

## **PENGUNAAN PENANDA GENETIK TUMBUH CEPAT UNTUK PRODUKSI CALON INDUK KERAPU SUNU, *Plectropomus leopardus* DALAM PROGRAM SELEKSI**

**Sari Budi Moria Sembiring, Haryanti, Ketut Suwirya, Ida Komang Wardana,  
Tatam Sutarmat, dan Hirmawan Tirta Yudha**

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Budidaya Laut  
Jl. Br. Gondol Kec. Gerokgak Kab. Buleleng, Kotak Pos 140, Singaraja-Bali 81101  
E-mail: moriasembiring@yahoo.co.id

(Naskah diterima: 9 Agustus 2011; Disetujui publikasi: 16 Maret 2012)

### **ABSTRAK**

Penurunan kualitas benih kerapu seringkali diindikasikan dengan pertumbuhan yang lambat, rentan terhadap infeksi penyakit, dan perubahan lingkungan serta terjadinya abnormalitas. Upaya perbaikan sifat genetik benih kerapu akan memberikan dampak signifikan dalam keberhasilan budidaya. Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh penanda gen tumbuh cepat pada benih/calon induk kerapu sunu sehingga dapat meningkatkan efisiensi dan efektivitas pemuliaan. Untuk mendapatkan penciri gen tumbuh cepat digunakan metode analisis mikrosatelit (SSR/*Simple Sequence Repeats*) dengan mengaplikasikan enam set primer (*forward* dan *reverse*). Calon induk yang digunakan untuk analisis masing-masing berjumlah 4 ekor ukuran kecil dan 10 ekor ukuran besar. Validasi dan akurasi lokus yang dihasilkan dianalisis lebih lanjut dengan *sequencing*. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa penanda gen tumbuh cepat dapat terlihat dari lokus PL-03 dengan alel/fragmen DNA pada berat molekul 370 bp. Tingkat keakuratan penanda gen tersebut pada kelompok ukuran besar mencapai 80%, sedangkan pada kelompok ukuran kecil hanya 30%. Hal ini juga didukung dengan keakuratan prediksi dari hasil *sequencing* memberikan nilai kemiripan sebesar 99%. Dengan demikian lokus PL-03 dapat digunakan sebagai penanda gen tumbuh cepat pada ikan kerapu sunu dalam mempercepat seleksi calon induk.

**KATA KUNCI:** penanda genetik, pertumbuhan cepat, mikrosatelit, *selective breeding*

**ABSTRACT:** *Determination of genetic marker for fast growth in produce candidates broodstock of coral trout grouper, Plectropomus leopardus by selective breeding. By: Sari Budi Moria Sembiring, Haryanti, Ketut Suwirya, Ida Komang Wardana, Tatam Sutarmat, and Hirmawan Tirta Yudha*

*Reduction of fry quality frequently indicated by slow growth, susceptible disease infection and environmental fluctuation and increased of abnormality of juvenile. The effort to improve genetic quality of fish fry will give significant impact on successfully of grouper culture. The aim of this experiment was to find genetic marker for fast growth in order to get fry or candidate broodstock of coral trout which phenotype and genetically better and also to increase efficiency and effectiveness of selective breeding. To get fast growth marker, microsatellite analysis (SSR/*Simple Sequence Repeats*) method was applied with six set of primers forward and reverse. Samples of candidate broodstock were used to analyze i.e. 4 and 10 fishes for small and big size group respectively. To validate and accurate of loci produced, further analyzed by*

sequencing was conducted. The results showed that fast growth marker was found in loci PL-03 at DNA allele/fragment with molecule weight of 370 bp. The accuracy of this genetic marker for big size group of candidate broodstock was 80% while on small size group only 30%. This result was fit to sequencing prediction which gave similarity value of 99%, mean that loci PL-03 is good to apply as fast growth genetic marker for coral trout candidate broodstock selection.

**KEYWORDS:** genetic marker, fast growth, microsatellite, selective breeding

## PENDAHULUAN

Kerapu merupakan komoditas ikan laut yang mempunyai nilai ekonomi tinggi dan mempunyai potensi pasar yang cukup besar di dunia. Salah satu di antara kerapu yang dibudidayakan adalah kerapu sunu, *Plectropomus leopardus*. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Budidaya Laut Gondol-Bali sudah berhasil mengembangkan pembenihan kerapu sunu hingga menghasilkan benih dengan ukuran yang sesuai untuk budidaya. Walaupun demikian, produksi benih belum stabil oleh karena sintasan yang masih berfluktuasi.

