

Sử dụng chỉ thị microsatellite trong phân biệt cá trê lai (*Clarias macrocephalus* x *C. larias gariepinus*) với hai loài bố mẹ

• Dương Thúy Yên

Trường Đại Học Cần Thơ

(Bài nhận ngày 08 háng 12 năm 2016, nhận đăng ngày 26 tháng 07 năm 2017)

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm tìm ra những microsatellite giúp phân biệt cá trê lai (trê vàng *Clarias macrocephalus* x trê phi *C. gariepinus*) với hai loài bố mẹ. Các cặp mỗi microsatellite được sàng lọc, chuẩn hóa từ các kết quả nghiên cứu trước. Sáu cặp mỗi microsatellite được chọn để phân tích trên mẫu cá trê vàng ($n = 37$), trê phi ($n = 29$) và trê lai ($n = 30$). Kết quả cho thấy có 4 trong 6 locus được khuếch đại có số lượng alen và kích thước alen khác nhau giữa hai loài

cá trê vàng và trê phi, 2 locus còn lại có 1 một alen chung, trùng lặp ở phần đầu của khoảng dao động kích thước alen và với tần số rất khác nhau. Cá trê lai mang kiểu gene trung gian giữa hai loài bố mẹ. Sự khác biệt di truyền giữa cá trê vàng và trê phi lớn, thể hiện qua hai thông số $F_{st} = 0,59$ và $R_{st} = 0,95$. Như vậy, 6 microsatellite này đã được ứng dụng thành công để phân biệt cá trê lai với hai loài bố mẹ với độ chính xác cao.

Từ khóa: lai khác loài, xác định con lai, *Clarias*, microsatellite

MỞ ĐẦU

Lai khác loài ở các loài cá xảy ra phổ biến hơn so với các loài động vật khác, trong điều kiện tự nhiên hoặc do con người để phục vụ cho mục đích nuôi thủy sản [1]. Bên cạnh giá trị kinh tế mà con lai mang lại, chúng cũng gây mối nguy về tác động di truyền lên loài bố, mẹ bản địa khi con lai thất thoát ra ngoài tự nhiên và lai ngược lại với loài bố hoặc mẹ, dẫn đến hiện tượng xâm nhập gene [2]. Để nghiên cứu vấn đề này, việc quan trọng và cũng là khó khăn đó là phân biệt chính xác con lai với hai loài bố, mẹ thuần [3].

Phương pháp truyền thống để nhận biết con lai là dựa vào hình thái [4]. Tuy nhiên, phương pháp này gặp nhiều trở ngại do đặc điểm của con lai thể hiện rất khác nhau giữa các tính trạng và tùy theo môi trường [5]. Trong nhiều trường hợp, rất khó phân biệt con lai với hai loài bố mẹ. Hiện nay, chỉ thị sinh học phân tử được xem là một công cụ hữu hiệu để giải quyết khó khăn trên. Một số loại chỉ thị dùng trong xác định con lai đang được dùng phổ biến hiện nay

như PCR-RFLP (Polymerase Reaction Chain-Restriction Fragment Length Polymorphism), microsatellite,... Ví dụ, PCR-RFLP được sử dụng trong nhận diện con lai giữa hai loài cá trê ở Brazil *Leporinus macrocephalus* và *Leporinus elongatus* [6–8]. Khó khăn của phương pháp này là phải tìm ra gen cần khuếch đại có sự khác biệt giữa hai loài bố mẹ và từ đó tìm enzyme cắt giới hạn cho các đoạn cắt đặc trưng riêng của hai loài. Tuy nhiên, chưa có nhiều gene trong nhân trên các loài cá được phát triển các mẫu phổ biến [9]. Do đó, số lượng gen dùng trong mỗi nghiên cứu bị hạn chế, thường từ một đến hai gene [6, 10]. Chỉ thị microsatellite có thể khắc phục nhược điểm này. Đối với cá trê lai giữa hai loài cá trê vàng *Clarias macrocephalus* và trê phi *Clarias gariepinus*, về hình thái chúng có thể được nhận biết dựa vào màu sắc và hình dạng xương chẩm nhưng những đặc điểm này rất khó phân biệt với cá trê vàng khi cá ở giai đoạn nhỏ hoặc ở con lai F2. Ứng dụng chỉ thị phân tử để xác định con lai cá trê mới được

