

EKSPLORASI GEN *GROWTH HORMONE* EXON 3 PADA KAMBING PERANAKAN ETAWAH (PE), SAANEN DAN PESA MELALUI TEKNIK PCR-SSCP

(Exon 3 Growth Hormone Gene Exploration in Etawah Grade, Saanen and Pesa by PCR-SSCP Method)

PAULIN YUNIARSIH, JAKARIA dan MULADNO

*Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan
Institut Pertanian Bogor, Jl. Agatis Darmaga, Bogor*

ABSTRACT

This research was conducted to identify genetic polymorphism growth hormone gene of the exon 3 in three goat breeds. Polymorphisms at exon 3 growth hormone gene was identified by single strand conformational polymorphism polymerase chain reaction (SSCP-PCR) method. The DNA of 234 goat used were from Etawah Grade (98 samples), Saanen (92 samples) and their crossbred (44 samples) in Cariu, Ciapus, Sukajaya, Cijeruk, Balitnak and Sukabumi. The PCR-SSCP method was performed at 250 V for 8 hours using 12% of acrylamide concentration. The result showed that the annealing temperature is 60°C. The PCR product was 157 bp (base pair). The result of SSCP method found four conformational patterns resulting 4 gene types of AA, AB, BC, dan AC. The genotype frequency in exon 3 were AA (0.205), AB (0.856), AC (0.163) and BC (0.045). Further, three alleles were found. The highest frequencies were allele A (0.602) and B (0.443) at Saanen, Etawah Grade and their crossbred goat. The highest genotype frequency was AB at three goat breeds. The highest heterozygosity was found in Etawah Grade, Saanen and their crossbred goat (0.938).

Key Word: Dairy Goat, GH Gene, PCR-SSCP, Polymorphism

ABSTRAK

Penelitian dilakukan untuk mengidentifikasi polimorfisme genetik gen Hormon Pertumbuhan ekson 3 pada ketiga bangsa kambing. Polimorfisme gen hormon pertumbuhan ekson 3 diidentifikasi melalui metode *polymerase chain reaction single strand conformational polymorphism* (PCR-SSCP). Sampel DNA dari sebanyak 234 ekor kambing digunakan terdiri dari Peranakan Etawah (98 ekor), Saanen (92 ekor), dan PESA (persilangan PE dan Saanen sebanyak 44 ekor) di wilayah Cariu, Ciapus, Sukajaya, Cijeruk, Balitnak dan Sukabumi. Metode PCR-SSCP dielektroforesis pada tegangan 250 V selama delapan jam menggunakan gel poliakrilamida 12%. Hasil menunjukkan bahwa suhu penempelan primer pada suhu 60°C. Produk PCR yang didapatkan sepanjang 157 pb (pasang basa). Hasil pendeteksian keragaman menggunakan metode SSCP ditemukan empat pola yang menghasilkan empat genotipe yaitu AA, AB, BC dan AC. Frekuensi genotipe ekson 3 berurutan untuk genotipe AA (0,205), AB (0,856), AC (0,163) dan BC (0,045). Ditemukan juga tiga macam alel yaitu alel A, B dan C. Frekuensi genotipe tertinggi adalah genotipe AB pada ketiga bangsa kambing. Nilai heterozigositas tertinggi ditemukan pada Peranakan Etawah, Saanen dan PESA (0,938). Gen hormon pertumbuhan ekson 3 pada ketiga bangsa kambing memiliki polimorfisme tinggi di enam populasi yang berbeda.

Kata Kunci: Kambing Perah, Gen GH, PCR-SSCP, Polimorfisme

PENDAHULUAN

Kambing merupakan ternak ruminansia kecil yang telah berkembang cukup luas di Indonesia. Pemanfaatan kambing digunakan untuk produksi daging, susu, kulit dan bulu. Kambing dapat beradaptasi pada lingkungan

dengan hijauan yang terbatas, bersifat prolifrik sehingga kambing memiliki peran penting sebagai sumber daya genetik ternak.