Keberhasilan perbenihan ikan kerapu sunu di hatcheri sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan (suhu, salinitas, variasi pakan, kandungan nutrisi, kepadatan larva) infeksi penyakit dan karakter genetik, sehingga akan dihasilkan kualitas benih yang bervariasi. Berdasarkan beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa peran sifat genetik sangat berpengaruh pada kualitas benih sehingga berdampak pada pertumbuhan, sintasan, ketahanan terhadap penyakit, dan perubahan lingkungan. Oleh karena itu, peranan sifat genetik sangat penting untuk memperoleh induk dan benih yang unggul (Benzie *et al.*, 1997; Sbordon *et al.*, 1987).

Teknologi pemuliaan melalui seleksi konvensional telah terbukti berhasil meningkatkan produksi, namun seleksi konvensional tersebut memiliki keterbatasan terutama dalam hal waktu yang diperlukan relatif lama untuk memunculkan gen-gen yang diinginkan. Salah satu kebutuhan dasar di dalam program pemuliaan adalah mendapatkan cara menyeleksi dalam jumlah sangat banyak, dalam waktu yang singkat dan pada fase awal pertumbuhan. Seleksi berdasarkan fenotipik seringkali memberikan hal yang tidak akurat, karena performansi fenotip banyak dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Dengan demikian penggunaan penanda molekular harus dikembangkan. Pemanfaatan penanda

molekular sebagai alat bantu seleksi pada program pemuliaan di Indonesia masih sangat sedikit dibandingkan dengan pemuliaan secara konvensional.

Seiring dengan semakin berkembangnya teknologi yang berbasis penanda DNA maka penanda mikrosatelit merupakan penanda molekular yang berkembang lebih akhir. Prinsip dasar penanda mikrosatelit adalah amplifikasi sekuen DNA tertentu menggunakan PCR dan umumnya salah satu primer diberi label supaya mempermudah deteksi (Fishback *et al.*, 1999). Kelebihan utama penanda mikrosatelit terletak pada sifat polimorfisme dan daya pembedanya yang tinggi. Sifat tersebut dapat dikembangkan sebagai alat identifikasi genotip (Hancock, 1999).

Penggunaan penanda mikrosatelit telah dilaporkan pada beberapa jenis ikan seperti *Hypophthalmichthys molitrix*, *Aphyocypris chinensis*, *Thunnus thynnus thynnus*, dan Atlantik salmon (Slettan *et al.*, 1993) serta leopard coral grouper (*Plectropomus leopardus*) (Xiong Ding *et al.*, 2009). Penanda mikrosatelit juga telah digunakan dalam studi hubungan antara heterosigositas terhadap parameter pertumbuhan seperti pada ikan nila, *Oreochromis niloticus* (Appleyard *et al.*, 2001), jenis kerang coklat, *Mytilus edulis* (Del Rio-Portilla & Beaumont, 2000) dan udang *P. stylirostris* (Bierne *et al.*, 2000).

Pemanfaatan penanda molekular dengan mengutamakan karakter kuantitatif tumbuh cepat dengan penciri gen bertujuan untuk memperbaiki kualitas genetik benih sehingga didapatkan benih/calon induk kerapu sunu dengan sifat fenotip dan genotip yang lebih baik dan juga untuk meningkatkan efisiensi dan efektivitas pemuliaan.

## BAHAN DAN METODE

### Hewan Uji

Jumlah sampel ikan kerapu sunu yang dianalisis sebanyak 14 ekor terdiri atas 4 ekor

kelompok ukuran kecil dan 10 ekor kelompok ukuran besar. Kelompok ukuran kecil mempunyai panjang dan bobot rata-rata 13,95 cm dan 46,14 g sedangkan kelompok ukuran besar 25,5 cm dan 248,2 g. Sampel ikan kerapu sunu yang dianalisis berasal dari satu kelompok umur yang sama.