thực hiện bằng phương pháp PCR-RFLP trên 2 gene: gene cytochrome C oxidase subunit I (COI) DNA ti thể (mtDNA) và gene rhodopsin trong nhân [11]. Kết quả PCR-RFLP của gene COI mtDNA xác định được hướng lai tạo, cá trê lai hiện đang nuôi phổ biến ở đồng bằng sông Cửu Long là con lai giữa cá cái trê vàng và đực trê phi. Kết quả PCR-RFLP của gen rhodopsin phân biệt được con lai F1 với hai loài bố mẹ. Trong trường hợp cần xác định trên nhiều gen hơn, chỉ thị microsatellite là lựa chọn tối ưu. Một số nghiên cứu trước đây đã phát triển đoạn mồi microsatellite cho một số loài cá trê, giống *Clarias* như trê vàng [12–14], trê phi [15], trê trắng *C. batrachus* [12, 16]. Những microsatellite đã được sử dụng trong đánh giá đa dạng di truyền, song chưa có nghiên cứu nào được ứng dụng để xác định cá trê lai.

Nghiên cứu này tìm ra những chỉ thị microsatellite có khả năng ứng dụng trong phân biệt cá trê lai với hai loài bố mẹ trê phi và trê vàng. Từ đó giúp cho các nghiên cứu tiếp theo để đánh giá vấn đề lai tạo và xâm nhập gene của cá trê phi vào nguồn gene bản địa cá trê vàng ở Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Thu mẫu cá

Cá trê vàng tự nhiên ở giai đoạn trưởng thành (khối lượng từ 65–200 g) được thu từ các khu bảo tồn Láng Sen (Long An), U-Minh Thượng (Kiên Giang) và U-Minh Hạ (Cà Mau) với số lượng 37 cá thể. Cá trê phi (N=29, khối lượng 502–1,680 g) và cá trê lai (N=30, khối lượng 168–340 g) được thu tại một trại sản xuất giống cá trê lai ở Châu Thành A, Hậu Giang. Cá trê lai F1 được xác định từ thông tin của người sản

xuất và từng cá thể được nhận dạng ban đầu dựa vào đặc điểm hình thái như màu sắc và hình dạng xương chẩm. Sau đó, mẫu vi cá (khoảng 1–2 cm²) được thu và giữ trong ethanol 95 % đến khi phân tích di truyền.

Ly trích DNA, chọn lựa chỉ thị và phân tích microsatellite

DNA tổng số được ly trích bằng bộ kit ly trích DNA từ mô động vật QIAGEN (QIAGEN, Inc.). Nồng độ DNA được xác định bằng máy đo Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Inc.). Sau đó, DNA được pha loãng 20 ng/μL để sử dụng cho các phản ứng khuếch đại (PCR).

Chọn lựa đoạn mồi microsatellite được thực hiện dựa vào các nghiên cứu trước trên các loài cá thuộc giống *Clarias* [12, 15, 17]. Ban đầu 10 cặp mồi dùng để khuếch đại theo điều kiện phản ứng như trong tài liệu tham khảo. Những cặp mồi không cho kết quả PCR hoặc vạch không rõ ràng (vết loang và nhòe) được chuẩn hóa bằng cách thay đổi nhiệt độ gắn mồi, nồng độ MgCl₂ và số chu kỳ PCR. Sáu cặp mồi cho kết quả PCR rõ ràng trên hai loài trê vàng và trê phi với kích thước allele khác nhau đã được chọn, trong đó sau khi chuẩn hóa 4/6 cặp mồi thay đổi nhiệt độ gắn mồi so với ban đầu (Bảng 1). Thành phần các chất trong phản ứng 25 μL PCR gồm 1 X dung dịch đệm, 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTPs; 0,5 μM cho mỗi mồi “xuôi” (forward primer, đã được đánh dấu huỳnh quang HEX hoặc FAM) và mồi “ngược” (reverse primer), 1,25 U Taq (Taq DNA Polymerase, InvitrogenTM, Life Technologies Inc.) và 100 ng DNA khuôn mẫu.

