



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การประยุกต์ใช้พันธุศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพ
เพื่อการพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน -2

โดย ศาสตราจารย์ ดร. อุทัยรัตน์ ฅ นคร

21 กันยายน 2554

กิตติกรรมประกาศ

การได้รับโอกาสจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย คัดเลือกให้เป็นเมธีวิจัยอาวุโส ติดต่อกัน 2 ครั้ง (เมธีวิจัยอาวุโส 2546 และ 2550) นั้น นับเป็นคุณูปการสูงสุดในชีวิตการทำงานของดิฉัน เนื่องจากได้โอกาสในการทำงานตามความสนใจ เปิดโอกาสให้สามารถสร้างทีมงาน และทำกิจกรรมทางวิชาการอื่นๆตามที่ต้องการ ทำให้เรียนรู้และพัฒนาตนเองได้อย่างดียิ่ง นอกจากนั้นแล้ว โครงการเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ยังก่อให้เกิดประโยชน์มหาศาลต่อวงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ในการสร้างองค์ความรู้ และสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ ทั้งที่เป็นนิสิตระดับบัณฑิตศึกษาและอาจารย์รุ่นใหม่ ดิฉันจึงใคร่ขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย เป็นอย่างสูง

ตลอดเวลาการทำงาน ดิฉันได้รับความช่วยเหลือ การอำนวยความสะดวกอย่างดียิ่ง จากฝ่ายวิชาการ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย โดยเฉพาะศาสตราจารย์ ดร.วิชัย บุญแสง ที่นอกจากจะให้ความช่วยเหลือตามหน้าที่แล้ว ยังให้การสนับสนุนด้านอื่นๆ เช่นการให้แนวคิด และให้กำลังใจ อีกด้วย ดิฉันจึงใคร่ขอขอบคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ ผู้ร่วมโครงการ และนักวิจัยเครือข่ายทุกท่าน ขอขอบคุณภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ตลอดจนผู้บริหารทุกระดับชั้น และผู้ร่วมงานที่ให้การสนับสนุนเป็นอย่างดี ที่จะลืมเสียไม่ได้คือขอขอบใจลูกศิษย์ทุกคน ที่เป็นส่วนสำคัญในการสร้างผลงานภายใต้โครงการ

สุดท้ายนี้ ดิฉันขอขอบคุณครอบครัวโดยเฉพาะอย่างยิ่ง พลเรือโทจิตต์ ณ นคร สามีผู้ล่วงลับ ลูกชুমศักดิ์ และชুমพร ณ นคร ที่ให้กำลังใจ เข้าใจ และสนับสนุนทุกวิถีทาง

(ศาสตราจารย์ ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร)

เมธีวิจัยอาวุโส สกว.

สารบัญ

บทคัดย่อ	3
ABSTRACT	10
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	17
EXECUTIVE SUMMARY	20
เนื้อหาทางวิจัย	24
1. โครงการย่อยที่ 1 กุ้งก้ามกราม	24
1.1 Commercial Mass Production of All-male Stock of Giant Freshwater Prawn	24
1.2 Estimation of Heritability of Economically Important Traits in Giant Freshwater Prawn	30
1.3 Effects of selection for growth performed on females of different maturing batches	32
1.4 Stock Evaluation and Assessing Reproductive Success of Male Broodstock of Freshwater Prawn, <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	33
1.5 Application of Lignin on Inhibitory of <i>Macrobrachium rosenbergii</i> Nodavirus (MrNV) in Giant Freshwater Prawn (<i>Macrobrachium rosenbergii</i>)	35
2. โครงการย่อยที่ 2 ปลากะพงขาว	39
2.1 Genetic Relatedness of Domestic Strains of Asian Seabass (<i>Lates calcarifer</i>) in Thailand Inferred from Microsatellite Genetic Markers	39
3. โครงการย่อยที่ 3 ปลา Pangasiid ลูกผสม	46
3.1 การศึกษา performance ของลูกผสมและชนิดพ่อแม่	46
3.2 เครื่องหมายพันธุกรรมที่จำเพาะกับชนิดปลากลุ่ม Pangasiids	51
4. โครงการย่อยที่ 4 หอยทะเล	53
4.1 Genetic diversity of the green mussel, <i>Perna viridis</i> in the Gulf of Thailand	53
4.2 Performance of different strains of <i>Mimachlamys senatoria</i>	56
5. โครงการที่ดำเนินการต่อเนื่องจากโครงการที่ได้รับทุนเมธีวิจัยอาวุโส 2546	59
5.1 Genetic diversity of hatchery stocks of striped catfish <i>Pangasianodon hypophthalmus</i> in Thailand	59
5.2 Performance and genetic diversity of wild and hatchery stocks of striped catfish <i>Pangasianodon hypophthalmus</i> in Vietnam	60

5.3 Improvement of African catfish <i>Clarias gariepinus</i> performance by strain crossing	61
5.4 Genetic Impacts of the Dissemination of the GIFT Strain Nile Tilapia in Thailand	62
6. โครงการที่ได้รับทุนสนับสนุนบางส่วนจากโครงการเมธีวิจัยอาวุโส	64
6.1 Novel Microsatellites for Multiplex PCR of the Humpback Grouper, <i>Cromileptes altivelis</i> (Valenciennes, 1828), and Application for Broodstock Management	64
6.2 Loss of Genetic Variation of <i>Phalacrodon bleekeri</i> (Günther, 1864) in the Hatchery Stocks as Revealed by the Newly Developed Multiplex PCRs Microsatellites	70
ผลผลิต (OUTPUT) ของโครงการ	74
เอกสารแนบ	84
รายการเอกสารแนบ	
(1) Wachirachaikarn, A., W. Rungsin, P. Srisapoom and U. Na-Nakorn. 2009. Crossing of African catfish (<i>Clarias gariepinus</i>) strains based on strain selection using genetic diversity data. <i>Aquaculture</i> 290: 53-60.	
(2) Ha, H.P., Nguyen, T.T.T., Poompuang, S. and Na-Nakorn, U. 2009. Microsatellites revealed no genetic differentiation between hatchery and contemporary wild populations of striped catfish, <i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (Sauvage 1878) in Vietnam. <i>Aquaculture</i> 291: 154-160.	
(3) Na-Nakorn, U., Moeikum, T. 2009. Genetic diversity of domesticated stocks of striped catfish, <i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (Sauvage 1878), in Thailand: Relevance to broodstock management regimes. <i>Aquaculture</i> 297: 70-77 doi:10.1016/j.aquaculture.2009.09.014	
(4) Prakoon, W., Tunkijjanukij, S., Nguyen, T.T.T., Na-Nakorn, U. 2010. Spatial and temporal genetic variation of green mussel, <i>Perna viridis</i> in the Gulf of Thailand and implication for aquaculture. <i>Marine Biotechnology</i> 12:506–515; DOI 10.1007/s10126-009-9234-x	
(5) Kitcharoen, N., Rungsin, W., Koonawootrittiron, S., Na-Nakorn, U. 2010. Selection of brooders from the early maturing freshwater prawn, <i>Macrobrachium rosenbergii</i> (de Mann 1879) resulted in better	

- growth rate of offspring than those selected from the late maturing. *Aquaculture* 306: 362 – 364.
- (6) Na-Nakorn, U., Yashiro, R., Wachirachaikarn, A., Pansaen, N. 2010. Novel microsatellites for multiplex PCRs of the Humpback grouper, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes, 1828), and application for broodstock management. *Aquaculture* 306: 57 – 62.
- (7) Karaked, T., Poompuang, S., Na-Nakorn, U., Kamonrat, W., Hallerman, E.M. 2011. DNA microsatellite-based evaluation of early growth performance among strains of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* de Man. *Aquaculture* 311: 115-122.
- (8) Sriphairoj, K., Klinbu-nga, S., Kamonrat, W., Na-Nakorn, U. 2010. Species identification of four economically important Pangasiid catfishes and related species using SSCP markers. *Aquaculture* 308 (SUPPL. 1): S47 – S50.
- (9) Kitcharoen, N., Rungsin, W., Koonawootrittiron, S., Na-Nakorn, U. 2011. Heritability for growth traits in Giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Mann 1879) based on BLUP method. *Aquaculture Research* 2011: 1-7. Doi:10.1111/j.1365-2109.2011.02796.x
- (10) Wachirachaikarn, A., Prakoon, W., Nguyen, T.T.T., Prompakdee, W., Na-Nakorn, U. *in press*. Loss of genetic variation of *Phalacrodon bleekeri* (Günther, 1864) in the hatchery stocks revealed by newly developed microsatellites. *Aquaculture*, in press
- (11) สิทธิชัย สะทะโซติ, เกตุณภัส ศรีไพโรจน์ และ อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2553. ลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจของปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*) ปลาเผาะ (*Pangasius bocourti*) และลูกผสม (*P. hypophthalmus* X *P. bocourti*), หน้า 210-217 ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48, สาขาประมง. 3-5 กุมภาพันธ์ 2553. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- (12) Sukmanomon, S., Senanan, W., Kapuscinski, A.R., **Na-Nakorn, U.** submitted manuscript. Genetic diversity of feral populations of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Thailand and evidences of genetic introgression. A manuscript submitted to **Fisheries Science**, September 2011

- (13) Sukmanomon, S., Kamonrat, W., Poompuang, S., Nguyen, T.T.T., Bartley, D.M., May, B., **Na-Nakorn, U.** submitted manuscript. Genetic changes, intra- and interspecific introgression in farmed Nile tilapia in Thailand. A manuscript submitted to **Aquaculture**, September 2011.
- (14) Rungsin, W., Swatdipong, A., **Na-Nakorn, U.** Submitted ms. Development stages of androgenic glands in Giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* De Mann, 1879 in relation to size and success rate of andrectomization in small and large size prawn” a manuscript submitted to **Aquaculture** (6th December 2010)
- (15) Senanan, W., Sornkeaw, S., Pechsiri, J., **Na-Nakorn, U.**, Saenin, N., Yashiro, R. Submitted manuscript. Relatedness of commercial broodstock populations of Asian seabass (*Lates calcarifer*) inferred from microsatellite genetic markers. **Aquaculture**
- (16) **Na-Nakorn, U.**, Jintasathaporn. 2011. Current status and prospects of farming the Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Mann 1879) in Thailand. **Aquaculture Research**, submitted manuscript. (review article)
- (17) Proceedings การประชุม Tenth International Symposium on Genetics in Aquaculture
- (18) การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 1
- (19) การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 2
- (20) การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 3

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การประยุกต์ใช้พันธุศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน-II

Application of Genetics and Biotechnology for Sustainable Development of Aquaculture-II

สัญญาเลขที่ RTA5080013

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ศาสตราจารย์ ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร

ระยะเวลาการรับทุน 1 สิงหาคม 2550 ถึง 31 กรกฎาคม 2554 (ขยายเวลาการวิจัย 12 เดือน)

นักวิจัยในโครงการ:

ศ.ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดร.วงศ์ปฐม กมลรัตน์ กรมประมง

รศ.ดร.สุภาวดี พุ่มพวง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดร.วันศุกร์ เสนานาญ มหาวิทยาลัยบูรพา

ดร.ประพันธ์ศักดิ์ ศิริชะภา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดร.เกตุณภัส ศรีไพโรจน์ มหาวิทยาลัยพะเยา

นักวิจัยเครือข่าย:

ผศ.ดร.วิฑูรย์ ถิระโสภณ มหาวิทยาลัยมหิดล

ผศ.ดร.ศกร คุณวุฒิฤทธิ์ ณ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดร.ศิริวราภรณ์ กลิ่นบุหงา ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

Dr. Thuy T.T. Nguyen, Deakin University, Australia

นิสิต:

น.ส.นิสรา กิจเจริญ (ปริญญาเอก-จบ)

นายรัชพล การะเกตุ (ปริญญาเอก-จบ)

น.ส.ศรีจรรยา สุขมนอนต์ (ปริญญาเอก)

นายวิกรม รังสินธุ์ (ปริญญาเอก)

นางอุไร กุลบุญ (ปริญญาเอก)

น.ส.อัญลักษณ์ วชิรไชยการ (ปริญญาเอก)

น.ส.วรางคณา พระคุณ (ปริญญาโท-จบ)

น.ส.สุภาภรณ์ ศรีแก้ว (ปริญญาโท-จบ)

วัตถุประสงค์และขอบเขตของโครงการ

วัตถุประสงค์ในภาพรวมมี 2 ประการ

1. ใช้แนวทางด้านพันธุศาสตร์เพื่อสร้างความรู้พื้นฐานที่จำเป็นสำหรับความยั่งยืนของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งมีวัตถุประสงค์เฉพาะคือ

- 1.1 เพื่อใช้เทคโนโลยีชีวภาพ ปรับปรุงผลผลิตของสัตว์น้ำ เช่น ปรับปรุงเทคโนโลยีการผลิตลูกกุ้งก้ามกรามเพศผู้ล้วน เพื่อศึกษาข้อมูลพื้นฐานที่จำเป็นในการปรับปรุงพันธุ์กุ้งก้ามกราม การแยกสายพันธุ์กุ้งก้ามกราม และหัวข้ออื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างความยั่งยืนของการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม เช่น การใช้สาร lignin เพื่อทำลายเชื้อไวรัสในกุ้งก้ามกราม และการปรับปรุงพันธุ์ปลาดุกยักษ์ โดยอิงข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรม

- 1.2 เพื่อใช้ความรู้และเทคโนโลยีด้านพันธุศาสตร์ประชากรเพื่อการจัดการพ่อแม่พันธุ์ปลา เช่น ปลาสวาย ปลานิล ปลากระพงขาว และปลากะรังหางอน

- 1.3 เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้แยกชนิดปลากลุ่ม Pangasiidae และนำมาติดตามลูกผสมระหว่างชนิดของปลาชนิดนี้ ตลอดจนเปรียบเทียบลักษณะของลูกผสม

- 1.4 เพื่อใช้ความรู้ทางพันธุศาสตร์ประชากรศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยแมลงภู่ในอ่าวไทย

- 1.5 การศึกษาผลของปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเลี้ยงหอยเชลล์

2. เพื่อสร้างบุคลากรที่มีความรู้ความชำนาญด้าน พันธุศาสตร์ประชากร พันธุศาสตร์ปริมาณ และเทคโนโลยีชีวภาพ

การศึกษาคครอบคลุม สัตว์น้ำ 8 ชนิด ได้แก่ กุ้งก้ามกราม ปลาดุกยักษ์ ปลาสวาย ปลานิล ปลากระพงขาว ปลากะรังหางอน หอยแมลงภู่ และหอยเชลล์ และครอบคลุมศาสตร์ต่างๆ คือ เทคโนโลยีชีวภาพ พันธุศาสตร์ประชากร และพันธุศาสตร์ปริมาณ

บทคัดย่อ

โครงการ “การประยุกต์ใช้พันธุศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน-II” มีวัตถุประสงค์เพื่อประยุกต์ใช้ ความรู้ด้านพันธุศาสตร์ประชากร พันธุศาสตร์ปริมาณ และเทคโนโลยีชีวภาพ เพื่อเพิ่มผลผลิตสัตว์น้ำสำคัญทางเศรษฐกิจ และการสร้างนักวิจัย การศึกษาแบ่งออกเป็นโครงการย่อย ได้แก่

1. โครงการย่อย กุ้งก้ามกราม มีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาองค์ความรู้และเทคโนโลยีเพื่อเพิ่มผลผลิตกุ้งก้ามกรามและแก้ปัญหาโรคในกุ้งก้ามกราม แบ่งออกเป็น 5 หัวข้อ ดังนี้

1.1 Commercial Mass Production of the All-male Stock of Giant Freshwater Prawn: ได้ทำการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมที่จะผ่าตัดเปลี่ยนเพศกุ้งเพศผู้ให้เป็นเพศเมีย (neofemale) เพื่อใช้ผลิตลูกกุ้งก้ามกรามเพศผู้ล้วน การศึกษานี้ได้รายงานการพัฒนาของ androgenic gland ของกุ้งก้ามกรามเป็นครั้งแรก และพบว่าการพัฒนาของต่อม androgenic จะขึ้นกับขนาดลูกกุ้งมากกว่าอายุ โดยกุ้งที่จะผ่าตัดได้ผลดีควรมีความยาวเปลือกส่วนหัวน้อยกว่า 0.6 เซนติเมตร

1.2 Estimation of Heritability of Economically Important Traits in Giant Freshwater Prawn: ทำการคำนวณค่าอัตราพันธุกรรมโดยใช้ข้อมูลจาก fullsib 16 ครอบครัว และ halfsib 8 ครอบครัว โดยใช้วิธี Restricted Maximum Likelihood procedure (REML) พบว่าอัตราพันธุกรรม (h^2) ของลักษณะการเจริญเติบโตของกุ้งที่ยังไม่แสดงความแตกต่างระหว่างเพศมีค่าค่อนข้างสูง (h^2 ความยาวหัว = 0.35 ± 0.15 ; h^2 น้ำหนักตัว = 0.26 ± 0.13) ส่วนค่า h^2 ที่คำนวณเมื่ออายุ 5 เดือนหลังคว่ำ มีค่าต่ำ และค่าที่คำนวณจากข้อมูลกุ้งเพศเมีย มีค่าสูงกว่าที่คำนวณจากข้อมูลกุ้งเพศผู้ ค่าที่คำนวณเมื่ออายุ 6 เดือนหลังคว่ำก็ให้ผลเช่นเดียวกัน

1.3 Effects of Selection for Growth Performed on Females of Different Maturing Batches: เกษตรกรผู้เพาะกุ้งก้ามกรามจะไม่นำกุ้งเพศเมียที่เจริญพันธุ์ในรุ่นแรกไปเป็นพ่อแม่พันธุ์ เพราะเข้าใจว่ากุ้งพวกนี้โตช้า แต่การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า เพศเมียที่เจริญพันธุ์เร็วจะให้ลูกที่เจริญเติบโตดีกว่าพวกที่เจริญพันธุ์ช้า การศึกษาทำโดยใช้กุ้ง 16 ครอบครัว แบ่งกุ้งเพศเมียตามอายุ ขณะเริ่มเจริญพันธุ์ออกเป็น 4 ชุดโดยยังแยกตามครอบครัว ทำการคัดเลือกแบบ within family พบว่าลูกกุ้งที่ได้จากแม่ที่เจริญพันธุ์เป็นชุดแรกมีความยาวหัว และน้ำหนักตัวมากกว่าลูกจากแม่ที่เจริญพันธุ์ช้า

1.4 Stock Evaluation of Male Broodstock of Freshwater Prawn: วัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยคือ การประเมินประสิทธิภาพของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์ เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายชีวภาพ สำหรับทดสอบสายพันธุ์กุ้งก้ามกราม โดยนำลูกกุ้ง 3 สายพันธุ์มาเลี้ยงเปรียบเทียบการเจริญเติบโต โดยเลี้ยงรวม และเลี้ยงแยกโดยทดลอง 3 ซ้ำ เลี้ยงนาน 3 เดือน นำข้อมูลจีโนไทป์ของลูกที่เลี้ยงรวม (ใช้ microsatellite 7 ตำแหน่ง) มา assign ไปยังจีโนไทป์ของพ่อแม่ โดยใช้วิธี exclusion-simulation ทดลองกับข้อมูลจาก primer 1-7 คู่ ผลการศึกษาพบว่า หากใช้ข้อมูลจาก primer 7 คู่จะ

ได้ผลแม่นยำสูงถึง 90% อย่างไรก็ตามการลดจำนวน primer ลงมาเหลือ 4 คู่ยังให้ระดับความแม่นยำสูงถึง 88% โดยค่าใช้จ่ายลดลง การเลี้ยงรวมและเลี้ยงแยกให้ผลการทดลองไม่แตกต่างกัน

1.5 Application of Lignin for Inhibiting *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus (MrNV) and Extra Small Virus (XSV) in Giant Freshwater Prawn: การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารลิกนินในการยับยั้งเชื้อ โดยทำการศึกษา 3 ขั้นตอนคือ (1) การศึกษาประสิทธิภาพของลิกนินในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสในฟอแมพันธุ์กึ่งกัมกราม (In vitro): นำเอาสารลิกนินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (5, 25 และ 50 ppm) มาผสมกับสารละลายที่มีไวรัส 2 ชนิดนี้ แล้วนำไปฉีดฟอแมกึ่งกัมกรามที่ปลอดโรค หลังจากนั้นทำการตรวจการปนเปื้อนของไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้ ด้วยเทคนิค RT-PCR ที่เวลาต่าง ๆ กัน ผลการทดลองพบว่ากึ่งกลุ่มควบคุมซึ่งฉีดเชื้อไวรัสโดยไม่มี lignin กลับไม่พบเชื้อไวรัส ซึ่งอาจเกิดจากการที่กึ่งกัมกรามสามารถกำจัดเชื้อออกไปได้เอง ส่วนกลุ่มที่ได้รับเชื้อผสม lignin ระดับต่าง ๆ ตรวจพบ virus ในระดับไม่แตกต่างกัน (2) การประเมินประสิทธิภาพของสารลิกนินต่อการยับยั้งการส่งผ่านเชื้อไวรัสจากแม่กุ้งสู่ลูก: โดยการผสมสารลิกนินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารให้แม่กุ้งกิน หลังจากนั้นนำกุ้งทดลองกลุ่มต่าง ๆ มาฉีดเชื้อไวรัส MrNV และ XSV แล้วนำไปผสมกับเพศผู้ปลอดโรค นำลูกกุ้งที่ได้ไปตรวจสอบการปนเปื้อนของไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน โดยพบว่าแม่กุ้งที่ได้รับสารลิกนินในอาหารให้ลูกที่มีการปนเปื้อนในอัตราที่สูง เช่นเดียวกับลูกกุ้งที่ได้จากแม่กุ้งในกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารไม่ผสมลิกนิน (3) การศึกษาประสิทธิภาพของลิกนินในอาหารต่อการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสในลูกกุ้งกัมกรามวัยอ่อน: นำแม่กุ้งไข่แก่ที่มีการติดเชื้อ MrNV และ XSV และแม่กุ้งไข่แก่ที่ไม่มีการติดเชื้อ MrNV และ XSV มาปล่อยให้วางไข่ในน้ำที่เค็มประมาณ 15 ppt ที่มีสารละลายลิกนินละลายอยู่ในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0-200 ppm แล้วอนุบาลลูกกุ้งต่อไปจนถึงระยะคว่ำ ระหว่างนี้สังเกตอาการและอัตราการรอดตายของกุ้งในแต่ละกลุ่ม เมื่ออนุบาลได้ 10 และ 20 วัน สุ่มลูกกุ้งจากทุกแม่มาตรวจหาเชื้อไวรัส พบว่า ลูกกุ้งกัมกรามที่ได้จากแม่กุ้งติดเชื้อไวรัส ซึ่งทำการเพาะและอนุบาลในน้ำที่มีสารละลายลิกนินอยู่ตั้งแต่ 25-200 ppm มีอัตราการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ณ เวลา 10 และ 20 วัน หลังจากฟักเป็นตัว

ผลการทดลองที่ได้ยังไม่แสดงให้เห็นชัดเจนว่า การใช้ lignin เพื่อกำจัดไวรัสสองชนิดนี้ ได้ผลหรือไม่

2. โครงการย่อย ปลากระพงขาว ทำการศึกษาเรื่อง Genetic Relatedness of Domestic Strains of Asian Seabass (*Lates calcarifer*) in Thailand Inferred from Microsatellite Genetic Markers: ปลากระพงขาวมีการเพาะเลี้ยงกันมานานกว่า 30 ปี โดยไม่ได้มีการจัดการทางพันธุกรรมอย่างชัดเจน ทำให้มีความกังวลว่า ประชากรโรงเพาะฟักจะมีพันธุกรรมใกล้เคียงกันจนทำให้เกิดการผสมเลือดชิดได้ วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ คือการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ภายในกลุ่มประชากรโรงเพาะฟัก 7 แห่ง เทียบกับประชากรธรรมชาติ 3 แห่ง โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม microsatellite 11 ตำแหน่ง ผลการศึกษาแสดงว่า ตัวอย่างโรงเพาะฟักส่วนใหญ่ มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำกว่าประชากรธรรมชาติเล็กน้อย ความความสัมพันธ์ทางเครือญาติ (genetic relatedness, r_{xy}) ของสมาชิกในประชากร พบว่า RACF-F1 ซึ่งเป็นรุ่นลูกที่คัดจาก RACF มีค่า r_{xy} สูงที่สุด ส่วน

ตัวอย่างอื่นๆ มีค่า r_{xy} ที่ไม่ต่างกัน และไม่ต่างจากประชากรธรรมชาติ จากการ assign ลูกปลากลับไปยังพ่อแม่พบว่า ในการผสมพันธุ์เป็นกลุ่มมีปลาเพียง 8 จาก 10 ตัวที่ได้ผสมพันธุ์ ยิ่งไปกว่านั้นลูกปลาส่วนใหญ่จะมาจากพ่อแม่เพียง 2 คู่

3. โครงการย่อย ปลา Pangasiid ลูกผสม ปลากลุ่มปลาสวาย (Family Pangasiidae) ได้ทวีความสำคัญทางเศรษฐกิจขึ้นเรื่อยๆ จึงจำเป็นต้องทำการศึกษา ทั้งที่เกี่ยวกับลักษณะที่สำคัญของปลาลูกผสมซึ่งในปัจจุบันนิยมเลี้ยงกันแพร่หลาย และการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อรองรับการค้าผลิตภัณฑ์ปลากลุ่มนี้ โครงการย่อยนี้ประกอบด้วย 2 หัวข้อ ดังนี้

