

BIẾN ĐỘNG DI TRUYỀN CÁC QUẦN ĐÀN CÁ TRA (*Pangasianodon hypophthalmus*, SAUVAGE 1878) Ở VIỆT NAM

Hà Phước Hùng¹, Nguyễn Thị Thu Thủy², Supawadee Poompuang³, Uthairat Nakorn^{3*}

¹ Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ, Việt Nam. E-mail: hphung@ctu.edu.vn

² Mạng lưới các Trung tâm Nuôi trồng thủy sản vùng Châu Á- Thái Bình Dương (NACA), cơ sở tại Đại học Kasetsart, Băng Cốc, Thái Lan. E-mail: thuy.nguyen@enaca.org

³ Khoa Thủy sản, Đại học Kasetsart, Thái Lan. E-mail: supawadee.p@ku.ac.th

^{3*} Khoa Thủy sản, Đại học Kasetsart, Thái Lan. E-mail: ffishurn@ku.ac.th

ABSTRACT

To assess in genetic diversity within and among populations striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*, Sauvage 1878) in Vietnam, a total of 391 fishes of were genotyped by five microsatellite loci *Pg1**, *Pg2**, *Pg3**, *Pg13** and *Pg14** from the DNA Technology Laboratory, Kasetsart University. Genetic diversity of striped catfish revealed no genetic differentiation among populations collected from four hatcheries and three wild populations as revealed by F_{ST} and a model-based clustering method. Genetic variation of wild (mean number of alleles per locus, $A = 4.80-6.20$; allelic richness, $A_r = 4.54-5.06$; mean effective number of alleles per locus, $A_e = 2.86-3.20$; observed heterozygosity, $H_o = 0.62-0.65$; expected heterozygosity, $H_e = 0.62-0.64$) and hatchery populations ($A = 4.60-5.20$; $A_r = 4.10-4.83$; $A_e = 2.80-3.11$; $H_o = 0.61-0.66$; $H_e = 0.61-0.64$) were not statistically different. No evidences for recent genetic bottleneck in all populations. The results indicate that the hatchery stocks were founded from sufficient numbers of brooders, current population size is large, and the domestication process is in an early stage.

Keywords: Microsatellite, Striped catfish, Bottleneck, Broodstock, Heterozygosity, Polymerase chain reaction.

TÓM TẮT

Để đánh giá biến động di truyền bên trong và giữa các quần thể cá Tra (*Pangasianodon hypophthalmus*, Sauvage 1878) đã có 391 mẫu cá Tra được xác định kiểu gen dựa vào 5 locut microsatellite *Pg1**, *Pg2**, *Pg3**, *Pg13** và *Pg14** từ Viện Công nghệ sinh học, trường Đại học Kasetsart, Thái Lan. Đánh giá đa dạng di truyền cá Tra Việt nam cho thấy không có sự khác biệt giữa các quần đàn cá Trại và cá hoang dã. Mức biến động di truyền đối với cá hoang dã (số alen trung bình trên locut $A = 4.80-6.20$, số alen hữu dụng $A_r = 4.54-5.06$, số allen hiệu quả $A_e = 2.86-3.20$, dị hợp tử quan sát $H_o = 0.62-0.65$, dị hợp tử tính toán $H_e = 0.62-0.64$), và đối với các quần đàn trại cá ($A = 4.60-5.20$; $A_r = 4.10-4.83$; $A_e = 2.80-3.11$; $H_o = 0.61-0.66$; $H_e = 0.61-0.64$). Không có hiện tượng cổ chai quần thể xảy ra trong các quần đàn nghiên cứu. Kết quả cho thấy cỡ quần thể hiệu quả N_e ở các trại cá là đủ lớn, và triển trình thuần hóa loài mới ở giai đoạn đầu.

Từ khóa: Microsatellite, cá Tra, Cổ chai quần thể, Quần đàn bố mẹ, Dị hợp tử, PCR.

GIỚI THIỆU

Trong tiến trình thuần hóa loài sinh vật, những thay đổi về di truyền đối với loài thuần hóa là tất yếu xảy ra, bởi nhà thuần hóa luôn hướng đến chọn những tính trạng mà mình mong muốn. Những thay đổi đó có thể là do quá trình chọn lọc, do suy giảm cỡ quần thể hiệu quả

N_e (số cá bố mẹ đóng góp tạo nên thế hệ sau), hoặc do nội phối, và có thể do kết hợp cả các nguyên nhân trên (Doyle, 1983). Tương tự, việc thuần hóa loài động vật thủy sinh cũng để nhằm đạt được một số tính trạng mong muốn nào đó, mà tính trạng đó vẫn được duy trì trong điều kiện nuôi nhốt (Gjedrem, 2005). Chẳng hạn, việc thuần hóa loài cá rô phi *Oreochromis niloticus* đã cải thiện năng suất sinh sản của loài (Osure và Phelps, 2006). Do đó, thuần hóa là tiến trình cần thiết để tạo ra một quần đàn nuôi thích nghi tốt trong điều kiện bị giam, nhốt. Tuy nhiên, thuần hóa cũng làm suy thoái các tính trạng khác của loài. Chẳng hạn, làm giảm mức sống sót và tăng mức dị hình sau 4 thế hệ thuần hóa của loài cá Nheo *Heterobranchus longifilis* (Agnès và ctv., 1995), hoặc giảm mức tăng trưởng của cá rô phi sau 50 năm thuần hóa ở một số nơi không có chương trình quản lý quần đàn thích hợp (Brummett và ctv., 2004).

Việc mất biến động di truyền trong các quần đàn cá ở các trại cá là hiện tượng phổ biến (Coughlan và ctv., 1998; Kohlmann và ctv., 2005; Sekino và ctv., 2002; Skaala và ctv., 2004; Luan và ctv., 2006), đa phần là do bởi cỡ quần thể hiệu quả N_e nhỏ (Falconer và MacKay, 1996). Vì thế, để duy trì biến động di truyền nhất thiết phải có một chương trình quản lý quần đàn thích hợp để đảm bảo cho tiến trình thuần hóa loài được thành công.

Cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) là loài cá di cư và bản địa của sông Mekong (Rainboth, 1996; Roberts và Vidthayanon, 1991). Ở Việt Nam, nghề nuôi cá Tra đã có gần 100 năm. Tuy nhiên, nghề này chỉ mang tính qui mô lớn trong những năm gần đây khi Việt Nam thành công về sinh sản nhân tạo từ những năm 1999 (Trong và ctv., 2002). Đến 2007, sản lượng cá Tra của Việt Nam đã đạt tới 1.2 triệu tấn và trở thành đối tượng nuôi có mức tăng sản lượng nhanh nhất thế giới. Ở Việt Nam, dù lượng giống cá Tra đã đủ cung cấp từ các trại cá (270 triệu cá giống được sản xuất hàng năm; Van Zalinge và ctv., 2002; Thang, 2006). Tuy nhiên, việc quản lý hiệu quả quần đàn cá Tra bố mẹ, dù có quan tâm, nhưng chưa được đúng mức (Ha và ctv., 2008). Thí dụ, Ha và ctv. (2008) đã cho thấy các trại cá khi chọn cá bố mẹ thì chưa đánh giá hết mối liên hệ di truyền giữa các cá thể. Điều này có thể dẫn đến rủi ro mất biến động di truyền, gây ra nội phối, hệ quả là bất lợi cho tiến trình thuần hóa loài (Schonhuth và ctv., 2003). Do vậy, hiểu biết về đa dạng di truyền của các quần đàn cá Tra bố mẹ ở Việt Nam là cấp thiết. Dù đã có vài nghiên cứu về biến động di truyền trên cá Tra. Chẳng hạn, So và ctv. (2006a) dùng các marker ADN ty thể, dựa trên phương pháp đa hình chiều dài các đoạn ngẫu nhiên (RFLP) cho thấy mức đa dạng di truyền của cá Tra hoang dã ở Cambodia là vừa phải. Hoặc So và ctv. (2006b) áp dụng các marker siêu biến ADN microsatellite chỉ ra mức đa dạng di truyền đối với các quần thể cá Tra hoang dã sông Mekong khu vực Cambodia là khá cao. Tuy nhiên, nghiên cứu đa dạng di truyền các quần đàn cá Tra ở Việt Nam cũng như mức khác biệt di truyền giữa quần đàn cá Trại và cá Tra hoang dã thì chưa được nghiên cứu.

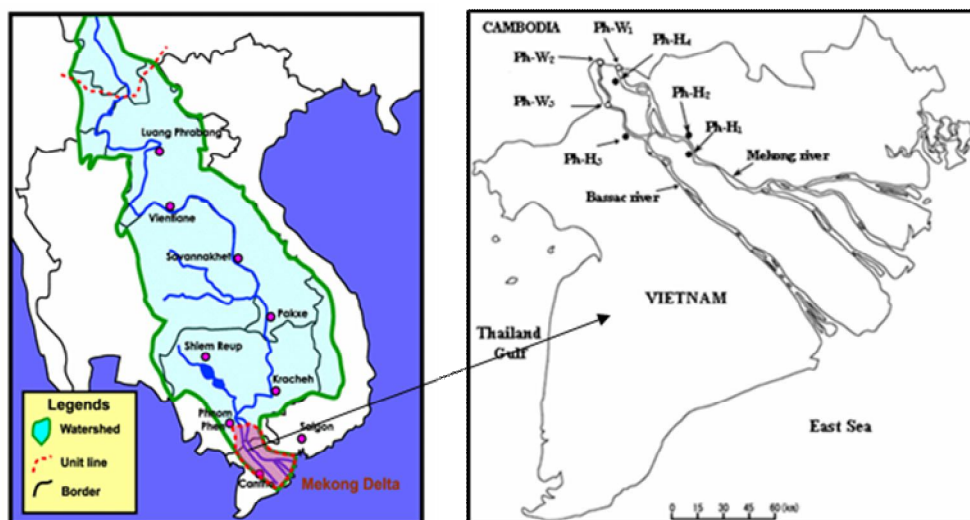
Mục đích của nghiên cứu này là ứng dụng các marker microsatellite ADN để khảo sát các mức biến động di truyền của các quần đàn cá Tra ở các trại cá và cá Tra hoang dã, và các ngụ ý trong việc quản lý quần đàn cá Tra bố mẹ một cách tốt nhất.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thu mẫu

Tổng số 391 mẫu vây đuôi cá Tra bố mẹ (khoảng 2 cm²) ở 4 trại cá thuộc hai tỉnh An Giang và Đồng Tháp, cùng với 2 quần thể cá Tra sông Tiền và sông Hậu (đẻ năm 2005) và 1 quần thể cá Tra Sông Hậu (đẻ năm 2006) đã được thu thập từ tháng 6-8/2006 (Hình 1, Bảng 1).

Do khó định loại chính xác cá Tra hoang dã ở giai đoạn cá bột, nên cá Tra bột hoang dã được tiếp tục nuôi đến khi trọng lượng đạt 50g/con khi đó mẫu vây mới được thu dùng.



Hình 1. Bản đồ vị trí thu mẫu cá Tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) ở Việt nam.

Bảng 1. Các quần thể, khu vực thu mẫu cá Tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) ở Việt Nam

Ký hiệu	Tên quần thể	Vùng thu mẫu	Vĩ độ/Kinh độ	Kiểu quần thể	Số mẫu
PhH1	Trại cá Nguyễn văn Mừng	Sa Đéc, Đồng Tháp	10°22'37"N 105°42'33"E	Trại cá	52
PhH2	Trung tâm giống Đồng Tháp	Cao Lãnh, Đồng Tháp	10°17'14"N 105°46'2"E	Trại cá	52
PhH3	Trại cá Nguyễn Văn Tùng	Châu Phú, An Giang	10°34'36"N 105°14'08"E	Trại cá	58
PhH4	Trại cá Trần Văn Hoàng	Vĩnh Hòa, An Giang	10°52'00"N 105°10'59"E	Trại cá	51
PhW1	Sông Tiền (đề năm 2005)	Vĩnh Xương, An Giang	10°54'15"N 105°10'46"E	Hoang dã	50
PhW2	Sông Hậu (đề năm 2005)	Phú Hữu, An Giang	10°55'04"N 105°05'42"E	Hoang dã	51
PhW3	Sông Hậu (đề năm 2006)	Cồn Tiên, An Giang	10°44'15"N 105°07'46"E	Hoang dã	77

Chiết suất AND và phân tích AND microsatellite

ADN tổng của từng mẫu được chiết suất theo phương pháp Phenol-Chloroform (Taggart và ctv., 1992). Các mẫu ADN sau đó được phân tích với 5 locut microsatellite: *Pg1**, *Pg2**, *Pg3**, *Pg13**, and *Pg14** (Na-Nakorn và ctv., 2006). Phản ứng chuỗi trùng hợp (PCR) được thực hiện trên máy chu kỳ nhiệt Px2 Thermal Cycler (Thermo Electron Corporation, USA). Trong mỗi phản ứng có 10 ng ADN khuôn, 1x PCR Tag buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM dNTPs, 0.25 μM của mỗi môi xuôi và môi ngược; và 0.2 unit of Taq ADN polymerase. Chu kỳ nhiệt được thực hiện sau: biến tính ban đầu (denaturation) ở 94°C trong 3 phút; tiếp đến là 35 chu kỳ khuếch đại, gồm: bắt cặp môi (annealing) trong 30 giây; kéo dài đoạn khuếch đại (extension) trong 1 phút; và kết thúc đoạn khuếch đại (a final extension step) ở 72°C trong 5 phút. Sau cùng, mỗi sản phẩm PCR được chạy điện di trên nền gel acrylamide 4.5% và nhuộm Nitrat bạc.