Bảng 1. Trình tự và nhiệt độ gắn mồi của 6 cặp mồi microsatellite được chọn

Tên mồi	Trình tự 5' – 3'	Ta*	Adj. Ta**	Kích thước dự kiến (bp)	Nguồn tham khảo
<i>Cga06</i>	F CAGCTCGTGTTTAATTTGGC	60	55	134 – 182	[15]
	R TTGTACGAGAACCGTGCCAGG				
<i>Cga09</i>	F CGTCCACTTCCCCTAGAGCG	65	57	166 – 192	[15]
	R CCAGCTGCATTACCATACATGG				

<i>Cba19</i>	F	CAGGGCTAAATTACCCATAATCA	55	59	222 – 290	[17]
	R	GGCATGTGTTATAACATGTGAGG				
<i>Cma02</i>	F	GAGCAATCAGCAGTGGAG	58	59	240 – 260 (Cm)	[12]
	R	AGGCAACAGTGAAACAGC			215 – 221 (Cg)	
<i>Cma05</i>	F	GAGATGACGTGTGTAGCAC	53	53	226 – 240 (Cm)	[11]
	R	GACCTGACTTTCAGGAAGC			211 (Cg)	
<i>NCmD11</i>	F	ACCACTGGAGCACGCATATC	50	50	240 – 264 (Cm)	[16]
	R	GTTTCGAATTATAGGGCGGAGAG			220 (Cg)	

(*)Ta = Nhiệt độ gắn mồi theo nguồn tham khảo, (**) Adj. Ta = Nhiệt độ gắn mồi sau khi được chuẩn hóa, Cm: Cá trê vàng, Cg: cá trê phi

Sáu microsatellite được phân tích theo hai cách: (i) bằng máy ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer – đo kích thước chính xác của các alen và (ii) điện di đứng trên gel polyacrylamide 6 % và đọc kết quả điện di qua máy Hitachi FMBIOII scanner.

Phân tích số liệu microsatellite

Số liệu microsatellite được kiểm tra “null” allele (hiện tượng đột biến ở vùng gắn mồi (flanking region sequence) dẫn đến không thu được sản phẩm PCR) bằng phần mềm microchecker và cho kết quả không phát hiện có trường hợp này. Tần số allele được ước lượng bằng chương trình GenAIEX 6.5 [18]. Sự khác biệt về tần số allele và tần số kiểu gene của 3 nhóm cá (cá trê vàng, trê phi và trê lai) được kiểm định bằng phương pháp Fisher’s và được thực hiện bằng chương trình GENEPOP 4.0 [19, 20]. **Chương trình GENPOP cũng được dùng để ước tính các thông số khác biệt di truyền Fst [21] và Rst [22, 23]** giữa hai loài cá trê vàng và trê phi. Phương pháp phân tích nhóm (Principal Coordinates Analysis, PCoA) dựa trên sự khác biệt di truyền của từng cặp cá thể được thực hiện bằng phần mềm GenAlex 6.5. Ngoài ra, chương trình STRUCTURE [24] được sử dụng để ước tính xác suất hậu nghiệm (posterior probability) xếp từng cá thể vào nhóm ban đầu (k= 2, gồm nhóm cá trê vàng và trê phi).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