Jumlah populasi kambing di Indonesia masih tergolong rendah. Hal ini didukung data DITJENNAK (2009) yang menyatakan bahwa populasi kambing di Indonesia pada tahun

2009 berjumlah 15.655.740 ekor. Kendala yang dihadapi adalah sistem pemeliharaan dan budidaya yang belum baik. Pemanfaatan kambing secara genetik belum diteliti secara optimal. Perkembangan ilmu genetika molekuler telah membuka peluang untuk mengetahui tingkat keragaman genetik pada tingkat DNA yang dapat digunakan untuk mengetahui potensi genetik ternak. Teknologi DNA dapat menjadi dasar untuk penentuan genotipe gen-gen bernilai ekonomis yang diperlukan sebagai bibit yang unggul.

Pengukuran potensi ternak dapat diamati melalui sifat pertumbuhan. Pertumbuhan merupakan sifat yang dikendalikan banyak gen. Salah satu gen penting yang mempengaruhi pertumbuhan ternak kambing adalah gen *growth hormone* (GH) yang disekresikan oleh kelenjar *pituitary*. *Growth Hormone* memiliki peranan penting dalam pertumbuhan jaringan, laktasi, reproduksi dan metabolisme protein, lipid dan karbohidrat.

Keragaman gen dapat diidentifikasi dengan dua metode yaitu metode *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) dan metode *single-strand conformation polymorphism* (SSCP). Teknik PCR-SSCP merupakan teknik yang mudah dan efisien untuk mengidentifikasi variasi urutan nukleotida pada fragmen gen DNA. Keterbatasan terhadap informasi keragaman genetik kambing sehingga teknik ini digunakan untuk mengidentifikasi gen GH pada ternak kambing.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan keragaman gen *Growth Hormone exon 3* pada kambing Peranakan Etawah (PE), Saanen dan PESA (Persilangan Peranakan Etawah dan Saanen) melalui teknik *polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism* (PCR-SSCP).

MATERI DAN METODE

Sampel darah

Sampel darah kambing yang disediakan sebanyak 234 sampel yang berasal dari tiga bangsa kambing pada lokasi berbeda. Sampel tersebut terdiri atas kambing PE berasal dari populasi Ciapus (20 ekor), Cariu (28 ekor) dan Sukajaya (50 ekor). Kambing Saanen berasal dari populasi Cijeruk (21 ekor), Cariu (31 ekor)

dan Sukabumi (40 ekor). Kambing PESA berasal dari populasi Cariu (25 ekor) dan Balitnak (19 ekor).

Primer GH

Primer merupakan molekul oligonukleotida yang berukuran pendek (18 – 24 base pair) dan menempel pada DNA cetakan di tempat yang spesifik. Primer yang digunakan dalam penelitian berdasarkan MALVEIRO *et al.* (2001) yaitu gen GH *exon 3* sebagai berikut *forward* 5'-GTG TGT TCT CCC CCC AGG AG-3' dan *reverse* 5'-CTC GGT CCT AGG TGG CCA CT-3'. Primer dapat menempel pada gen GH dengan panjang produk 157 bp yang disajikan pada Gambar 1.

Prosedur

Pengambilan sampel darah dan ekstraksi DNA

Sampel darah diambil melalui pembuluh vena jugularis menggunakan tabung *vacutainer* yang mengandung antikoagulan. Sampel tersebut kemudian disimpan dalam termos es dan suhu dipertahankan sekitar 4°C. Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan sampel darah mengikuti metode *phenol-chloroform* (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Amplifikasi DNA