Phân tích dữ liệu

Các thông số về biến động di truyền bên trong quần thể như tần số alen, số alen trung bình của mỗi locut (A), số alen hữu dụng (allelic richness - A_r) được ước lượng qua FSTAT for Windows v. 2.9.3 (Goudet, 2002). Số alen hiệu quả của mỗi locut (A_e) theo POPGENE v. 1.32 (Yeh, 2000). Sự khác biệt ý nghĩa của từng thông số A , A_r , A_e , H_o , H_e giữa các quần thể được kiểm định bằng kỹ thuật phi tham số (Sokal và Rohlf, 1995) áp dụng trên EXCEL for Window.

Cân bằng Hardy–Weinberg (HWE) và các chỉ số dị hợp tử quan sát (H_o), dị hợp tử tính toán (H_e) và chỉ số F_{is} (Weir và Cockerham, 1984) dựa vào GENEPOP v. 4.0 (Raymond và Rousset, 1995). Xác suất chính xác Fisher về độ lệch so với HWE được tính theo chuỗi Markov (mức dememorization = 1000; số mẽ = 100; số lần lập lại trên mỗi mẽ = 5000). Kiểm định ý nghĩa thống kê đối với các chỉ số trên được xét lại dựa trên hiệu chỉnh Bonferroni (Rice, 1989). Mặt khác, bởi vượt quá của đồng hợp tử đã xảy ra trong tất cả các quần thể nên kiểm định về số alen trơ (null alleles) cũng đã được kiểm tra bởi MICROCHECKER v. 2.2.3 (Van Oosterhout, 2004) và sau đó tần số kiểu gen đã được hiệu chỉnh lại theo đề nghị từ chương trình này.

Mất cân bằng kiểu gen giữa các cặp locut được vừa vào GENEPOP v. 4.0 (Raymond và Rousset, 1995). Sự suy giảm cỡ quần thể hiệu quả, cổ chai quần thể, được kiểm định đối với từng quần thể, áp dụng bằng hai cách: 1) Qua so sánh mức dị hợp tử tính toán (H_e), dựa trên số alen hiện có và dị hợp tử quan sát (H_o), vừa vào BOTTLENECK v. 1.2.02 (Cornuet và Luikart, 1999); 2) Qua giá trị thống kê M (M = tổng số alen k / khoảng cỡ alen r) dựa trên ARLEQUIN v. 3.11 (Excoffier và ctv., 2000), nếu $M < 0.68$ hiện tượng cổ chai sẽ xảy ra (Garza và Williamson, 2001).

Đánh giá mức khác biệt bên trong và giữa các quần thể, các giá trị thống kê F (F_{IS} , F_{ST} , F_{IT}) và (F_{SC} , F_{CT} - so sánh sự khác biệt bên trong và giữa các quần thể khi cá trại và cá hoang đã được gom lại thành 2 nhóm riêng) được ước lượng qua phân tích phương sai phân tử (AMOVA) dựa trên ARLEQUIN v. 3.11 (Excoffier và ctv., 2000). F_{ST} sau đó cũng được kiểm định để so sánh sự khác biệt ý nghĩa so với giá trị 0 bằng bootstrapping trong FSTAT v. 2.9.3 (Goudet, 2002).

Chúng tôi cũng dùng phương pháp kết nhóm (model-based clustering method) trong STRUCTURE v. 2.2 (Pritchard và ctv., 2000) để luận ra cấu trúc quần thể (ở đây, mức Burn-in và các chiều dài Monte-Carlo chuỗi Markov là 10.000; số nhóm tối đa $K = 10$, mỗi giá trị trung bình của K được lập lại 20 lần). Sau đó số nhóm K có khả năng nhiều nhất được đánh giá qua ΔK theo phương pháp *ad hoc* dựa trên mức thay đổi giá trị xác suất $\log$ theo giá trị K (Evano và ctv., 2005).

Khoảng cách di truyền Cavalli-Sforza and Edwards (1967) giữa các quần thể được dựa vào PHYLIP, v. 3.67 (Felsenstein 1993). Tiếp đó cây chủng loại UPGMA được xây dựng trên khoảng cách di truyền này. Mức tin cậy của dendrogram được ước lượng qua bootstrapping với 1000 lần lập lại. Biểu đồ hình cây sau cùng được vẽ ra dựa trên TreeView, v. 1.6.6 (Page, 1996).

KẾT QUẢ

Cân bằng Hardy-Weinberg (HWE) và mất cân bằng liên kết

Kiểm định chính xác Fisher về mức lệch so với HWE cho thấy đã có sự lệch HWE ở tất cả 7 quần thể nghiên cứu, các mức lệch này đều hướng đến sự vượt quá mức đồng hợp tử. Vì thế, dữ liệu đã được đánh giá lại cơ sở xét sự hiện diện của các alen trội trong các quần thể. Sau đó tần số kiểu gen đã được hiệu chỉnh theo đề nghị bởi MICROCHECKER. Sau khi hiệu chỉnh, vẫn còn 5 quần thể không HWE ($P < 0.05$). Tuy nhiên, sau khi hiệu chỉnh sequential Bonferroni ($P < 0.05/35$) chỉ còn duy nhất quần thể PhH4 là có mức lệch ý nghĩa so với HWE. Mặt khác, mất cân bằng liên kết đã không xảy ra trong tất cả các quần thể sau khi hiệu chỉnh sequential Bonferroni.

Biến động di truyền bên trong quần thể và cổ chai quần thể

Tất cả các thông số về biến động di truyền (Bảng 2) đối với quần thể hoang dã (số alen trung bình trên mỗi locut $A = 4.80 - 6.20$; số Alen hữu dụng $A_r = 4.54 - 5.06$; số alen hiệu quả trung bình trên mỗi locut $A_e = 2.86 - 3.20$; mức dị hợp tử quan sát $H_o = 0.62 - 0.65$; mức dị hợp tử tính toán $H_e = 0.62 - 0.64$) và các quần thể cá trại là ($A = 4.60 - 5.20$; $A_r = 4.10 - 4.83$; $A_e = 2.80 - 3.11$; $H_o = 0.61 - 0.66$; $H_e = 0.61 - 0.64$) không cho thấy khác biệt có ý nghĩa thống kê, và cũng không cho thấy khác biệt về mức biến động di truyền giữa các quần thể bên trong nhóm trại cá hay nhóm hoang dã. Số alen hiếm qua tất cả 7 quần thể khảo sát thì tương đối thấp (chỉ 1 alen hiếm trong quần thể trại cá; 3 alen hiếm trong quần thể hoang dã).