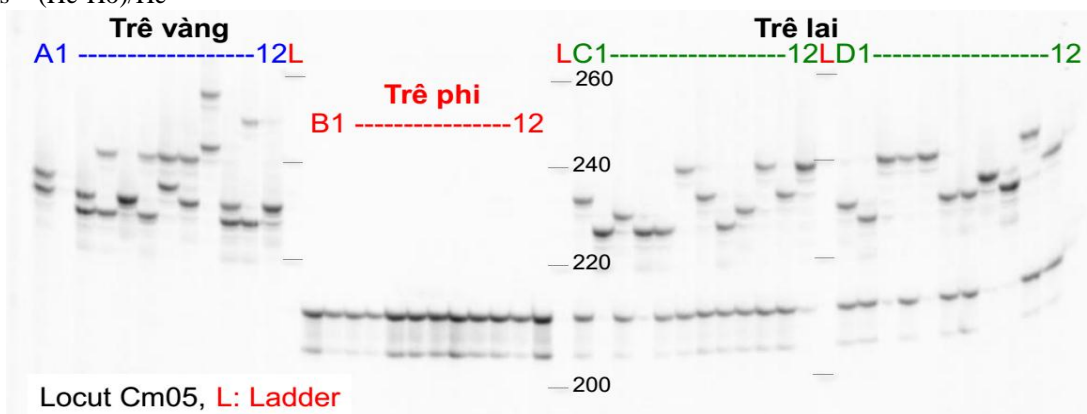
Kích thước và tần số allele

Trong 6 locus) microsatellite, 4 locus gồm *Cm02*, *Cm05*, *Cb19* và *NCmD11* thể hiện sự khác nhau về số lượng allele và kích thước allele giữa hai loài cá trê vàng và trê phi (Bảng 2). Trong đó, các cá thể cá trê phi đều đơn hình ở 4 locut này, trong khi đó, cá trê vàng thể hiện tính đa hình cao, với số lượng allele từ 9–21 trên mỗi locut. Hai locut còn lại Cg6 và Cg9 có sự trùng lặp về kích thước allele nhưng với tần số rất khác nhau (Phụ lục). Cụ thể, ở locut Cg6, cá trê phi có 2 allele 128 và 132 bp với tần số là 0,155 và 0,845; trong khi cá trê vàng có 17 allele dao động khoảng 132–168 bp, trong đó, allele 132 bp, giống với cá trê phi, có tần số 0,027. Ở locut Cg9, cá trê phi có 2 allele (182 và 190 bp) và trê vàng có 9 alen (từ 164–182 bp), chúng đều có allele 182 bp với tần số tương ứng là 0,534 và 0,014. Các locut ở cá trê lai thể hiện tính trung gian của hai loài bố mẹ, chúng mang các allele của cả hai loài trê vàng và trê phi. Ví dụ, kiểu gene của ba nhóm cá ở locut Cm05 được thể hiện ở Hình 1. Trong đó, cá trê vàng có các vạch (allele) trong khoảng 224–244 bp, cá trê phi có 1 vạch 211 bp, cá trê lai có vạch 211 bp của cá trê phi và các vạch khác trong khoảng dao động kích thước allele của cá trê vàng.

Bảng 2. Kích thước (bp), số allele (#) và các thông số đa dạng di truyền của cá trê vàng (*Cm*), trê phi (*Cg*), và trê lai dựa trên 6 chỉ thị microsatellite

Locut		Cm (n = 37)	Cg (n = 29)	Trê lai (n = 30)
<i>Cm02</i>	Kích thước	238-264	209	209-264
	# allele	14	1	11
<i>Cm05</i>	Kích thước	224 – 244	211	211 - 236
	# allele	9	1	6
D11	Kích thước	244 – 264	222	220 - 262
	# allele	13	1	12
<i>Cb19</i>	Kích thước	254 – 300	225	223 - 300
	# allele	21	1	18
<i>Cg6</i>	Kích thước	132 – 168	128-132	128 -168
	# allele	17	2	16
<i>Cg9</i>	Kích thước	164-182	182-190	172-190
	# allele	7	2	7
Các thông số về đa dạng di truyền				
Na		12,67 (2,14)	1,33 (0,21)	11,67 (1,94)
Ne		8,89 (2,06)	1,22 (0,16)	5,36 (0,79)
Ho		0,766 (0,061)	0,126 (0,082)	0,956 (0,029)
uHe		0,847 (0,054)	0,129 (0,087)	0,795 (0,026)
Fis		0,083 (0,043)	- 0,042 (0,082)	- 0,205 (0,044)

Na: Số lượng allele; Ne: Số allele hiệu quả; Ho: Tỷ lệ dị hợp quan sát; uHe: Tỷ lệ dị hợp mong đợi và Fis: Hệ số F, Fis = (He-Ho)/He



Hình 1. Kiểu gene của cá trê vàng (A1–A12), trê phi (B1–B12) và trê lai (C1–D12) ở locut Cm05
(Ghi chú: L - Thang DNA chuẩn 25 bp)

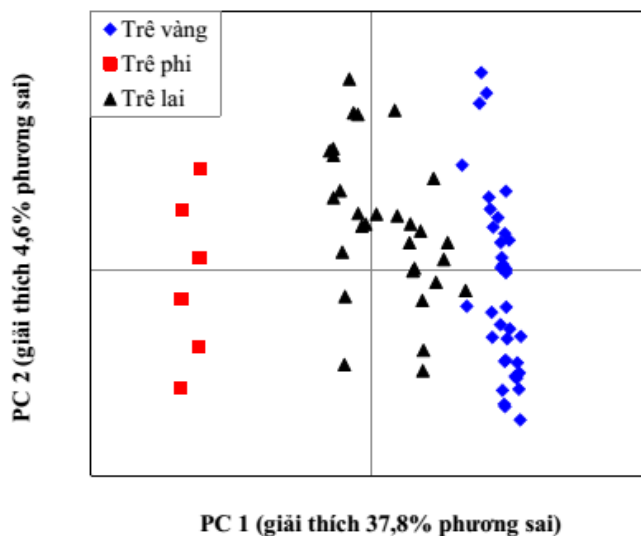
Đa dạng di truyền và sự khác biệt di truyền giữa cá trê vàng, trê phi và trê lai