3.1 Performance of Parental Species and Their Hybrid: การศึกษาเพื่อ

เปรียบเทียบลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจ ของปลาสวาย ปลาเฒะ และปลาลูกผสม (สวายเฒะ) ปลาเฒะเป็นปลาที่มีเนื้อขาว เป็นที่ต้องการของตลาด แต่มีไข่จำนวนน้อย เกษตรกรจึงใช้ไข่ปลาสวาย ซึ่งเป็นปลาที่มีไข่ดก ผสมกับน้ำเชื้อปลาเฒะ การทดลองทำโดยนำลูกปลาทั้ง 3 กลุ่มข้างต้น มาเลี้ยงในกระชัง ในอัตราปล่อย 45 ตัวต่อลูกบาศก์เมตร 3 ข้าง เลี้ยงเป็นเวลา 303 วัน ผลการทดลองแสดงว่า ปลาลูกผสมมีลักษณะต่างๆต่ำกว่าพ่อแม่ ได้แก่ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตรารอด เฟอร์เซ็นต์เนื้อแล ความแน่นเนื้อ ส่วนอัตราแลกเนื้อไม่แตกต่างกัน สีของเนื้อ (พิจารณาจากปริมาณ carotenoid) ของลูกผสมมีค่าต่ำกว่าปลาสวาย แต่สูงกว่าปลาเฒะ

3.2 Species Specific Genetic Markers of Pangasiid Catfishes: ผลจากงานวิจัยในส่วนนี้ ได้เครื่องหมายพันธุกรรมสำหรับแยกชนิดปลาในกลุ่ม Pangasiids จำนวน 5 ชนิด คือ ปลาน้ำจืด (*Pangasianodon gigas*) ปลาสวาย (*P. hypophthalmus*) ปลาเฒะ (*Pangasius bocourti*) ปลาเทโพ (*P. lamarudii*) และ ปลาสวายหนู (*Helicophagus leptocephalus*) โดยการใช้เทคนิค Single stranded conformation polymorphism (SSCP) ซึ่งจากการทดสอบในไพรเมอร์จำนวน 7 คู่ พบว่าไพรเมอร์ PL8 สามารถแยกชนิดปลาทั้ง 5 ชนิดได้ นอกจากนี้ไพรเมอร์ PL8 ยังสามารถใช้แยกลูกปลาของปลาน้ำจืด ปลาสวาย ปลาเฒะ และปลาเทโพได้ อย่างไรก็ตามไพรเมอร์ PL8 ยังไม่สามารถใช้แยกปลาลูกผสมของปลาในกลุ่มนี้ได้

4. โครงการย่อย หอยทะเล

4.1 Genetic Diversity of the Green Mussel, *Perna viridis* in the Gulf of Thailand:

หอยแมลงภู่เป็นสินค้าสัตว์น้ำที่สำคัญชนิดหนึ่ง โดยมีการเลี้ยงมากในหลายพื้นที่ โดยเฉพาะในอำเภอรามราช การเลี้ยงหอยแมลงภู่ ใช้ลูกหอยที่ล่อจากธรรมชาติ โดยไม่ทราบที่มาที่แน่นอน จากภาวะแวดล้อมที่เสื่อมโทรมลงเป็นลำดับ ประกอบกับการจับหอยออกจากแหล่งน้ำในปริมาณมหาศาลในแต่ละปี ทำให้เกิดความกังวลว่า ประชากรหอยจะมีพันธุกรรมเสื่อมโทรมลง จึงได้ทำการศึกษาโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม microsatellite จำนวน 5 ตำแหน่ง ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยแมลงภู่รวม 11 ประชากรที่มีความแตกต่างในเชิงพื้นที่ และฤดูกาล ผลการศึกษาพบว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยแมลงภู่ในอ่าวไทยอยู่ในระดับปานกลาง และไม่มีความแตกต่างระหว่างประชากร หอยที่เก็บในพื้นที่เดียวกันแต่คนละช่วงเวลา มีพันธุกรรมแตกต่างกัน ซึ่งแสดงว่า ลูกหอยที่มาเกะนั้นลอยน้ำมาจากบริเวณอื่น

4.2 Factors Affecting Growth and Survival of Scallop (*Mimachlamys senatoria*): ทำการทดลองปัจจัยต่างๆคือ (1) ชนิดของแพลงก์ตอน และความหนาแน่นที่เหมาะสม ในการอนุบาลลูกหอย (2) ปริมาณการกรอกกินอาหารและอัตราการรอดของลูกหอยเซลล์ ในน้ำความเค็ม 4 ระดับ (3) ผลของระดับความลึกน้ำและความชุ่มต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของหอยเซลล์ (4) ศึกษาผลของขนาดตาอวนต่อผลการเลี้ยงหอยเซลล์ การทดลองได้ผลที่สามารถสรุปได้เฉพาะการทดลองที่ (1) ส่วนการทดลองอื่นๆล้มเหลวเนื่องจากสาเหตุสำคัญคือมีปัจจัยอื่นๆที่ไม่ใช่ปัจจัยทดลอง มีอิทธิพลต่อข้อมูลที่ได้ ทำให้ไม่สามารถสรุปผลได้ บางการทดลองหอยตายโดยไม่ทราบสาเหตุ ผลการทดลองที่ (1) มีดังนี้ จากการเลี้ยงลูกหอยเซลล์ด้วยแพลงก์ตอนพืช 5 ชนิด ได้แก่ *Isochrysis* sp., *Chaetoceros* sp., *Skeletonema* sp., *Chlorella* sp. และ *Tetraselmis* sp. ให้ในความเข้มข้น 5,000; 20,000 และ 40,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมง พบว่าลูกหอยเซลล์สามารถกรอกกิน *Chaetoceros* sp. และ *Isochrysis* sp. ได้ดีและรวดเร็ว ที่ความหนาแน่น 5,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลูกหอยเซลล์ทุกชุดการทดลองรอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์

5. โครงการที่ดำเนินการต่อเนื่องจากโครงการที่ได้รับทุนเมธีวิจัยอาวุโส 2546

ขณะสิ้นสุดโครงการเมธีวิจัยอาวุโส 2546 ในปี 2549 ยังมีโครงการที่ยังดำเนินการไม่เสร็จสมบูรณ์จำนวน 4 โครงการ ซึ่งได้ดำเนินการต่อโดยใช้งบประมาณจากโครงการเมธีวิจัยอาวุโส 2550 ผลการศึกษาที่ได้มีดังต่อไปนี้

5.1 Genetic Diversity of Hatchery Stocks of Pla Sawai *Pangasianodon hypophthalmus* in Thailand:

ปลาสาวยสายพันธุ์ของไทยผ่านการ domesticate มานาน (มากกว่า 20ชั่วอายุ) โดยเริ่มจากปลาในแม่น้ำเจ้าพระยา ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในปลาสาวย 6 ประชากร ซึ่งมีการจัดการพันธุกรรมแตกต่างกันเป็น 2 แบบ คือเป็นประชากรปิด (ไม่มีการนำปลาจากประชากรอื่นเข้ามาผสม) และประชากรแบบเปิด (มีการนำปลาจากประชากรอื่น ซึ่งอาจเป็นประชากรจากแหล่งดั้งเดิม คือแม่น้ำเจ้าพระยา หรือประชากรจากต่างแหล่งซึ่งก็คือแม่น้ำโขง เข้ามาผสมเป็นครั้งคราว) และได้นำประชากรธรรมชาติในแม่น้ำเจ้าพระยา และสาขา และจากแม่น้ำโขงมาร่วมศึกษาด้วย ผลการศึกษาโดยใช้ microsatellite 5 ตำแหน่ง แสดงว่าความหลากหลายของอัลลีลในประชากรที่นำปลาจากแม่น้ำโขงมาผสม มีค่าสูงกว่าประชากรที่นำปลาจากแหล่งดั้งเดิมมาผสม และประชากรแบบปิด พบการปนเปื้อนของพันธุกรรมบางส่วนจากประชากรแม่น้ำโขง ส่วนประชากรธรรมชาติมีความหลากหลายของอัลลีลต่ำและไม่แตกต่างจากประชากรโรงเพาะฟัก

5.2 Genetic Diversity of Wild and Hatchery Stocks of Striped Catfish (Pla Sawai) *Pangasianodon hypophthalmus* in Vietnam:

ในปัจจุบันประเทศเวียดนามส่งออกปลาสาวยจากการเพาะเลี้ยงปละหลายแสนตัน และเริ่มนำสายพันธุ์ปลาสาวยจากธรรมชาติมาเพาะเลี้ยงให้เกิดการ domestication ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องศึกษาสถานะภาพปัจจุบันของปลาสาวยเหล่านี้ เพื่อประโยชน์ในการวางแผนต่อไป ในการศึกษาที่ใช้ microsatellite 5 ตำแหน่ง ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาสาวยจากฟาร์มเลี้ยง 4 แห่ง และจากแหล่งน้ำธรรมชาติ 3 ประชากร ซึ่งเก็บจากแม่น้ำโขง และแม่น้ำ Bassac ในประเทศเวียดนาม เมื่อ พ.ศ. 2548 และจากอีก 1 ประชากรเก็บจากแม่น้ำ Bassac ใน

ปี 2549 ผลการศึกษาไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลาแต่ละประชากร ไม่มีความแตกต่างระหว่างประชากรธรรมชาติและประชากรจากฟาร์ม ความหลากหลายทางพันธุกรรมก็ไม่แตกต่างกันระหว่างประชากรธรรมชาติ และประชากรเลี้ยง แสดงว่า เกษตรกรได้นำปลาจากธรรมชาติจำนวนมากมาใช้เป็นประชากรเริ่มต้น จึงทำให้ไม่เกิดความแตกต่างทางพันธุกรรม ระหว่างปลาธรรมชาติ และปลาเลี้ยง นอกจากนี้แล้วยังสรุปได้ว่า การ domesticate ยังเพิ่งเริ่มต้น จึงสามารถนำวิธีการจัดการพ่อแม่พันธุ์ที่ดีเข้าไปใช้ได้ทันที

5.3 Improvement of African Catfish *Clarias gariepinus* Performance by Strain Crossing: หลังจากที่ได้มีการนำปลาดุกยักษ์มาเลี้ยงในประเทศไทยเป็นเวลานานนับศตวรรษ เกษตรกรสังเกตว่า ปลาดุกยักษ์ มีอัตราการเจริญเติบโตต่ำลง ในการศึกษาที่มีวัตถุประสงค์ในการปรับปรุงพันธุกรรมของปลาดุกยักษ์ โดยการนำปลาต่างประชากรมาผสมข้าม เพื่อให้ได้ลูกผสมที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และอาจมีลักษณะทางเศรษฐกิจดีขึ้นด้วย ในการศึกษาใช้เครื่องหมายพันธุกรรม microsatellite 6 ตำแหน่ง ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาดุกยักษ์ จากโรงเพาะฟัก 4 แห่ง ได้แก่ สุพรรณบุรี อ่างทอง นครปฐม และนครสวรรค์ พบว่า ปลา 4 ประชากรนี้ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม (นครปฐม-นครสวรรค์ และ สุพรรณบุรี-อ่างทอง) ชัดเจนตามลักษณะพันธุกรรม ดังนั้นจึงเลือกตัวแทนแต่ละกลุ่มประชากรมาผสมข้ามกัน โดยใช้ประชากร อ่างทอง ผสมกับนครปฐม ลูกผสมที่ได้มีค่าทางอิมมูโนวิทยา (mean phagocytosis) ดีขึ้นกว่าค่าเฉลี่ยของพ่อแม่ (heterosis=70.97%; $P<.01$) อย่างไรก็ตามลักษณะอื่นๆ [ความยาวลำตัว และน้ำหนัก, ค่าความต้านทานจำเพาะต่อ *Aeromonas hydrophila* (antibody titre), phagocytic index และ ลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ในเพศผู้] ไม่แตกต่างระหว่างลูกผสมกับเฉลี่ยของพ่อแม่

5.4 Genetic Impacts of the Dissemination of the GIFT Strain Nile tilapia in Thailand: ปลานิลเป็นปลาพื้นเมืองของทวีปอาฟริกา ถูกนำเข้าสู่ประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ.2508 และตั้งแต่นั้นมาก็ได้มีการเลี้ยงเป็นการค้า ภายใต้ชื่อสายพันธุ์ จิตรลดา ในปี 2540 ได้มีการนำปลานิลปรับปรุงพันธุ์ (GIFT=Genetically Improved Farmed Tilapia) เข้ามาเลี้ยงแพร่หลายในประเทศไทย มีความเป็นไปได้มากกว่าปลาสายพันธุ์ GIFT ที่นำเข้ามานี้ อาจเกิดความเปลี่ยนแปลง ไปในทางที่ไม่ต้องการ นอกจากนั้นแล้ว ยังอาจทำให้ปลาสายพันธุ์จิตรลดา ในฟาร์มต่างๆปนเปื้อน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาทั้งสองสายพันธุ์ การศึกษานี้ใช้เครื่องหมายพันธุกรรม microsatellite 14 คู่ ศึกษาประชากรปลาจากฟาร์มที่เลี้ยงปลาสายพันธุ์ GIFT 4 ฟาร์ม และฟาร์มที่เลี้ยงสายพันธุ์พื้นเมือง (จิตรลดา) 2 ฟาร์ม ใช้ประชากรเทียบเคียงจากแหล่งต่างๆ คือ ปลาสายพันธุ์ GIFT ชั่วอายุที่ 9 สายพันธุ์จิตรลดา ประชากรปลานิลจาก Ivory Coast และ Uganda ปลาหมอเทศ *O. mossambicus* และ ปลา *O. aureus* ผลการศึกษาพบว่าปลาสายพันธุ์ GIFT จากฟาร์ม 3 ใน 4 ฟาร์ม ยังคงเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ และความหลากหลายทางพันธุกรรมไม่ลดลง ปลาสายพันธุ์ GIFT จากโรงเพาะฟัก 1 แห่งเกิดการปนเปื้อนกับปลาสายพันธุ์จิตรลดา ในทำนองเดียวกัน การปนเปื้อนจากสายพันธุ์ GIFT สู่สายพันธุ์จิตรลดาก็เกิดขึ้น พบการปนเปื้อนจากพันธุกรรมปลาหมอเทศในปลา GIFT และประชากรปลาสายพันธุ์จิตรลดาในฟาร์มหนึ่ง อย่างไรก็ตามพบว่าการปนเปื้อนมีผลให้

ความหลากหลายทางพันธุกรรมมีค่าสูงขึ้น นอกจากนั้นแล้ว ยังได้ศึกษาประชากรปลานิลในแหล่งน้ำของไทย เพราะปลาเหล่านี้เป็นผลผลิตสำคัญที่หล่อเลี้ยงชีวิตของชาวประมงสมัครเล่นจำนวนมาก การศึกษาโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม microsatellite 14 คู่ ศึกษาประชากรปลานิลจาก บึงบรเพ็ด อ่างเก็บน้ำบางพระ และบึงสามร้อยยอด ผลการศึกษาแสดงว่า ประชากรปลานิลในอ่างเก็บน้ำทั้ง 3 แห่งมาจากปลาสายพันธุ์จิตรลดา แต่พบการปนเปื้อนทางพันธุกรรมจากสายพันธุ์ GIFT ในปลาประชากรจากบึงบรเพ็ด และบางพระ ส่วนประชากรสามร้อยยอด พบการปนเปื้อนจากปลาหมอเทศ ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรมีค่าสูงในประชากร บางพระ ค่อนข้างต่ำในประชากรบึงบรเพ็ด และสามร้อยยอด

6. โครงการที่ได้รับทุนสนับสนุนบางส่วนจากโครงการเมธีวิจัยอาวุโส

กรมประมงได้เพาะพันธุ์ปลาหลายชนิดเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และเพื่อการอนุรักษ์ แต่เนื่องจากเทคนิคการเพาะพันธุ์ปลาบางชนิด เช่น ปลากระรังหน้างอน และปลาแดง ยังไม่พัฒนามากนัก ทำให้เกิดความกังวลว่า effective population size (N_e) ของประชากรพ่อแม่พันธุ์มีค่าต่ำ กรมประมงจึงได้ประสานคณะผู้วิจัยเพื่อทำการศึกษา ในปลา 2 ชนิดนี้ ผลการศึกษามีดังนี้

6.1 Novel Microsatellites for Multiplex PCR of the Humpback Grouper, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes, 1828), and Application for Broodstock Management: ปลากระรังหน้างอน เป็นปลาราคาสูง ศูนย์วิจัยพัฒนาประมงชายฝั่งระยอง สามารถเพาะปลาชนิดนี้ได้สำเร็จ โดยปล่อยให้ผสมพันธุ์แบบหมู่ วิธีการนี้ มักจะให้ค่า effective population size (N_e) ต่ำ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาผลของการผสมพันธุ์ปลากระรังหน้างอน ในการศึกษาครั้งนี้ได้พัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรม microsatellite สำหรับปลากระรังหน้างอน จำนวน 8 คู่ จากนั้นนำไปศึกษาตัวอย่างปลา 3 ประชากร คือ ประชากรพ่อแม่พันธุ์ (P) ประชากรรุ่นลูก (G1) และประชากรที่นำมาจากแหล่งธรรมชาติอื่นๆเพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ต่อไป (PP) ผลการศึกษาแสดงว่า ประชากรพ่อแม่พันธุ์มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่ารุ่นลูก ส่วนประชากร PP นั้นมีความหลากหลายของอัลลีลในภาพรวมค่อนข้างต่ำกว่าพ่อแม่พันธุ์ P ค่า N_e ที่คำนวณได้จากวิธี genetic disequilibrium มีค่าเท่ากับ 30 ตัว สำหรับประชากรพ่อแม่พันธุ์รุ่นแรก 13.8 ตัว สำหรับลูกรุ่นที่ 1 และ 18 ตัว สำหรับพ่อแม่พันธุ์รุ่นใหม่ ส่วนการคำนวณด้วยค่า heterozygote excess ได้ค่า N_e เท่ากับ 10.3, infinity และ 18.2 สำหรับ พ่อแม่พันธุ์รุ่นแรก ลูกรุ่นที่ 1 และพ่อแม่พันธุ์รุ่นใหม่ ตามลำดับ

6.2 Loss of genetic variation of *Phalacrodon bleekeri* (Günther, 1864) in the hatchery stocks as revealed by the newly developed multiplex PCRs microsatellites: นักวิชาการกรมประมงประสบความสำเร็จในการเพาะพันธุ์ปลาแดง และในปัจจุบันได้เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ไว้ 2 รุ่นที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดจังหวัดชัยนาท และได้ใช้ลูกปลาจากสต็อกเหล่านี้ปล่อยลงแม่น้ำเจ้าพระยา เพื่อเพิ่มผลผลิต เนื่องจากมีความกังวลว่าปลาพ่อแม่พันธุ์จะสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรม จึงได้ทำการศึกษานี้เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรพ่อแม่ปลาแดง 2 รุ่นเทียบกับประชากรธรรมชาติ ในการศึกษาได้พัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรม microsatellites สำหรับปลาแดง 7 คู่ (นำมาใช้ศึกษา 6 คู่) จากนั้นนำไปศึกษาจีโนมไทป์ของตัวอย่างพ่อแม่ปลาแดงในโรงเพาะฟักของ

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดชัยนาท 2 ประชากร ได้แก่ ประชากรที่ได้จากการเพาะพันธุ์ ในปี 2542 และ 2549 และตัวอย่างจากปลาธรรมชาติในแม่น้ำเจ้าพระยาบริเวณหน้าศูนย์ฯ ผลการศึกษา แสดงว่า ความหลากหลายของอัลลีลของประชากรโรงเพาะฟักต่ำกว่าประชากรธรรมชาติ 1.5 เท่า โดยที่ heterozygosity ไม่แสดงความแตกต่าง Bayesian assignment จำแนกปลาแต่ละตัวจากประชากร ธรรมชาติลงในกลุ่มประชากรธรรมชาติ 100% แสดงว่าประชากรโรงเพาะฟักที่มีการปล่อยลงในแหล่งน้ำ ก่อนหน้านี้ ไม่ได้มีส่วนใน genepool ของประชากรธรรมชาติเลย

ABSTRACT

The project “Application of Genetics and Biotechnology for Sustainable Development of Aquaculture-II” aimed to apply population genetics, quantitative genetics and biotechnology to enhance production of economically importance aquatic animals and to develop human resource in these fields. The subprojects are described below.

1. Giant Freshwater Prawn Subproject: This subproject aimed to develop knowledge and technology relevant to enhancement of giant freshwater prawn production and solving problems on diseases. Five research topics were conducted as follow.

1.1 Commercial Mass Production of The All-male Stock of Giant Freshwater Prawn: The study was conducted to verify the suitable timing to induce feminization of male post-larvae (PL) by removing androgenic glands wherein the “neofemales” obtained were used to produce all-male PL. This study provided the first report on developmental stages of the androgenic gland of giant freshwater prawn. In addition, it showed that development of the gland depended on sizes of PL rather than ages. The best result of sex change was obtained when the PL with carapace length less than 0.6 cm were used for androgenic gland removal.

1.2 Estimation of Heritability of Economically Important Traits in Giant Freshwater Prawn: Heritabilities (h^2) were estimated base on the data from 16 full-sibs and 8 half-sibs of giant freshwater prawn using the Restricted Maximum Likelihood procedure (REML). The heritability of growth traits at juvenile stage (before sex differentiation) was relatively high (h^2 carapace length = 0.35 ± 0.15 ; h^2 body weight = 0.26 ± 0.13). Whereas the heritabilities estimated at five months after reaching a post-larval stage were low and showed different values between sexes (those estimated from female data were higher than those of male data). The h^2 estimated at six months after reaching a PL stage showed the same trend.

1.3 Effects of Selection for Growth Performed on Females of Different Maturing Batches: Thai farmers did not use the first batch of maturing females for production of post-larvae giant freshwater prawn because of the perception that the early maturing females had slow growth rate. The results of the present study showed that the early maturing females produced PL with better growth rate than those of the late maturing females. The study was conducted by dividing female prawns of 16 full-sib families into four maturing batches. Then a within family selection for large body size was performed. The results revealed that the PL obtained from the females selected from the first maturing batch were larger than those of the later maturing batches.

1.4 Stock Evaluation of Male Broodstock of Freshwater Prawn: The objective of the present study was to evaluate the efficiency of microsatellites as biomarkers for strain evaluation. Post larvae of three strains of giant freshwater prawn were compared in two types of triplicate growth trials, communal rearing and individual strain rearing. The experiment lasted three months. Then the multilocus genotypes of the progenies were assigned to parental genotypes using the exclusion-simulation method base on data from 1-7 microsatellites. The results showed that the assignment based on seven loci was 90% correct. However, the percentage of correct assignment was still high (88%) when the number of loci was reduced to 4 with reduced cost. The communal and single strain rearing gave the same results.

1.5 Application of Lignin for Inhibiting *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus (MrNV) and Extra Small Virus (XSV) in Giant Freshwater Prawn: This study aimed to evaluate the efficiency of lignin in inhibiting MrNV and XSV in giant freshwater prawn. Three experiments were conducted as follow. (1) Efficiency of lignin in inhibiting MrNV and XSV in giant freshwater prawn brooders (*in vitro*). Lignin at different concentration (5, 25 and 50 ppm) was mixed with MrNV and XSV and injected into virus-free giant freshwater prawns brooders. Then RT-PCR was performed to detect these viruses in the injected prawns after various times after injection. The results showed that the control group which was injected with the viruses without lignin was free of virus. This might reveal the ability of the prawns to destroy viral particles. The groups received viruses plus different concentrations of lignin showed indifferent copy numbers of viruses. (2) Efficiency of lignin in inhibiting vertical transfer of MrNV and XSV from brooders to offspring in giant freshwater prawn: Lignin at different concentrations was mixed with feed and fed to virus free female brooders of giant freshwater prawn. Then, the lignin-fed prawns were injected with MrNV and XSV and subsequently mated with virus free males. The offspring were tested by RT-PCR to detect the virus load at different ages. The results showed that the amount of viruses was high in both treatment groups, with and without lignin. (3) Efficiency of feeding lignin on inhibiting infection of MrNV and XSV in giant freshwater prawn larvae: The female freshwater prawns carrying fertilized eggs, infected or MrNV and XSV free, were stocked in 15 ppt saline water with 0-200 ppm of lignin. After spawning and hatching took place, the larvae of each group were separately reared. The virus load was estimated at 10 and 20 days after hatching using RT-PCR. The results showed that the offspring of the infected brooders hatched in water containing 25-200 ppm lignin showed less virus loads than the control group at 10 and 20 days post-hatching.

Overall, the results did not provide apparent evidence for efficiency of lignin in inhibiting MrNV and XSV.

2. Sea Bass Subproject: Genetic Relatedness of Domestic Strains of Asian Seabass (*Lates calcarifer*) in Thailand Inferred from Microsatellite Genetic Markers: Sea bass has been cultured in Thailand for more than 30 years without systematic genetic management. Hence, the concern has been raised on inbreeding among the broodstock. The objective of this study was to estimate genetic relationship within seven hatchery populations of sea bass in comparison with three wild populations using 11 microsatellite loci. The results showed that a majority of the hatchery populations had slightly lower genetic variation than that of the wild populations. Genetic relatedness (r_{xy}) was highest in RACF-F1 which was the selected offspring of RACF. The other hatchery populations showed insignificant different r_{xy} within the group and neither did between the hatchery and wild populations. The assignment of offspring genotypes into the parent genotypes revealed that only eight of 10 brooders participated in the mating and the offspring were dominated by offspring from two parental pairs.

3. Hybrid Pangasiids Subproject: The Pangasiid catfishes have gained economic importance. Therefore, the performance of hybrid catfishes which have been widely cultured should be studied along with the development of genetic markers for authentication of the products. This subproject comprised two research topics as follow.

3.1 Performance of Parental Species and Their Hybrid: The objective of this study was to compare economic important traits of Pla Sawai, *Pangasianodon hypophthalmus* (PH), Pla Poh, *Pangasius bocourti* (PB) and their hybrid. PB has white meat which receives high consumers demand. However, it is non prolific. Therefore, eggs of the prolific species, PH were used to fertilize with sperm from PB. The growth trial was conducted in triplicate including the two species and their hybrid. The fingerling had been reared in cages at 45 fish/m² for a period of 303 days. The results showed that the hybrid had lower specific growth rate, survival rate, dressed-out percentage and meat firmness score than those of the parental species. Feed conversion ratio was not different between groups. The meat colour, as revealed by amount of carotenoid in meat, of the hybrid was lower than PH but higher than PB.