Bảng 2. Biến động di truyền trong các quần thể cá Tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) ở Việt Nam. Dấu * chỉ sự khác biệt so với 0 ($P < 0.0014$)

Quần thể	Cỡ mẫu	Đa dạng alen			Dị hợp tử		F_{is}
		A	A_r	A_e	H_o	H_e	
PhH1	47.6±9.8	5.00±1.87	4.83±1.82	3.03±1.22	0.66±0.10	0.63±0.13	-0.042
PhH2	51.8±0.4	5.20±1.64	4.63±1.20	2.87±1.13	0.61±0.17	0.61±0.16	-0.009
PhH3	53.4±6.5	4.80±1.64	4.45±1.44	3.11±1.20	0.64±0.16	0.64±0.16	-0.002
PhH4	46.8±8.8	4.60±1.52	4.10±1.25	2.80±1.04	0.64±0.17	0.61±0.14	-0.049*
PhW1	42.6±11.1	4.80±1.64	4.54±1.49	2.86±1.10	0.62±0.09	0.62±0.14	-0.003
PhW2	46.6±11.2	5.40±2.07	4.91±1.88	3.20±1.49	0.65±0.19	0.64±0.16	-0.009
PhW3	67.8±13.8	6.20±2.68	5.06±1.82	3.05±1.10	0.65±0.14	0.64±0.12	-0.016
Các QT	356 ±47.5	6.80 ±3.19	4.75 ±1.64	3.04 ±1.19	0.64±0.14	0.63±0.14	

Các kiểm định sign test, standard difference test, và Wilcoxon sign-rank test đã không cho thấy có hiện tượng cổ chai quần thể. Kết quả này còn được khẳng định qua giá trị $M = 0.820-0.916$ thì luôn cao hơn giá trị tới hạn 0.68 (nếu $M < 0.68$ quần thể sẽ bị ảnh hưởng của cổ chai di truyền, Garza và Williamson, 2001).

Đa dạng di truyền giữa các quần thể

So sánh F_{ST} qua 5 locut cho thấy không có sự khác biệt giữa các quần thể ($F_{ST} = 0.003$; $CI_{95\%} = -0.001 - 0.006$). Tương tự, phân tích AMOVA cũng không chỉ ra khác biệt giữa các nhóm trại cá và nhóm hoang dã ($F_{SC} = 0.004$, $P = 0.018$). Tuy nhiên, sự khác biệt có ý nghĩa lại ngay bên trong nhóm ($F_{SC} = 0.004$, $P = 0.018$). Sự biến động di truyền giữa các cá thể bên trong các quần thể thì cũng không có ý nghĩa ($F_{IS} = -0.003$, $P = 0.917$) (Bảng 3).

Bảng 3. Phân tích phương sai phân tử (AMOVA) của hai nhóm cá Tra hoang dã và trại cá (*Pangasianodon hypophthalmus*) ở Việt Nam.

Nguồn biến động	Tổng bình phương	Th. phần phương sai	% biến động	Chỉ số cố định	Giá trị <i>P</i>
Giữa các nhóm	0.618	-0.005	-0.319	-0.019 (F_{CT})	0.998
Giữa các quần thể trong các nhóm	11.100	0.007	0.450	0.004 (F_{SC})	0.018
Giữa các cá thể trong các quần thể	529.301	-0.030	-1.937	-0.003 (F_{IS})	0.917
Trong các cá thể	567.000	1.598	101.806	-0.018 (F_{IT})	0.871
Tổng	1108.020	1.570			

Kiểm định chính xác Fisher về khác biệt giữa các cặp quần thể, ban đầu cho thấy có 10 cặp quần thể khác biệt di truyền ($P < 0.05$) nhưng sau khi hiệu chỉnh sequential Bonferroni ($P > 0.05/21$) chỉ còn lại 2 cặp PhH3-PhH1, và PhH4-PhH3 là khác biệt có ý nghĩa (Bảng 4).

Khoảng cách di truyền

Khoảng cách di truyền Cavalli-Sforza and Edwards giữa các cặp quần thể (Bảng 4) từ 0.0084 (PhH3-PhW1) đến 0.0201 (PhH1-PhH4). Khoảng cách di truyền giữa các quần thể hoang dã là 0.0173 – 0.0194, và giữa các quần thể trại cá là 0.0131 – 0.0201.

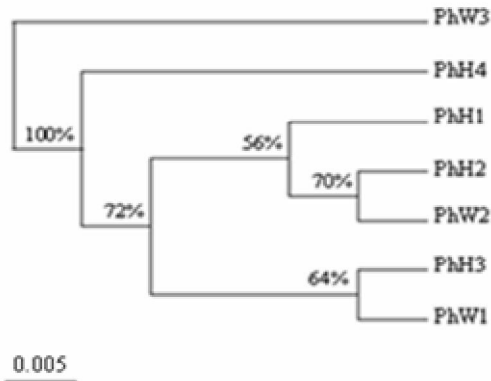
Bảng 4. Giá trị F_{ST} (góc dưới) và khoảng cách di truyền Cavalli-Sforza and Edwards (góc trên) của các cặp quần thể cá Tra ở Việt Nam. Dấu * chỉ sự khác biệt ý nghĩa.

	PhH1	PhH2	PhH3	PhH4	PhW1	PhW2	PhW3
PhH1	-	0.0187	0.0135	0.0201	0.0157	0.0155	0.0170
PhH2	-0.0032	-	0.0152	0.0177	0.0132	0.0100	0.0176
PhH3	0.0226*	0.0168	-	0.0131	0.0084	0.0161	0.0118
PhH4	0.0068	0.0031	0.0190*	-	0.0168	0.0166	0.0123
PhW1	-0.0010	-0.0050	0.0189	-0.0040	-	0.0194	0.0173
PhW2	-0.0027	-0.0060	0.0038	0.0002	-0.0048	-	0.0175
PhW3	0.0044	-0.0006	0.0058	0.0000	-0.0016	-0.0054	-

Phân tích nhóm và biểu đồ UPGMA

Phân tích STRUCTURE đối với 391 cá thể cho thấy xác suất $\log \text{Ln } P(X/K)$ về khác biệt của các nhóm di truyền (K), giá trị di truyền cao nhất ở $K = 1$ ($\text{Ln } P(X/K) = -4323.4$), và thấp nhất ở $K = 5$ ($\text{Ln } P(X/K) = -4763.5$). Tính toán ΔK cho thấy ΔK thì cao nhất ở $K = 2$ và $K = 5$. Tuy nhiên, trong cả hai trường hợp trên mức quan hệ giữa các thành viên trong cùng nhóm thì rất thấp (0.136-0.675 với $K = 3$ và 0.067-0.439 với $K = 5$) và cũng không tạo thành từng nhóm rõ ràng.

Biểu đồ UPGMA (Hình 2) chỉ ra các nhóm riêng (PhH3-PhW1), (PhH1-PhH2-PhW2). Trong đó quần thể PhW3 là có khoảng cách di truyền xa nhất. Đáng chú ý là hai quần thể được thu khác thời điểm của sông Hậu (PhW2 và PhW3) thì lại có khoảng cách rất xa nhau. Qua bootstrapping cho thấy hầu hết mối quan hệ giữa quần thể khoảng từ (56%-72%).