Thông số về đa dạng di truyền gồm số allele và tỷ lệ dị hợp dựa trên 6 chỉ thị microsatellite trong nghiên

cứu cho thấy cá trê vàng và trê lai có mức độ đa dạng di truyền cao hơn cá trê phi (Bảng 2). Khác biệt di truyền giữa cá trê vàng và trê phi là rất có ý nghĩa với $F_{st} = 0,525$ và $R_{st} = 0,95$ ($P < 0,01$). Khi phân tích các

nguồn biến dị di truyền cho thấy, sự khác biệt giữa ba nhóm cá chiếm 46,6 %. Sự khác biệt này được thể hiện qua phân tích tọa độ PCA (Principal coordinate analysis), 3 nhóm cá khác nhau chủ yếu theo tọa độ 1 (PC 1) và tọa độ này giải thích 37,8 % khác biệt di

truyền, tọa độ 2 (PC 2) giải thích 4,6 % khác biệt di truyền (Hình 2), PC 3 (không thể hiện qua Hình 2) giải thích 4,2 %. Khác biệt di truyền giữa cá trê lai so với trê vàng ($F_{st} = 0,094$) nhỏ hơn so với cá trê phi ($F_{st} = 0,337$).



Hình 2. Phân tích tọa độ dựa trên 6 microsatellite của ba nhóm cá trê

Với sự khác biệt về kiểu gene dựa trên 6 chỉ thị microsatellite, bằng ứng dụng chương trình STRUCTURE, có thể xếp từng cá thể trê vàng và trê phi vào nhóm (loài) ban đầu với xác suất hậu nghiệm tương ứng là 98,9 % và 99,0 %. Trong khi cá trê lai được xếp vào 2 nhóm với xác suất lần lượt là 72,4 và 27,6 %. Do đó, độ chính xác trong phân biệt giữa 3 nhóm cá là 99 %.

Thảo luận

Nghiên cứu này đã thành công trong việc sàng lọc tìm ra sáu locut microsatellite cho phép phân biệt chính xác cá trê lai, trê vàng và trê phi. Các mẫu cá trê lai (N=30) trong nghiên cứu được xác định là con lai F1, thể hiện qua kiểu gene mang những allele của cả hai loài bố mẹ bởi chỉ thị microsatellite là chỉ thị đồng trội [25, 26]. Mỗi locut đều xác định được con lai. Kết quả thống kê phân tích cấu trúc đàn dựa trên càng cao [24, 27]. Bằng phân tích mô phỏng, Vähä and Primmer [27] cho biết với 6 microsatellite và khi $F_{st} = 0,21$, độ chính xác trong phân biệt con lai so với loài bố mẹ thuần là 90 %. Trong nghiên cứu hiện tại,

tần số allele thực hiện bằng chương trình STRUCTURE cho kết quả tương tự, con lai có xác suất xếp vào một trong hai loài bố mẹ là 27,6 và 72,4 % và ở trong khoảng giá trị từ 23–78 % của con lai F1 [3], trong khi đó, mỗi loài bố, mẹ có xác suất xếp đúng nhóm là 99 %.

Trong 6 microsatellite, 4 loại có số lượng allele và kích thước allele khác nhau giữa hai loài cá trê vàng và trê phi, 2 loại microsatellite còn lại có 1 một alen chung của hai loài nhưng với tần số rất khác nhau. Chỉ riêng sự khác nhau về tần số allele đã dẫn đến sự khác biệt di truyền giữa hai loài cá trê phi và trê vàng ($F_{st} = 0,59$) và khi có kết hợp với sự khác biệt về kích cỡ allele, sự khác biệt giữa hai loài bố mẹ càng lớn ($R_{st} = 0,95$). Giá trị F_{st} và R_{st} có ảnh hưởng quan trọng đến kết quả xác định con lai với qui luật chung giá trị này càng lớn, độ chính xác F_{st} giữa hai loài cá trê đạt cao (0,59) nên độ chính xác trong xác định con lai sẽ cao hơn. Theo lý thuyết tính toán bởi Epifanio and Philipp (1997)[28], với 6 microsatellite, có thể phân biệt con lai ngược (con của

F1 với cá trê vàng thuần) với cá trê vàng với xác suất sai số là 1,5 % (hay $0,5^L$ với L là số locut sử dụng, công thức 2), hoặc giữa F2 với cá trê vàng thuần với xác suất sai số $2,4 \times 10^{-4}$ (or $0,5^{2L}$, công thức 1).