3.2 Species Specific Genetic Markers of Pangasiid Catfishes: In this study genetic markers for identification of five pangasiid catfishes including Pla Buk (*Pangasianodon gigas*-PG), Pla Sawai (*P. hypophthalmus*-PH), Pla Poh (*Pangasius bocourti*-PB), Pla Tepo (*P. larnaudii*-PL) and Pla Sawai Noo (*Helicophagus leptorhynchus*-HL) were developed using the Single Stranded Conformation Polymorphism (SSCP) technique. Among seven primers being tested, PL8 differentiated the five species. Besides, PL8 could identify larvae of PG, PH, PB and PL. However, PL8 could not differentiate hybrids of these species.

4. Marine Bivalves Subproject:

4.1 Genetic Diversity of the Green Mussel, *Perna viridis* in the Gulf of Thailand:

Green mussel is one of the important aquaculture commodities. It is intensively cultured in many areas especially Sri Racha Bay. Mussel culture depends on wild spats those being trapped from wild. There was concern on genetic deterioration of green mussel which may occur as a consequence of over-exploitation and deteriorated environment. Therefore, the study was conducted employing five microsatellite loci to evaluate spacial and temporal genetic diversity of eleven populations of green mussel. The results revealed moderate genetic variation within populations of all populations without genetic differentiation between populations. The samples collected from a sampling site at different seasons showed different genetic background which implied that the recruitment of the spats was from other areas.

4.2 Factors Affecting Growth and Survival of Scallop (*Mimachlamys senatoria*):

Four experiments were conducted as follow. (1) Species of plankton and suitable density for nursing of scallop larvae; (2) Quantity of plankton consumed by scallop larvae and survival of the scallop larvae reared in different salinities; (3) Effects of water depth and turbidity on growth and survival of scallop; (4) Effects of mesh size on scallop culture. Only experiment 1 gave the conclusive results wherein among five species of planktons, *Chaetoceros* sp, *Isochrysis* sp, *Skeletonema* sp, *Chlorella* sp and *Tetraselmis* sp, the scallop larvae could efficiently uptake the first two species at the concentration of 5,000 cells/ml with 100% survival rate. The other experiments failed due to confounding factors and mass mortality occurred in experiment 3.

5. The Continuing Subprojects from the First Phase of TRF Research Scholar Award

2003: When the TRF Research Scholar Award 2003 terminated in 2006 four subprojects were not yet completed. They were continued base on funding support of the TRF Research Scholar Award 2007. The results are as follow.

5.1 Genetic Diversity of Hatchery Stocks of Pla Sawai, *Pangasianodon*

hypophthalmus in Thailand: Thai stocks of Pla Sawai have a relatively long domestication history (>20 generations) that began with fish of Chaophraya River origin. The genetic diversity of this species was studied in six hatchery populations with two different broodstock management regimes (without introduction of either wild or domesticated stocks vs. with occasional introduction of either original or non-original populations) and in three wild populations (from the Chaophraya River and its tributary and from the Mekong River). The results, based on five microsatellite loci, revealed high allele diversity of the hatchery populations with the introduction of non-original stock (from the Mekong population) relative to those with the introduction of original stock (from the Chaophraya population) or without

introduction. Genetic introgression from the Mekong population was observed in every population. The wild populations showed unexpectedly low allele diversity and were not genetically differentiated from the hatchery populations.

5.2 Genetic Diversity of Wild and Hatchery Stocks of Striped Catfish (Pla Sawai) *Pangasianodon hypophthalmus* in Vietnam: At present Vietnam annually exports a few hundred thousand tonnes of Pla Sawai, of which the stocks are being domesticated. Therefore, it is necessary to study present status of genetic diversity of the domesticating stocks. The results will be useful for further broodstock management plan. Five microsatellites were employed to score genotypes of Pla Sawai from four hatcheries and three populations of wild samples comprising one from Mekong River and two populations collected from Bassac River in Vietnam in 2005 and 2006. The results revealed no genetic difference both among each population pairs and between hatchery and wild populations. The genetic variation within populations was not different among populations. The results implied that the Vietnamese farmers used large number of brooders to found the hatchery populations, hence no genetic differentiation was observed between the wild and hatchery populations. In addition, the domestication process was in an early stage so that good broodstock management practices may be introduced in time.

5.3 Improvement of African Catfish *Clarias gariepinus* Performance by Strain Crossing: After African catfish has been introduced to Thailand for decades, the farmers noticed decline of growth rate. The objective of this study was to genetically improve African catfish by cross breeding among genetically diverse stocks expecting increase genetic diversity and improvement of economically important traits. Six microsatellites were employed to evaluate genetic diversity of four Thai hatchery stocks of African catfish including the stocks from Suphanburi, Angthong, Nakornpathom and Nakornsawan. The results showed that the four populations were divided into two genetically distinct groups, Nakornpathom-Nakornsawan and Suphanburi-Angthong. Then, Angthong and Nakornpathom were taken as representatives of each group and were cross bred. The crossbred offspring showed improved mean phagocytosis relative to parent mean (heterosis=70.97%; $P<0.01$). However, other traits [body length, body weight, a specific immune response to *Aeromonas hydrophila* (antibody titre), phagocytic index and reproductive traits of male] were not different from parent means.

5.4 Genetic Impacts of the Dissemination of the GIFT Strain Nile Tilapia in Thailand: Nile tilapia, native to Africa, was introduced to Thailand in 1965. Since then it was adopted for commercial aquaculture and the stock was named "Chitralada strain". In 1997 the genetically improved strain (GIFT= Genetically Improved Farmed Tilapia) was introduced to

Thailand. It is possible that the introduced GIFT may have changed its genetic background towards deterioration. Moreover, it may cause genetic introgression in the Chitralada strain cultured in farms. Thus, it is necessary to study on genetic diversity of these two strains. Fourteen microsatellites were employed to study genetic diversity of four hatchery stock originated from GIFT and two hatchery stocks originated from Chitralada. Reference populations were 9th generation of GIFT, pure Chitralada, a population each of Nile tilapia from Ivory Coast and Uganda, and a population each of *Oreochromis mossambicus* and *O. aureus*. The results showed that three of four GIFT derived populations were pure GIFT with un-altered genetic variation within population. One GIFT derived population was contaminated by Chitralada strain and likewise one Chitralada derived population was contaminated by GIFT. Genetic introgression of *O. mossambicus* occurred in the GIFT reference population and one of the Chitralada derived population. However, the introgression increased genetic variation within populations. In addition, feral populations of Nile tilapia established in reservoirs in Thailand were studied due to their importance on livelihood of many artisanal fishermen. The same set of microsatellites were used to score genotypes of three feral populations collected from the following reservoirs, Bung Boraphet (BB), Bang Phra (BH) and Sam Roy Yot (SY). The results revealed Chitralada origin of the three populations. Genetic introgression from GIFT was observed in BB and BP, while SY was contaminated by *O. mossambicus*. Genetic variation within populations was high for BP and low for BB and SY.

6. The Subprojects received partial funding support from the TRF Research Scholar

Award 2007: Department of Fisheries was successful in breeding of many fish species for aquaculture and conservation. However, limited success of the breeding in some species, e.g. Humpback grouper and Pla Daeng has raised concern on small effective population size (N_e). Therefore, DoF has contacted our group to study genetic diversity of these two species. The results were as follow.

6.1 Novel Microsatellites for Multiplex PCR of the Humpback Grouper, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes, 1828), and Application for Broodstock Management: Humpback grouper demands high price and successful breeding of this species was achieved by researchers at Rayong Brackishwater Research and Development Institute whereby mass spawning which easily leads to small effective population size (N_e) was performed. In this study eight microsatellite primer pairs were developed and seven of them were used to study genetic diversity of three hatchery stocks of humpback grouper including the brooders (P), first generation offspring of P (G1) and a population of wild brooders from various origins (PP). The results showed that genetic variation of P was higher than that of G1 while PP had lower

genetic variation than P. N_e base on genetic disequilibrium method was 30 for P, 13.8 for G1 and 18 for PP. Whereas N_e base on heterozygote excess was 10.3, infinity and 18.2 respective to P, G1 and PP.

6.2 Loss of Genetic Variation of Pla Daeng *Phalacrodon bleekeri* (Günther, 1864) in the Hatchery Stocks as Revealed by the Newly Developed Multiplex PCRs Microsatellites: A successful breeding of Pla Daeng was carried out by researchers in Department of Fisheries. At present two generations of brooders were reared at Chainat Freshwater Fisheries Research and Development Institute. The offspring of these brooder stocks have been released into Chao Phraya River for stock enhancement. Due to a concern that the brooders may lose their genetic variation, the study was conducted to estimate genetic diversity of these stocks in comparison with a wild stock. Seven microsatellite primers were developed and six of them were used to score genotypes of two brooder stocks (1999- and 2006-broodstock) and a wild stock collected from Chao Phraya River in front of the institute. The results showed that allele diversity of the hatchery stocks was 1.5 fold lower than that of the wild stock while heterozygosity was not different. The Bayesian assignment assigned 100% of the wild individuals to its own population. This implied that the previous release of the hatchery fish did not contribute to the genepool of the wild stock.

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

วัตถุประสงค์ในภาพรวมของโครงการ “การประยุกต์ใช้พันธุศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน-II” คือ 1) ใช้แนวทางด้านพันธุศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อสร้างความรู้พื้นฐานที่จำเป็นเพื่อการเพิ่มผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การปรับปรุงพันธุ์ และการจัดการพ่อแม่พันธุ์สัตว์น้ำ 2) เพื่อสร้างบุคลากรที่มีความรู้ความชำนาญด้าน พันธุศาสตร์ประชากร พันธุศาสตร์ปริมาณ และเทคโนโลยีชีวภาพ

การศึกษาคอร์บคลุม สัตว์น้ำ 8 ชนิด ได้แก่ กุ้งก้ามกราม ปลาดุกยักษ์ ปลาสวาย ปลานิล ปลากระพงขาว ปลากระแหหนังอ่อน หอยแมลงภู่ และหอยเชลล์ และครอบคลุมศาสตร์ต่างๆ คือ เทคโนโลยีชีวภาพ พันธุศาสตร์ประชากร และพันธุศาสตร์ปริมาณ ผลการศึกษามีดังนี้

1. กุ้งก้ามกราม ได้รายงานขั้นตอนการพัฒนาของต่อม androgenic ในลูกกุ้งก้ามกรามเป็นครั้งแรก จากนั้นได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างขั้นตอนการพัฒนาของต่อมกับ ขนาด หรือ อายุ ของลูกกุ้งก้ามกราม ซึ่งการศึกษานี้ทำให้สามารถรายงานขนาดของลูกกุ้งเพศผู้ที่เหมาะสมในการผ่าตัดทำลายต่อม androgenic เพื่อสร้างกุ้ง neofemale ที่จะใช้ในการผลิตกุ้งก้ามกรามเพศผู้ล้วน สำหรับการปรับปรุงพันธุ์กรรมของกุ้งก้ามกราม การศึกษานี้ได้รายงานค่าอัตราพันธุกรรมของการเจริญเติบโต และแนวทางการคัดเลือกแม่พันธุ์ที่โตเร็ว และเพื่อการเพิ่มประสิทธิภาพการเปรียบเทียบสายพันธุ์กุ้ง ได้ศึกษาประสิทธิภาพการใช้เครื่องหมายพันธุกรรม microsatellite เพื่อการแยกครอบครัวกุ้งก้ามกรามในการเลี้ยงรวม ผลการศึกษานี้ยังแสดงว่าการเลี้ยงรวมและเลี้ยงแยกแต่ละครอบครัว ให้ผลการเปรียบเทียบไม่แตกต่างกัน ส่วนการทดลองใช้ lignin ในการควบคุมไวรัส *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus (MrNV) และ Extra Small Virus (XSV) ในลูกกุ้ง ไม่สามารถสรุปผลได้

2. ปลาสวาย การศึกษาครั้งนี้ได้รายงานข้อมูลลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจของปลาลูกผสมระหว่างปลาเผาะกับปลาสวาย ซึ่งไม่เคยมีข้อมูลเชิงวิทยาศาสตร์มาก่อน ซึ่งพบว่าปลาลูกผสมมีลักษณะส่วนใหญ่ด้อยกว่าพ่อแม่ ได้เครื่องหมายพันธุกรรม SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism) ที่ใช้แยกชนิดได้ โดยไพรเมอร์ PL8 สามารถแยกชนิดปลาทั้ง 5 ชนิดคือ ปลาบึก ปลาสวาย ปลาเผาะ ปลาเทโพ และ ปลาสวายหนู ได้ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาสวายที่เลี้ยงในประเทศไทย และเวียดนาม โดยพบว่าปลาสวายไทยซึ่งพัฒนามาจากปลาน้ำจืดและเลี้ยงติดต่อกันมากกว่า 20 ชั่วอายุ มีความหลากหลายค่อนข้างต่ำ และมีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างโรงเพาะฟักต่างๆ การนำปลาจากแม่น้ำโขงมาผสมทำให้ความหลากหลายสูงขึ้น ส่วนปลาสวายเวียดนามนั้น ไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรโรงเพาะฟัก และประชากรธรรมชาติ (แม่น้ำโขง และแม่น้ำ Baasac) และความหลากหลายทางพันธุกรรมก็ไม่แตกต่างกัน สรุปได้ว่า การ domesticate ของปลาสวายเวียดนามอยู่ในระยะเริ่มต้น

3. หอยทะเล ศึกษาในหอย 2 ชนิดคือหอยแมลงภู่ และหอยเชลล์ พบว่าหอยแมลงภู่ที่เลี้ยงในอ่าวศรีราชาซึ่งเป็นแหล่งเลี้ยงสำคัญ มีความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับปานกลาง แสดงว่าการเก็บ

เกี่ยวหอยแมลงภู่มิใช่หลายแสนตัวไม่ได้ทำให้ความหลากหลายลดลง หอยที่เก็บในพื้นที่เดียวกันแต่คนละช่วงเวลามีพันธุกรรมแตกต่างกัน ซึ่งแสดงว่า ลูกหอยที่มาจากเกสรนั้นลอยน้ำมาจากบริเวณอื่น ส่วนหอยเชลล์นั้นได้ทดลองการอนุบาลและการเลี้ยง โดยเน้นการศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ได้ผลการทดลองเฉพาะในส่วนการอนุบาลด้วยแพลงก์ตอน โดยพบว่าลูกหอยเชลล์สามารถรองรับ *Chaetoceros* sp. และ *Isochrysis* sp. ได้ดีและรวดเร็ว ที่ความหนาแน่น 5,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนการทดลองอื่นๆ ล้มเหลวเนื่องจากสาเหตุสำคัญคือมีปัจจัยอื่นๆ ที่ไม่ใช่ปัจจัยทดลอง มีอิทธิพลต่อข้อมูลที่ได้ ทำให้ไม่สามารถสรุปผลได้ บางการทดลองหอยตายโดยไม่ทราบสาเหตุ

4. การใช้เครื่องหมายพันธุกรรมและความรู้ด้านพันธุศาสตร์ประชากรเพื่อการปรับปรุงพันธุ์และการจัดการพ่อแม่พันธุ์ในปลาอื่น ๆ ได้ผลดังนี้

4.1 จากการใช้ microsatellite 11 ตำแหน่งในการศึกษา พบว่าพ่อแม่พันธุ์ปลากะพงขาวในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำกว่าประชากรธรรมชาติเพียงเล็กน้อย และมีค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเฉลี่ยในประชากร (ซึ่งจะแสดงถึงโอกาสการเกิดผสมเลือดชิด) ไม่แตกต่างจากประชากรธรรมชาติ ยกเว้นตัวอย่างจากโรงเพาะฟักหนึ่งที่พบว่า การคัดเลือกเพียง 1 ชั่วโมงทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลงมาก และค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเฉลี่ยในประชากรสูงมาก

4.2 ทำการผสมข้ามระหว่างประชากรพ่อแม่พันธุ์ปลาดุกยักษ์ ซึ่งเป็นตัวแทนของกลุ่มพันธุกรรมที่แตกต่างกัน (แยกโดยใช้เครื่องหมาย microsatellite) พบว่าลูกผสมที่ได้มีค่าทางอิมมูโนวิทยา (mean phagocytosis) ดีขึ้นกว่าค่าเฉลี่ยของพ่อแม่ ส่วนลักษณะอื่นๆ [ความยาวลำตัว และน้ำหนัก, ค่าความต้านทานจำเพาะต่อ *Aeromonas hydrophila* (antibody titre), phagocytic index และ ลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ในเพศผู้] ไม่แตกต่างระหว่างลูกผสมกับเฉลี่ยของพ่อแม่

4.3 จากการศึกษาโดยใช้ microsatellite 14 ตำแหน่ง พบว่าปลานิลสายพันธุ์ GIFT จากฟาร์ม 3 ใน 4 ฟาร์ม ยังคงเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ และความหลากหลายทางพันธุกรรมไม่ลดลง อย่างไรก็ตามเกิดการปนเปื้อนระหว่างปลานิล GIFT และจิตรลดาในโรงเพาะฟักบางแห่ง และพบการปนเปื้อนจากพันธุกรรมปลาหมอเทศ ในปลา GIFT และประชากรปลาสายพันธุ์จิตรลดาในฟาร์มหนึ่ง นอกจากนั้นแล้ว ยังพบว่าประชากรปลานิลจากแหล่งน้ำ 3 แห่ง (บึงบรเพ็ด อ่างเก็บน้ำบางพระ และบึงสามร้อยยอด) มีต้นกำเนิดมาจากปลาสายพันธุ์จิตรลดา แต่พบการปนเปื้อนทางพันธุกรรมจากสายพันธุ์ GIFT ในปลาประชากรจากบึงบรเพ็ด และบางพระ ส่วนประชากรสามร้อยยอด พบการปนเปื้อนจากปลาหมอเทศ ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรมีค่าสูงในประชากรบางพระ ค่อนข้างต่ำในประชากรบึงบรเพ็ด และสามร้อยยอด

4.4 ใช้เครื่องหมายพันธุกรรม microsatellite ที่พัฒนาขึ้นสำหรับปลากะรังหางอน จำนวน 7 คู่ (จากที่พัฒนาขึ้น 8 คู่) ศึกษาประชากรพ่อแม่พันธุ์และรุ่นลูกของปลากะรังหางอน พบว่าประชากรพ่อแม่พันธุ์มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่ารุ่นลูก ส่วนประชากรที่นำมาจากแหล่งธรรมชาติอื่นๆ เพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ต่อไป มีความหลากหลายของอัลลีลในภาพรวมค่อนข้างต่ำกว่าพ่อแม่พันธุ์ ค่า effective population size (N_e) ซึ่งเป็นปฏิกิริยากลับกับค่าสัมประสิทธิ์การผสมเลือดชิด มีค่าต่ำกว่าเกณฑ์ ในทุกประชากร โดยประชากรพ่อแม่พันธุ์รุ่นแรกมีค่า N_e ค่อนข้างสูงกว่าประชากรอื่น

4.5 จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรพ่อแม่ปลาแดง 2 รุ่นเทียบกับประชากรธรรมชาติ โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม microsatellites ที่พัฒนาขึ้นเอง 6 คู่ (พัฒนาทั้งหมด 7 คู่) พบว่าความหลากหลายของอัลลีลของประชากรโรงเพาะฟักต่ำกว่าประชากรธรรมชาติ 1.5 เท่า และไม่พบพันธุกรรมของประชากรโรงเพาะฟักที่มีการปล่อยลงในแหล่งน้ำก่อนหน้านั้นใน genepool ของประชากรธรรมชาติเลย

จำนวนนักวิจัยในโครงการ 7 คนจาก 4 สถาบัน นักวิจัยเครือข่าย 4 คนจาก 4 สถาบัน ผลิตนิสิต/นักศึกษาระดับปริญญาเอก 6 คน (จบแล้ว 2 คน) และระดับปริญญาโท 2 คน (จบแล้วทั้งหมด)

ผลผลิตของโครงการประกอบด้วย 1) รายงานการวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ จำนวน 10 เรื่อง, 2) รายงานเรื่องเต็มในการประชุมระดับชาติ 1 เรื่อง, 3) ไพรมอร์สำหรับ microsatellite ที่พัฒนาจากดีเอ็นเอของปลาแดง และปลากะรังหางอนจำนวน 7 และ 8 คู่ตามลำดับ และลำดับนิวคลีโอไทด์ฝากไว้ใน Genbank, 4) ถ่ายทอดเทคโนโลยีจากผลงานวิจัยเรื่องการผลิตลูกกุ้งก้ามกรามเพศผู้ล้วน สูบริษัทเอกชน 1 ราย (Power Prawn Producer Company Ltd.), 5) ผลิตบัณฑิตระดับปริญญาเอก 2 คน และ ปริญญาโท 2 คน

มีการเผยแพร่ผลงานในการประชุมวิชาการนานาชาติ รวม 10 เรื่อง และในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ จำนวน 2 เรื่อง

ในระยะเวลาของโครงการมีนักวิจัยได้รับรางวัล และเลื่อนตำแหน่งดังนี้ 1) ศาสตราจารย์ ดร. อุทัยรัตน์ ณ นคร ได้รับรางวัลนักวิจัยดีเด่นแห่งชาติสาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา ประจำปี 2550, 2) รศ.ดร.สุภาวดี พุ่มพวง ได้เลื่อนตำแหน่งทางวิชาการเป็นรองศาสตราจารย์

โครงการได้จัดการประชุมประจำปี 2 ครั้ง (พ.ศ. 2550 และ 2552) และร่วมจัดประชุมนานาชาติ 1 ครั้ง ในปี พ.ศ.2551 (the 10th International Symposium on Genetics in Aquaculture) และจัดการประชุมเชิงปฏิบัติการ 1 ครั้ง การบรรยายพิเศษ 1 ครั้ง

EXECUTIVE SUMMARY

The overall objectives of the project entitled “Application of Genetics and Biotechnology for Sustainable Development of Aquaculture-II” were, 1) to employ genetical and biotechnological approaches to establish basic knowledge required for enhancement of aquaculture production, genetic improvement and broodstock management of aquatic animals. 2) to develop human resources in the fields of population genetics, quantitative genetics and biotechnology.

The studies covered a total of 8 species of aquatic animals including Giant Freshwater Prawn (GFP), African Catfish, Pla Sawai (Striped Catfish), Nile Tilapia, Asian Sea Bass, Humpback Grouper, Green Mussel and Scallop. The results of the studies are as follow.

1. Giant Freshwater Prawn: The developmental stages of androgenic glands of GFP were reported for the first time. Then the relationship of the stages and size or age of GFP larvae was determined. This has led to the identification of suitable sizes of male postlarvae for removing the androgenic glands to trigger sex reversal to neofemale which will be used to produce all-male GFP. In the attempts to improve performance of GFP the heritability of growth was estimated while the appropriate way of selecting fast-growing brooders was reported. To facilitate efficient stock comparison, the efficiency of microsatellites to identify families of the communally reared GFP was validated. The study also showed that the communal rearing gave the same results of strain comparison as the separate rearing. The experiments on efficiency of lignin to control *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus (MrNV) and Extra Small Virus (XSV) in GFP failed to give conclusive results.

2. Pla Sawai (Striped Catfish): The present study reported the economic important traits of the hybrid between female Pla Sawai and male Pla Poh of which scientific information was lacking. Wherein the hybrid showed inferior traits relative to the parental species. We reported SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism) markers (primer PL8) that could identify five species of Pangasiids including Pla Buk, Pla Sawai, Pla Poh, Pla Tepo and Pla Sawai Noo. The genetic diversity of hatchery stocks of Pla Sawai in Thailand and Vietnam was reported. The Thai stock of Pla Sawai which had Chao Phraya origin and had been domesticated for more than 20 generations had relatively low genetic variation. There was genetic differentiation among stocks of different hatcheries. The introduction of brooders from Mekong River has enhanced genetic variation of some Thai stocks. On the contrary, the Vietnamese hatchery stocks of Pla Sawai showed no genetic differentiation between stocks and neither did between the hatchery and wild stocks (collected from Mekong and Baasac River). In

addition, genetic variation of each stock was not different. This has led to a conclusion that domestication process of the Vietnamese stocks was in an early stage.

3. Marine Bivalves: The studies were conducted in two species, Green Mussels and Scallop. The study revealed that the green mussel cultured in Sri Raja Bay which is among important culture areas in Thailand, has moderate genetic variation. This implied that annual harvesting of a few hundred thousand did not affect the genetic variation. The temporal populations (populations collected from the same site but at different seasons) showed genetic difference which implied recruitment of spats from other populations. The studies in Scallop emphasized factors affecting success of nursing and culture of Scallop. Only the results from the nursing experiment using different planktons were achieved. It revealed that the scallop spats could efficiently uptake *Cheatoceros* sp. and *Isochrysis* sp. at a concentration of 5,000 cells/ml. The other experiments failed because of confounding factors while mass mortality occurred in some experiments due to un-identify reasons.

4. Utilization of Genetic Markers and Population Genetics Approach for Genetic Improvement and Broodstock Management in Other Fish Species

4.1 Eleven microsatellite loci were used to study genetic diversity of sea bass. The results showed that genetic diversity of hatchery stocks of sea bass was slightly lower than that of wild populations. Genetic relationship among individuals (which reflects inbreeding) of the hatchery stocks was not different with the wild populations except for one hatchery stock (the offspring of one generation of selection). The result revealed that after one generation of selection, genetic variation of the offspring was lower than the parental population. On the contrary, genetic relatedness of the offspring increased relative to the parent.