Gen GH *exon 3* diamplifikasi oleh PCR menggunakan primer *forward* dan *reverse* (Gambar 1). Bahan pereaksi PCR terdiri atas 1,0 µl sampel DNA; 8,5 µl air destilasi; 0,1 µl primer; 0,1 µl dNTP; 1,0 µl MgCl₂ dan 0,05 µl taq DNA dengan volume akhir 12 µl. Proses amplifikasi diawali tahap denaturasi pada suhu 94°C selama lima menit, tahap kedua memiliki 30 siklus yang masing-masing siklus terdiri atas denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, penempelan (*annealing*) primer pada suhu 60°C selama 45 detik dan pemanjangan (*extension*) DNA pada suhu 72°C selama satu menit. Tahap terakhir adalah pemanjangan primer pada suhu 72°C selama 10 menit. Hasil amplifikasi DNA dianalisis dengan elektroforesis.

```

1021 aaggcagtga ggggaaccac acaccagctt agaccgggtt gggtgtttc tccccagg
1081 agcgaccta catcccggag ggacagagat actccatcca gaacaccag gttgccttct
1141 gttctccga aaccatcccg gccccacgg gcaagaatga ggcccagcag aaatcagtga
1201 gtggccactt aggaccgagg agcaggggac ctcttcac ttaagtaggc tgccccagct
    
```

huruf tebal dan garis bawah merupakan situs primer

Gambar 1. Sekuens primer didasarkan pada sekuens gen GH Exon 3 pada kambing

Pendeteksian keragaman gen GH melalui teknik *polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP)*

Pendeteksian gen GH exon 3 berdasarkan MALVEIRO *et al.* (2001) dilakukan menggunakan 10 µl produk PCR yang ditambahkan larutan *formamida dye* (95% formamida; 10 mM NaOH; 0,05% *xylene cyanol* dan 0,05% *bromfenol blue*) hingga mencapai 20 µl. Campuran tersebut didenaturasi pada suhu 95°C selama lima menit dan segera didinginkan pada suhu 0°C selama tiga menit. Sampel sebanyak 5 µl dimasukkan ke dalam gel poliakrilamida 12% untuk mendeteksi konformasi untai DNA. Sampel DNA dielektroforesis pada gel poliakrilamida pada tegangan 250 volt selama delapan jam pada suhu 4°C. Gel poliakrilamida 12% dikeluarkan dari kaca dan dilakukan proses pewarnaan perak.

Pewarnaan perak

Pewarnaan perak dilakukan menggunakan metode BYUN *et al.* (2009) yang telah dimodifikasi. Gel direndam dalam larutan A (200 ml air destilasi; 0,23 g AgNO₃; 80 µl N NaOH dan 800 µl *ammonia*) selama delapan

menit sambil digoyang menggunakan *water bath shaker*. Kemudian larutan dibuang dan gel dibilas dengan menggunakan air destilasi. Pemunculan pita diperoleh dengan merendam gel dalam larutan B (200 ml air destilata, 6 g NaOH, 200 µl *formaldehid*) sambil dipanaskan. Setelah itu, larutan B dibuang dan gel direndam dalam 100 ml asam asetat untuk menghentikan reduksi perak.

Penentuan genotipe

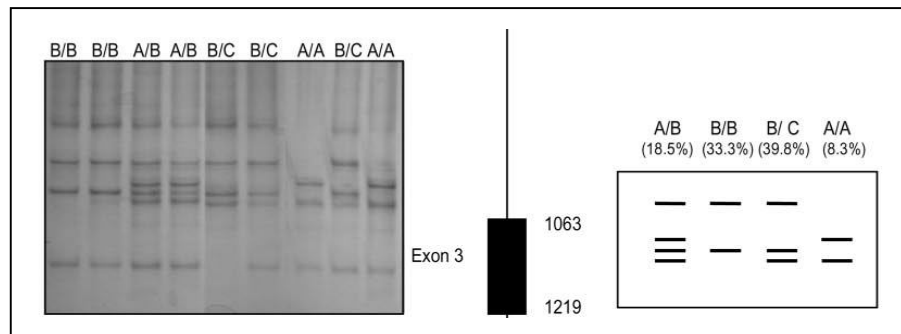
Penentuan genotipe sampel kambing PE, Saanen dan PESA berdasarkan MALVEIRO *et al.* (2001) dapat dilihat pada Gambar 2.