#### Isolasi dan Purifikasi DNA

DNA ikan kerapu sunu diisolasi dari bagian daging dengan menggunakan *Nucleospin tissue kit (Macherey-Nagel)*. Tahapan isolasi dan purifikasi DNA sesuai dengan standar protokol dari produk tersebut. Kuantitas dan kemurnian DNA dari masing-masing sampel diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Kemurnian DNA ditetapkan berdasarkan nilai rasio  $A_{260}/A_{280}$  sekitar 1,8-2,0 (Sambrook *et al.*, 1989).

#### Analisis Marker Gen dengan Primer Mikrosatelit

Ikan kerapu sunu hasil seleksi fenotipik (ukuran kecil dan besar) selanjutnya dianalisis untuk mendapatkan marker gen. Reaksi PCR dilakukan terhadap semua sampel menggunakan enam set primer mikrosatelit (*forward* dan *reverse*). Susunan primer yang digunakan disajikan dalam Tabel 1. Setiap pasang primer

diberi label dengan pewarna *fluorescent (Fam; Hex dan Tet)* pada *forward primer* yang bertujuan untuk mendeteksi secara terpisah alel dari setiap primer dalam satu sampel menggunakan mesin (*automatic sequencer*). Amplifikasi telah dilakukan dalam 25  $\mu$ L volume reaksi yang mengandung 25 ng DNA template, 10 mM primer, 10x Buffer, 2,5 mM dNTP, dan 0,5 unit Taq polymerase (*MD-Bio*). PCR mengikuti *thermal cycling* untuk 1 siklus 95°C selama 5 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus selama 30 detik pada 94°C, 30 detik pada 56°C dan 30 detik pada 72°C, diikuti 1 siklus suhu *extention* akhir 72°C selama 5 menit. Untuk lokus PL-L5, kondisi PCR adalah sama dengan lokus PL-03; PL-04; PL-08; dan PL-L4 kecuali suhu *annealing* yaitu 60°C, demikian juga untuk lokus PL-L12 menggunakan suhu *annealing* yang berbeda yaitu 50°C. Hasil amplifikasi kemudian disepari menggunakan *ABI 3100 Aviant Genetic Analyzer* dan dilaksanakan di laboratorium Genetika Molekuler Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan (BBPBPTH - Jogjakarta). Pada saat elektroforesis menggunakan *genescan 400 HD (Rox) size standard* sebagai marker ukuran untuk mendeterminasi ukuran alel. Produk PCR sebanyak 1-2  $\mu$ L untuk masing-masing sampel dimasukkan dalam *cover plate 96 reaction + 12  $\mu$ L (Genescan 400 HD dan formamide*

Tabel 1. Susunan basa pada primer mikrosatelit (*forward* dan *reverse*) yang digunakan dalam analisis gen penanda tumbuh cepat

Table 1. Sequence of primer microsatellite (*forward* and *reverse*) used to analyse gen marker of fast growth

Nama primer Primer name	Pengulangan sequens Repeat sequence	Urutan Basa (5'-3') Sequence of Bases (5'-3')
PL-03	(CA)22	F : TTTGTAGTTCAGTTCAGAAGAGC R : AACTAAGGTTCAATCCAAGTCCAAT
PL-04	(CA)19....(TG)23	F : GAAAGTAAAAATACAGAGACGGAGG R : TCAAATACATCCCCCTATCTCCA
PL-08	(TG)9...(CT)5.....(CA)23	F : CCTCCTCTTCATTAGGGACATTG R : GCCCAGCACCTACGCCAGTTTTAT
PL-L4	(GT)17	F : ACCCATCCACCTCCCATCCCTAA R : TGTCTGCGTGCTCCAATCTATCT
PL-L5	(CA)21	F : GCTGCCATTTATTTTCGGCTTGA R : TTCAATTTAGCTCCACTTGCTT
PL-L12	(AC)19	F : CTTGATGACTCGGGCTCCTTTC R : GTGTTTGGCAGGACCTTGAGTG

deionized) dan ditutup dengan *MicroAmp™ Caps*, kemudian di-*vortex* dan di-*flushing*. Selanjutnya dilakukan *heat shock temperature* dari suhu 95°C selama 2 menit ke suhu 4°C selama  $\pm$  15 menit. Kemudian *cover plate* diletakkan dalam mesin *ABI 3100 Aviant Genetic Analyzer*. Hasil elektroforesis berupa *peak* kemudian dianalisis menggunakan *software Genescan*. Selanjutnya data fragmen tersebut dipindahkan ke program *gene mapper 3.5* untuk menganalisis ukuran dari setiap fragmen tersebut. Hasil pembacaan ukuran fragmen setiap primer diinterpretasikan sebagai alel.