4.2 Cross breeding was performed between two strains of African catfish, each represented the genetically diverse populations (revealed by microsatellite loci) in Thailand. The results showed that the hybrid had higher mean phagocytosis than the parental mean while the other traits [body length, body weight, specific immune response to *Aeromonas hydrophila* (antibody titre), phagocytic index and reproductive traits of males) were not different between hybrid and parent.

4.3 Genetic analyses base on 14 microsatellites showed that the GIFT strain of Nile tilapia maintained in three of four hatcheries retained the purity as GIFT of which the genetic variation was not reduced. However, genetic contamination was detected between GIFT and Chitralada strain in some hatcheries. Genetic introgression from *O. mossambicus* was observed in the reference population of GIFT and one of the Chitralada derived populations. Moreover, we found that three feral populations collected from three reservoirs (Bung Boraphet, Bang

Phra and Sam Roy Yot Reservoir) originated from the Chitralada strain. Genetic contamination from GIFT was observed in the populations from Bung Boraphet and Bang Phra while the Sam Roy Yot population was contaminated by *O. mossambicus*. Genetic variation was high in the Bang Phra Reservoir, relatively low in Bung Boraphet and Sam Roy Yot.

4.4 Seven of eight microsatellite primer pairs developed from DNA of Humpback grouper were used to study three brooder populations of this species. We found significant reduction of allele diversity of the offspring population relative to that of the parent. The other brooder population collected from various wild habitats show low allele diversity. Effective population size (N_e) which is a reverse proportion of inbreeding was relative low in every population whereas N_e of the first generation brooders was relative high.

4.5 The study on genetic diversity of two generations of hatchery stocks of Pla Daeng and a wild population was performed using the six of seven newly developed microsatellite primers. The results showed that allele diversity of the hatchery populations was 1.5 fold lower than that of the wild population. The hatchery fish previously released into the river did not contribute to the genepool of the wild population.

There were seven researchers from four institutions participated in the project while four researchers from four institutions formed a network with our group. A total of six Ph.D. students (two of them were graduated) and two master students (all of them were graduated) worked under the project.

The outputs of the project included, 1) 10 scientific papers published in international journals, 2) one paper published in national proceedings, 3) seven and eight microsatellite primer pairs developed from DNA from Pla Daeng and Humpback Grouper, respectively and their sequences were deposited in GenBank, 4) a technology on production of all-male freshwater prawn was transferred to a private company (Power Prawn Producer Company Ltd.), 5) two Ph.D. and two master degree graduates.

Ten research topics were presented in international conferences and two topics were presented in national conferences.

Two researchers in the project received an award and promotion during the project period, 1) Professor Dr.Uthairat Na-Nakorn was awarded “ 2007 National Distinguished Researcher Award” in the field of Agricultural Science and Biology from National Research Council of Thailand, 2) Associate Professor Dr.Supawadee Poompuang was promoted to be Associate Professor.

Two annual scientific meetings were organized (2007 and 2009) and the project co-hosted an international symposium in 2008 (the 10th International Symposium on Genetics in Aquaculture). In addition one workshop and one special lecture were organized.

เนื้อหาของงานวิจัย

1. โครงการย่อยที่ 1 กุ้งก้ามกราม

1.1 Commercial Mass Production of All-male Stock of Giant Freshwater Prawn

ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิกรม รังสินธุ์ และศาสตราจารย์อุทัยรัตน์ ณ นคร

โครงการนี้มีวัตถุประสงค์ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกุ้งก้ามกรามเพศผู้ล้วนเชิงพาณิชย์ โดยในโครงการเมธีวิจัยอาวุโส ปี 2546 Rungsin และคณะ ได้ประสบความสำเร็จในการผลิตกุ้งเพศผู้ล้วนโดยเทคโนโลยี neofemale ในระดับห้องปฏิบัติการ ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต neofemale โดยเน้นการศึกษาระยะการพัฒนา androgenic gland อย่างละเอียด และมีแนวคิดที่ว่า หากเลี้ยงลูกกุ้งอย่างหนาแน่น จะมีผลให้กุ้งมีพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์ช้าลง ดังนั้นจะสามารถยืดระยะเวลาที่จะผ่าตัดลูกกุ้งเพื่อแปลงเพศออกไปได้ รายงานการวิจัยต้นฉบับได้ส่งไปตีพิมพ์ในวารสาร AQUACULTURE โดยผู้ทรงคุณวุฒิได้ให้ความเห็นในเรื่องอายุของกุ้งทดลอง ผู้วิจัยจึงได้เก็บข้อมูลเพิ่มเติม คาดว่าจะสามารถแก้ไข และส่งตีพิมพ์ได้ต่อไป รายงานโดยย่อมีดังนี้

ความสัมพันธ์ระหว่างระยะการพัฒนาของต่อม androgenic กับความยาว carapace

อนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามเพศผู้ล้วนในระยะหลังคว่ำ ที่ความหนาแน่น 2500 ตัวต่อปริมาตรน้ำ 1500 ลิตร สุ่มเก็บตัวอย่างลูกกุ้งที่ยังไม่พัฒนา appendix masculina ครั้งละ 30 ตัว ทุก 10 วัน ในช่วงระยะเวลาหลังจากระยะคว่ำนาน 10-80 วัน วัดความยาว carapace แล้วนำตัวอย่างไปผ่านกระบวนการทางมิถุนวิทยา

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของระยะการพัฒนาต่อม androgenic และขนาดความยาว carapace ด้วยวิธีการวิเคราะห์สมการถดถอย และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของทั้งสองลักษณะนี้โดยการนำค่าทั้งสองนี้พล็อตลงในกราฟ โดยการ resampling เพื่อประเมินค่า confident limit (95%) และหาค่าเฉลี่ยจากค่าที่ได้จากการสุ่ม 1000 ครั้ง โดยใช้โปรแกรม PopTools 3.0 (Hood 2008)

ผลการศึกษา

ระยะการพัฒนาของต่อม androgenic

รายงานผลการศึกษาในครั้งนี้เป็นการรายงานการครั้งแรกของการพัฒนาต่อม androgenic ในกุ้งก้ามกราม การพัฒนาต่อม androgenic สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ ได้แก่

ระยะที่ 1 Initiation stage เป็นระยะที่เกิดการรวมกลุ่มของ primordial epithelial cell โดยเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบของต่อมมีลักษณะเป็นเซลล์รูปร่างทรงรี ย่อมนิดสีทึบ เกาะกลุ่มและจับยึดอยู่ทางด้านหน้าของท่อลำเลียงส่วนปลาย (ภาพที่ 1)

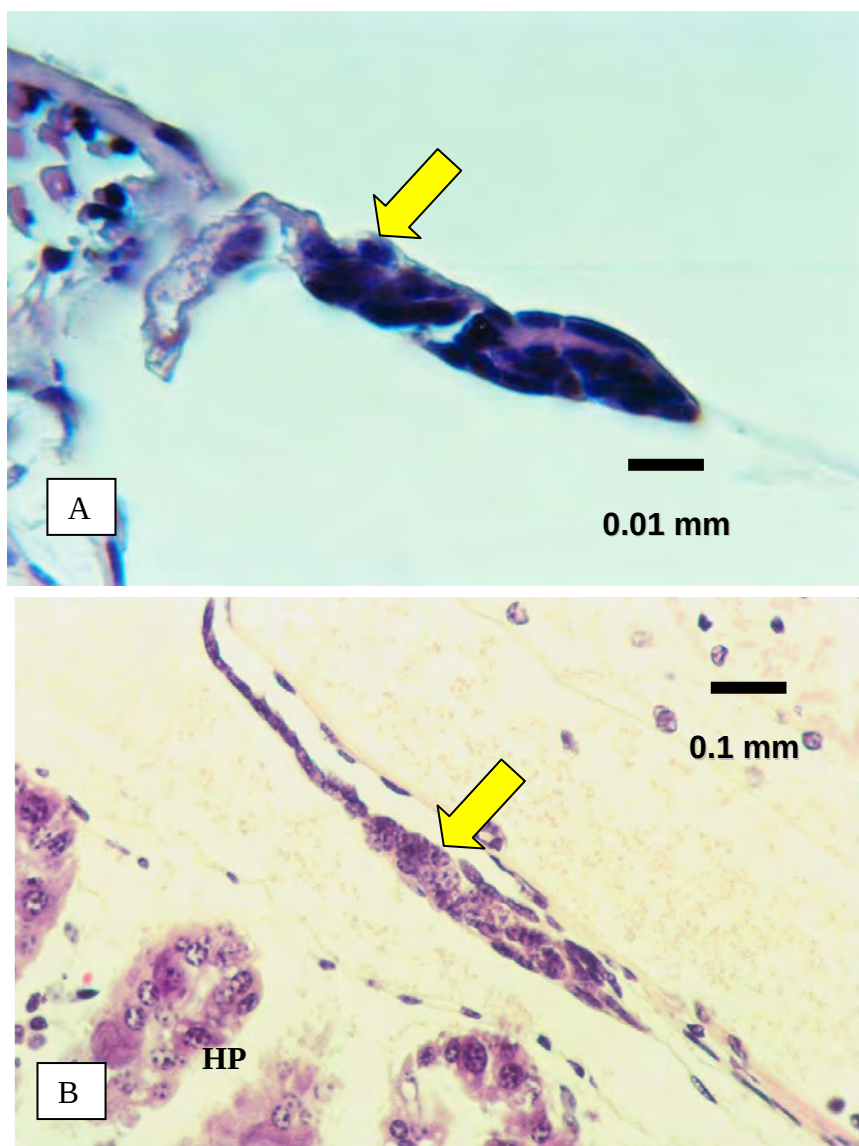
ระยะที่ 2 Early development stage เป็นระยะที่ต่อม androgenic พัฒนาโครงสร้างเกิดเป็นรูปร่างของต่อมโดยมีลักษณะเป็น single cord of cell นอกจากนั้นในแต่ละเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบของ

ต่อมสามารถพบ nucleolus อยู่ตามผนังด้านในของเยื่อหุ้ม nucleus ซึ่งแสดงถึงศักยภาพของต่อมที่สามารถสร้างสารประกอบโปรตีนได้ ซึ่งสอดคล้องกับในระยะนี้ลูกกึ่งเริ่มขบวนการพัฒนาลักษณะเพศภายนอกลักษณะแรกได้แก่ การเกิดขึ้นของ gonopore complex ซึ่งคาดว่าขบวนการพัฒนาลักษณะเพศน่าจะถูกรับควบคุมโดยสารประกอบชีวภาพที่หลังจากต่อม androgenic (ภาพที่ 2)

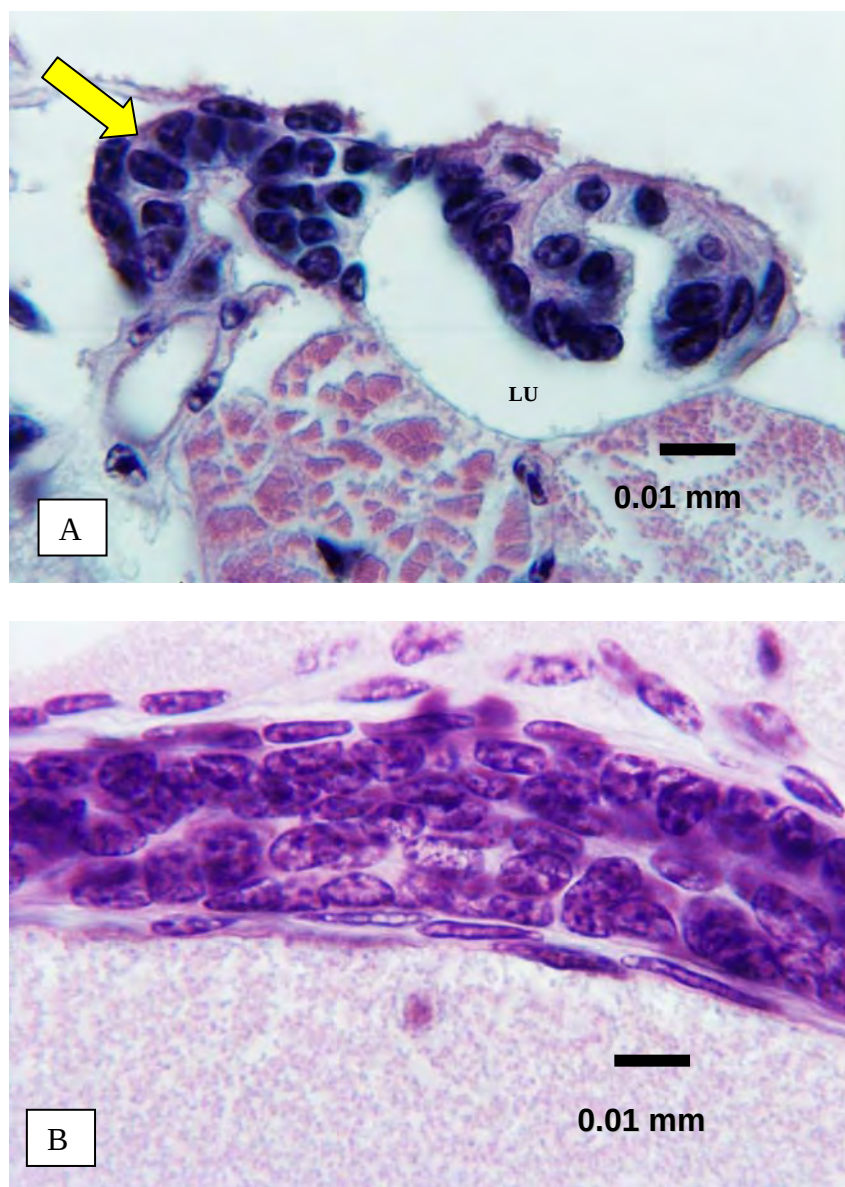
ระยะที่ 3 Intermediate development stage เป็นระยะที่เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ภายในต่อม androgenic จนกระทั่งมีโครงสร้างที่ซับซ้อนขึ้นมากกว่าระยะก่อน โดยมีลักษณะเป็น multiple cord of cell นอกจากนั้นเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบของต่อมยังมีความหลากหลายด้านรูปร่างและขนาด ในระยะนี้ทุกเซลล์ติดสีย้อมทึบและไม่พบโครงสร้างของ nucleolus (ภาพที่ 3)

ระยะที่ 4 Fully development stage ในระยะนี้มีจำนวนเซลล์ภายในต่อมมากกว่าระยะที่ผ่านมา นอกจากนั้นเกือบทุกเซลล์สามารถพบโครงสร้างของ nucleolus และในระยะนี้เริ่มเกิดขบวนการเปลี่ยนแปลงอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ไปเป็นอวัยวะโดยสามารถพบโครงสร้างของ spermatogenic lobule ในอวัยวะ ดังนั้นต่อม androgenic ในระยะนี้คาดว่าน่าจะสร้างสารประกอบชีวภาพอีกรูปแบบหนึ่งมาควบคุมขบวนการพัฒนาอวัยวะ (ภาพที่ 4)

นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถใช้ความยาวเปลือกส่วนหัวเป็นตัวชี้วัดในการจำแนกระยะการพัฒนาต่อม androgenic ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยลูกกึ่งที่มีต่อม androgenic ในระยะที่ยังไม่เสร็จสิ้นขบวนการพัฒนา (ระยะการพัฒนา Initial, Early และ Intermediate development stage) จะมีความยาวเปลือกส่วนหัวเท่ากับ 0.38 ± 0.07 , 0.44 ± 0.07 และ 0.56 ± 0.06 เซนติเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ลูกกึ่งที่มีต่อม androgenic ที่อยู่ในระยะ Fully development stage จะมีความยาวเปลือกส่วนหัวเท่ากับ 0.73 ± 0.04 เซนติเมตร ดังนั้นลักษณะที่เหมาะสมของลูกกึ่งก้ามกรามสำหรับการผลิตแม่พันธุ์ neofemale ควรมีความยาวเปลือกส่วนหัวที่น้อยกว่า 0.6 เซนติเมตร

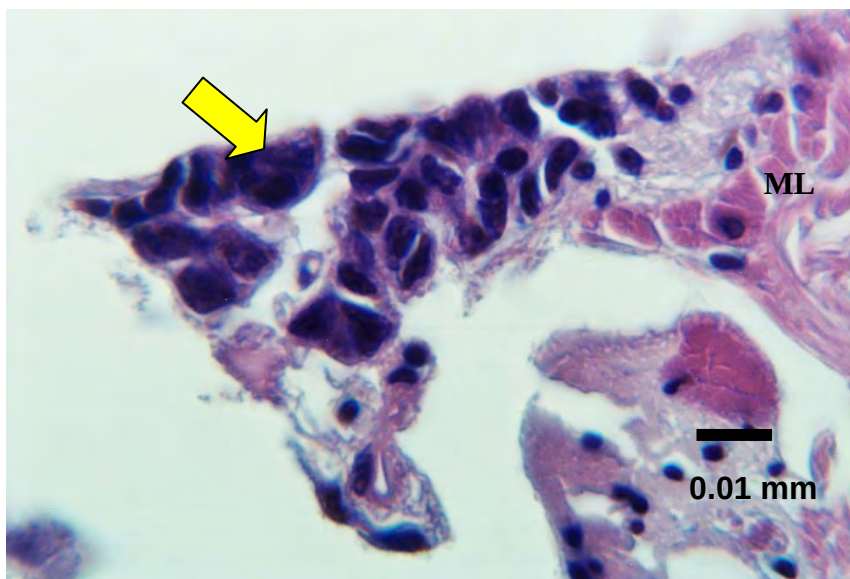


ภาพที่ 1 A. แสดงลักษณะของต่อม androgenic ในระยะ initiation stage (ศรีษี) (x100)
 B. แสดงลักษณะของ อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ในลูกกึ่งกำกรมที่มีต่อม androgenic อยู่
 ในระยะ initiation stage (ศรีษี) HP: hepatopancreas (x100)



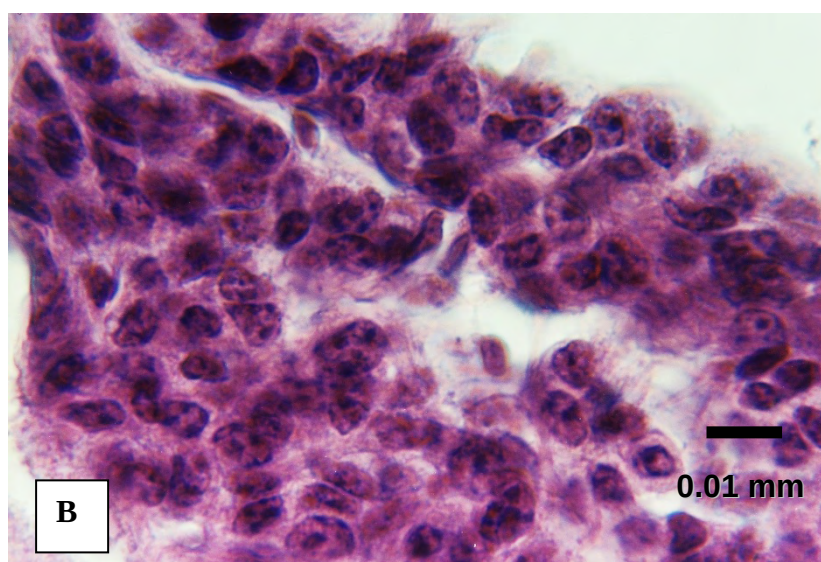
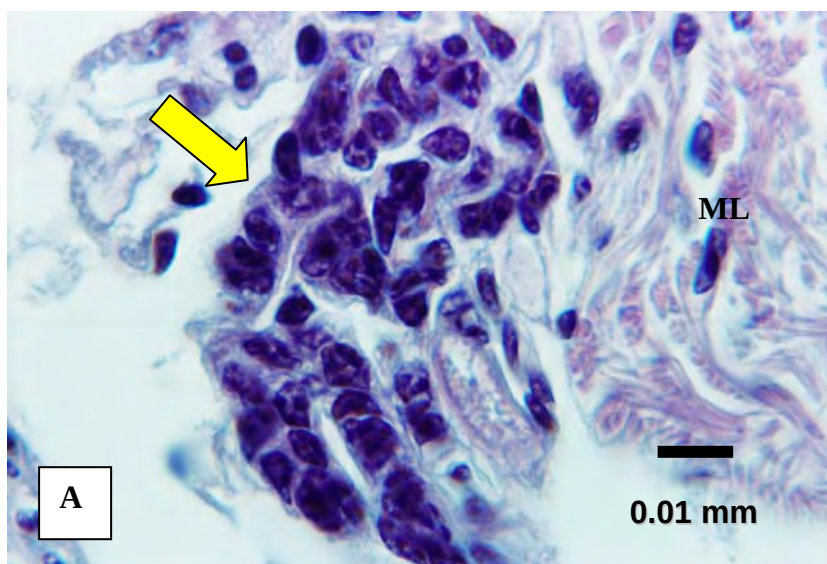
ภาพที่ 2 A. แสดงลักษณะของต่อม androgenic ในระยะ Early development stage (ครี) LU: lumen (x100)

B. แสดงลักษณะของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในลูกกุ้งก้ามกรามที่มีต่อม androgenic อยู่ในระยะ Early development stage (x100)



ภาพที่ 3 แสดงลักษณะของต่อม androgenic ในระยะ Intermediate development stage (ครี) (ครี)

ML: muscular layer



ภาพที่ 4 **A.** แสดงลักษณะของต่อม androgenic ในระยะ Fully development stage (ครีซ)
 ML: muscular layer
B. แสดงแสดงลักษณะของต่อม androgenic ในลูกกุ้งก้ามกรามที่พัฒนาเข้าสู่ระยะที่สามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้

รายงานเรื่องนี้ส่งไปตีพิมพ์ในวารสาร Aquaculture แต่ได้รับคำแนะนำให้เก็บข้อมูลเพิ่มเติม ซึ่งไม่สามารถทำได้เสร็จทันรายงานฉบับนี้ แต่มั่นใจว่าจะสามารถตีพิมพ์ได้อย่างแน่นอน

1.2 Estimation of Heritability of Economically Important Traits in Giant Freshwater Prawn

น.ส.นิสรา กิจเจริญ และ ศาสตราจารย์อุทัยรัตน์ ณ นคร

ในการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการคัดเลือก (selection) นั้น จำเป็นต้องมีข้อมูลค่าสัดส่วนความแปรปรวนอันเนื่องมาจากยีนผลบวก (additive genetic variance) ซึ่งเป็นค่าที่จะบอกว่า ลักษณะที่ต้องการปรับปรุงนั้นจะตอบสนองต่อการคัดเลือกดีหรือไม่ หรืออีกนัยหนึ่ง วิธีการแบบใดจึงจะเหมาะสม ค่าที่บอกถึงสัดส่วนความแปรปรวนของยีนผลบวก เรียกว่า “อัตราพันธุกรรม (heritability, h^2)” แม้จะมีการศึกษาค่า h^2 ในกุ้งก้ามกรามอยู่บ้าง แต่ค่าเหล่านี้จะขึ้นกับประชากรที่ศึกษา และมีปัจจัยความแปรปรวนของสิ่งแวดล้อมมาเกี่ยวข้องด้วยเช่นกัน นอกจากนั้นผลการศึกษาที่ผ่านมา มักใช้วิธีการดั้งเดิม (การวิเคราะห์โดย Analysis of Variance) ซึ่งผลการศึกษาที่ได้จะไม่น่าเชื่อถือหากจำนวนครอบครัวที่ใช้ไม่มากพอ ซึ่งในการศึกษาทั่วไปจะประสบปัญหาไม่สามารถเลี้ยงกุ้งจำนวนมากๆเช่นนั้นได้ ในการศึกษาครั้งนี้ ได้นำวิธีการ BLUP (Best Linear Unbiased Prediction) มาใช้ในกุ้งก้ามกรามเป็นครั้งแรก การศึกษาเน้นค่า h^2 ของอัตราการเจริญเติบโตที่อายุ 2 เดือน ซึ่งเป็นระยะที่กุ้งยังไม่แสดงความแตกต่างระหว่างเพศ และที่อายุ 5 เดือนหลังจากนั้น โดยศึกษาจากข้อมูลรวมเพศ และแยกเพศ โดยมีวิธีการศึกษาและผลโดยย่อดังนี้

อุปกรณ์และวิธีการ

ผสมพันธุ์กุ้งตามแผนการทดลองแบบ Nested design โดยใช้พ่อจำนวน 7 ตัว (พ่อ 1 ตัวผสมกับแม่ 2-3 ตัว) ได้ครอบครัวที่มีเป็นลูกร่วมพ่อ-และแม่ทั้งสิ้น 16 full sib families โดยจัดเป็นครอบครัวร่วมพ่อต่างแม่ (half sib families) 8 ครอบครัว

เริ่มทำการชั่งวัด เมื่อลูกกุ้งมีอายุ 2 เดือนหลังจากนั้น โดยวัดความยาวคาราแพซ (Carapace length) และชั่งน้ำหนักตัว (Total weight) ทำการชั่งวัดเดือนละ 1 ครั้ง

นำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลตามวิธีการของ Sokal และ Rohlf (1981) ซึ่งมีโมเดลดังนี้

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_{ij} + \gamma_k + \square_{ijkl}$$

โดย Y_{ijk} = ค่าสังเกตของลักษณะน้ำหนักของกุ้งตัวที่ k ที่เกิดจากแม่ตัวที่ j ภายในพ่อตัวที่ i

μ = น้ำหนักเฉลี่ยทั้งหมด

α_i = อิทธิพลของพ่อตัวที่ i

β_{ij} = อิทธิพลของแม่ตัวที่ j ภายในพ่อตัวที่ i

γ_k = อิทธิพลของซ้ำที่ k

$\square_{ijkl}$ = ค่าความคลาดเคลื่อน (error term)

จากการวิเคราะห์ข้อมูลตามวิธีการของ Becker (1984) เพื่อประเมินค่าอัตราพันธุกรรม ดังนี้