Hình 2. Biểu đồ UPGMA theo khoảng cách di truyền Cavalli-Sforza và Edwards của 7 quần thể cá Tra (*Pagasianodon hypophthalmus*) ở Việt Nam.

THẢO LUẬN

Đa dạng di truyền bên trong các quần thể và sự ngụ ý liên quan đến số N_e

Mức biến động di truyền của cá Tra Việt Nam đặc trưng bởi đa dạng alen thấp so với trung bình của cá nước ngọt $A = 9.1 \pm 6.1$, cá biển $A = 19.9 \pm 6.6$ (DeWoody và Avise, 2000) và cũng thấp hơn so với cá Tra ở Cambodia ($A_r = 7.9-10.4$; So và ctv., 2006a). Tuy nhiên, mức H_o và H_e của cá Tra Việt Nam thì vừa phải, hơi cao hơn so với trung bình cá nước ngọt ($H = 0.54 \pm 0.25$; DeWoody và Avise, 2000), nhưng hơi thấp hơn cá biển ($H = 0.77 \pm 0.19$, DeWoody và Avise, 2000) và cá Tra Cambodia ($H_e = 0.757$; So và ctv., 2006a).

Nhìn chung, số alen thấp là biểu hiện của cổ chai quần thể (Nei và ctv., 1975; Allendorf và Phelps 1980; Norris và ctv., 1999) cái này, trong trường hợp quần thể hoang dã, có thể là do quần thể bị phân lập hoặc cỡ quần thể hiệu quả bị suy giảm đột ngột. Nếu là cá trại có thể là do số cá bố mẹ ban đầu ít nên dễ làm mất alen (Irvin và ctv., 1998; Skaala, 2004; Innes và Elliott, 2006). Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu thì không thấy có hiện tượng cổ chai trong cả quần thể trại cá và hoang dã. Mặt khác, bởi tập tính cá Tra là di cư ((Roberts và Vidthayanon, 1991), vùng sinh sống rộng (Touch, 2000), lượng cá thể là rất lớn ($20-30 \times 10^6$; So và Nao, 1999) nên biến động di truyền là rất cao. Thường mức dị hợp tử cao luôn liên quan đến cỡ quần thể hiệu quả, đặc biệt là đối với quần thể cá tự nhiên thì luôn có cỡ quần thể lớn. Ngoài ra, các nghiên cứu của So và ctv. (2006a) khi dùng loại marker microsatellite khác cũng cho thấy số alen hữu dụng của quần thể sông Hậu cũng khá cao (PhW2 and PhW3, $A_r = 10.3$). Vì lẽ đó, số alen thấp có thể bởi nguyên nhân khác, chẳng hạn do bởi áp dụng primer là khác nhau. Bởi vì, kết quả của chúng tôi gần tương tự như kết quả của Na-Nakorn ($A_r = 4.8-5.9$) khi sử dụng cùng loại primer lên các quần thể cá Tra ở sông Chao Phraya và sông Mekong, Thái Lan, nhưng mức dị hợp tử cũng chỉ hơi cao hơn kết quả của chúng tôi một ít ($H_o = 0.61-0.79$). Hoặc cũng có thể do mẫu cá hoang dã là cá bột, do vậy chỉ gồm một vài gia đình có quan hệ gần gũi nhau (Na-Nakorn và ctv., 2004) nên số alen trung bình bị thấp. Ngoài ra, bởi mức đồng hợp tử cũng không bị vượt quá nên giúp khẳng định rằng các mẫu thu được vẫn đại diện tốt cho các quần thể hoang dã.

Giá trị H_e tương đối cao trong các quần thể nghiên cứu ngụ ý rằng các quần thể xuất phát từ một lượng lớn cá thể tham gia sinh sản (cỡ quần thể hiệu quả, N_e). Ha và ctv. (2008) cho biết các trại cá đã giữ một lượng lớn cá Tra bố mẹ (từ 100 đến hơn 1000 cá bố mẹ trong mỗi trại). Dù chưa ai định ra cỡ quần thể cần phải lớn bao nhiêu để đảm bảo duy trì tính đa dạng di truyền quần thể trại cá. Đối với cá Hồi, Tave (1993) đề nghị phải từ 45-50 cá thể,

nhưng Gjerd (1993); Jøstad và Naevdal (1996) thì đề nghị phải lớn 100 cá thể bố mẹ tham gia sinh sản. Tuy vậy, do mức H_e tương đối cao trong các quần đàn nghiên cứu đã chứng tỏ rằng các trại cá đã dùng một lượng cá bố mẹ đủ lớn để tham gia sinh sản. Mặt khác, thường thì một quần đàn hoang dã khi được thuần hóa thường bị suy giảm mức biến động di truyền, bởi các tác nhân như lạc dòng di truyền (genetic drift), chọn lọc và nội phối. Chẳng hạn, cá Bơn khi được thuần hóa thì suy giảm về mức đa dạng alen và dị hợp tử (Sekino và ctv., 2002). Cá Nheo Mỹ (*Ictalurus punctatus*) bị suy giảm mức đa hình AFLP và dị hợp tử (Simmons và ctv., 2006). Cá Hồi nâu (*Salmo trutta*) có tương quan nghịch giữa thời gian thuần hóa và mức biến động di truyền (Aho và ctv., 2006). Riêng quần đàn cá Tra ở các trại cá Việt Nam sở dĩ mức biến động di truyền vẫn khá cao là do các trại đã sử dụng một lượng lớn cá bố mẹ và lịch sử thuần hóa của loài chỉ mới xảy ra trong thời gian ngắn.

Chưa khác biệt di truyền giữa quần đàn hoang dã và quần đàn đang thuần hóa

Sự khác biệt di truyền giữa cá hoang dã và cá thuần hóa thường gặp trong nhiều loài cá nước ngọt và cá biển (chẳng hạn cá rô phi *Oreochromis niloticus* (Hassanien và Gilbey, 2005); cá Chép *Cyprinus carpio* (Thai và ctv., 2007); cá Hồi *Salmo salar* (Norris và ctv., 1999; Skaala và ctv., 2004); cá Hồi brown, *Salmo trutta* (Hansen và ctv., 2000; Heggenes và ctv., 2002); cá Hồi rainbow, *Oncorhynchus mykiss* (Silverstein và ctv., 2004); cá Bơn *Verasper moseri* (Ortega-Villaizán Romo và ctv., 2005); cá Chêm *Lates calcarifer* (Ze và ctv., 2006). Lý do là bởi ảnh hưởng của lượng cá bố mẹ ban đầu ít, làm suy giảm của cỡ quần thể hiệu quả, hoặc do nội phối. Dầu vậy, nhưng dựa trên AMOVA cá Tra Việt nam chưa chỉ ra sự khác biệt giữa các quần đàn trại cá và quần đàn hoang dã. Điều này thì phù hợp với lịch sử thuần hóa ngắn (khoảng 1-2 thế hệ, Ha và ctv., 2008) của các quần đàn cá Tra ở Việt Nam. Hơn nữa, như đã đề cập phần trên, là do bởi các trại cá đã dùng một lượng N_e đủ lớn vì thế mà sự lạc dòng di truyền (sự thay đổi ngẫu nhiên của tần số alen) đã không xảy ra. Mặt khác, Ha và ctv. (2008) đã quan sát thấy một số trại cá còn một sự thu (nhập) thêm cá hoang dã từ các nông hộ nuôi cá Tra tự nhiên làm cá bố mẹ. Đó chính là những lý do tạo ra sự không khác biệt giữa các quần đàn hoang dã và quần đàn trại cá (Schonhuth và ctv., 2003).