Untuk pembuktian dan validasi pengujian gen tumbuh cepat, maka selanjutnya dilakukan analisis lagi melalui *sequencing*. Dalam *sequencing* tersebut, dipersiapkan hasil amplifikasi PCR dan purifikasi *amplicon*. Hasil *sequencing* dianalisis menggunakan program MEGA4 untuk mengetahui similaritas antar lokus mikrosatelit yang digunakan.

## HASIL DAN BAHASAN

Dari enam set primer yang digunakan untuk analisis penanda gen tumbuh cepat dengan penanda mikrosatelit setelah di-separasi menggunakan *ABI 3100 Aviant Genetic Analyzer* dan dianalisis dengan perangkat lunak (*software*) *gene mapper 3.5*, nampaknya hanya 4 primer yaitu PL-03; PL-08; PL-L4; dan PL-L5 yang dapat menunjukkan polimorfisme fragmen gen yang bertanggung jawab pada tumbuh cepat, sedangkan primer PL-04 dan PL-L12 tidak memberikan *fragment* yang polimorfisme.

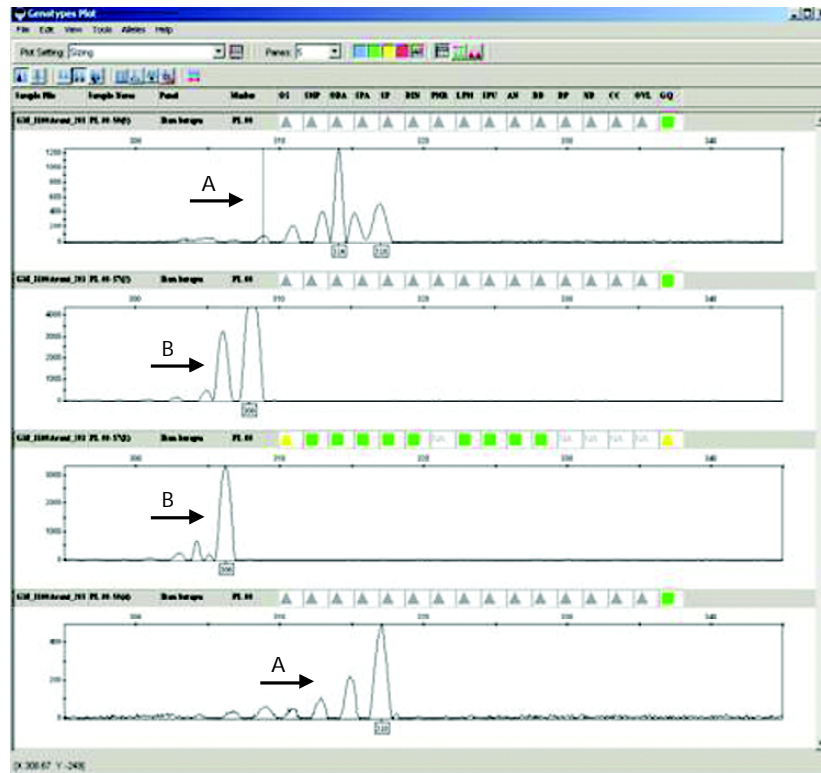
Hasil yang diperoleh dari analisis mikro-satelit dengan primer PL-03 pada kelompok ukuran besar yang terdeteksi ada 80% yang menunjukkan ukuran 370 bp, sedangkan pada ukuran kecil hanya sebesar 30% (Gambar 1).