1. ประเมินจากความแปรปรวนของพ่อพันธุ์ (sire component)

$$\text{ตามสมการ : } h^2_s = 4 \sigma^2_s / (\sigma^2_s + \sigma^2_d + \sigma^2_w)$$

2. ประเมินจากความแปรปรวนของแม่พันธุ์ (dam component)

$$\text{ตามสมการ : } h^2_d = 4 \sigma^2_d / (\sigma^2_s + \sigma^2_d + \sigma^2_w)$$

3. ประเมินจากความแปรปรวนของพ่อและแม่พันธุ์ (sire + dam component)

$$\text{ตามสมการ : } h^2_{s+d} = 2\sigma^2_{s+d} / (\sigma^2_s + \sigma^2_d + \sigma^2_w)$$

ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error, S.E.) ของค่าอัตราพันธุกรรมคำนวณได้ตามวิธีการของ Becker (1984)

ผลการศึกษา

ค่า h^2 ที่คำนวณจากข้อมูลที่ซึ่งวัด ณ อายุกึ่งต่าง ๆ กันได้ มีค่าแปรปรวนมาก เมื่ออายุ 2 เดือน หลังกว่า ค่า h^2 ของลักษณะความยาวหัว (carapace length, CL) มีค่าเท่ากับ 0.35 ± 0.15 และลักษณะ น้ำหนักตัว (BW) มีค่า h^2 เท่ากับ 0.26 ± 0.13 ซึ่งมีค่าสูงกว่าที่คำนวณจากข้อมูลซึ่งวัดเมื่ออายุ 5 เดือน หลังกว่า (ข้อมูลทะเลเทศ) อย่างไรก็ตามเมื่อแยกข้อมูลตามเพศ ค่า h^2 ที่คำนวณจากข้อมูลเพศเมียมีค่า สูงกว่าค่าที่คำนวณจากข้อมูลเพศผู้ (h^2 สำหรับความยาวหัว = 0.26 ± 0.16 ในเพศเมีย เทียบกับ 0.10 ± 0.06 ในเพศผู้; h^2 สำหรับน้ำหนักตัว = 0.28 ± 0.17 ในเพศเมีย เทียบกับ 0.12 ± 0.08 ในเพศผู้; h^2 สำหรับความยาวลำตัว = 0.40 ± 0.17 ในเพศเมีย เทียบกับ 0.11 ± 0.07 ในเพศผู้; h^2 สำหรับความยาว ทั้งหมด = 0.47 ± 0.18 ในเพศเมีย เทียบกับ 0.11 ± 0.07 ในเพศผู้; h^2 สำหรับความยาวก้าม = 0.29 ± 0.16 ในเพศเมีย เทียบกับ 0.03 ± 0.04 ในเพศผู้) ค่าที่ได้มีแนวโน้มเช่นเดียวกันที่อายุ 6 เดือนหลังกว่า ผลที่ได้ ไม่ต่างกันเมื่อทดลองเลี้ยงกึ่งแบบเลี้ยงรายตัว และเลี้ยงรวมครอบครัว (ครอบครัวละ 1 ป่อ)

ข้อมูลนี้แสดงว่าการคัดเลือกมีศักยภาพที่จะทำให้ได้กุ้งที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ทั้งนี้ควรคัดเลือกเมื่อ อายุ 2 เดือน หรือเมื่อกุ้งเริ่มแสดงความแตกต่างระหว่างเพศแล้ว ก็ให้ทำการคัดเลือกในกุ้งเพศเมีย รายงานฉบับนี้ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

Kitcharoen, N., Rungsin, W., Koonawootrittiron, S., Na-Nakorn, U. 2011. Heritability for growth traits in Giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Mann 1879) based on BLUP method. Aquaculture Research 2011: 1-7. Doi:10.1111/j.1365-2109.2011.02796.x (2010 IF = 1.186)

1.3 Effects of selection for growth performed on females of different maturing batches

น.ส.นิสรา กิจเจริญ และ ศาสตราจารย์อุทัยรัตน์ ณ นคร

โครงการนี้สืบเนื่องมาจากรายงานของ Doyle et al. (1983) ซึ่งตีพิมพ์ผลจากการคำนวณว่า การที่เกษตรกรไทยคัดแม่พันธุ์กุ้ง (ซึ่งมีไข่ที่ผสมแล้วติดท้อง) จากกุ้งชุดที่เจริญพันธุ์ช้า ไปเป็นพ่อแม่พันธุ์ มีผลให้ได้กุ้งโตช้าไปทำพันธุ์ ทั้งนี้เกษตรกรทำไปโดยเข้าใจว่า กุ้งที่เจริญพันธุ์เร็วนั้นมีขนาดเล็กจึงน่าจะไม่เป็นแม่พันธุ์ที่ดี

อุปกรณ์และวิธีการ

ใช้กุ้งก้ามกรามจากการทดลองที่ 1.2 โดยนำกุ้งแต่ละครอบครัว (16 ครอบครัว) มาเลี้ยงแยกครอบครัวละ 1 บ่อ เมื่อเริ่มพบกุ้งเพศเมียที่มีไข่ติดหน้าท้อง (อายุ 6-7 เดือนหลังคว่ำ) เก็บกุ้งที่เจริญพันธุ์เหล่านั้นมาติดเครื่องหมายและเลี้ยงไว้ต่อไป ทำเช่นเดียวกันนี้กับกุ้งที่มีไข่ติดท้องในรุ่นที่ 2 (8-9 เดือน) รุ่นที่ 3 (10-11 เดือน) และรุ่นที่ 4 (10-11 เดือน) คัดเลือกกุ้งที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในแต่ละชุดมา 10% จากนั้นผสมพันธุ์กับเพศผู้ที่สุ่มมาจากบ่อเลี้ยง โดยผสมไขว้ระหว่างครอบครัว ภายในแต่ละชุดการเจริญพันธุ์ เมื่อได้ลูกกุ้ง นำมาอนุบาลและเลี้ยงเปรียบเทียบกันระหว่างชุด วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธี Analysis of variance เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี t-test

ผลการทดลอง

กุ้งทดลองเริ่มเจริญพันธุ์และมีไข่ติดหน้าท้องเมื่ออายุได้ 6-7 เดือนหลังคว่ำ โดยจำนวนกุ้งที่เจริญพันธุ์ในรุ่นแรก คิดเป็น 18.18–21.43% ของแม่กุ้งแต่ละครอบครัว ส่วนชุดที่ 2 เจริญพันธุ์เมื่ออายุ 8 เดือน คิดเป็น $31.49 \pm 1.14\%$ ของแม่กุ้งแต่ละครอบครัว ส่วนชุดที่ 3 เจริญพันธุ์เมื่ออายุ 9 เดือน คิดเป็น $14.11 \pm 0.91\%$ และชุดที่ 4 เจริญพันธุ์เมื่ออายุ 10-11 เดือน คิดเป็น $17.66 \pm 2.31\%$ ของแม่กุ้งแต่ละครอบครัว โดยมีกุ้งจำนวนหนึ่งที่ไม่สร้างไข่เลย จากการชั่งวัดเปรียบเทียบระหว่างกุ้งที่เจริญพันธุ์ กับที่ยังไม่เจริญพันธุ์ พบว่าชุดที่เจริญพันธุ์มีขนาดใหญ่กว่า เมื่อเปรียบเทียบขนาดของลูกกุ้งที่ได้จากแม่แต่ละชุด พบว่าลูกกุ้งจากแม่ที่เจริญพันธุ์ชุดแรก มีขนาดใหญ่ที่สุด ผลการทดลองนี้เป็นการยืนยันการประเมินของ Doyle et al. (1983) ดังนั้นจึงต้องแนะนำให้เกษตรกรเปลี่ยนวิธีการในการคัดแม่กุ้ง โดยให้คัดกุ้งที่เจริญพันธุ์รุ่นแรกไปเป็นแม่พันธุ์

รายงานฉบับนี้ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

Kitcharoen, N., Rungsin, W., Koonawootrittiron, S., Na-Nakorn, U. 2010. Selection of brooders from the early maturing freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Mann 1879) resulted in better growth rate of offspring than those selected from the late maturing. **Aquaculture** 306: 362 – 364. (2010 IF = 2.044)

1.4 Stock Evaluation and Assessing Reproductive Success of Male Broodstock of Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*

รศ.ดร.สุภาวดี พุ่มพวง และนายรัชพล การะเกตุ

โครงการปรับปรุงพันธุ์กรรมสัตว์น้ำเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ปลา และกุ้งทะเล ได้นำเทคโนโลยีลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาใช้ในการจำแนกครอบครัว จำแนกสายพันธุ์และจัดทำพันธุ์ประวัติ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายชีวภาพของสัตว์น้ำแต่ละตัว ทำให้สามารถเลี้ยงสัตว์น้ำตั้งแต่ระยะวัยอ่อนรวมในบ่อเดียวกันหลายสายพันธุ์และหลายครอบครัวและลดจำนวนบ่อเลี้ยงได้มาก โดยทั่วไปการคัดเลือกสัตว์น้ำโดยดูลักษณะครอบครัว ต้องใช้บ่อจำนวนมากและแรงงานในการเลี้ยงสัตว์น้ำแยกครอบครัว ทำให้เสียค่าใช้จ่ายสูงมาก เช่นเดียวกับการทดสอบลักษณะผลผลิตที่เกี่ยวกับการเจริญเติบโตของสายพันธุ์ต่างๆ ที่ต้องแยกบ่อเลี้ยง ทั้งนี้เป็นเพราะการทำเครื่องหมายเพื่อแยกครอบครัวและสายพันธุ์ในสัตว์น้ำวัยอ่อนทำได้ยากมาก การเลี้ยงสัตว์น้ำแยกบ่อทำให้ไม่สามารถแยกผลของสิ่งแวดล้อม ออกจากผลที่เกิดจากพันธุ์กรรม ค่าพารามิเตอร์และผลการทดสอบสายพันธุ์จึงมีความคลาดเคลื่อนสูง ในกุ้งก้ามกรามได้มีการพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพสูงและได้มีการนำไปใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุ้งก้ามกรามสายพันธุ์ต่างๆ

วัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยคือ การประเมินคุณค่าของไมโครแซทเทลไลท์เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายชีวภาพ สำหรับทดสอบสายพันธุ์กุ้งก้ามกรามและประเมินความสามารถในการผสมพันธุ์ของกุ้งเพศผู้ โดยมีวัตถุประสงค์ย่อยดังนี้ 1) คัดเลือกไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่งที่เหมาะสมสำหรับใช้ระบุสายพันธุ์กุ้งก้ามกรามที่เลี้ยงรวมในบ่อ 2) เปรียบเทียบลักษณะการเจริญเติบโตในระยะวัยรุ่นของกุ้งสามสายพันธุ์ และ 3) ใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ศึกษาความสามารถในการผสมพันธุ์ของกุ้งเพศผู้

ไมโครแซทเทลไลท์เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพสำหรับการศึกษาเกี่ยวกับการจำแนกชนิดและการระบุประชากรและสายพันธุ์ และมีการพัฒนาโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับทดสอบการระบุสายพันธุ์ด้วยขั้นตอนการแก้ปัญหาหลายๆแบบที่มีหลักการเดียวกันคือ ใช้ข้อมูลจีโนไทป์และการทดสอบทางสถิติเพื่อระบุประชากรหรือสายพันธุ์ต้นกำเนิดของสมาชิกแต่ละตัว ในการทดลองนี้ใช้โปรแกรม GENECLASS 2 ซึ่งมีความเหมาะสมกับสายพันธุ์กุ้งก้ามกรามจากโรงเพาะฟัก เนื่องจากโปรแกรมนี้ไม่ได้กำหนดเรื่องสมดูลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กของประชากร ผลการระบุสายพันธุ์ด้วยวิธี Simulation-exclusion ปรากฏว่าความถูกต้องของการระบุสายพันธุ์แก่สมาชิกทุกตัวมีค่าสูง (90% ที่ความน่าจะเป็นน้อยกว่า 0.05) และค่าดังกล่าวเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย (88%) ที่ระดับความน่าจะเป็นน้อยกว่า 0.01 และ 0.001

ปัจจัยที่กำหนดประสิทธิภาพของวิธีการระบุสายพันธุ์มีหลายประการ เช่น ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (F_{ST}) จำนวนและขนาดประชากรที่ศึกษา และจำนวนตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าประสิทธิภาพของการระบุสายพันธุ์มีค่าสูงถ้าความแตกต่างระหว่างประชากร (F_{ST}) มากกว่า 0.1 และจำนวนประชากรที่ศึกษาเพียง 2 ประชากรที่มีขนาดใหญ่

(หรือมากกว่า 50 ตัวอย่าง) และใช้ไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่งที่มีมากกว่า 10 อัลลิล การเลือกไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่งที่เหมาะสม จะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอในขณะที่ความถูกต้องของการระบุสายพันธุ์ยังคงมีค่าสูง การจำลองสถานการณ์ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ 127 ชุด พบว่าการใช้ชุดเครื่องหมาย 4 ตำแหน่งคือ *Mbr-1* *Mbr-2* *Mbr-3* และ *Mbr-8* ให้ความถูกต้องของการระบุสายพันธุ์ใกล้เคียงกับผลการทดสอบด้วยไมโครแซทเทลไลท์ 7 ตำแหน่ง

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสามารถนำระบบการเลี้ยงรวมสายพันธุ์เพื่อทดสอบสายพันธุ์กึ่งก้ามกรามสำหรับลักษณะการเจริญเติบโตเนื่องจากไม่มีการแข่งขันระหว่างสายพันธุ์ แต่ระบบการเลี้ยงรวมสายพันธุ์ไม่เหมาะสมสำหรับการทดสอบอัตรารอด เนื่องจากพฤติกรรมการกินกันเองของกึ่งก้ามกราม ส่วนการระบุสายพันธุ์ด้วยไมโครแซทเทลไลท์เพียง 4 ตำแหน่ง สามารถลดจำนวนปฏิกิริยาพีซีอาร์และค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ถึง 45%

การศึกษาความสามารถในการผสมพันธุ์ของกึ่งเพศผู้ 3 ลักษณะ คือ กึ่งก้ามน้ำเงิน (Blue claw) กึ่งก้ามทอง (Orange claw) และกึ่งSM (Small male) มีแผนการทดลองดังนี้ ปล่อยกึ่งเพศผู้และเพศเมียที่ผ่านการวิเคราะห์จีโพอัฟด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์แล้วทุกตัวในบ่อซีเมนต์ และกำหนดอัตราส่วนเพศแบบต่างๆ คือ แบบที่หนึ่ง ปล่อยกึ่งเพศผู้ลักษณะละ 1 ตัว ทั้งสามลักษณะ และกึ่งเพศเมีย 12 ตัว แบบที่สอง ปล่อยกึ่งเพศผู้ลักษณะละ 1 ตัว ทั้งสามลักษณะ และกึ่งเพศเมีย 3 ตัว และแบบที่สาม ปล่อยกึ่งเพศผู้ลักษณะละ 1 ตัว ทั้งสามลักษณะ และกึ่งเพศเมีย 1 ตัว การผสมพันธุ์แต่ละแบบทำซ้ำ 7 บ่อ เมื่อกึ่งตัวเมียได้รับการผสมแล้วจะแยกมาเลี้ยงในถังฟักถึงละ 1 ตัว สุ่มลูกกึ่ง 10 ตัวต่อแม่เพื่อวิเคราะห์จีโพอัฟและตรวจสอบพ่อแม่

ผลการทดลองพบว่ากึ่งก้ามน้ำเงินมีความสามารถในการผสมพันธุ์สูงที่สุด (54-71%) ในแผนการทดลองทั้งสามแบบและอัตราส่วนเพศไม่มีผลต่อความสามารถในการผสมพันธุ์ของกึ่งก้ามกราม และเมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนร่วม (Analysis of covariance) ของปัจจัยต่างๆ คือ ค่า Condition factor น้ำหนักตัว ความยาวลำตัว และความยาวของก้าม พบว่าปัจจัยข้างต้นไม่มีผลกระทบต่อความสามารถในการผสมพันธุ์ของกึ่งก้ามกรามเช่นกัน สรุปได้ว่ากึ่งก้ามน้ำเงิน มีความสามารถในการผสมพันธุ์สูงสุด และมีความเหมาะสมกว่ากึ่งลักษณะอื่น ในการเป็นพ่อพันธุ์ แต่มีรายงานว่ากึ่งก้ามน้ำเงินเมื่อผสมพันธุ์ไปแล้วปริมาณสเปิร์มจะลดลงโดยไม่มีการผลิตขึ้นมาทดแทนเหมือนกึ่งSM ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาว่ากึ่งก้ามน้ำเงินจะสามารถผสมพันธุ์ได้กี่ครั้งแล้วจะผสมไม่ติด

ผลการวิจัยได้ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้

Karaked, T., Poompuang, S., Na-Nakorn, U., Kamonrat, W., Hallerman, E.M. 2011.

DNA microsatellite-based evaluation of early growth performance among strains of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* de Man. *Aquaculture* 311: 115-122. (2010 IF = 2.044)

1.5 Application of Lignin on Inhibitory of *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus (MrNV) in Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*)

ดร.ประพันธ์ศักดิ์ ศิริชะภาภูมิ และนายสุวินัย ปานขาว

กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii* de Man 1879) เป็นกุ้งน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของโลกชนิดหนึ่ง เนื่องจากเป็นกุ้งที่มีขนาดใหญ่ รสชาติดี มีความต้องการของตลาดโลกอย่างต่อเนื่อง ในประเทศไทยเองก็ถือว่าเป็นหนึ่งในประเทศที่สำคัญในการผลิตที่มีมานานกว่า 40 ปี เนื่องจากมีความเหมาะสมทั้งทางด้านสภาพภูมิอากาศและภูมิประเทศในการเลี้ยง ทำให้ประเทศไทยนั้นสามารถผลิตกุ้งก้ามกรามได้เป็นอันดับต้น ๆ ของโลก อย่างไรก็ตาม ปัญหาก็เกิดโรคก็เป็นปัจจัยลบอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญ โดยเฉพาะในช่วง 2-3 ปีที่ผ่านมา ได้มีการรายงานการระบาดของโรคในกุ้งก้ามกรามที่เรียกว่า “White tail disease” โดยมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสชนิด *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus และ Extrasmall virus ซึ่งเกิดขึ้นในหลาย ๆ ประเทศเช่น ไต้หวัน จีน รวมทั้งพื้นที่ในเขต French West Indies และอินเดีย โดยพบการระบาดของโรคชนิดนี้ในกุ้งก้ามกรามขนาดเล็กและลูกกุ้งวัยอ่อนในบ่ออนุบาลในหลาย ๆ ซึ่งโรคดังกล่าวจะเป็นสาเหตุของการตายของลูกกุ้งอย่างรุนแรงโดยอาจถึง 80-100 เปอร์เซ็นต์ภายใน 3-4 วันเท่านั้น ลูกกุ้งที่เป็นโรคโดยเฉพาะลูกกุ้งก่อนเข้าสู่ระยะจะแสดงอาการกล้ามเนื้อบริเวณปล้องลำตัวขาวชून โดยเฉพาะบริเวณหาง และทยอยตายลงไปคราวละมาก ๆ จนถึงหมดบ่อ ซึ่งในประเทศไทยนั้นโรคชนิดดังกล่าวก็กำลังทำให้เกิดความเสียหายรุนแรงเช่นเดียวกัน และนับวันโรคชนิดนี้ยิ่งได้เพิ่มความเสียหายอย่างใหญ่หลวง จนทำให้โรงเพาะและอนุบาลในประเทศไทยโดยเฉพาะโรงเพาะในแถบภาคกลางเกษตรกรต้องหยุดกิจการลงกว่าครึ่ง และจำนวนลูกกุ้งที่ออกขายตามท้องตลาดก็ลดจำนวนลงอย่างมาก ส่งผลต่อเนื่องให้ลูกกุ้งที่เพาะได้และเหลือรอดมีราคาสูงและยังส่งผลต่อเนื่องให้พื้นที่การเลี้ยงในบ่อดินก็เริ่มลดลง เกษตรกรผู้เลี้ยงบางส่วนได้หยุดกิจกรรมการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามและหันไปเลี้ยงกุ้งทะเลชนิดอื่นแทน ทำให้ราคากุ้งก้ามกรามขนาดใหญ่มีราคาสูงขึ้นมากในปัจจุบัน นอกจากนี้เกษตรกรผู้เพาะและอนุบาลบางส่วนได้หันไปใช้ยาและสารเคมีชนิดใหม่ ๆ กันอย่างแพร่หลายแต่ก็ยังไม่สามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ ซ้ำยังทำให้เกิดการตกค้างในตัวกุ้ง รวมถึงสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติอีกด้วย

เพื่อเป็นการแก้ไขปัญหาดังกล่าว ผู้วิจัยจึงมีแนวความคิดที่จะใช้สารลิกนิน (Lignin) ซึ่งเป็น By-product ของอุตสาหกรรมการเผาไม้เพื่อเป็นเชื้อเพลิง โดยสารชนิดนี้จะเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเซลล์พืชขนาดใหญ่จัดเป็นสารอินทรีย์ที่ย่อยสลายได้ยาก มีความเป็นพิษต่อสัตว์น้อยมากเมื่อถูกเอนไซม์จะเปลี่ยนเป็นผงสีดำ ละลายน้ำได้ดี มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อน ๆ เมื่อละลายในน้ำ นอกจากนี้ในทางการแพทย์สารชนิดนี้ยังมีสรรพคุณทาง Biological activity ที่สำคัญคือ (1) เป็นสารที่ต่อต้านและยับยั้งการเจริญของเซลล์ที่ผิดปกติ (Antitumor activity) โดยเฉพาะเซลล์เนื้องอกหรือมะเร็ง (2) เป็นสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพให้โทษ (Antimicrobial activity) (3) เป็นสาร

ที่สามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการดักจับกินเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม โดยกระบวนการ Phagocytosis โดยเฉพาะ เซลล์ Monocyte, Neutrophil และ HL-60 (Activation of myeloperoxidase-positive cells) และที่สำคัญคือ (4) สารชนิดนี้ยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อโรคในกลุ่มไวรัส (Antiviral activity) โดยเฉพาะไวรัสที่เป็น RNA ไวรัส ซึ่งได้แก่ HIV, HSV, influenza virus, rotavirus, enterovirus ซึ่งเป็นผลมาจากสารลิกนินนี้มีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (Enzyme inactivation) เช่น Reverse transcriptase, RNA polymerase, poly (ADP-ribose) glycohydrolase เป็นต้น ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเห็นว่าสารลิกนินนี้น่าจะมีศักยภาพในการแก้ไขปัญหาที่เกิดจากไวรัส MrNV และ XSV ในกุ้งก้ามกราม ซึ่งหากการวิจัยเกิดผลสำเร็จ จะทำให้สามารถนำความรู้ดังกล่าวไปเผยแพร่ให้แก่เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงต่อไป และยังสามารถลดผลกระทบทางลบจากการใช้ยาและสารเคมีได้อีกทางหนึ่ง ซึ่งจะส่งผลให้ธุรกิจการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามสามารถดำเนินต่อไปได้อย่างเป็นระบบและยั่งยืนต่อไปในอนาคต

ระเบียบวิธีวิจัยอย่างสังเขป

1. การศึกษาประสิทธิภาพของลิกนินในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสในพ่อแม่พันธุ์กุ้งก้ามกราม (*In vitro*)

การศึกษาในส่วนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความสามารถของสารลิกนินในการยับยั้งเชื้อ MrNV และ XSV โดยการนำเอาสารลิกนินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มาผสมกับสารละลายที่มีไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้อยู่ แล้วนำไปฉีดพ่อแม่กุ้งก้ามกรามที่ปลอดโรค หลังจากนั้นทำการตรวจการปนเปื้อนของไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้ ด้วยเทคนิค RT-PCR ที่เวลาต่าง ๆ กัน

2. การศึกษาประสิทธิภาพของลิกนินในอาหารต่อการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสในแม่พันธุ์และลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน

การศึกษาส่วนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ประเมินประสิทธิภาพของสารลิกนินต่อการต้านทานเชื้อไวรัส โดยการผสมสารลิกนินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารให้แม่กุ้งก้ามกรามทดลองกิน หลังจากนั้นนำกุ้งทดลองกลุ่มต่าง ๆ มาทำการฉีดด้วย เชื้อไวรัส MrNV และ XSV หลังจากนั้นนำแม่กุ้งที่ได้ไปเลี้ยงร่วมกับกุ้งเพศผู้ปลอดโรคไวรัส เมื่อแม่กุ้งไข่แก่ นำแม่กุ้งไปเพาะและอนุบาลลูกกุ้งไว้อ่อนที่ได้ หลังจากนั้นนำลูกกุ้งที่ได้ในแต่ละแม่ไปตรวจสอบการปนเปื้อนของไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน รวมทั้งการนำเอาลูกกุ้งวัยอ่อนมาแช่ด้วยสารละลายไวรัสที่มีสารลิกนินละลายอยู่ในระดับต่าง ๆ ด้วย

3. การศึกษาประสิทธิภาพของลิกนินในอาหารต่อการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสในลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนระหว่างอนุบาล

การศึกษาในส่วนนี้จะนำแม่กุ้งไข่แก่ที่มีการติดเชื้อ MrNV และ XSV จำนวน 20 ตัว และแม่กุ้งไข่แก่ที่ไม่มีการติดเชื้อ MrNV และ XSV จำนวน 5 ตัว มาทำการเพาะลูกกุ้งในถังน้ำที่เค็มประมาณ 15 ppt ที่มีสารละลายลิกนินละลายอยู่ในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0-200 ppm เมื่อแม่กุ้งสลัดไข่แล้วทำการอนุบาลลูกกุ้งต่อไปจนถึงระยะคว่ำระหว่างนี้สังเกตอาการและอัตราการรอดตายของกุ้งในแต่ละกลุ่มเมื่ออนุบาลได้ 10 วัน ทำการสุ่มลูกกุ้งจำนวน 10 ตัว จากทุกแม่ รวมทั้งแม่กุ้งทุกตัวมาทำการสกัด Total