Analisis Data

Frekuensi alel dan genotipe

Hasil genotipe dilakukan perhitungan frekuensi alel dan genotipe. Perhitungan frekuensi alel sebagai berikut (NEI dan KUMAR, 2000) sebagai berikut:

$$X_i = \frac{(2n_{ii} + \sum_{i \neq j} n_{ij})}{2N}$$



Gambar 2. Hasil visualisasi pita gen GH Exon 3 pada kambing algarvia melalui teknik PCR-SSCP (MALVEIRO *et al.*, 2001)

Frekuensi genotipe dapat dihitung dengan persamaan sebagai berikut (NEI dan KUMAR, 2000):

$$X_{ii} = \frac{n_{ii}}{N}$$

X_i : frekuensi alel ke-i

X_{ii} : frekuensi genotipe ke-i

n_{ii} : jumlah individu bergenotipe ii

n_{ij} : jumlah individu bergenotipe ij

N : total sampel

Derajat heterozigositas

Keragaman genetik dilakukan melalui perhitungan nilai heterozigositas pengamatan (H_o) (WEIR, 1996):

$$H_o = \sum_{i=j} \frac{N_{ij}}{N}$$

H_o : frekuensi heterozigositas pengamatan

N_{ij} : jumlah individu heterozigositas pada lokus ke-1

N: jumlah individu yang dianalisis

HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi Gen GH

Gen GH *exon 3* pada kambing PE, Saanen, dan PESA (Persilangan PE dan Saanen) berhasil diamplifikasi menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Hasil amplifikasi gen GH *exon 3* pada kambing

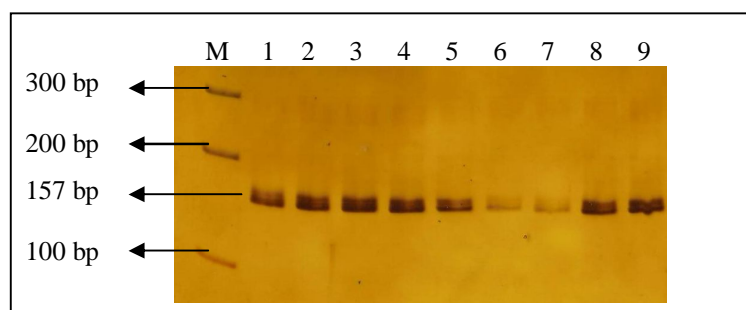
adalah berukuran 157 bp. Gambar 3 memperlihatkan hasil amplifikasi gen GH *exon 3* kambing.

Keberhasilan amplifikasi gen GH *exon 3* dapat ditentukan oleh penempelan primer. Suhu yang digunakan agar primer dapat menempel pada fragment DNA target 60°C. Suhu penempelan primer (*annealing*) sesuai dengan suhu yang digunakan dalam penelitian MALVEIRO *et al.* (2001). Keberhasilan amplifikasi gen GH sebesar 98,29% atau sebanyak 230 sampel yang berhasil diamplifikasi dari total 234 sampel.

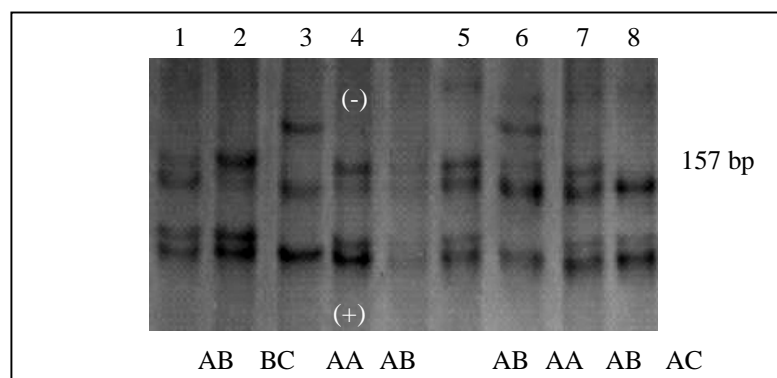
Pendeteksian keragaman gen GH

Hasil pendeteksian keragaman GH *exon 3* kambing melalui teknik PCR-SSCP dan gambaran dari diagram elektroforesis (*zymogram*) dari masing-masing genotipe kambing dapat dilihat pada Gambar 4.