Trước đây chưa có nghiên cứu nào trên thế giới về phân biệt cá trê lai với hai loài bố (trê phi), mẹ (trê vàng) bằng chỉ thị sinh học phân tử. Ở Thái Lan, nghiên cứu chỉ dừng lại ở việc so sánh sự khác biệt giữa 4 loài cá trê thuộc giống *Clarias*, trong đó có cá trê vàng và trê phi, dựa trên chỉ thị isozyme [29]. Kết quả của nghiên cứu cho thấy có sự khác biệt về tần số allele giữa hai loài trên vàng và trê phi ở 7 trong 12 locut. Mặc dù kết quả này có thể ứng dụng trong phân biệt cá trê lai nhưng chưa có nghiên cứu nào thực hiện. Hơn nữa, chỉ thị isozyme có một số điểm bất lợi hơn so với chỉ thị DNA như cần lượng mẫu tươi nhiều và có chất lượng tốt, số lượng allele trên mỗi locut thấp, thường xảy ra hiện tượng “null allele” (do enzyme không hoạt động), khó phát hiện đa hình khi một số thay đổi nhỏ ở mức độ DNA không làm thay đổi trình tự polypeptide...[26]. Gần đây, phương pháp PCR-RFLP đã được ứng dụng ở Việt Nam để phân biệt cá trê lai với hai loài bố mẹ [11], tuy nhiên số lượng gen trong nghiên cứu còn ít (2 gen). Vì vậy, kết quả của nghiên cứu góp phần tăng số lượng chỉ thị DNA cho những nghiên cứu tiếp theo về đánh giá sự xâm nhập gen của cá trê phi đối với cá trê vàng.

Từ kết quả nghiên cứu này, một câu hỏi khác đặt ra là tại sao giữa 2 loài cá trê lai có mang allele chung ở 2 locut (Cg6 và Cg9). Có ba giả thiết giải thích hiện tượng này [30]. Thứ nhất, đó là kết quả của sự xâm nhập gen—một loài mang gen của loài khác do kết quả lai ngược của con lai với một trong hai loài bố mẹ [2]. Theo hướng này, một số nghiên cứu ở Thái Lan dựa trên chỉ thị allozyme cho thấy cá trê vàng bản địa ở Thái Lan có mang allele phổ biến của cá trê phi [31, 32]. Tuy nhiên, giả thiết này chỉ được củng cố khi hai giả thiết tiếp theo bị loại trừ [30]. Thứ hai, hiện tượng

“homoplasy” hay sự đột biến kích thước allele đã xảy ra ở một hoặc hai loài [30]. Allele ở locut Cg6 và Cg9 của cá trê vàng trùng lặp với cá trê phi ở đoạn đầu của khoảng biến động kích thước alen của cá trê vàng (thí dụ, ở locut Cg6, allele trùng là 132 bp, nằm ở đoạn đầu của khoảng dao động 128–134 bp). Allele trùng này có tần số thấp ở cá trê vàng nhưng cao ở cá trê phi nên có thể đột biến xảy ra ở cá trê vàng. Hiện tượng đột biến này xảy ra phổ biến ở các đoạn microsatellite trong cơ thể nhiều loài sinh vật [33, 34]. Thứ ba, hai loài mang cùng alen do có cùng nguồn gốc tổ tiên. Giả thiết này có thể loại trừ vì bằng chứng thể hiện qua trình tự gene mã vạch COI và gene rhodopsin cho thấy chúng rất khác nhau [11]. Vậy, nghiên cứu tiếp theo có thể kết hợp chỉ thị microsatellite với chỉ thị khác như PCR-RFLP [11] và phân tích trên nhiều mẫu cá trê vàng để có khả năng kiểm chứng giả thiết xâm nhập gen hay hiện tượng đột biến allele xảy ra ở cá trê vàng.

KẾT LUẬN

Sáu locut microsatellite được tìm ra cho kết quả kiểu gene khác biệt giữa cá trê vàng, trê phi và con lai. Chúng có khả năng ứng dụng để xác định con lai F1 trên một mẫu cá nghi vấn bất kỳ.

Các nghiên cứu tiếp theo có thể ứng dụng các chỉ thị này để đánh giá hiện tượng xâm nhập gene của cá trê phi đối với cá trê vàng ở Việt Nam.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số: 106-NN.05-2014.86. Tác giả xin chân thành cảm ơn GS. TS. Kim Scribner và Bộ môn Thủy sản và Động vật Hoang dã, trường Đại học Bang Michigan (Hoa Kỳ) đã hỗ trợ phương tiện phân tích mẫu. Xin cảm ơn Quỹ Giáo dục Việt Nam (Vietnam Education Foundation –VEF) đã tài trợ kinh phí để tác giả được đi thực tập tại Hoa Kỳ trong Chương trình Học giả 2014.