Một vấn đề quan trọng liên quan đến quần đàn cá nuôi (có mức biến động di truyền thấp do lai "gần") là chúng thoát khỏi ao nuôi trở lại vùng hoang dã lại tiếp tục giao phối với cá hoang dã, nó sẽ làm mất đi tính đặc trưng di truyền riêng cho từng quần đàn hoang dã. Về vấn đề này, từ kết quả nghiên cứu cũng ngụ ý rằng các quần đàn cá nuôi vẫn chưa có sự đe dọa lớn đến sự đa dạng di truyền bởi quần đàn cá Tra Việt Nam vẫn chưa có sự khác biệt lớn với quần đàn hoang dã về phân bố tần số alen và mức biến động di truyền.

Không khác biệt giữa các quần đàn hoang dã

Sự không khác biệt giữa các quần đàn cá Tra hoang dã ở Việt nam thì phù hợp với tập tính di cư kiếm ăn của loài và cũng cùng kết quả với So và ctv. (2006a) khi đánh giá quần đàn cùng khu vực nghiên cứu. Tuy nhiên, So và ctv. (2006a) cũng báo cáo rằng có sự khác biệt ý nghĩa đối với cá Tra bố mẹ có thời gian sinh sản khác nhau. Sự khác biệt như thế thì không liên quan đến nghiên cứu của chúng tôi bởi các mẫu cá hoang dã của chúng tôi chỉ là cá Tra bột.

Tương đồng và bất tương đồng di truyền dựa trên cây phả hệ

Dù chưa có khác biệt quần thể, nhưng cây phả hệ cũng chỉ ra có một số nhóm tương đồng về di truyền (PhH3 với PhW1; PhH1 và PhH2 với PhW2) điều này có thể phản ánh nguồn gốc chung của quần đàn. Ngược lại, sự bất tương đồng cũng được chỉ ra, từ cây phả hệ,

giữa các quần thể hoang dã được thu từ sông Hậu năm 2005 và 2006 và sông Tiền. Do vậy, kết quả này cũng như là mức biến động di truyền khá cao bên trong các quần thể trại cá và hoang dã, được chỉ ra bởi AMOVA, cho thấy rằng sự đa dạng di truyền giữa các quần thể (đặc biệt là các quần thể trại cá) cần nên được xem xét trong việc hoạch định các chính sách quản lý quần đàn thích hợp.

Các ngụ ý đối với nuôi thủy sản cá Tra

Mặc dù các kết quả, đặc biệt là số N_e khá lớn và chưa có hiện tượng cổ chai quần thể ngụ ý rằng các quần đàn trại cá là đủ lớn, là nhân tố đảm bảo duy trì mức đa dạng di truyền đối với loài thuần hóa (Waples, 2002). Nhưng sự tác động của số alen hữu dụng thấp, liên quan đến tính thích nghi của loài (Allendorf và Phelps, 1980; Shikano và Taniguchi, 2002), thì cần nên được quan tâm hơn. Hơn nữa, mức biến động di truyền (đặc biệt là A) có khả năng bị giảm trong tiến trình thuần hóa (ví dụ, nhiều nghiên cứu cho thấy đã mất 0.1 alen/thế hệ đối với cá Hồi brown *Salmo trutta*, Aho và ctv., 2006; hoặc giảm từ 7.7 xuống còn 4.7 alen/locut đối với cá Bơn *Scophthalmus maximus*, Coughlan và ctv., 1998; Dị hợp tử không thay đổi nhưng lại giảm 46% số alen đối với cá chép hoang dã *Cyprinus carpio*, Kohlmann và ctv., 2005). Vì thế, việc quản lý quần đàn cá Tra sao cho làm tăng lên số alen là cần thiết. Chẳng hạn, nên bổ sung thêm cá Tra bố mẹ có gốc từ hoang dã. Điều quan trọng là cần bổ sung sớm vào quần đàn suốt trong giai đầu thuần hóa hiện nay để không gây bất lợi cho tiến trình thuần hóa sau này (Schonhuth và ctv., 2003).

Dù rằng biến động di truyền ở các locut trung tính (như microsatellite) không đảm bảo sự biến động ở các locut kiểm soát tính trạng kinh tế (Halliburton, 2004), nhưng đa dạng di truyền giữa các quần thể trại cá đòi hỏi phải có các dòng đa dạng di truyền để thích ứng với môi trường nuôi. Và dù F_{ST} chưa chỉ ra sự khác biệt, nhưng sự biến động đủ lớn bên trong các nhóm trại cá và hoang dã (được chỉ ra bởi AMOVA) có thể phản ánh một vài bất tương đồng (được chỉ ra từ cây phả hệ). Do đó, sẽ là tốt hơn nếu duy trì được tính đồng nhất trong từng trại cá, tránh trao đổi nguồn bố mẹ giữa các quần đàn này. Đồng thời, cần nghiên cứu so sánh biểu hiện các tính trạng kinh tế giữa các quần đàn để mà việc quản lý quần đàn đạt hiệu quả, hơn là chỉ dựa duy nhất vào nguồn thông tin từ các locut trung tính.

Công tác giám sát cá Tra về di truyền nên được thực hiện thường xuyên để có thể quản lý quần đàn một cách hiệu quả, tránh mất sự đa dạng di truyền. Hơn nữa, chọn lọc nhân tạo, một công cụ hiệu quả để cải thiện các tính trạng kinh tế của các dòng thuần hóa (ví dụ, đã cải thiện 12-17% về tăng trưởng đối với Rô phi dòng GIFT chỉ sau 5 thế hệ, Dey và Gupta, 2000; 20-30% trọng lượng cá Nheo trong 3 thế hệ, Rezk và ctv., 2003; 3.6-18.4 % sức đề kháng virus gây hội chứng Taura trên tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei*, Argue và ctv., 2002) cần được áp dụng sớm trong cá Tra Việt Nam (Dan và Griffiths, 2007). Dù vậy, các chương trình chọn lọc thường có xu hướng gây bất lợi cho biến động di truyền liên quan tới các dòng phối giống ngẫu nhiên (như đối với cá Nheo; Dan and Griffiths, 2007), do vậy công việc này cũng cần thường xuyên giám sát về phương diện di truyền.