Hasil pendeteksian ditemukan empat macam genotipe yaitu genotipe AA, AB, AC dan BC. Munculnya empat macam genotipe dibedakan berdasarkan jumlah pita yang muncul pada gel poliakrilamida 12%. Penentuan keempat macam genotipe didasarkan pada MALVEIRO *et al.* (2001). Genotipe AA merupakan genotipe homozigot yang muncul dua pita. Genotipe AB terbentuk karena dua genotipe homozigot (genotipe AA dan BB) bergabung menjadi heterozigot (muncul empat pita). Genotipe AC terbentuk karena dua genotipe homozigot (genotipe AA dan CC) yang bergabung menjadi heterozigot (muncul tiga pita). Menurut BASTOS *et al.* (2001) jumlah maksimum pita yang muncul dari satu individu diploid adalah empat pita. Hasil visualisasi pada semua sampel DNA



Gambar 3. Hasil amplifikasi gen GH *Exon 3* melalui teknik PCR pada Gel Poliakrilamida 6% (M: marker 100 bp DNA)



Gambar 4. Hasil visualisasi pita gen GH *Exon 3* kambing melalui teknik PCR-SSCP pada gel poliakrilamida 12%

menunjukkan jumlah pita yang muncul yaitu dua, tiga dan empat pita.

Penemuan empat macam genotipe dapat dihasilkan tiga macam alel yaitu alel A, B dan C. Pendeteksian keragaman gen GH *exon 3* yang ditemukan, didukung oleh MALVEIRO *et al.* (2001) yang menemukan dua macam genotipe homozigot (AA dan BB) dan dua pola genotipe heterozigot (AB dan BC) pada gen GH *exon 3* dari 108 kambing Algarvia. Hasil pendeteksian yang dilakukan pada penelitian, ditemukan genotipe AC yang bersifat heterozigot dimana genotipe ini tidak ditemukan pada penelitian MALVEIRO *et al.* (2001).

Frekuensi Genotipe dan Alel

Hasil analisis frekuensi genotipe pada fragmen gen GH *exon 3* pada kambing PE, Saanen dan PESA disajikan pada Tabel 1.

Kambing PE, Saanen dan PESA memiliki frekuensi genotipe AB tinggi di tiga lokasi yaitu Ciapus, Sukabumi dan Cariu. Hasil frekuensi genotipe pada bangsa kambing PE memiliki genotipe AB (0,856) tinggi, sedangkan genotipe AA (0,062), AC (0,052), dan BC (0,031) rendah. Pada bangsa kambing Saanen frekuensi AB (0,719) tinggi juga, kemudian AA (0,135), AC (0,101) dan BC

Tabel 1. Frekuensi genotipe gen GH *Exon 3* pada kambing PE, Saanen dan PESA

| Bangsa kambing | Lokasi | Genotipe | | | |
|----------------|-------------------|----------|-------|-------|-------|
| | | AA | AB | AC | BC |
| PE | Ciapus (n = 20) | 0,000 | 0,900 | 0,000 | 0,100 |
| | Cariu (n = 28) | 0,107 | 0,821 | 0,036 | 0,036 |
| | Sukajaya (n = 50) | 0,061 | 0,857 | 0,082 | 0,000 |
| Total (n= 98) | | 0,062 | 0,856 | 0,052 | 0,031 |
| Saanen | Cijeruk (n = 21) | 0,190 | 0,762 | 0,000 | 0,048 |
| | Cariu (n = 31) | 0,194 | 0,613 | 0,161 | 0,032 |
| | Sukabumi (n = 40) | 0,054 | 0,784 | 0,108 | 0,054 |
| Total (n= 92) | | 0,135 | 0,719 | 0,101 | 0,045 |
| PESA | Cariu (n = 25) | 0,360 | 0,560 | 0,080 | 0,000 |
| | Balitnak (n = 19) | 0,000 | 0,789 | 0,211 | 0,000 |
| Total (n = 44) | | 0,205 | 0,659 | 0,136 | 0,000 |