Pada lokus PL-08 (Gambar 2), hasil polimorfisme DNA pada 342 bp menunjukkan



Gambar 1. Hasil separasi PCR produk ikan kerapu sunu, *P. leopardus* dengan primer PL-03 menggunakan *ABI 3100 Aviant Genetic Analyzer* (A. ukuran besar; B. ukuran kecil)

Figure 1. Result of separation PCR product of coral trout grouper, *P. leopardus* with PL-03 primer using *ABI 3100 Aviant Genetic Analyzer* (A. big size; B. small size)



Gambar 2. Hasil separasi PCR produk ikan kerapu sunu, *P. leopardus* dengan primer PL-08 menggunakan ABI 3100 Aviant Genetic Analyzer (A. ukuran besar; B. ukuran kecil)

Figure 2. Result of separation PCR product of coral trout grouper, *P. leopardus* with PL-08 primer using ABI 3100 Aviant Genetic Analyzer (A. big size; B. small size)

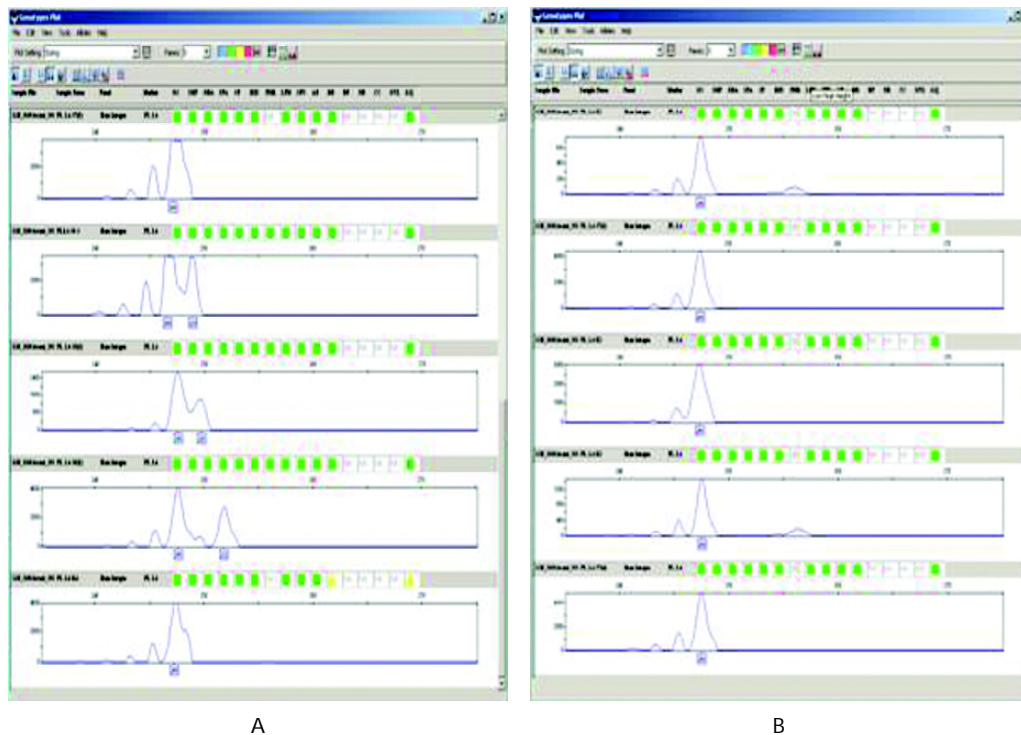
20% terdeteksi pada ikan kerapu sunu kelompok ukuran besar, sedangkan untuk ukuran kecil sebesar 80% terdeteksi pada ukuran 306 bp, sehingga lokus ini juga belum dapat digunakan sebagai penciri gen tumbuh cepat.

Pada primer PL-L4 juga nampak adanya separasi DNA untuk sampel kelompok ukuran besar dan kecil. Dari kelompok ukuran besar yang dianalisis ada 40% yang menunjukkan ukuran 315 bp; 50% (305 bp) dan 20% (317 bp), sedangkan pada ukuran kecil 40% (305 bp dan 315 bp) dan 20% (317 bp) (Gambar 3).

Pada lokus PL-L5 (Gambar 4), ikan kerapu sunu kelompok ukuran besar tidak dapat terseparasi pada *fragment* DNA dengan bobot molekul 341 bp secara jelas dan sempurna, hal ini terlihat dari "*peak*" yang muncul tidak seperti pada lokus PL-03, sementara kelompok ukuran kecil hanya 20% yang terdeteksi.