RNA ด้วย Trizol Reagent และนำ Total RNA ที่ได้ไปสังเคราะห์ First-strand cDNA และทดสอบการติดเชื้อด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ Specific primers ต่อไวรัส MrNV และ XSV ระหว่างการอนุบาลให้ สุ่มนับจำนวนลูกกุ้งตั้งแต่เริ่มฟักไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง สังเกตและบันทึกอัตราการตายของกุ้งในแต่ละกลุ่ม หากพบว่ากุ้งแสดงอาการของโรคให้นำลูกกุ้งไปตรวจวินิจฉัยโรคด้วยเทคนิค RT-PCR และ ยืนยันผลด้วยการนำลูกกุ้งที่ป่วยไปตรวจวินิจฉัยโรคด้วยวิธีเนื้อเยื่อพยาธิวิทยา (Histopathology)

ผลการศึกษา

1) การศึกษาประสิทธิภาพของลูกนินในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสในพ่อแม่พันธุ์ ก้ามกราม (*In vitro*)

การศึกษาในส่วนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความสามารถของสารลูกนินในการยับยั้ง เชื้อ MrNV และ XSV โดยการนำเอาสารลูกนินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มาผสมกับสารละลายที่มีไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้อยู่ แล้วนำไปฉีดพ่อแม่พันธุ์ก้ามกรามที่ปลอดโรค หลังจากนั้นทำการตรวจการ ปนเปื้อนของไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้ ด้วยเทคนิค RT-PCR ที่เวลาต่าง ๆ กัน พบว่าการฉีด ไวรัส ร่วมกับลูกนินที่ระดับความเข้มข้น 5, 25 และ 50 ppm มีผลทำให้พ่อแม่พันธุ์ก้ามกรามในวันที่ 7, 15, 30, 60 มีอัตราการปนเปื้อนน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตาม เมื่อเข้าสู่วันที่ 90 กลับปรากฏว่า กุ้งทุกกลุ่มมีอัตราการปนเปื้อนเชื้อไวรัสแตกต่างกันอย่างไม่มี นัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยพบว่ากุ้งที่ได้รับ ไวรัสเพียงอย่างเดียวกลับไม่มีการปนเปื้อนของ ไวรัสเลย เช่นเดียวกับกุ้งในกลุ่มอื่น ๆ

2) การศึกษาประสิทธิภาพของลูกนินในอาหารต่อการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสในแม่พันธุ์ และลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน

การศึกษาส่วนนี้ได้ทำการประเมินประสิทธิภาพของสารลูกนินต่อการต้านทานเชื้อไวรัส โดยการ ผสมสารลูกนินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารให้แม่กุ้งก้ามกรามทดลองกิน หลังจากนั้นนำกุ้งทดลองกลุ่มต่าง ๆ มาทำการฉีดด้วย เชื้อไวรัส MrNV และ XSV หลังจากนั้นนำแม่กุ้งที่ได้ไปเลี้ยงร่วมกับกุ้งเพศผู้ปลอดโรค ไวรัส เมื่อแม่กุ้งไข่แก่ให้นำแม่กุ้งไปเพาะและอนุบาลลูกกุ้งไว้อ่อนที่ได้ หลังจากนั้นนำลูกกุ้งที่ได้ในแต่ละแม่ ไปตรวจสอบการปนเปื้อนของไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน โดยพบว่าแม่กุ้งที่ได้รับ สารลูกนินในอาหารให้ลูกที่มีการปนเปื้อนในอัตราที่สูง เช่นเดียวกับลูกกุ้งที่ได้จากแม่กุ้งในกลุ่มควบคุมที่ ได้รับอาหารไม่ผสมลูกนิน โดยไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$)

3. การศึกษาประสิทธิภาพของลูกนินในอาหารต่อการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสในลูกกุ้งก้ามกราม วัยอ่อนระหว่างอนุบาล

การศึกษาในส่วนนี้จะนำแม่กุ้งไข่แก่ที่มีการติดเชื้อ MrNV และ XSV จำนวน 20 ตัว และแม่กุ้ง ไข่แก่ที่ไม่มีการติดเชื้อ MrNV และ XSV จำนวน 5 ตัว มาทำการเพาะลูกกุ้งในถังน้ำที่เค็มประมาณ 15 ppt ที่มีสารละลายลูกนินละลายอยู่ในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0-200 ppm เมื่อแม่กุ้งสลัดไข่แล้วทำ การอนุบาลลูกกุ้งต่อไปจนถึงระยะคร่าระหว่างนี้สังเกตอาการและอัตราการรอดตายของกุ้งในแต่ละกลุ่ม เมื่ออนุบาลได้ 10 วัน ทำการสุ่มลูกกุ้งจำนวน 10 ตัว จากทุกแม่ จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ลูกกุ้ง ก้ามกรามที่ได้จากแม่กุ้งติดเชื้อ ไวรัสทั้ง 2 ชนิด ซึ่งทำการเพาะและอนุบาลในน้ำที่มีสารละลายลูกนินอยู่

ตั้งแต่ 25-200 ppm มีอัตราการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ณ เวลา 10 และ 20 วัน หลังจากฟักเป็นตัว

อย่างไรก็ตาม เนื่องจากมีผลการวิจัยรายงานว่ากิ้งก่ามกรมสามารถกำจัดไวรัสทั้งสองชนิดนี้ได้ด้วยตนเองอีกทางหนึ่ง จึงจำเป็นต้องทำการศึกษาต่อไปในรายละเอียดว่าผลการทดลองนี้เกิดจากลักษณะหรือไม่ ทำให้ยังไม่สามารถตีพิมพ์ผลการศึกษานี้ในขณะนี้ได้

2. โครงการย่อยที่ 2 ปลากระพงขาว

2.1 Genetic Relatedness of Domestic Strains of Asian Seabass (*Lates calcarifer*) in Thailand Inferred from Microsatellite Genetic Markers

ดร.วันศุกร์ เสนานาญ นางสาวสุภาพร สอนแก้ว ศาสตราจารย์ ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร

ปลากระพงขาว (*Lates calcarifer*) เป็นปลาทะเลเศรษฐกิจในระดับชาติ และนานาชาติ และมีแนวโน้มความต้องการของตลาดที่เพิ่มขึ้นไม่ว่าจะเป็นปลาเนื้อสำหรับการบริโภค หรือลูกปลา แม้ว่าในปัจจุบันจะมีการผลิตพ่อแม่พันธุ์ปลากระพงขาวจากบ่อเลี้ยง หรือกระชัง ได้ในปริมาณมาก แต่ก็มีข้อความเป็นห่วงในด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรโรงเพาะฟักเหล่านี้ เนื่องจากไม่สามารถติดตามความสายสัมพันธ์ของปลาเหล่านี้ได้ นอกจากนี้เกษตรกรยังเริ่มสังเกต ความถดถอยของบางลักษณะ เช่น การเจริญเติบโตช้า การพัฒนากระดูก ของปลาในระบบการเพาะเลี้ยง ซึ่งอาจเป็นผลจากการผสมเลือดชิดเป็นเวลานาน

เทคนิคการเพาะเลี้ยงปลากระพงขาวของประเทศไทยมีความรู้ตื้นเขินไปมาก และมีการการเพาะขยายพันธุ์ปลากระพงขาวในโรงเพาะฟักมานานกว่า 30 ปี ดังนั้นข้อขัดข้องหนึ่งของการพัฒนาอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงนี้คือ การขาดแคลนสายพันธุ์ที่ปรับปรุงแล้ว ปลากระพงขาวเป็นปลาทะเล ที่มีศักยภาพพร้อมสำหรับการปรับปรุงพันธุ์หลายประการ กล่าวคือเกษตรกรสามารถเลี้ยงปลาชนิดนี้ได้จนครบวงจรจากระยะวัยอ่อน จนถึงพ่อแม่พันธุ์ได้ แม้ว่าการเพาะพันธุ์ การอนุบาล และการเลี้ยงปลาเนื้อ จะทำโดยเกษตรกรคนละกลุ่มก็ตาม และการลงทุนปรับปรุงสายพันธุ์ น่าจะมีความคุ้มค่า เนื่องจากอุตสาหกรรมโดยภาพรวมมีความเข้มแข็ง และมีความต้องการทางการตลาดที่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ดังนั้นข้อมูลด้านพันธุกรรมของประชากรโรงเพาะฟักที่มีอยู่ และในธรรมชาติจึงมีความสำคัญสำหรับการวางแผนการปรับปรุงพันธุ์ และการอนุรักษ์พันธุกรรมของปลาชนิดนี้ในธรรมชาติ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ คือการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ภายในกลุ่มประชากรโรงเพาะฟัก เทียบกับประชากรธรรมชาติ และ ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากร ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ 11 ตำแหน่ง ทั้งนี้ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการติดตามผลกระทบทางพันธุกรรมที่เกิดจากการจัดการพ่อแม่พันธุ์ในระยะเวลากว่า 30 ปีที่ผ่านมา และเพื่อประเมินว่าประชากรโรงเพาะฟักที่มีอยู่ในปัจจุบัน ซึ่งทนสภาพการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้ดี จะมีศักยภาพในการเป็นทรัพยากรทางพันธุกรรมในการสร้างประชากรฐานสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ได้หรือไม่ การศึกษาในครั้งนี้ได้ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรโรงเพาะฟัก 7 แหล่ง คือ ได้แก่ โรงเพาะฟักเอกชน จ.ชลบุรี (CHN), ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง จ.ระยอง (ศพข.ระยอง) ซึ่งประกอบด้วย 2 รุ่นคือ รุ่นพ่อแม่ (RACF) และปลาที่ผ่านการคัดพันธุ์ รุ่นลูก F1 (RFCF-F1), ศพข. นครศรีธรรมราช (NKCF), ศพข. สงขลา (SKCF) สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง (NICA) และ ศพข. สตูล (STCF) และจากธรรมชาติ 3 แหล่ง ได้แก่ จันทบุรี (CHT), ตราด (TRT) และ นครศรีธรรมราช (NST) นอกจากนี้ผู้วิจัยยังประเมินผลกระทบจากการทดลองคัดพันธุ์ของ ศพข.

ระยอง โดยเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลารุ่นลูก (RACF-F1) กับรุ่นพ่อแม่ (RACF) และประชากรอื่นๆ

ผลการวิจัย

เครื่องหมายพันธุกรรมทุกตำแหน่ง (11 ตำแหน่ง) มีสภาวะหลากหลายรูปแบบ ในทุกประชากร โดยมีจำนวนรวมอัลลีล 203 อัลลีล ค่าเฉลี่ยอัลลีลต่อตำแหน่งในแต่ละประชากร มีค่า 7.27 (RACF-F1) ถึง 13.0 (NST) ค่าเฉลี่ย allelic richness ระหว่าง 6.99 (RACF-F1) ถึง 11.27 (NST) และค่า expected heterozygosity (H_e) มีค่าระหว่าง 0.66 (RACF-F1) และ 0.80 (SKCF) (ตารางที่ 1)

เมื่อพิจารณาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแต่ละประชากร ในประชากรธรรมชาติ ทุกตัวอย่างมีความหลากหลายใกล้เคียงกัน (มีจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งเฉลี่ย = 11.36 - 13.0 ค่า allelic richness = 9.75 - 11.27 และ ค่า observed heterozygosity (H_o) = 0.77-79) ในขณะที่ตัวอย่างโรงเพาะฟัก (ไม่รวม RACF-F1) มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำกว่าประชากรธรรมชาติเล็กน้อย แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) (จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งเฉลี่ย = 8.91-11.91 ค่า allelic richness = 8.09-10.66 และค่า H_o = 0.78-0.81) ประชากรโรงเพาะฟัก RACF-F1 มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำที่สุด ($P < 0.05$) นอกจากนี้ ค่า effective population size (N_e) ของประชากรโรงเพาะฟักส่วนใหญ่มีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ประเมินได้ในประชากรธรรมชาติ ยกเว้น RACF-F1 และ ประชากรสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง NICA ที่มีค่า N_e เท่ากับ 7.8 และ 17.4 ตามลำดับ ซึ่งค่า N_e ของ RACF-F1 เป็นค่าที่ลดลงจากรุ่นพ่อแม่ RACF กว่า 10 เท่าตัว

เมื่อทดสอบความเบี่ยงเบนของสัดส่วนจีโนไทป์ที่สังเกต จากสัดส่วนภายใต้สภาวะสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก พบว่าเครื่องหมายพันธุกรรมเกือบทุกตำแหน่งในเกือบทุกประชากร มีสัดส่วนของจีโนไทป์เป็นไปตามค่าที่คาดหวังตามสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก โดยมีเพียง 6 จาก 110 การทดสอบที่เบี่ยงเบนไปจากสมดุล ความเบี่ยงเบนส่วนใหญ่ (5 การทดสอบ) พบในตัวอย่างจากโรงเพาะฟักศพข. ระยอง (RACF, 2 ตำแหน่ง) สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง (NICA, 2 ตำแหน่ง) และ จากโรงเพาะฟักเอกชน จากจังหวัดชลบุรี (CHN, 1 ตำแหน่ง) ส่วนอีก 1 ตำแหน่งพบในประชากรธรรมชาติ CHT ตัวอย่างส่วนใหญ่ มีทิศทางของการเบี่ยงเบนของเกือบทุกการทดสอบ ในลักษณะที่ค่า H_o สูงกว่า H_e (4 จาก 6 ตำแหน่ง) ซึ่ง อาจสะท้อนถึงการนำพ่อแม่พันธุ์เริ่มต้น มาจากหลายแหล่งพันธุกรรม ในขณะที่ค่า H_o ที่ต่ำกว่า H_e สะท้อนถึงระดับของการผสมพันธุ์ระหว่างเครือญาติ นอกจากนี้ยังพบการเกิด Linkage disequilibrium ที่ 1-2 คู่ทดสอบ ในประชากรส่วนใหญ่ (ทั้งธรรมชาติและโรงเพาะฟัก) และพบการเกิด linkage disequilibrium หลายคู่ทดสอบ ในประชากร RACF-F1 (34 คู่) และ NICA (28 คู่)

ตารางที่ 1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลากะพงขาวจากโรงเพาะฟัก และจากธรรมชาติ ที่เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 11 ตำแหน่ง ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละสดมภ์ แสดงถึงความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น $P = 0.05$

		Averaged genetic diversity indexes				N_e (95%
	N	Allele	Allelic	Expected	Observed	Confidence
		per locus	richness	heterozygosity	heterozygosity	Interval)
Hatchery						
CHN	55.64	10.27 ^a	9.18 ^{a,b}	0.80	0.78 ^a	102 (76.2-148.1)
RACF	30.55	10.27 ^a	10.27 ^a	0.80	0.79 ^a	88.7 (59.9-159)
RACF-F1	35.91	7.27 ^b	6.99 ^b	0.76	0.66 ^b	7.8 (6.4-9.3)
NSCF	38.55	9.82 ^a	9.30 ^{a,b}	0.78	0.78 ^a	82.9 (60-127)
NICA	38.00	10.18 ^a	9.79 ^{a,b}	0.79	0.78 ^a	17.4 (15.3-19.8)
SKCF	47.64	11.91 ^a	10.66 ^a	0.81	0.80 ^a	88.5 (70-117.6)
STCF	56.91	8.91 ^{a,b}	8.09 ^{a,b}	0.80	0.76 ^a	34.7 (29.5-41.2)
Wild						
CHT	64.36	11.45 ^a	9.75 ^{a,b}	0.79	0.79 ^a	132 (98.8-194)
TRT	41.73	11.36 ^a	10.59 ^a	0.78	0.79 ^a	83.6 (66.4-110.1)
NST	54.73	13.00 ^a	11.27 ^a	0.79	0.77 ^a	46.8 (40.5-54.8)

เมื่อประเมินความสัมพันธ์ทางเครือญาติ (genetic relatedness, ตารางที่ 2) ของสมาชิกในประชากร พบว่าทุกดัชนี ประเมินความสัมพันธ์ของพี่น้องท้องเดียวกันได้อย่างถูกต้อง ($r_{xy}=0.5$) และทุกค่าให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน โดยค่าการประเมินแบบ Maximum likelihood จะให้ค่าสูงกว่าการประเมินแบบ moment method เล็กน้อย เมื่อพิจารณาค่า r_{xy} ของแต่ละตัวอย่าง พบว่า RACF-F1 ซึ่งเป็นรุ่นลูกที่ตัดจาก RACF มีค่า r_{xy} สูงที่สุด ที่ทุกดัชนี ($r_{xy} = 0.075-0.204$, $p<0.05$) ส่วนตัวอย่างอื่นๆ มีค่า r_{xy} ที่ไม่ต่างกัน และไม่ต่างจากประชากรธรรมชาติ ทั้งนี้ค่า r_{xy} สะท้อนถึงความใกล้ชิดทางเครือญาติที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จาก ไม่มีความใกล้ชิดในรุ่น RACF เป็นมีความใกล้ชิดในระดับที่เป็นพี่น้องกัน หลังจากการคัดพันธุ์เพียงรุ่นเดียว ซึ่งค่า N_e จากผลการศึกษาข้างต้นก็ยืนยันความสัมพันธ์นี้ได้เป็นอย่างดี การเพิ่มขึ้นของค่า r_{xy} นี้ น่าจะเกี่ยวข้องกับการผสมพันธุ์เป็นกลุ่มของปลากะพงขาว ที่ไม่อาจทราบได้ว่าจะมีพ่อหรือแม่กี่ตัวที่จะได้รับการผสมพันธุ์ จากการศึกษาในครั้งนี้ จากการ assign ลูกปลาเพื่อหา fullsib families พบว่าจากปลา 10 ตัว มีปลาเพียง 8 ตัว ที่ได้ผสมพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่าลูกส่วนใหญ่เป็นสมาชิกของ 2 ครอบครัว เท่านั้น ยิ่งไปกว่านั้น มีปลาเพียง 2 ตัวที่ให้ลูกเป็นสัดส่วนถึงกว่า 90% รูปแบบการเพิ่มขึ้นของความสัมพันธ์ทางเครือญาติ ในลักษณะนี้ ยังพบได้ในปลาหลายๆ ชนิดในการผสมรวมเป็นกลุ่ม เช่นปลา common sole (Blonk et al., 2009) Senegal

sole (Porta et al., 2006) หรือ ปลา haddock (Trippel, 2009) รวมถึงปลากะพงขาวในประเทศออสเตรเลีย (Frost et al., 2006) ดังนั้นจุดนี้จึงเป็นจุดที่ควรระมัดระวังในการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างระดับ r_{xy} ที่ประเมินจากเครื่องหมายพันธุกรรม และลักษณะภายนอก (เช่น อัตราการฟัก การพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อน และอัตราการเจริญเติบโต) ซึ่งน่าจะทำการศึกษาในโอกาสต่อไป

ส่วนในตัวอย่างโรงเพาะฟักอื่นๆ ค่า r_{xy} ที่ประเมินได้ ไม่แตกต่างจากประชากรธรรมชาติ ซึ่งถ้าประมวลผลโดยภาพรวมแล้ว การจัดการพ่อแม่พันธุ์ในอดีต ถึงปัจจุบัน ไม่ได้ทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลง หรือ ความใกล้ชิดทางเครือญาติเพิ่มขึ้น เร็วนัก ดังนั้น ประชากรโรงเพาะฟักเหล่านี้จะสามารถนำมาสร้างประชากรตั้งต้นสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้

เกือบทุกคู่ตัวอย่างที่วิเคราะห์มีความแตกต่างทางพันธุกรรม (ตารางที่ 3, AMOVA, $p < 0.05$) ในประชากรธรรมชาติ ตัวอย่างจากอ่าวไทยตอนล่าง (นครศรีธรรมราช, NST) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับตัวอย่างจากอ่าวไทยตอนบน (จันทบุรี, NST และตราด, TRT) ในขณะที่ตัวอย่างจากอ่าวไทยตอนบนจาก 2 แหล่งไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม ส่วนในประชากร โรงเพาะฟัก ตัวอย่าง RACF-F1, STCF และ NICA มีความแตกต่างจากทุกประชากร ในขณะที่ ตัวอย่างจาก ศพช. สงขลา (SKCF) ศพช. นครศรีธรรมราช (NSCF), ศพช. ระยอง (RACF) และ โรงเพาะฟักจากจ. ชลบุรี (CHN) ไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม เมื่อประเมินจากค่า pairwise Φ_{PT} นอกจากนี้ตัวอย่าง SKCF, NSCF และ CHN ยังมีความคล้ายทางพันธุกรรมกับตัวอย่างจากธรรมชาติ CHN และ TRT

รูปแบบความแตกต่าง/คล้ายคลึงทางพันธุกรรมนี้ น่าจะสะท้อนถึงการจัดการภายในแต่ละโรงเพาะฟัก ระดับการแลกเปลี่ยนพ่อแม่พันธุ์ และ แหล่งของพ่อแม่พันธุ์เริ่มต้น ความแตกต่างทางพันธุกรรมของ STCF จากประชากรอื่นๆ น่าจะเกิดจากการใช้พ่อแม่พันธุ์จากแหล่งที่มีความต่างพันธุกรรมจาก โรงเพาะฟักอื่นๆ (ทะเลอันดามัน) ในขณะที่ความต่างของ NICA น่าจะเกิดจากการใช้แหล่งพ่อแม่พันธุ์ที่ค่อนข้างจำกัด และเป็นแหล่งเฉพาะ (ทะเลสาบสงขลา) NICA เป็นส่วนหนึ่งของพ่อแม่พันธุ์ปลากะพงขาวที่พัฒนาขึ้นที่สถานีประมงทะเลสงขลา (เป็นแหล่งเพาะพันธุ์แหล่งแรกๆ ของประเทศไทย) และสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง ได้ซื้อพ่อแม่พันธุ์เพิ่มเติมจากเกษตรกรที่ซื้อลูกปลาไปจาก NICA ความแตกต่างของ RACF-F1 น่าจะเกิดจากกระบวนการ genetic drift (การสูญเสียอัลลีล และการเปลี่ยนความถี่อัลลีลจากกระบวนการสุ่ม) เนื่องจากมีเพียงพ่อแม่พันธุ์บางตัวเท่านั้นที่ให้ลูกในรุ่นที่ถูกคัดพันธุ์ ส่วนตัวอย่างที่มีความคล้ายคลึงกัน (RACF, NSCF, SKCF และ CHN) น่าจะเกิดจากแลกเปลี่ยนพ่อแม่พันธุ์ และการใช้พ่อแม่พันธุ์จากแหล่งเดียวกัน (ในกรณีซื้อจากเกษตรกร) นอกจากนี้ตัวอย่างทั้งสาม ยังคล้ายกับประชากรธรรมชาติจากอ่าวไทยฝั่งตะวันออก ซึ่งน่าจะสะท้อนถึงอิทธิพลทางพันธุกรรมของปลาที่เลี้ยงในภาคตะวันออก (ซึ่งเป็นแหล่งใหญ่ แหล่งหนึ่งของประเทศไทย) ต่อพ่อแม่พันธุ์ปลากะพงขาวของประเทศไทย (ทั้งภาคตะวันออก และภาคใต้)

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (Genetic relatedness, r_{xy}) ภายในประชากรโรงเพาะฟัก และธรรมชาติ ของปลากะพงขาว โดยใช้การประเมิน 6 แบบ ค่าความแปรปรวนนำเสนอได้ค่าเฉลี่ย ตัวอักษรบนค่าเฉลี่ยแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 (โดยใช้วิธีการ bootstrap)

	Sample	Moment estimators				Maximum likelihood estimators	
		Wang (2002)	Lynch (1988) and Li (1993)	Lynch-Ritland (1999)	Queller-Goodnight (1989)	Milligan (2003)	Wang (2007)
<i>Hatchery</i>	Fullsib 1	0.525	0.543	0.493	0.522	0.511	0.471
	CHN10xCHN4	(0.030)	(0.023)	(0.034)	(0.026)	(0.029)	(0.029)
	Fullsib 2	0.502	0.530	0.489	0.504	0.535	0.499
	CHN8xCHN7	(0.016)	(0.016)	(0.052)	(0.014)	(0.017)	(0.016)
	CHN	0.015 ^a	0.023 ^a	-0.001 ^a	0.019 ^a	0.058 ^a	0.042 ^a
		(0.021)	(0.025)	(0.009)	(0.020)	(0.009)	(0.005)
	RACF	-0.048 ^a	-0.041 ^a	-0.048 ^a	-0.040 ^a	0.067 ^a	0.057 ^a
		(0.020)	(0.022)	(0.008)	(0.028)	(0.008)	(0.007)
	RACF_F1	0.204 ^b	0.193 ^b	0.075 ^b	0.151 ^b	0.177 ^b	0.164 ^b
		(0.063)	(0.066)	(0.042)	(0.055)	(0.048)	(0.047)
	NSCF	-0.024 ^a	-0.031 ^a	-0.030 ^a	-0.017 ^a	0.046 ^a	0.035 ^a
		(0.028)	(0.025)	(0.019)	(0.027)	(0.008)	(0.005)
	NICA	0.039 ^a	0.044 ^a	-0.001 ^a	0.061 ^a	0.137 ^a	0.126 ^a
		(0.070)	(0.068)	(0.035)	(0.065)	(0.050)	(0.042)
<i>Wild</i>	SKCF	0.014 ^a	0.013 ^a	-0.016 ^a	0.014 ^a	0.052 ^a	0.041 ^a
		(0.026)	(0.029)	(0.008)	(0.026)	(0.010)	(0.007)
	STCF	0.008	0.010 ^a	-0.003 ^a	-0.004 ^a	0.066 ^a	0.051 ^a
		(0.021)	(0.023)	(0.020)	(0.022)	(0.011)	(0.007)
	CHT	-0.040 ^a	-0.026 ^a	-0.024 ^a	-0.022 ^a	0.045 ^a	0.037 ^a
		(0.019)	(0.025)	(0.008)	(0.020)	(0.009)	(0.006)
	TRT	0.029 ^a	0.042 ^a	0.036 ^a	0.048 ^a	0.082 ^a	0.076 ^a
		(0.047)	(0.047)	(0.033)	(0.042)	(0.031)	(0.030)
	NST	0.029 ^a	0.042 ^a	0.036 ^a	0.048 ^a	0.082 ^a	0.076 ^a
		(0.047)	(0.047)	(0.033)	(0.042)	(0.031)	(0.030)