n: jumlah individu

heterozigositas pengamatan pada fragmen gen (0,045) rendah. Hal yang sama terjadi pada kambing PESA, frekuensi genotipe AB (0,659) tinggi sedangkan genotipe AA (0,205), AC (0,136) rendah dan genotipe BC (0,000) tidak ditemukan. Hasil frekuensi genotipe pada ketiga bangsa kambing memiliki genotipe tertinggi yaitu AB. Hal ini dikarenakan genotipe AB merupakan pola pita yang dominan muncul pada gel poliakrilamida. Hasil penelitian ini berbeda dengan yang didapatkan oleh MALVEIRO *et al.* (2001) yang melaporkan frekuensi genotipe tertinggi pada genotipe BC (0,398), BB (0,333), AB (0,185) dan AA (0,083). Perbedaan frekuensi genotipe fragmen GH exon 3 antara kambing PE, Saanen, dan PESA disebabkan oleh perbedaan bangsa ternak.

Frekuensi alel adalah frekuensi relatif dari suatu alel dalam populasi atau jumlah suatu alel terhadap total alel yang terdapat dalam suatu populasi (NEI dan KUMAR, 2000). Hasil frekuensi alel gen GH dapat dilihat pada Tabel 2.

Pada kambing PE adalah alel A dan B tinggi. Frekuensi alel A sebesar 0,531 dan alel B sebesar 0,443. Frekuensi alel pada bangsa kambing Saanen memiliki alel A dan B tinggi. Frekuensi alel A dan B sebesar 0,545 dan 0,382. Frekuensi alel pada kambing PESA yaitu alel A dan B tinggi sebesar 0,602 dan 0,330.

Frekuensi genotipe pada ketiga bangsa kambing menunjukkan bahwa genotipe AB lebih tinggi dibandingkan genotipe yang lain. Sedangkan frekuensi alel ketiga bangsa kambing menunjukkan bahwa alel A dan B memberikan frekuensi hampir sama. Hasil frekuensi genotipe dan alel yang diperoleh dari ketiga bangsa kambing pada lokasi berbeda memberikan keragaman (polimorfisme) yang tinggi. Polimorfisme tinggi jika dalam suatu populasi ditemukannya dua atau lebih alel (frekuensi alel atau lebih dari 0,01) (NEI dan KUMAR, 2000).

Nilai heterozigositas

Nilai heterozigositas merupakan cara yang paling tepat untuk mengukur keragaman genetik suatu populasi (NEI, 1987). Nilai GH exon 3 kambing PE, Saanen dan PESA disajikan pada Tabel 3.

Hasil analisis menunjukkan nilai heterozigositas pengamatan tertinggi pada kambing PE di lokasi Ciapus merupakan nilai heterozigositas yang tinggi 1,000 sedangkan di lokasi Cariu dan Sukajaya 0,893 dan 0,939. Lokasi Ciapus memiliki nilai heterozigositas tertinggi dari sampel pengamatan sebanyak 20 individu memiliki genotipe heterozigot 100%. Nilai heterozigotas pada kambing Saanen di lokasi Cijeruk, Cariu dan Sukabumi memiliki nilai yang tinggi berurutan sebesar 0,810;

Tabel 2. Frekuensi alel gen GH Exon 3 pada kambing PE, Saanen dan PESA

| Bangsa kambing | Lokasi | Alel | | |
|----------------|-------------------|-------|-------|-------|
| | | A | B | C |
| PE | Ciapus (n = 20) | 0,450 | 0,500 | 0,050 |
| | Cariu (n = 28) | 0,536 | 0,429 | 0,036 |
| | Sukajaya (n = 50) | 0,531 | 0,429 | 0,041 |
| Total (n= 98) | | 0,515 | 0,443 | 0,041 |
| Saanen | Cijeruk (n = 21) | 0,571 | 0,405 | 0,024 |
| | Cariu (n = 31) | 0,581 | 0,323 | 0,097 |
| | Sukabumi (n = 40) | 0,500 | 0,419 | 0,081 |
| Total (n= 92) | | 0,545 | 0,382 | 0,073 |
| PESA | Cariu (n = 25) | 0,680 | 0,280 | 0,040 |
| | Balitnak (n = 19) | 0,500 | 0,395 | 0,105 |
| Total (n = 44) | | 0,602 | 0,330 | 0,068 |

