haplotipe dimana masing-masing populasi memiliki 14 haplotipe. Keragaman haplotipe populasi induk udang

windu asal Pangandaran adalah 0,9045, lebih tinggi daripada populasi asal Binuangen (0,8865). Dari kedua lokus yang diamati (COI dan 12S rRNA), keragaman induk udang windu baik asal Pangandaran maupun Binuangen cukup tinggi. Walaupun demikian, keragaman populasi asal Pangandaran sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan asal Binuangen.

Daftar Pustaka

1. Bartley, D.M. 1992. *Biodiversity And Genetics In Aquaculture And Fisheries*. FAO Aquaculture Newsletter 1 :8-12
2. Bert, T.M and M.D. Tringali. 1999. *The Preservation Of Genetic Diversity For Sustainable Aquaculture*. Conference on Mariculture and the Environment-Toward the New Millenium, Kualalumpur.
3. Mustafa, S. E. 1999. *Genetics in Sustainable Fisheries Management*. Fishing News Books (Blackwell Science). Oxford.
4. Nei, M.1989. *Moleculer Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York. 512 pp.
5. Nei, M. and F. Tajima. 1981. *DNA polymorphism Detecable by Restriction Endonucealses*. Genetics 97: 146-163.
6. Pullin, R.S.V. 1996. *Biodiversity and Aquaculture*, pages 409-423, in Biodiversity, science and development : towards a new partnership.