Dengan demikian nampaknya lokus tersebut juga belum dapat dijadikan penciri gen tumbuh cepat.

Pada lokus PL-08; PL-04; dan PL-L5, juga terlihat adanya fragmen yang tidak terdeteksi, hal ini karena munculnya *band stutter* yang disebabkan oleh *slipp-strand mispairing* selama proses PCR, dan *band stutter* akan cenderung berkurang dengan meningkatnya panjang unit mikrosatelit. Sehingga ketiga lokus tersebut masih belum dapat dijadikan lokus kuantitatif untuk mendeteksi secara akurat dari sifat gen yang bertanggung jawab pada tumbuh cepat. Dari keempat lokus tersebut di atas, nampaknya primer PL-03 lebih baik dan akurat sebagai penciri gen tumbuh cepat pada ikan kerapu sunu karena dilihat dari polimorfisme *fragment* DNA pada 370 bp sebanyak 80% sampel ukuran besar dapat terekspresi pada alel tersebut, sedangkan pada kelompok ukuran kecil hanya 30%.



Gambar 3. Hasil separasi PCR produk ikan kerapu sunu, *P. leopardus* dengan primer PL-L4 menggunakan ABI 3100 Aviant Genetic Analyzer (A. ukuran besar; B. ukuran kecil)

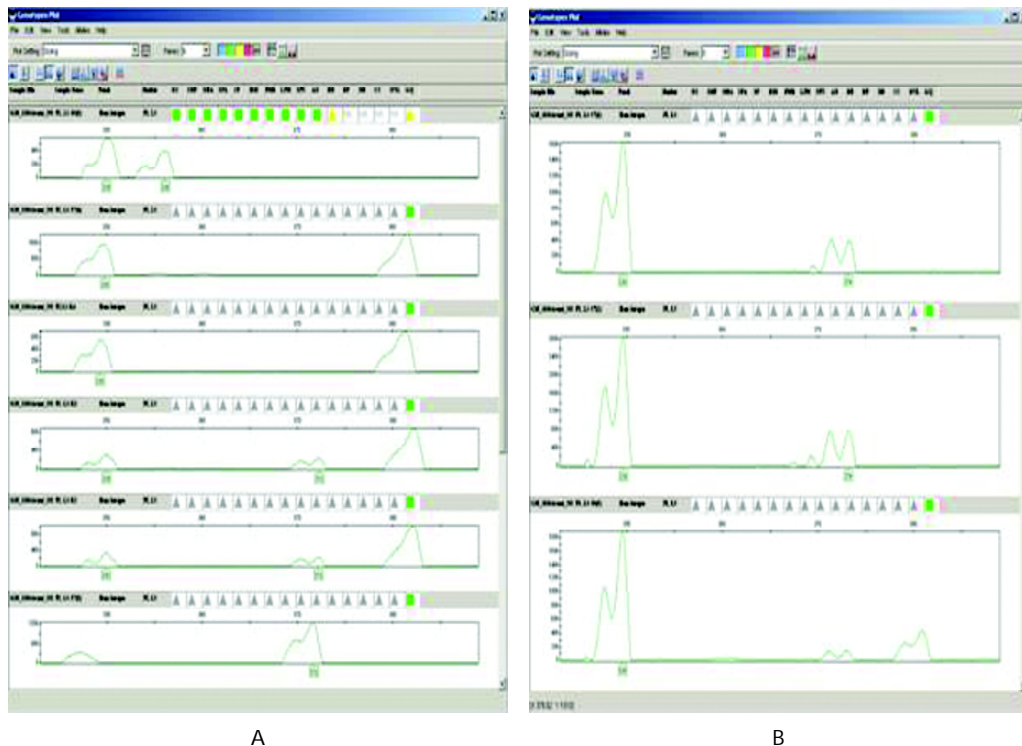
Figure 3. Result of separation PCR product of coral trout grouper, *P. leopardus* with PL-L4 primer using ABI 3100 Aviant Genetic Analyzer (A. big size; B. small size)