ตารางที่ 3 ค่า Φ_{PT} ระหว่างตัวอย่าง (ได้จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรม, AMOVA) คำนวณได้จากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 11 ตำแหน่ง ค่าที่ขีดเส้นใต้ และ แสดงสัญลักษณ์ * แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.001$, after Bonferroni correction for 45 tests) ของค่า Φ_{PT} และ exact tests ระหว่างคู่ตัวอย่าง

	CHN	RACF	RACF_F1	NSCF	NICA	SKCF	STCF	CHT	TRT
CHN	-								
RACF	0.019*	-							
RACF_F1	0.180*	0.096*	-						
NSCF	0.018*	0.004	0.120*	-					
NICA	0.050*	0.053*	0.194*	0.059*	-				
SKCF	0.038*	0.024*	0.135*	0.018*	0.058*	-			
STCF	0.061*	0.061*	0.179*	0.049*	0.098*	0.052*	-		
CHT	0.010	0.010	0.142*	0.013*	0.034*	0.014*	0.062*	-	
TRT	0.022*	0.012*	0.125*	0.004*	0.041*	0.028*	0.053*	0.007*	-
NST	0.056*	0.048*	0.155*	0.045*	0.108*	0.059*	0.062*	0.067*	0.060*

สรุปผลการศึกษา

1. ประชากรโรงเพาะฟักของปลากะพงขาวส่วนใหญ่ ที่วิเคราะห์ มีระดับความหลากหลายทางพันธุกรรม ที่ไม่แตกต่างทางสถิติ กับประชากรธรรมชาติ ซึ่งน่าจะสามารถนำมาเป็นแหล่งพันธุกรรมสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคตได้
2. ประชากรที่ผ่านการคัดพันธุ์ของ ศพช. ระยอง RACF-F1 มีการลดลงของความหลากหลายทางพันธุกรรม และ ค่า N_e เมื่อเทียบกับประชากรตั้งต้น RACF อย่างเห็นได้ชัด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง N_e ที่มีค่าน้อยกว่าประชากรตั้งต้นเกือบ 10 เท่า การลดลงทางพันธุกรรมอย่างรวดเร็วใน 1 รุ่นของการคัดพันธุ์นั้น สะท้อนถึงความไม่เป็นตัวแทนทางพันธุกรรมของรุ่นลูก ทั้งนี้ปลากะพงขาวเป็นปลาที่ผสมรวมกันเป็นกลุ่มทำให้ ไม่ทราบสายสัมพันธ์ของปลาในรุ่นอย่างแน่ชัด และมีแนวโน้มที่บางครอบครัวที่เป็นส่วนน้อยเท่านั้นที่จะประสบความสำเร็จ ซึ่งข้อจำกัดในส่วนนี้น่าจะต้องเป็นจุดที่ควรระวังในการปรับปรุงพันธุ์ที่มีขึ้นในอนาคต
3. โรงเพาะฟัก NICA มีค่า N_e ค่อนข้างต่ำเช่นเดียวกัน แต่ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมอื่นๆ ไม่มีความแตกต่างกับประชากรธรรมชาติ ซึ่งน่าจะเป็นสัญญาณว่าน่าจะมีการเพิ่มขนาด/ความหลากหลายทางพันธุกรรม ของพ่อแม่พันธุ์ประชากรนี้ ก่อนที่จะมีการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป
4. การประเมินความใกล้ชิดทางพันธุกรรมทุกวิธีการให้ผลในทิศทางเดียวกัน และอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างพี่น้องท้องเดียวกันอย่างถูกต้อง ($r_{xy} = 0.5$)

5. ค่าความใกล้เคียงทางพันธุกรรม (r_{xy}) ของประชากรโรงเพาะฟักส่วนใหญ่ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากประชากรธรรมชาติ ยกเว้น RACF-F1 ซึ่งมีค่า r_{xy} อยู่ในช่วง 0.075 ถึง 0.204
6. ประชากรโรงเพาะฟัก ที่วิเคราะห์มีความแตกต่างพันธุกรรม โดยสามารถแบ่งกลุ่มได้ดังนี้คือ กลุ่มภาคตะวันออก (CHN, RACF) จ. สงขลา (NICA) และ ทะเลอันดามัน (STCF) ส่วนโรงเพาะฟัก NSCF และ SKCF มีความคล้ายทางพันธุกรรมกับกลุ่มภาคตะวันออก มากกว่ากลุ่มจ. สงขลา ซึ่งสะท้อนระดับของการใช้แหล่งพ่อแม่พันธุ์ หรือลูกพันธุ์ร่วมกัน นอกจากนี้ ข้อมูลยังแสดงให้เห็นว่าการสร้างประชากรฐานสำหรับการปรับปรุงพันธุ์อาจมีการใช้พ่อแม่พันธุ์จากหลายโรงเพาะฟักได้ อย่างไรก็ตาม น่าจะจัดแยกกลุ่มภาคตะวันออก ออกจากจ.สงขลา และ ทะเลอันดามันอย่างชัด
7. ประชากรโรงเพาะฟักภาคตะวันออก, NSCF และ SKCF มีความคล้ายกับประชากรธรรมชาติอ่าวไทยตอนบน (CHT และ TRT) มากกว่าประชากรธรรมชาติอ่าวไทยตอนล่าง (NST) ซึ่งน่าจะสะท้อนความสำคัญของประชากรธรรมชาตินี้ ในประชากรโรงเพาะฟักในปัจจุบัน

การเผยแพร่ผลงานวิจัย

รายงานการวิจัยได้ส่งเพื่อตีพิมพ์ในวารสาร Aquaculture ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้

Wansuk Senanan, Supaporn Sornkeaw, Jamjun Pechsiri, Uthairat Na-Nakorn, Niphon Saenin and Renoo Yashiro. *Submitted manuscript*. Relatedness of commercial broodstock populations of Asian seabass (*Lates calcarifer*) inferred from microsatellite genetic markers. Aquaculture

3. โครงการย่อยที่ 3 ปลา Pangasiid ลูกผสม

3.1 การศึกษา performance ของลูกผสมและชนิดพ่อแม่

วัตถุประสงค์ของโครงการย่อยนี้คือ ศึกษาศักยภาพทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของปลากลุ่ม Pangasiids 3 ชนิด และปลาลูกผสม โดยเปรียบเทียบลักษณะที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจบางลักษณะ เช่น การเจริญเติบโต อัตรารอด คุณภาพเนื้อ ตลอดจนคุณค่าทางโภชนาการของเนื้อปลา ระหว่างปลาสายพันธุ์แท้ และลูกผสมในกลุ่ม Pangasiidae จำนวน 6 ชนิด/คู่ผสม ซึ่งประกอบด้วย

1. ปลาน้ำจืด *Pangasianodon gigas*
2. ปลาสวาย *Pangasianodon hypophthalmus*
3. ปลาเผาะ หรือปลาโมง *Pangasius bocourti*
4. ปลาสายยู *Pangasius conchophilus*
5. ปลาสวายเผาะ ลูกผสมระหว่างปลาสวายและปลาเผาะ
6. ปลาลูกผสมสามสาย (ลูกผสมระหว่างปลาน้ำจืด ปลาสวาย และปลาเผาะ)

งานทดลองนี้ดำเนินการเลี้ยงในกระชัง ณ อุทยานหนองหารเฉลิมพระเกียรติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จ.สกลนคร โดยได้จัดหาปลาทั้ง 6 ชนิดมาเรียบร้อยแล้ว แต่เนื่องจากในช่วงฤดูหนาว ซึ่งเป็นเวลาที่สัตว์น้ำจะเกิดการติดเชื้อโรคและปรสิตง่ายกว่าในฤดูอื่นๆ ปลาที่ลงเลี้ยงในกระชังก็ประสบกับปัญหาการติดปรสิตหมดปลาทำให้ปลาทายเป็นจำนวนมาก ส่งผลให้มีปลาน้ำจืด และปลาสวายเผาะ เหลือไม่เพียงพอกับการทดลอง จึงได้ปรับวัตถุประสงค์เป็น การเปรียบเทียบ performance ของปลาสามชนิดคือ ปลาสวาย ปลาเผาะ และปลาสวายเผาะ

สรุปย่อรายงานผลการศึกษา

ปลาสวายเป็นปลาพื้นเมืองของไทย มีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย สำหรับปลาเผาะนั้น ได้รับการส่งเสริมให้เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจตัวใหม่ ในโครงการพัฒนาสัตว์น้ำเศรษฐกิจชนิดใหม่ของไทย เพื่อการส่งออก เนื่องจากคุณสมบัติของเนื้อปลาที่มีสีขาว จึงเป็นที่ต้องการของประเทศแถบยุโรปโดยจะส่งออกกันมากในรูปของเนื้อแล่ (fillet) ทำให้มีการส่งเสริมการเลี้ยงปลาชนิดนี้กันมากโดยเฉพาะในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยธรรมชาติแล้วปลาเผาะเป็นปลาที่มีความดกไข่น้อย ทำให้ไม่สามารถผลิตลูกพันธุ์ปลาเผาะได้เพียงพอความต้องการซึ่งเป็นข้อจำกัดของการผลิตปลาชนิดนี้ในเชิงพาณิชย์ ด้วยเหตุนี้จึงมีการผลิตลูกปลาสวายเผาะซึ่งได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างแม่พันธุ์ปลาสวายซึ่งมีความดกไข่น้อย (อำพล และอารีย์, 2532) และพ่อพันธุ์ปลาเผาะ แม้ว่าการแก้ไขปัญหาดังกล่าวจะสามารถผลิตลูกปลาเนื้อขาวได้ทันกับความต้องการของตลาด และเริ่มมีการผลิตลูกปลาสวายเผาะในเชิงพาณิชย์กันอย่างกว้างขวางในแถบภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แต่ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับลักษณะที่สำคัญที่มีผลต่อศักยภาพการผลิต เช่น อัตราการเจริญเติบโต การเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ความต้านทานโรค อัตรารอดของปลาสวายเผาะ และคุณภาพของเนื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับชนิดพ่อแม่ (ปลาสวายและ

ปลาเผาะ) นั้นยังไม่พบรายงานทางวิชาการที่เกี่ยวกับข้อมูลเหล่านี้ ซึ่งหากอนาคตจะมีการส่งเสริมการเลี้ยงปลาสวายเผาะให้เป็นปลาเศรษฐกิจที่สำคัญจำเป็นต้องอาศัยข้อมูลดังกล่าวข้างต้นในการพัฒนาการเลี้ยงปลาชนิดนี้ ผลจากการศึกษาในครั้งนี้จะทำให้ทราบข้อมูลเบื้องต้นที่เป็นประโยชน์ต่อการเลี้ยง และการผลิตปลาเนื้อขาวกลุ่ม Pangasiids ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษากการเจริญเติบโต คุณภาพซาก และคุณค่าทางโภชนาการ ระหว่างปลาสวาย ปลาสวายเผาะ และปลาเผาะ ทำการทดลองโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) เลี้ยงปลาในกระชังขนาด 3x3x1.5 เมตร จำนวน 9 กระชัง อัตราปล่อย 45 ตัวต่อลูกบาศก์เมตร ให้อาหาร 30% โปรตีน วันละ 2 ครั้ง ปลาทดลองมีน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นระหว่าง 13.62-23.32 กรัม เลี้ยงเป็นเวลา 303 วัน

การเก็บข้อมูลการเจริญเติบโต

ชั่งวัดปลาทดลองจำนวน 10% ของแต่ละชุดการทดลองเดือนละ 1 ครั้ง เก็บข้อมูลน้ำหนักปลา ปริมาณอาหารที่ปลากิน และจำนวนปลาตายในแต่ละชุดการทดลอง นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific Growth Rate; SGR) อัตราแลกเนื้อ (Feed Conversion Ratio; FCR) และอัตราการรอด (Survival rate)

หลังสิ้นสุดการทดลองสุ่มเก็บตัวอย่างปลาจำนวน 60 ตัว เก็บข้อมูลเปอร์เซ็นต์ซาก ทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของเนื้อปลา โดยวัดสี และวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมทั้งหมด วิเคราะห์เนื้อสัมผัสของเนื้อปลาด้วยเครื่อง Texture Analyser (TA.XTPlus, Stable Micro Systems, UK) วิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของเนื้อปลา

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองโดยวิธี Duncan's new multiple range test

ผลการทดลอง

พบว่าลูกผสมมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่ำกว่าชนิดพันธุ์พ่อแม่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4) อัตราการแลกเนื้อของปลาทั้ง 3 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกัน ในขณะที่อัตราการรอดมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยปลาเผาะมีอัตราการรอดสูงสุด ($95.93 \pm 1.10\%$) รองลงมาได้แก่ปลาสวาย ($83.5 \pm 3.82\%$) และลูกผสมมีอัตราการรอดต่ำที่สุด ($37.83 \pm 5.89\%$) ปลาสวายมีเปอร์เซ็นต์ซาก (dress-out percentage) และปริมาณเนื้อแล้ (fillet percentage) สูงที่สุด ลักษณะทางกายภาพของเนื้อแล้พบว่าปลาสวายมีความแน่นเนื้อ (Firmness) และปริมาณแคโรทีนอยด์ (Total carotenoid) สูงสุด ($P < 0.05$) การวัดสีของเนื้อปลาพบว่าปลาเผาะมีค่าความสว่าง (L^*) สูงที่สุด ($P < 0.05$) ปลาสวายมีค่าสีแดง-เขียว (a^*) และค่าสีเหลือง-น้ำเงิน (b^*) สูงที่สุด ($P < 0.05$)

สำหรับคุณค่าทางโภชนาการของเนื้อปลาทั้ง 3 ชนิด (ตารางที่ 5) พบว่าปลาสวายเผาะมีปริมาณโปรตีนและเถ้าสูงที่สุด และมีปริมาณไขมันต่ำที่สุด ($P < 0.05$) ปริมาณเยื่อใยของเนื้อปลาทั้ง 3 ชนิดไม่มีความแตกต่างกัน ($P > 0.05$)

ตารางที่ 4 การเจริญเติบโต เปอร์เซ็นต์ซาก สีเนื้อ ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม และความแน่นเนื้อของ ปลาสวาย ปลาลูกผสม และปลาเผาะ

ลักษณะที่ทำการศึกษ	ชุดการทดลอง		
	ปลาสวาย	ปลาลูกผสม	ปลาเผาะ
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (%/วัน)	1.46±0.20 ^a	0.89± 0.26 ^b	1.26±0.20 ^a
อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR)	1.47 ±0.35 ^a	1.22±0.40 ^a	1.27 ±0.51 ^a
อัตราการตาย (%)	83.5±3.82 ^b	37.83± 5.89 ^c	95.93 ±1.10 ^a
เปอร์เซ็นต์ซาก Dress-out percentage(%)	53.15 ± 5.13 ^a	37.50 ± 6.46 ^c	42.61 ± 6.56 ^b
ปริมาณเนื้อแล้ Fillet percentage (%)	43.73 ± 3.03 ^a	32.15 ± 3.31 ^c	35.70 ± 5.77 ^b
L* (ค่าความสว่าง)	47.38± 2.10 ^b	44.81±2.75 ^c	50.40±1.39 ^a
a* (ค่าสีแดง-เขียว)	4.24±0.69 ^a	-0.08±0.66 ^b	-0.87±0.64 ^c
b* (ค่าสีเหลือง-น้ำเงิน)	13.35±1.37 ^a	7.49±0.84 ^b	6.74±1.00 ^c
ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม (Total carotenoid, mg/ml)	0.68±0.25 ^a	0.46±0.34 ^b	0.19±0.09 ^c
ความแน่นเนื้อ (Firmness, N)	2.84±0.67 ^a	0.85±0.34 ^c	2.34±0.76 ^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($\alpha = 0.05$)

ตารางที่ 5 คุณค่าทางโภชนาของเนื้อปลาสวาย ปลาเผาะ และปลาลูกผสม

คุณค่าทางโภชนาที่ศึกษา	ชุดการทดลอง		
	ปลาสวาย	ปลาลูกผสม	ปลาเผาะ
ปริมาณโปรตีนรวม (Crude protein,%)	69.43±6.57 ^b	74.74±2.58 ^a	68.46±5.24 ^b
ปริมาณไขมัน (Lipid,%)	24.11±5.20 ^a	15.64±1.63 ^b	25.96±6.71 ^a
ปริมาณเถ้า (Ash,%)	5.01±0.61 ^b	5.52±0.47 ^a	4.18±0.42 ^c
ปริมาณเยื่อใย (Fiber,%)	0.18±0.09 ^a	0.16±0.05 ^a	0.13±0.03 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($\alpha = 0.05$)

วิจารณ์ผล

การเจริญเติบโต

ปลาลูกผสมมีอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดต่ำกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ สาเหตุหลักของการตายคือปรสิตภายนอก เช่น ปลิงใส เห็บระฆัง และก่อให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียตามมา ซึ่งพบผลการศึกษาคล้ายคลึงกันนี้ ในลูกผสมระหว่างปลา gilthead sea bream (*Sparus aurata*) กับปลา red porgy (*Pagrus pagrus*) ซึ่งมีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าชนิดพ่อแม่ และมีอัตราการรอดที่ต่ำกว่า ปลา gilthead sea bream ส่วนอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของปลาทั้ง 3 ชนิดไม่ต่างกัน (Paspatis et al., 1999) อย่างไรก็ตามในบางการศึกษาก็พบว่าลูกผสมมีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีกว่าชนิดพ่อแม่เช่น ในปลาลูกผสมระหว่างแม่พันธุ์ Channel catfish สายพันธุ์ Kansas กับพ่อพันธุ์ Blue catfish ที่ลูกผสมโตดีกว่าชนิดพ่อแม่ถึง 35% (Dunham and Brummett, 1999)

เปอร์เซ็นต์ซาก

ปลาลูกผสมมีเปอร์เซ็นต์ซาก และเปอร์เซ็นต์เนื้อแล่ ต่ำกว่าชนิดพ่อแม่ ค่าที่ได้ใกล้เคียงกับค่าที่มีรายงานในปลากลุ่มเดียวกันนี้ (เช่น เปอร์เซ็นต์เนื้อแล่ของปลาสาวยในประเทศไทยมีเปอร์เซ็นต์เนื้อแล่ 39% ปลาน้ำจืด 41.5% และลูกผสมของปลาสาวยและปลาน้ำจืด 42%, Mongkonpanya et al., 1996) เปอร์เซ็นต์เนื้อแล่ของปลาสาวยที่เลี้ยงในประเทศไทยมีค่าเฉลี่ย 35.6% (Sang et al., 2009) ส่วนปลาเผาะมีเปอร์เซ็นต์เนื้อแล่ไม่รวมหนังอยู่ที่ 41-47% (ปัทมา และคณะ, 2550) ผลการศึกษาที่ได้นี้ต่างจากที่มีรายงานในปลาลูกผสมระหว่าง channel catfish x blue catfish channel (Argue et al., 2003) แต่บางรายงานก็พบว่าลูกผสมมีเปอร์เซ็นต์ซากที่ต่ำกว่าชนิดพ่อแม่ (Dunham et al., 1983) หรือไม่มีความแตกต่างกับชนิดพ่อแม่ เช่น ลูกผสมระหว่าง channel catfish สายพันธุ์ NWAC 103 กับ Blue catfish สายพันธุ์ D&B (Jiang et al., 2008) ในขณะที่การศึกษาในปลาน้ำจืด ปลาสาวย และลูกผสม ก็พบว่าเปอร์เซ็นต์ซากและเปอร์เซ็นต์เนื้อแล่ของลูกผสมไม่มีความแตกต่างกับชนิดพ่อแม่ (Mongkonpanya et al., 1996) อย่างไรก็ตามมีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อค่าเปอร์เซ็นต์ซากและเปอร์เซ็นต์เนื้อแล่ที่ประเมินได้ ซึ่งพบว่านอกจาก สายพันธุ์ เพศ อายุ ขนาด และชนิดปลา แล้ว (Argue et al., 2003) วิธีการที่ใช้ในการชำแหละหรือแล่เนื้อปลาก็มีผลไม่น้อยเช่นกัน (Ammerman, 1985)

สีของเนื้อปลา

สีเนื้อแล่ของปลาเผาะจะมีความขาวมากที่สุด ส่วนเนื้อแล่ปลาสาวยจะมีค่าสีแดงและสีเหลืองมากที่สุด เนื้อแล่ของปลาลูกผสมมีความขาวน้อยที่สุด แต่มีค่าสีแดงและสีเหลืองรองลงมาจากเนื้อของปลาสาวย ในรายงานที่ผ่านมาไม่ค่อยพบการศึกษาที่ใช้การผสมข้ามเพื่อปรับปรุงลักษณะสีเนื้อมากนัก มีเพียงรายงานในปลา Atlantic salmon ที่ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะที่เกี่ยวกับคุณภาพเนื้อระหว่างปลา Atlantic salmon สายพันธุ์ธรรมชาติกับสายพันธุ์โรงเพาะฟัก และลูกผสมระหว่าง 2 สายพันธุ์ แต่ก็ไม่พบว่าสีเนื้อ ของปลาลูกผสมมีความแตกต่างกับปลาสายพันธุ์พ่อแม่ (Glover et al., 2009) ทั้งนี้เนื่องจาก

ชนิดปลาที่มีผลต่อสีเนื้อของปลาแล้ว น่าจะมีปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องด้วย เนื้อแล่ของปลาเพาะที่ส่งมายังโรงงานในประเทศเวียดนามมีสีเนื้อไม่สม่ำเสมอ โดยพบทั้งเนื้อปลาที่มีสีขาว สีชมพู และสีเหลือง ซึ่งน่าจะเกิดจาก อาหารที่ใช้ สภาพการเลี้ยง รวมถึง รูปแบบการชำแหละด้วย นอกจากนี้ยังมีรายงานที่แสดงว่าปริมาณไขมันในเนื้อมีส่วนต่อการเพิ่มขึ้นของค่าสีขาว (L^*) โดยพบว่าปริมาณไขมันที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ค่า L^* สูงขึ้นด้วย (Mørkøre et al., 2001) ซึ่งจากการวิเคราะห์ปริมาณไขมันในเนื้อปลาก็พบว่าเนื้อปลาเพาะและปลาสวยงามมีปริมาณไขมันมากกว่าเนื้อปลาลูกผสม

ผลวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมมีความสอดคล้องกับผลของค่า $L^* a^* b^*$ โดยปริมาณแคโรทีนอยด์รวมมีค่าสูงสุดในปลาสวยงาม (0.68 ± 0.25) รองลงมาคือปลาลูกผสม (0.46 ± 0.34) และปลาเพาะมีปริมาณแคโรทีนอยด์รวมต่ำที่สุด (0.19 ± 0.09) โดยแคโรทีนอยด์เป็นเซลล์รงควัตถุที่จะทำให้สีของเนื้อ หนัง หรือเปลือกของสัตว์น้ำมีสีแดง ส้ม และเหลือง (Nickell and Springate, 2001)

เนื้อสัมผัสและคุณค่าทางโภชนาของเนื้อปลา

ผู้บริโภคโดยทั่วไปชอบเนื้อสัมผัสที่มีความแน่น (firmness) และยืดหยุ่น (elasticity) มากกว่าเนื้อปลาที่มีความอ่อนนุ่ม (Bahuaud et al., 2010) สำหรับผลจากการทดลองครั้งนี้พบว่าความแน่นเนื้อของปลาสวยงาม มีค่ามากกว่าปลาเพาะ และปลาลูกผสม

ปริมาณโปรตีนในเนื้อปลาลูกผสม (74.74%) มีค่าสูงกว่าชนิดพ่อแม่ ในขณะที่มีปริมาณไขมันต่ำกว่า โดยทั่วไปปริมาณโปรตีนและถ้าจะมีความสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามกับปริมาณไขมัน กล่าวคือถ้าปริมาณโปรตีนในเนื้อสูงก็จะมีปริมาณไขมันต่ำ (Thammapat et al., 2010)

การใช้วิธีผสมข้ามเพื่อจุดประสงค์ในการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการนั้นยังไม่พบรายงานการศึกษาในปลาแต่จากการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนและไขมันในเนื้อปลาระหว่างลูกผสม กับชนิดพ่อแม่ พบเพียงรายงานในปลาบิก ปลาสวยงาม และลูกผสม ซึ่งผลการวิเคราะห์แสดงว่าปริมาณโปรตีนของปลาทั้ง 3 ชนิดไม่แตกต่างกัน แต่ปลาบิกจะมีปริมาณไขมันที่มากกว่าปลาสวยงามและลูกผสม

(Mongkonpanya et al., 1996)