Ngoài ra, cũng còn có thể có các quần đàn trại cá khác có sự đa dạng di truyền khác hơn nữa nhưng chưa được đánh giá trong nghiên cứu này. Theo So và ctv. (2006a) có 2 quần thể cá Tra khác nhau trên sông Mekong có thời gian sinh sản khác nhau và một vài trại cá cũng đã bổ sung cá bố mẹ từ những quần đàn này. Do vậy việc giám sát thêm về di truyền các quần đàn khác nữa là cần thiết để khai thác hết khả năng đa dạng di truyền của các quần đàn cá Tra Việt Nam.

KẾT LUẬN

Dựa trên microsatellite cho thấy mức biến động di truyền bên trong quần thể của cá Tra ở các trại cá và cá Tra hoang dã thì vừa phải, ngụ ý rằng cỡ quần thể là đủ lớn. Tuy nhiên sự đa dạng alen thì nhỏ nhưng lại không cho thấy có hiện tượng cổ chai quần thể. Chưa có sự thay đổi di truyền trong các quần đàn cá trại so với hoang dã. Do đó, tiến trình thuần hóa được cho là chỉ giai đoạn ban đầu. Các đàn cá Tra bố mẹ ở Việt Nam thì đủ lớn để giúp tiến hành thuần hóa loài thành công. Tuy nhiên công việc giám sát, quản lý quần đàn cần phải có kế hoạch thích hợp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Agnèsè, J.F., Z.J. Otéméé, S. Gilles. 1995. Effects of domestication on genetic variability, survival and growth rate in a tropical Siluriform: *Heterobranchus longifilis* Valenciennes 1840. *Aquaculture* 131: 197–204.
- Aho, T., J. Rönn, J. Piironen, M. Björklund. 2006. Impacts of effective population size on genetic diversity in hatchery reared Brown trout (*Salmo trutta* L.) populations. *Aquaculture* 253: 244–248.
- Allendorf, F.M., and S.R. Phelps. 1980. Loss of genetic variation in a hatchery stock of cutthroat trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* 109: 537–543.
- Argue, B.J., Arce, S.M., Lotz, J.M., Moss, S.M., 2002. Selective breeding of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for growth and resistance to Taura Syndrome Virus. *Aquaculture* 204, 447–460.
- Brummett, R.E., D.E. Angoni and V. Pouomogne. 2004. On-farm and on-station comparison of wild and domesticated Cameroonian populations of *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 242: 157–164.
- Cavalli-Sforza, L.L. and A.W. Edwards. 1967. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *Am J. Hum. Genet.* 19: 233–57.
- Cornuet, J.M. and G. Luikart. 1999. BOTTLENECK, a program for detecting recent effective population size reductions from allele data frequencies. INRA, URLB, Laboratoire de Modélisation et Biologie Evolutive. France. Available at: <http://www.ensam.inra.fr/URLB>.
- Coughlan, J.P., A.K. Imsland, P.T. Galvin, R.D. Fitzgerald, G. Naevdal and T.F. Cross. 1998. Microsatellite DNA variation in wild populations and farmed strains of turbot from Ireland and Norway: a preliminary study. *J. Fish Biol.* 52: 916–922.
- Dan, C.N., Griffiths, D., 2007. Establishment of national broodstock centres in Vietnam. In: Bondad-Reantaso, M.G. (ed.). Assessment of freshwater fish seed resources for sustainable aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper No. 501. FAO, Rome, 625–628.
- De Woody, J.A., and J.C. Avise. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *J. Fish Biol.* 56: 461–473.
- Dey, M.M., Gupta, M.V., 2000. Socioeconomics of disseminating genetically improved Nile tilapia in Asia: an introduction. *Aquac. Econ. Manag.* 4 (1/2), 5–11.
- Doyle, R.W. 1983. An approach to the quantitative analysis of domestication selection in aquaculture. *Aquaculture* 33: 167–185.
- Evano, G., S. Regnaut and J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611–2620.

- Excoffier, L., G. Laval and S. Schneider. 2000. ARLEQUIN version 3.11, an Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG). Institute of Zoology, University of Berne, Switzerland. Available in <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>.
- Falconer, D.S. and T.F.C. Mackay. 1996. Introduction to Quantitative Genetics. 4th Edition. Pearson Education Ltd., Essex, England.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package), Version 3.6. Department of Genome Sciences and Department of Biology, University of Washington, Seattle, USA.
- Garza, F.C. and E.G. Williamson. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology* 10, 305–318.
- Gjerde, B. 1993. Breeding and selection. In: K. Heen, R.L. Monahan and F. Utter, Editors, *Salmon aquaculture*, Fishing News Books, Cambridge USA, pp. 187–208.
- Goudet, J. 2002. A program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Institute of Ecology, University of Lausanne. Switzerland.
- Ha, P.H., An, N.T.T., Trieu, N.V., Yen, D.T., Na-Nakorn, U. Nguyen. T.T.T., 2008. Some technical and management aspects of catfish hatcheries in Hong Ngu district, Dong Thap province, Vietnam. *Aquac. Asia Mag.*, October-December, pp. 23-25.
- Halliburton, R. 2004. Introduction to Population Genetics. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. 650 pp.
- Hansen, M.M., D.E. Ruzzante, E.E. Nielsen and K.D. Mensberg. 2000. Microsatellite and mitochondrial DNA polymorphism reveals life-history dependent interbreeding between hatchery and wild brown trout (*Salmo trutta* L.). *Molecular Ecology* 9, 583–594.
- Hassanien, H.A. and J. Gilbey. 2005. Genetic diversity and differentiation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) revealed by DNA microsatellites. *Aquaculture Research* 36: 1450–1457.
- Heggenes, J., K.H. Røed, B. Høyheim and L. Rosef. 2002. Microsatellite diversity assessment of brown trout (*Salmo trutta*) population structure indicate limited genetic impact of stocking in a Norwegian alpine lake. *Ecology of Freshwater Fish* 11: 93–100.
- Innes, B.H. and N.G. Elliott. 2006. Genetic diversity in a Tasmanian hatchery population of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) compared with its Canadian progenitor population. *Aquaculture Research* 37: 563–569.
- Irvin, S.D., K.A. Wetterstrand, C.M. Hutter and C.F. Aquadro. 1998. Genetic Variation and Differentiation at Microsatellite Loci in *Drosophila simulans*: Evidence for Founder Effects in New World Populations. *Genetics Society of America*. 777–790.
- Jøstad, K.E., and G. Nævdal. 1996. Breeding and genetics. In: W. Pennel and B.A. Barton, Editors, *Principles of salmonid culture*, Elsevier, Amsterdam, pp. 655–725.
- Kohlmann, L., P. Kersten and M. Flajshans. 2005. Microsatellite-based genetic variability and differentiation of domesticated, wild and feral common carp (*Cyprinus carpio* L.) populations. *Aquaculture* 247: 253–266.
- Luan, S., J. Kong and Q.Y. Wang. 2006. Genetic variation of wild and cultured populations of the Kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* (Bate 1888) using microsatellites. *Aquaculture Research* 37: 785–792.