Dengan menggunakan 4 penanda mikrosatelit saja, ternyata sudah dapat mendeteksi perbedaan genetik tumbuh cepat pada ikan kerapu sunu. Hal ini menunjukkan bahwa penanda mikrosatelit dapat digunakan untuk mendeteksi variasi alel yang tinggi. Selanjutnya Morgante & Olivieri (1993), menyatakan bahwa penanda mikrosatelit yang memiliki nilai "Polymorphic Information Content" (PIC) 8 7 dapat digunakan untuk menyusun pemetaan QTL (*Quantitative Trait Loci*) dan dikembangkan untuk mencari penanda mikrosatelit yang berperan sebagai MAS (*Marker Assisted Selection*). Selain itu, penggunaan lokus mikrosatelit sebagai *marker* genetik dapat mengekspresikan sifat kodominan, mengikuti pola dasar keturunan Mendel, reproduktibilitas yang baik, menghasilkan alel yang terdeteksi dalam jumlah banyak dan mengekspresikan variasi genetik yang lebih tinggi (Mukherjee & Nripendranath, 2009). Demikian juga Schloetterer & Pemberton (1996) yang

menyatakan bahwa mikrosatelit merupakan alat bantu yang sangat akurat untuk membedakan genotipe, evaluasi kemurnian turunan, pemetaan, dan seleksi genotipe untuk karakter yang diinginkan.

Untuk validasi dari lokus-lokus tersebut, dilakukan *sequencing* sampel ukuran besar. Hasil *sequencing* dari *amplicon* PCR kelompok besar untuk lokus PL-03; PL-L4; dan PL-L5 setelah dianalisis dengan MEGA4 seperti tertera pada Tabel 2.

Dari ketiga lokus tersebut terlihat bahwa lokus PL-03 memberikan nilai kemiripan yang paling tinggi pada kelompok ukuran besar yaitu mencapai 99%, sehingga lokus PL-03 dapat dijadikan sebagai lokus kuantitatif untuk sifat tumbuh cepat pada ikan kerapu sunu. Demikian juga bila dilihat dari hasil kemiripan *sequens* total *nucleotide* DNA ikan kerapu sunu kelompok ukuran besar menunjukkan nilai kemiripan yang tinggi dari lima sampel yang di *sequencing* (Tabel 3).



Gambar 4. Hasil separasi PCR produk ikan kerapu sunu, *P. leopardus* dengan primer PL-L5 menggunakan ABI 3100 Aviant Genetic Analyzer (A. ukuran besar; B. ukuran kecil)

Figure 4. Result of separation PCR product of coral trout grouper, *P. leopardus* with PL-L5 primer using ABI 3100 Aviant Genetic Analyzer (A. big size; B. small size)

Tabel 2. Hasil similaritas pada ikan kerapu sunu, *P. leopardus* kelompok ukuran besar dengan 3 lokus mikrosatelit

Table 2. Result of similarity on big size of coral trout grouper, *P. leopardus* with 3 locus microsatellite

Aksesi Accession	Deskripsi Description	Nilai maksimum Maximum score	Nilai total Total score	Tingkat kemiripan Similarity (%)
<a href="#">gi 254679483 FJ548641.1</a>	<i>Plectropomus leopardus</i> clone PL-03 microsatellite sequence	562	5549	99
<a href="#">gi 254679490 FJ549858.2</a>	<i>Plectropomus leopardus</i> clone PL-L5 microsatellite sequence	492	2424	85
<a href="#">gi 253879959 6325758.1</a>	<i>Plectropomus leopardus</i> clone PL-L4 microsatellite sequence	351	3049	90



Tabel 3. Hasil tingkat kemiripan *sequens total nucleotide* DNA ikan kerapu sunu, *P. leopardus* kelompok ukuran besar pada GenBank dengan nomor aksesori yang sama

Table 3. Similarity *sequens of total DNA nucleotide on big size coral trout grouper, P. leopardus* in GenBank with same accession number

Aksesori <i>Accession</i>	Deskripsi <i>Description</i>	Nilai maksimum <i>Maximum score</i>	Nilai total <i>Total score</i>	Tingkat kemiripan <i>Similarity (%)</i>
FJ548641.1	8-1	311	314	99
FJ548641.1	8-5	304	306	99
FJ548641.1	7-1	309	314	98
FJ548641.1	7-4	305	309	99
FJ548641.1	7-5	301	305	99