Use of microsatellite markers in differentiating catfish hybrids (*Clarias macrocephalus* x *C. larias gariepinus*) from their parental species

• Duong Thuy Yen

College of Aquaculture and Fisheries, Can Tho University

ABSTRACT

This study aimed to develop microsatellite markers that can be used to differentiate catfish hybrids (bighead catfish *Clarias macrocephalus* x African catfish *C. larias gariepinus*) from their parental species. Microsatellite primers developed from previous studies were screened and optimized. Six microsatellite markers were selected to amplify samples of bighead catfish ($n = 37$), African catfish ($n = 29$), and the hybrids ($n = 30$). Results show that 4 of 6 loci differ in allele numbers and sizes between the bighead

and African catfish. In the other two loci, these two species share one allele that overlaps at a portion of the size range with different allele frequencies. Hybrids' genotypes are intermediate between those of the parental species. The genetic divergence between bighead and African catfish is high with $F_{st} = 0.59$ and $R_{st} = 0.95$. Therefore, these 6 microsatellites were applied to successfully distinguish hybrids from their parental species with high accuracy.

Keywords: hybridization, hybrid identification, *Clarias*, microsatellite

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. K.T. Scribner, K. S. Page, M.L. Bartron, Hybridization in freshwater species: a review of case studies and cytonuclear methods of biological inference, *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10, 293–323 (2000).
- [2]. J.M. Rhymer, D. Simberloff, Extinction by hybridization and introgression, *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27, 1, 83–109 (1996).
- [3]. J.H. Bohling, J. R. Adams, L.P. Waits, Evaluating the ability of Bayesian clustering methods to detect hybridization and introgression using an empirical red wolf data set, *Molecular Ecology*, 22, 1, 74–86 (2013).
- [4]. D.E. Campton, Natural hybridization and introgression in fishes. Methods of detection and genetic interpretations, *Population Genetics and Fishery Management*, 161–192 (1987).
- [5]. R. Shine, Ecological causes for the evolution of sexual dimorphism: a review of the evidence, *The Quarterly Review of Biology*, 64, 4, 419–461 (2015).
- [6]. D.T. Hashimoto, J.A. Senhorini, F. Foresti, P. Martinez, F.P. Foresti, Genetic Identification of F1 and Post-F1 Serrasalmid Juvenile Hybrids in Brazilian Aquaculture, *PLoS One*, 9, 3 (2014).
- [7]. D.T. Hashimoto, F.F. Mendonça, J. A. Senhorini, J. Bortolozzi, C. de Oliveira, F. Foresti, F. P. Foresti, Identification of hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* by PCR-RFLP and multiplex-PCR: Tools for genetic monitoring in aquaculture, *Aquaculture*, 298, 3–4, 346–349 (2010).
- [8]. F.P. Foresti, D.T. Hashimoto, F. D. Prado, J. A. Senhorini, F. Foresti, Genetic markers for the