n: jumlah individu

0,806; 0,946. Nilai heterozigotas pada kambing PESA di populasi Cariu dan Balitnak memiliki nilai sebesar 0,640 dan 1,000. Nilai heterozigositas dipengaruhi oleh jumlah alel, dan frekuensi alel.

Hasil analisis nilai heterosigositas pengamatan (Tabel 3) menunjukkan bahwa ketiga bangsa kambing memiliki keragaman yang tinggi. Hal ini ditandai dengan nilai Heterozigositas yang tinggi pada kambing PE (0,938), kambing Saanen (0,865) dan kambing PESA (0,795). Nilai heterozigositas pengamatan dapat digunakan sebagai salah satu cara untuk menduga nilai koefisien biak dalam (inbreeding) pada suatu kelompok ternak (HARTL dan CLARK, 1997).

Tabel 3. Nilai heterozigositas pengamatan pada fragmen gen GH

| Bangsa kambing | Lokasi | Heterozigositas |
|----------------|------------------|-----------------|
| PE | Ciapus (n = 20) | 1,000 |
| | Cariu (n= 28) | 0,893 |
| | Sukajaya (n= 50) | 0,939 |
| Total (n= 98) | | 0,938 |
| Saanen | Cijeruk (n= 21) | 0,810 |
| | Cariu (n= 31) | 0,806 |
| | Sukabumi (n= 40) | 0,946 |
| Total (n = 92) | | 0,865 |
| PESA | Cariu (n= 25) | 0,640 |
| | Balitnak (n= 19) | 1,000 |
| Total (n= 44) | | 0,795 |

KESIMPULAN

Hasil penelitian gen GH *exon 3* dapat disimpulkan bahwa sampel DNA kambing PE,

Saanen dan PESA dengan teknik PCR-SSCP bersifat beragam. Pada fragmen gen GH *exon 3* ditemukan empat macam genotipe yaitu AA, AB, AC dan BC dengan tiga macam alel yaitu alel A, B dan C. Ketiga bangsa kambing dengan lokasi berbeda memiliki polimorfisme tinggi ditandai dengan nilai heterozigositas yang tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- BASTOS, E., A. CRVADOR, J. AZEVEDO and H.G. PINTO. 2001. Single strand conformation polymorphism (SSCP) detection in six genes in Portuguese indigenous sheep breed "Churra da Terra Quente". *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 5(1): 7 – 15.
- BYUN, S.O., Q. FANG, H. ZHOU and J. G.H. HICKFORD. 2009. An effective method for silver-staining DNA in large numbers of polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 385: 174 – 175.
- DITJENNAK. 2009. *Statistik Peternakan 2009*. Direktorat Jenderal Peternakan Departemen Pertanian RI, Jakarta.
- HARTL, D.L. and A.G. CLARK. 1997. *Principle of Population Genetic*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- MALVEIRO, E., M. PEREIRA, P.X. MARQUES, I.C. SANTOS, C. BELO, R. RENAVILLE, and A. CRAVADOR. 2001. Polymorphisms at the five exons of growth hormone gene: *In the algarvia goat: possible association with milk traits*. *Small Ruminant Research* 41: 163 – 170.
- NEI, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York.
- NEI, M. and S. KUMAR. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH and T. MANUATIS. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Third Editio. Cold Spring Harbour Lab. Press, New York.
- WEIR, B.S. 1996. *Genetic data analysis: Method for discrete population genetic data*. Second ed. Sinauer Associates. Sunderland, MA USA.