## KESIMPULAN

- Penggunaan penanda mikrosatelit untuk penciri gen tumbuh cepat pada ikan kerapu sunu untuk seleksi diperoleh pada berat molekul 370 bp dengan primer PL-03.
- Primer PL-03 dapat dijadikan lokus kuantitatif untuk tumbuh cepat dengan adanya prediksi karakter fenotip tumbuh cepat sebanyak 80%.
- Hasil *sequencing* untuk validasi ketiga lokus primer menunjukkan nilai kemiripan 99% pada lokus PL-03.

## SARAN

Penciri gen tumbuh cepat dengan penanda mikrosatelit pada lokus PL-03 perlu diaplikasikan lebih lanjut dalam seleksi calon induk ikan kerapu sunu.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada semua teknisi dan analis Laboratorium Bioteknologi Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Budidaya Laut, Gondol yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini, serta teman-teman di Laboratorium Genetika Molekuler Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan (BBPBPTH - Jogjakarta) yang sudah membantu dalam menganalisis mikrosatelit.

## DAFTAR ACUAN

Appleyard, S.A., Renwick, J.L., & Mather, P.B. 2001. Individual Heterozygosity Levels

and Relative Growth Performance in *Oreochromis niloticus* (L.) Cultured under Fijian Conditions. *Aquaculture Research*, 32: 287-296.

Benzie, J.A.H., Kenway, M., & Trott, L. 1997. Estimates for The Heritability of Size in Juvenile *P. monodon* from Half-sib Matings. *Aquaculture*, 152: 49-53.

Bierne, N., Beuzart, I., Vonau, V., Bonhomme, F., & Bédier, E. 2000. Microsatellite-Associated Heterosis in Hatchery-Propagated Stocks of the Shrimp *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture*, 184(3-4): 203-219.

Del Rio-Portilla, M.A. & Beaumont, A.R. 2000. Larval Growth, Juvenile Size and Heterozygosity in Laboratory Reared Mussel (*Mytilus edulis*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 254: 1-17.

Fishback, A.G., Danzman, R.G., Sakamoto, T., & Ferguson, M.M. 1999. Optimization of Semi-automated Microsatellite Multiplex Polymerase Chain Reaction Systems for Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 172: 247-254.

Hancock, J.M. 1999. Microsatellite and other Simple Sequence: Genomic Context and Mutational Mechanisms. In Goldstein, D.B. and Schlottere, C. (Eds.). Microsatellites: Evolution and Applications. *Oxford University Press*.

Morgante, M. & Olivieri, A.M. 1993. Amplified microsatellites as Markers in Plant Genetics. *Plant Journal*, 3: 175-182.

Mukherjee, K. & Nripenderanath, M. 2009. A Microsatellite DNA Marker Developed for Identifying Disease-resistant Population



- of Giant Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon*. *Journal of The World Aquaculture Society*, 40(2): 274-280.
- Sambrook, J., Fritsh, E.F., & Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York, p. 568-500.
- Sbordoni, V., De Mattthaeis, E., Cobolli-Sbordoni, M., La Rosa, G., & Mattoccia, M. 1987. Bottleneck Effects and The Depression of Genetic Variability in Hatchery Stocks of *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). *Aquaculture*, 57: 239-251.
- Schloetterer, C. & Pemberton, J. 1996. The Use of Microsatellite for Genetics Analysis of Natural Population. *Paper on European Union Meeting "Molecular Tools for Biodiversity"*. December 14<sup>th</sup>-18<sup>th</sup> 1996, Vienna.
- Slettan, A., Olsaker, I., & Lie, O. 1993. Isolation and Characterization of Variable (GT)<sub>n</sub> Repetitive Sequences from Atlantic Salmon, *Salmo-salar* L. *Anim Genet*, 24: 195-197.
- Xiong Ding, S., Zeng, H.S., Wang, Y., Pan, Y., & Feng Shi, X. 2009. Characterization of eight polymorphic microsatellite loci for the leopard coral grouper (*Plectropomus leopardus*). *Molecular Ecology Resources*. *Blackwell Publishing Ltd*.