- identification of hybrids among catfish species of the family Pimelodidae, *Journal of Applied Ichthyology*, 29, 3, 643–647 (2013).
- [9]. W.J. Chen, M. Miya, K. Saitoh, R.L. Mayden, Phylogenetic utility of two existing and four novel nuclear gene loci in reconstructing Tree of Life of ray-finned fishes: the order Cypriniformes (Ostariophysi) as a case study, *Gene*, 423, 2, 125–34 (2008).
- [10].D.T. Hashimoto, F.F. Mendonça, J. A. Senhorini, C. de Oliveira, F. Foresti, F. Porto-Foresti, Molecular diagnostic methods for identifying Serrasalmid fish (Pacu, Pirapitinga, and Tambaqui) and their hybrids in the Brazilian aquaculture industry, *Aquaculture*, 321, 1–2, 49–53 (2011).
- [11].T.Y. Duong, Differentiation of two *Clarias* species (*Clarias macrocephalus* and *C. gariepinus*) and their hybrids based on PCR-RFLP analysis, *Journal of Sciences & Development*, 13, 6, 904–912(2015).
- [12].C. Sukkorntong, D. Panprommin, S. Poompuang, Sixteen EST-linked microsatellite markers in Gunther’s walking catfish, *Clarias macrocephalus*, *Molecular Ecology Resources*, 8, 6, 1300–1302 (2008).
- [13].A.K. Nazia, M. Suzana, H. Azhar, T.T. Nguyen Thuy, M.N. Siti Azizah, T.T.N. Thuy, M.N.S. Azizah, T.T. Nguyen Thuy, M.N. Siti Azizah, No genetic differentiation between geographically isolated populations of *Clarias macrocephalus* Gunther in Malaysia revealed by sequences of mtDNA Cytochrome b and D-loop gene regions, *Journal of Applied Ichthyology*, 26, 4, 568–570 (2010).
- [14].U.N. Nakorn, N. Taniguchi, E. Nugroho, S. Seki, W. Kamonrat, Isolation and characterization of microsatellite loci of *Clarias macrocephalus* and their application to genetic diversity study, *Fisheries Science*, 65, 4, 520–526 (1999).
- [15].P. Galbusera, F.A. Volckaert, B. Hellemans, F. Ollevier, Isolation and characterization of microsatellite markers in the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), *Molecular Ecology*, 5, 5, 703–705 (1996).
- [16].A.K. Nazia, M.N.S. Azizah, Isolation of microsatellites in the bighead catfish, *Clarias macrocephalus* and cross-amplification in selected *Clarias* species, *Molecular Biology Reports*, 41, 3, 1207–1213 (2014).
- [17].G.H. Yue, B. Kovacs, L. Orban, Microsatellites from *Clarias batrachus* and their polymorphism in seven additional catfish species, *Molecular Ecology Notes*, 3, 3, 465–468 (2003).
- [18].R. Peakall, P. E. Smouse, GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update, *Bioinformatics*, 28, 19, 2537–2539 (2012).
- [19].F. Rousset, GENEPOP’007: A complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux, *Molecular Ecology Resources*, 8, 1, 103–106 (2008).
- [20].M. Raymond, F. Rousset, GENEPOP (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism, *Journal of Heredity*, 86, 248–249(1995).
- [21].B.S. Weir, C.C. Cockerham, Estimating F-statistics for the analysis of population structure, *Evolution (N. Y.)*, 38, 6, 1358–1370 (1984).
- [22].F. Rousset, Equilibrium values of measures of population subdivision for stepwise mutation processes, *Genetics*, 142, 4, 1357–1362 (1996).
- [23].M. Slatkin, A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies, *Genetics*, 139, 1, 457–462 (1995).
- [24].J.K. Pritchard, M. Stephens, P. Donnelly, Inference of population structure using multilocus genotype data., *Genetics*, 155, 2, 945–959(2000).

- [25].J.C. Avise, *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*, Sinauer Associates; 2 edition, pp684 (2004).
- [26].Z.J. Liu, J.F. Cordes, DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics, *Aquaculture*, 238, 1–37 (2004).
- [27].J.P. Vähä, C.R. Primmer, Efficiency of model-based Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci, *Molecular Ecology*, 15, 1, 63–72 (2006).
- [28].J.M. Epifanio, D.P. Philipp, Sources for misclassifying genealogical origins in mixed hybrid populations, *Journal of Heredity*, 88, 1, 62–65 (1997).
- [29].U.N. Nakorn, P. Sodsuk, P. Wongrat, S. Janekitkarn, D.M. Bartley, Isozyme variation among four species of the catfish genus *Clarias*, *Journal of Fish Biology*, 60, 4, 1051–1057 (2002).
- [30].J.C. Avise, N.C. Saunders, Hybridization and introgression among species of sunfish (*Lepomis*): analysis by mitochondrial DNA and allozyme markers, *Genetics*, 108, 1, 237–255 (1984).
- [31].W. Senanan, A.R. Kapuscinski, U. Na-Nakorn, L. M. Miller, Genetic impacts of hybrid catfish farming (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*) on native catfish populations in central Thailand, *Aquaculture*, 235, 1–4, 167–184 (2004).
- [32].U.N. Nakorn, W. Kamonrat, T. Ngamsiri, Genetic diversity of walking catfish, *Clarias macrocephalus*, in Thailand and evidence of genetic introgression from introduced farmed *C. gariepinus*, *Aquaculture*, 240, 1–4, 145–163 (2004).
- [33].T. Ohta, M. Kimura, A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population, *Genetical Research*, 22, 2, 201–204 (1973).
- [34].A. Di Rienzo, A.C. Peterson, J.C. Garza, A.M. Valdes, M. Slatkin, N.B. Freimer, Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 8, 3166–3170 (1994).