- Na-Nakorn, U., W. Kamonrat, and T. Ngamsiri. 2004. Genetic diversity of walking catfish, *Clarias macrocephalus*, in Thailand and evidence of genetic introgression from introduced farmed *C. gariepinus*. *Aquaculture* 240: 145–163.
- _____, K. Sriphairoj, S. Sukmanomon, S. Poompuang and W. Kamonrat. 2006. Polymorphic microsatellite from DNA of the endangered Mekong giant catfish, *Pangasianodon gigas* (Chevey) and cross-species amplification in three species of *Pangasius*. *Molecular Ecology Notes* 6, 1174–1176.
- Nei, M., T. Maruyama and R. Chakraborty. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, 29: 1–10.
- Norris, A.T., D.G. Bradley and E.P. Cunningham. 1999. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations. *Aquaculture* 180: 247–264.
- Ortega-Villaizán Romo, M., S. Suzuki, M. Ikeda, M. Nakajima and N. Taniguchi. 2005. Monitoring of the genetic variability of the hatchery and recaptured fish in the stock enhancement program of the rare species barfin flounder (*Verasper moseri*). *Fisheries Sciences* 71: 1120–1130.
- Osure, G.O. and R.P. Phelps. 2006. Evaluation of reproductive performance and early growth of four strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L) with different histories of domestication. *Aquaculture* 253: 485–494.
- Page, R.D.M. 1996. TREEVIEW. An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comp. Appl. Biosci.* 12: 357–358.
- Pritchard, J.K., M. Stephens and P.J. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–59.
- Rainboth, W.J. 1996. Fishes of the Cambodian Mekong. FAO identification sheets for fishery purposes. Food and Agriculture Organization. Rome.
- Raymond, M. and F. Rousset. 1995. GENEPOP Version 4.0: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248–249.
- Rezk, M.A. Smitherman, R.O., Williams, J.C., Nichols, A., Kucuktas, H., Dunham, R.A., 2003. Response to three generations of selection for increased body weight in channel catfish *Ictalurus punctatus*, grown in earthen ponds. *Aquaculture* 228, 69–79.
- Rice W. R. 1989. Analyzing tables of statistics test. *Evolution* 43: 223–225.
- Rober, T.R. and C. Vidthayanon. 1991. Systematic revision of the Asian catfish, *Pangasiidae*, with biological observations and descriptions of 3 new species. *Proceeding of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 143: 97–144.
- Schonhuth, S., G. Luikart and I. Doadrio. 2003. Effects of a founding event and supplementary introductions on genetic variation in a captive breeding population of the endangered Spanish killifish, *J. Fish Biol.* 63: 1538–1551.
- Sekino, M., M. Harab, N. Taniguchi. 2002. Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 213: 101–122.
- Shikano, T., and N. Taniguchi. 2002. Relationships between genetic variation measured by microsatellite DNA markers and a fitness-related trait in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Aquaculture* 209: 77–90.

- Silverstein, J.T., C.E. Rexroad III. and T.L. King. 2004. Genetic variation measured by microsatellites among three strains of domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture Research* 35: 40-48.
- Simmons, M., Mickett, K., Kucuktas, H., Li, P., Dunham, R., Liu, Z., 2006. Comparison of domestic and wild channel catfish (*Ictalurus punctatus*) populations provides no evidence for genetic impact. *Aquaculture* 240, 131-143.
- Skaala, Ø., B. Høyheim, K. Glover and G. Dahle. 2004. Microsatellite analysis in domesticated and wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): allelic diversity and identification of individuals. *Aquaculture* 240: 131–143.
- So, N., and T. Nao. 1999. National Aquaculture Development Review (1984–1999) and Aquaculture Development Plan (2000–2020). Department of Fisheries, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries: Phnom Penh, Cambodia, 74pp.
- _____, J.K.J. Van Houdt and F.A.M. Volckaert. 2006a. Genetic diversity and population history of the migratory catfishes *Pangasianodon hypophthalmus* and *Pangasius bocourti* in the Cambodian Mekong river. *Fisheries Science* 469-476.
- _____, G.E. Maes and F.A.M. Volckaert. 2006b. High genetic diversity in cryptic stocks of the migratory Striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus* in the Mekong river. *Heredity* 96, 166-174.
- Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. 1995. *Biometry*, 3rd ed. W.H. Freeman and Company, U.S.A. (887pp.)
- Taggart, J.B., R.A. Hynes, P.A. Prodohl and A. Ferguson. 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from *salmonid* fishes. *Journal of Fish Biology* 40, 963-965.
- Tave, D. 1993. *Genetics for fish hatchery managers*, 2nd ed. Van Nostrand-Reinhold, New York. 415pp.
- Thai, T.B., C.P. Burridge and C.M. Austin. 2007. Genetic diversity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in Vietnam using four microsatellite loci. *Aquaculture* 269: 174–186.
- Thang, N.V. 2006. Development of fishery seed produced technology. *Journal of science activities*. Department of Dong Nai Science and Technology, Vietnam. 02-2006.
- Touch, S.T. 2000. Life cycle of *Pangasianodon hypophthalmus* and the impact of catch and culture. Paper presented at the Catfish Asia Conference, Bogor. Indonesia.
- Trong, T.Q., N.V. Hao and D. Griffiths. 2002. Status of *Pangasiid* aquaculture in Viet Nam. MRC Technical Paper No. 2. Mekong River Commission. Phnom Penh. ISSN: 1683-1489.
- Van Oosterhout, C., W.F. Hutchinson, D.P.M. Wills and P. Shipley. 2004. MICROCHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535–538.
- Van Zalinge, N., L. Sopha, N.P. Bun, H. Kong and J.V. Jorgensen. 2002. Status of the Mekong *Pangasianodon hypophthalmus* resources, with special references to the stock shared between Cambodia and Viet Nam. Mekong River Commission. Phnom Penh.
- Waples, R.S. 2002. Definition and estimation of effective population size in the conservation of endangered species. In: Beissinger SR, McCullough DR (eds) *Population Viability Analysis*. University of Chicago Press: Chicago. 147–168.
- Weir, B.C. and C.C. Cockerham. 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38, 1358-1370.

Yeh, F.C., T. Boyle and R.C. Yang. 2000. POPGENE version 1.32: Microsoft Windows-Based Freeware for Population Genetic Analysis. Distributed by the authors. Department of Renewable Resources, University of Alberta, Edmonton, Canada.

Ze, Y.Z., G. Lin, L.C. Lo, Y.X. Xu, F. Feng, R. Chou and G.H. Yue. 2006. Genetic analysis seabass stocks using novel polymorphic microsatellites. *Aquaculture* 256: 167-173.