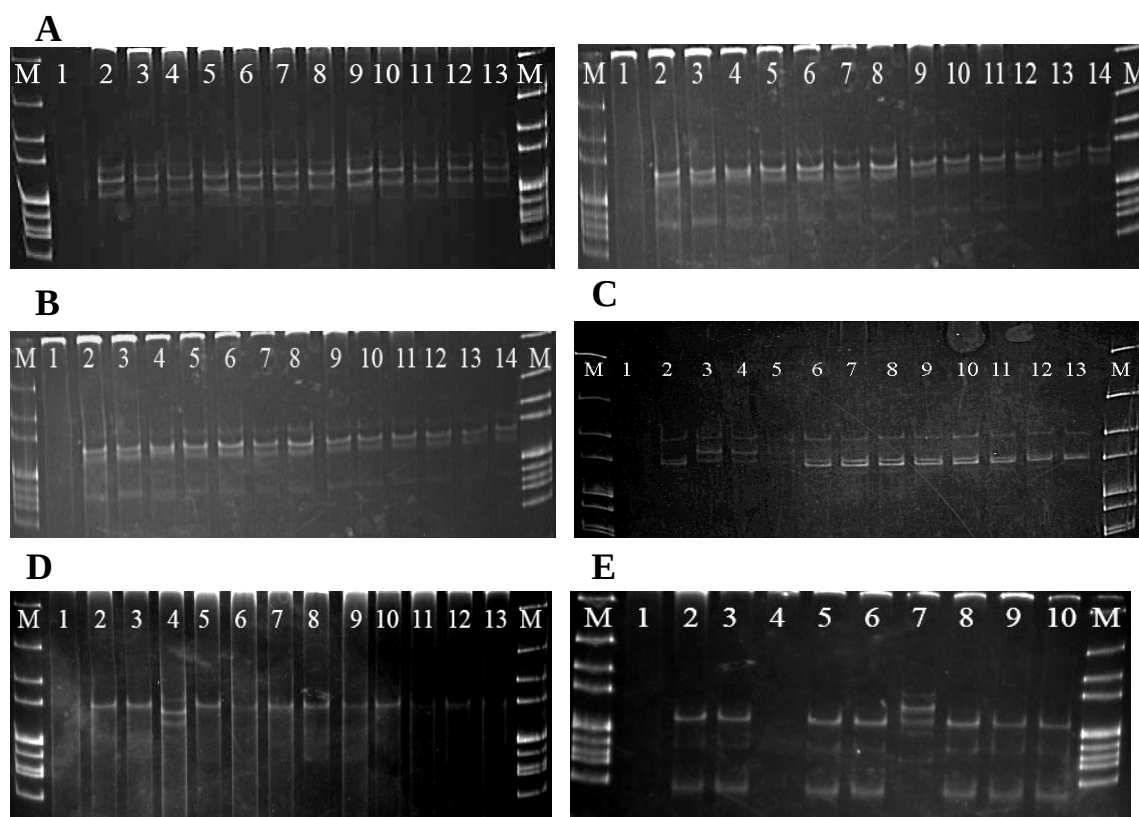
ผลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงว่า การผสมข้ามระหว่างปลาสวยงามกับปลาเพาะ ไม่ได้ปรับปรุงคุณลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจ

ตีพิมพ์ผลงานในรายงานการประชุมประจำปีของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ดังนี้

สิทธิชัย สะทะโชติ, เกตุณภัส ศรีไพโรจน์ และ อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2553. ลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจของปลาสวยงาม (*Pangasianodon hypophthalmus*) ปลาเพาะ (*Pangasius bocourti*) และลูกผสม (*P. hypophthalmus* X *P. bocourti*), หน้า 210-217 ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48, สาขาประมง. 3-5 กุมภาพันธ์ 2553. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

3.2 เครื่องหมายพันธุกรรมที่จำเพาะกับชนิดปลากลุ่ม Pangasiids

ผลจากงานวิจัยในส่วนนี้ ได้เครื่องหมายพันธุกรรมสำหรับแยกชนิดปลาในกลุ่ม Pangasiids จำนวน 5 ชนิด คือ ปลาบึก (*Pangasianodon gigas*) ปลาสวาย (*P. hypophthalmus*) ปลาเผาะ (*Pangasius bocourti*) ปลาเทโพ (*P. larnaudii*) และ ปลาสวายหนู (*Helicophagus leptorhynchus*) โดยใช้เทคนิค Single stranded conformation polymorphism (SSCP) ซึ่งจากการทดสอบในไพรเมอร์ จำนวน 7 คู่ (PH1, PL5, PL6, PL7, PL8, PM1, HW1) พบว่าไพรเมอร์ PL8 สามารถแยกชนิดปลาทั้ง 5 ชนิดได้ โดยไพรเมอร์ PL8 ให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันของปลา 5 ชนิด เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SSCP (รูปที่ 1) นอกจากนี้ไพรเมอร์ PL8 ยังสามารถใช้แยกลูกปลาของ ปลาบึก ปลาสวาย ปลาเผาะ และปลาเทโพได้ ซึ่งเครื่องหมายพันธุกรรมที่ได้ในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิทยา และการตรวจสอบผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากปลาในกลุ่ม Pangasiids อย่างไรก็ตาม ไพรเมอร์ PL8 ยังไม่สามารถใช้แยกปลาลูกผสมของปลาในกลุ่มนี้ได้ และเครื่องหมายพันธุกรรมที่ได้จากเทคนิค SSCP ค่อนข้างใช้เวลานานและจำเป็นต้องวิเคราะห์ผ่านตัวกลางอะครีลาไมด์เจล ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้แยกชนิดปลากลุ่ม Pangasiids เพิ่มเติม โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้เครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้ง่าย ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่าเทคนิค SSCP และสามารถแยกลูกผสมของปลาในกลุ่ม Pangasiids ได้ ซึ่งผู้วิจัยได้รับงบประมาณสนับสนุนเพิ่มเติมจากทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ (MRG528013)



ภาพที่ 5 แถบดีเอ็นเอ (SSCP patterns) ที่แตกต่างกันของปลา 5 ชนิด (A) ปลาสวาย (B) ปลาสวายหนู (C) ปลาบึก (D) ปลาเผาะ (E) ปลาเทโพ

ตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

Sripairoj, K., Klinbu-nga, S., Kamonrat, W., Na-Nakorn, U. 2010. Species identification of four economically important Pangasiid catfishes and closely related species using SSCP markers. *Aquaculture* 308: S47-S50.

4. โครงการย่อยที่ 4 หอยทะเล

4.1 Genetic diversity of the green mussel, *Perna viridis* in the Gulf of Thailand

น.ส.วราภรณ์ พระคุณ และ ศาสตราจารย์อุทัยรัตน์ ณ นคร

โครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของหอยแมลงภูในอ่าวไทย และเพื่อศึกษาแหล่งที่มาของลูกหอยในอ่าวศรีราชา โดยได้เริ่มดำเนินการตั้งแต่วันที่ 2550 โดยได้รับการสนับสนุนงบประมาณเริ่มต้นจาก Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific

โดยมีเนื้อความโดยย่อคือ หอยแมลงภูเป็นสินค้าสัตว์น้ำที่สำคัญชนิดหนึ่ง โดยมีการเลี้ยงมากในหลายพื้นที่ โดยเฉพาะในอ่าวศรีราชา ซึ่งในปัจจุบันการเลี้ยงหอยแมลงภูได้กลายเป็นอาชีพสำคัญของประชาชนรอบอ่าว การเลี้ยงหอยแมลงภูใช้ลูกหอยที่ปล่อยจากธรรมชาติ โดยไม่ทราบที่มาที่แน่นอน จากสภาวะแวดล้อมที่เสื่อมโทรมลงเป็นลำดับ ประกอบกับการจับหอยออกจากแหล่งน้ำในปริมาณมหาศาลในแต่ละปี ทำให้เกิดความกังวลว่า ประชากรหอยจะมีพันธุกรรมเสื่อมโทรมลง จึงได้ทำการศึกษาโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม microsatellite จำนวน 5 ตำแหน่ง ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยแมลงภูรวม 11 ประชากรที่มีความแตกต่างในเชิงพื้นที่ และฤดูกาล (ตารางที่ 6) ผลการศึกษาพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยแมลงภูในอ่าวไทยอยู่ในระดับปานกลาง (averaged number of alleles per locus, $A=10.4-12.2$; effective number of alleles per locus, $A_e=5.36-6.59$; mean allelic richness, $A_r=10.23-12.06$; observed heterozygosity, $H_o=0.52-0.63$, และ expected heterozygosity, $H_e=0.66-0.73$) (ตารางที่ 7) และไม่มีความแตกต่างระหว่างประชากร ข้อมูลนี้แสดงว่าประชากรหอยแมลงภูในอ่าวไทยไม่ได้รับความกระทบกระเทือนจากการที่หอยถูกเก็บออกไปปีละจำนวนมาก ซึ่งอาจเป็นเพราะหอยได้วางไข่ก่อนที่จะถูกเก็บไป

ความแตกต่างระหว่างประชากรมีค่าต่ำ ($F_{ST}=0.0046$, $CI_{0.95}=0.0020-0.0083$ สำหรับตัวอย่างชุดที่เก็บในเดือนมกราคม 2550 และ $F_{ST}=0.0088$, $CI_{0.95}=0.0010-0.0162$ สำหรับตัวอย่างชุดที่เก็บในเดือนกรกฎาคม 2550) จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี AMOVA (the analysis of molecular variance) แสดงว่าหอยที่เก็บในพื้นที่เดียวกันแต่คนละช่วงเวลามีพันธุกรรมแตกต่างกัน ซึ่งแสดงว่า ลูกหอยที่มาจากเกสรนั้นลอยน้ำมาจากบริเวณอื่น และเนื่องจากกระแสน้ำที่มีทิศทางแตกต่างกันในแต่ละฤดูกาล จึงทำให้ประชากรที่เก็บในต่างฤดูกาลมีความแตกต่างกัน

โครงการนี้ดำเนินการเสร็จสิ้นสมบูรณ์ และได้เขียนรายงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ เรื่อง

Prakoon, W., Tunkijjanukij, S., Nguyen, T.T.T., **Na-Nakorn, U.** 2010. Spatial and temporal genetic variation of green mussel, *Perna viridis* in the Gulf of Thailand and implication for

aquaculture. **Marine Biotechnology** 12:506–515; DOI 10.1007/s10126-009-9234-x (2010

IF = 2.962)

ตารางที่ 6 แสดงข้อมูลสถานที่และเวลาในการเก็บตัวอย่าง

แหล่งเก็บตัวอย่าง	ละติจูด/ลองจิจูด	ช่วงเวลาที่เก็บ	ชื่อ ประชากร	จำนวนตัว/ ประชากร
ฤดูกาลที่ 1				
แม่น้ำตาปี จ.สุราษฎร์ธานี	9° 16' 35.45" N 99° 25' 00.12" E	11 ก.พ. 2550	TP-1	50
แม่น้ำแม่กลอง จ.สมุทรสงคราม	13° 21' 26.5" N 100° 00' 57.51" E	9 ม.ค. 2550	MK-1	48
แม่น้ำท่าจีน จ.สมุทรสาคร	13° 27' 40.99" N 100° 19' 45.76" E	9 ม.ค. 2550	TC-1	46
แม่น้ำเจ้าพระยา จ.สมุทรปราการ	13° 28' 54.93" N 100° 32' 39.95" E	10 ม.ค. 2550	CY-1	41
แม่น้ำบางปะกง จ.ฉะเชิงเทรา	13° 25' 46.35" N 100° 55' 52.77" E	10 ม.ค. 2550	BK-1	46
อ่าวศรีราชา จ.ชลบุรี	13° 07' 07.65" N 100° 52' 14.53" E	9 ก.พ. 2550	SR-1	46
ฤดูกาลที่ 2				
แม่น้ำแม่กลอง จ.สมุทรสงคราม	13° 21' 26.5" N 100° 00' 57.51" E	1 มิ.ย. 2550	MK-2	47
แม่น้ำท่าจีน จ.สมุทรสาคร	13° 27' 40.99" N 100° 19' 45.76" E	1 มิ.ย. 2550	TC-2	46
แม่น้ำเจ้าพระยา จ.สมุทรปราการ	13° 28' 54.93" N 100° 32' 39.95" E	23 มิ.ย. 2550	CY-1	41
แม่น้ำบางปะกง จ.ฉะเชิงเทรา	13° 25' 46.35" N 100° 55' 52.77" E	2 มิ.ย. 2550	BK-1	46
อ่าวศรีราชา จ.ชลบุรี	13° 07' 07.65" N 100° 52' 14.53" E	2 มิ.ย. 2550	SR-1	46

ตารางที่ 7 ชื่อย่อประชากร จำนวนตัวอย่างต่อประชากร จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง ($\pm$ SE) ค่าเฉลี่ย Effective number of alleles per locus (A_e) ($\pm$ SE) Mean allelic richness ($\pm$ SE) ค่าเฉลี่ยค่าสังเกตเฮตเทอโรไซโกซิตี (H_o) และค่าคาดหวัง (H_e) ($\pm$ SE) และ ค่า F_{IS} ในหอยแมลงภู่ จำนวน 11 ประชากร

ประชากร	จำนวน	จำนวนอัลลีล	ค่าเฉลี่ย (A_e)	Mean allelic	ค่าเฉลี่ย		
		ตัวอย่าง	Effective number of allele per locus	richness	H_o	H_e	F_{IS}^*
TP-1	50	11.20 $\pm$ 6.76	5.92 $\pm$ 4.68	10.77 $\pm$ 6.51	0.52 $\pm$ 0.22	0.66 $\pm$ 0.32	0.212
MK-1	48	11.80 $\pm$ 6.90	5.72 $\pm$ 3.98	11.49 $\pm$ 6.60	0.59 $\pm$ 0.25	0.70 $\pm$ 0.26	0.157
MK-2	47	11.60 $\pm$ 6.70	5.82 $\pm$ 3.51	11.35 $\pm$ 6.42	0.57 $\pm$ 0.19	0.73 $\pm$ 0.26	0.219
TC-1	46	11.40 $\pm$ 6.73	6.15 $\pm$ 4.13	11.16 $\pm$ 6.63	0.54 $\pm$ 0.29	0.70 $\pm$ 0.30	0.229
TC-2	46	11.60 $\pm$ 6.80	5.86 $\pm$ 4.40	11.38 $\pm$ 6.63	0.59 $\pm$ 0.22	0.70 $\pm$ 0.30	0.157
CY-1	41	10.80 $\pm$ 5.50	5.44 $\pm$ 3.55	10.80 $\pm$ 5.50	0.58 $\pm$ 0.11	0.73 $\pm$ 0.22	0.205
CY-2	50	12.00 $\pm$ 7.04	6.35 $\pm$ 4.77	11.62 $\pm$ 6.69	0.63 $\pm$ 0.18	0.72 $\pm$ 0.25	0.125
BK-1	46	11.00 $\pm$ 7.21	5.99 $\pm$ 5.04	10.80 $\pm$ 7.01	0.54 $\pm$ 0.23	0.68 $\pm$ 0.31	0.206
BK-2	44	12.20 $\pm$ 7.36	6.59 $\pm$ 4.49	12.06 $\pm$ 7.23	0.58 $\pm$ 0.27	0.73 $\pm$ 0.27	0.205
SR-1	46	11.20 $\pm$ 5.98	5.64 $\pm$ 4.05	11.10 $\pm$ 5.94	0.52 $\pm$ 0.21	0.67 $\pm$ 0.30	0.224
SR-2	46	10.40 $\pm$ 5.86	5.36 $\pm$ 3.74	10.23 $\pm$ 5.68	0.62 $\pm$ 0.23	0.70 $\pm$ 0.28	0.114
ค่าเฉลี่ย	46.36	11.38 $\pm$ 0.53	5.90 $\pm$ 0.37	11.16 $\pm$ 0.50	0.57 $\pm$ 0.04	0.70 $\pm$ 0.02	0.187

$$*F_{IS} = 1 - (H_o/H_e) \text{ (Nei, 1977)}$$

4.2 Performance of different strains of *Mimachlamys senatoria*

นายสาโรจน์ เริ่มดำริห์ และศาสตราจารย์อุทัยรัตน์ ณ นคร

การศึกษาเรื่องนี้ได้รับโครงการเป็นการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการรอดของ หอยเชลล์ (*Mimachlamys senatoria*) โดยทำการทดลองดังนี้

(1) ศึกษาชนิดของแพลงก์ตอน และความหนาแน่นที่เหมาะสม ในการอนุบาลลูกหอยอายุ 45 วัน โดยทดลองเลี้ยงลูกหอยเชลล์ด้วยแพลงก์ตอนพืช 5 ชนิด ได้แก่ *Isochrysis* sp., *Chaetoceros* sp., *Skeletonema* sp., *Chlorella* sp. และ *Tetraselmis* sp. ให้ในความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 5,000, 20,000 และ 40,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงว่า ชนิดแพลงก์ตอนพืชที่ลูกหอยเชลล์สามารถรองรับได้ดีและรวดเร็ว คือ *Chaetoceros* sp. และ *Isochrysis* sp. และความหนาแน่นเซลล์ของแพลงก์ตอนพืชที่ลูกหอยเชลล์รองรับได้ดีและรวดเร็ว คือ 5,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลูกหอยเชลล์ทุกชุดการทดลองรอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์

(2) ศึกษาปริมาณการรองรับอาหารและอัตราการรอดของลูกหอยเชลล์อายุประมาณ 70 วัน ที่ทดลองเลี้ยงในน้ำความเค็มต่างกัน 4 ระดับ คือ 25, 27, 29 และ 31 ppt. โดยให้อาหารเป็นแพลงก์ตอนพืชชนิด *Tetraselmis* sp. ในปริมาณ 25,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่าแนวโน้มในการรองรับอาหารและอัตราการรอดของหอยเชลล์ที่ระดับความเค็มต่าง ๆ กัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และมีแนวโน้มว่าอาจมีอิทธิพลของอุณหภูมิร่วมด้วย (confound) ทำให้ผลการทดลองอาจไม่แม่นยำ

(3) ผลของระดับความลึกน้ำและความขุ่นต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของหอยเชลล์
ทดลองนำลูกพันธุ์หอยเชลล์ *Mimachlamys senatoria* อายุประมาณ 6 – 7 เดือน ขนาดความยาวเปลือกเฉลี่ย 2.0 – 2.6 เซนติเมตร ทดลองเลี้ยงในถุงอวนแบบ Pearl net เลี้ยงที่ระดับความลึกน้ำ 1 เมตร และ 4 เมตร ในบริเวณพื้นที่เลี้ยงต่างกัน 2 แห่ง คือ ทะเลบริเวณอ่าวศรีราชา และบริเวณท่าเทียบเรือช่องแสมสาร เป็นระยะเวลา 4 เดือน ตรวจวัดปริมาณความขุ่นน้ำ วิเคราะห์หาปริมาณของแข็งที่แขวนลอยในน้ำ (suspended solids) ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตและการรอดตายของหอยเชลล์ เมื่อทำการทดลองไประยะหนึ่ง เกิดปัญหาหอยตายโดยไม่ทราบสาเหตุ จึงยุติการทดลอง

(4) ศึกษาผลของขนาดตาอวน ต่อผลการเลี้ยงหอยเชลล์ ทดลองนำลูกพันธุ์หอยเชลล์ *Mimachlamys senatoria* อายุประมาณ 6 – 7 เดือน ขนาดความยาวเปลือกเฉลี่ย 2.0 – 2.6 เซนติเมตร ทดลองเลี้ยงในถุงอวนแบบ Pearl net ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 36 เซนติเมตร สูง 45 เซนติเมตร ซึ่งมีขนาดตาอวน 0.1 0.5 และ 1.0 เซนติเมตร จำนวนถุงละ 10 ตัว แขนงเลี้ยงที่ระดับความลึกน้ำ 4 เมตร ในบริเวณพื้นที่เลี้ยงต่างกัน 2 แห่ง คือ ทะเลบริเวณอ่าวศรีราชา และบริเวณท่าเทียบเรือช่องแสมสาร เป็นระยะเวลา 4 เดือน บันทึกชนิดของสิ่งมีชีวิตที่พบอาศัยในอุปกรณ์เลี้ยงทั้ง 3 แบบ พร้อมทั้งศึกษาอัตราการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตายของหอยเชลล์

เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูล พบว่ากลุ่มทดลองไม่มีความแตกต่างกันในด้านความยาว ความสูง และอัตราการรอด แต่ในเดือนที่ 3 หอยเชลล์ที่เลี้ยงในถุงอวนขนาดตา 1.0 ซม. มีความกว้างมากกว่าชุดที่เลี้ยงด้วยถุงอวนขนาดตา 0.1 ซม. อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่แตกต่างทางสถิติจากชุดถุงตาอวนขนาด 0.5

ชม. และในเดือนที่ 4 หอยเชลล์ที่เลี้ยงในถุงอวนขนาดตา 1.0 ซม. มีความกว้างและน้ำหนักสูงกว่าชุดที่เลี้ยงด้วยถุงอวนขนาดตา 0.1 ซม. แต่ไม่แตกต่างทางสถิติจากชุดถุงตาอวนขนาด 0.5 ซม. (ตารางที่ 8) อย่างไรก็ตามมีความเป็นไปได้ว่า จำนวนหอยที่เหลือในแต่ละชุดการทดลอง อาจมีผลทำให้เกิดความแตกต่างดังกล่าว และพบว่ากลุ่มที่เลี้ยงในตาอวนขนาดใหญ่กว่ามีแนวโน้มที่จะมีศัตรูเข้าไปอาศัยอยู่มากกว่า

ตารางที่ 8 ขนาดของหอยเชลล์ที่เลี้ยงด้วยถุงอวนที่มีขนาดตาอวนต่างกัน

ลักษณะ	ตาอวน (ซม.)	ระยะเวลาในการทดลองเลี้ยง				
		เดือนที่ 0	เดือนที่ 1	เดือนที่ 2	เดือนที่ 3	เดือนที่ 4
ความยาว (ซม.)	0.1	2.61±0.00 ^a	3.39±0.16 ^a	3.96±0.21 ^a	4.37±0.20 ^a	4.56±0.21 ^a
	0.5	2.61±0.00 ^a	3.08±0.16 ^a	3.77±0.12 ^a	4.35±0.12 ^a	4.76±0.16 ^a
	1.0	2.61±0.00 ^a	2.91±0.33 ^a	3.87±0.14 ^a	4.46±0.06 ^a	4.88±0.01 ^a
ความสูง (ซม.)	0.1	3.06±0.00 ^a	3.78±0.14 ^a	4.37±0.16 ^a	4.78±0.17 ^a	4.94±0.18 ^a
	0.5	3.06±0.00 ^a	3.46±0.17 ^a	4.19±0.12 ^a	4.77±0.15 ^a	5.14±0.14 ^a
	1.0	3.06±0.00 ^a	3.27±0.34 ^a	4.28±0.18 ^a	4.84±0.10 ^a	5.27±0.04 ^a
ความกว้าง (ซม.)	0.1	0.82±0.00 ^a	1.08±0.57 ^a	1.19±0.07 ^a	1.32±0.06 ^a	1.42±0.09 ^a
	0.5	0.82±0.00 ^a	1.01±0.05 ^a	1.35±0.29 ^a	1.36±0.04 ^{ab}	1.52±0.04 ^{ab}
	1.0	0.82±0.00 ^a	0.96±0.10 ^a	1.26±0.02 ^a	1.45±0.03 ^b	1.62±0.05 ^b
น้ำหนัก (ก.)	0.1	3.91±0.00 ^a	7.10±0.87 ^a	11.13±1.43 ^a	14.46±1.91 ^a	15.71±2.00 ^a
	0.5	3.91±0.00 ^a	5.73±0.84 ^a	10.33±0.84 ^a	15.07±1.28 ^a	19.19±1.66 ^{ab}
	1.0	3.91±0.00 ^a	5.23±1.09 ^a	11.13±0.63 ^a	16.55±0.27 ^a	21.13±1.59 ^b
อัตราการรอด (%)	0.1	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a
	0.5	100.00±0.00 ^a	93.33±0.58 ^a	93.33±0.58 ^a	93.33±0.58 ^a	93.33±0.58 ^a
	1.0	100.00±0.00 ^a	93.33±0.58 ^a	76.67±2.31 ^a	76.67±2.31 ^a	76.67±2.31 ^a

การทดลองที่ได้ไม่เป็นไปตามวัตถุประสงค์ เนื่องจากมีปัญหาสิ่งทดลองถูกรบกวนโดยปัจจัย
สิ่งแวดล้อม โดยผู้วิจัยยังไม่สามารถหาวิธีกำจัดปัจจัยเหล่านั้นได้ จึงขอยุติการทดลองทั้งหมด อย่างไรก็ตาม
ตามผลการทดลองที่ได้แม้จะไม่สามารถเขียนเป็นรายงานแต่ก็ให้ข้อมูลที่นักวิจัยจะสามารถนำไปปรับ
ใช้ได้ในอนาคต

5. โครงการที่ดำเนินการต่อเนื่องจากโครงการที่ได้รับทุนเมธีวิจัยอาวุโส 2546

5.1 Genetic diversity of hatchery stocks of striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus* in Thailand

เป็นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาสวายในโรงเพาะฟักในประเทศไทย เนื่องจากปลาสวายในประเทศไทย ได้มีการนำมาเพาะเลี้ยงในฟาร์มต่อเนื่องหลายสิบชั่วอายุแล้ว ทำให้เป็นที่น่ากังวลว่า พันธุกรรมของมันอาจจะถดถอย เนื่องจากไม่ได้มีการจัดการทางพันธุกรรมที่ดี ทำการศึกษาในปลาสวาย 6 ประชากร ซึ่งมีการจัดการพันธุกรรมแตกต่างกันเป็น 2 แบบ คือเป็นประชากรปิด (ไม่มีการนำปลาจากประชากรอื่นเข้ามาผสม) และประชากรแบบเปิด (มีการนำปลาจากประชากรอื่นเข้ามาผสมเป็นครั้งคราว) และได้นำประชากรธรรมชาติในแม่น้ำเจ้าพระยา และสาขา และจากแม่น้ำโขงมาร่วมศึกษาด้วย จากการวิเคราะห์ microsatellite 5 ตำแหน่ง พบว่าประชากรโรงเพาะฟักที่มีการนำประชากรอื่นเข้ามาผสม มีความหลากหลายของอัลลีลในระดับสูง ($A_r=6.53-8.06$) เมื่อเทียบกับประชากรที่นำประชากรจากแหล่งเดียวกัน (แม่น้ำเจ้าพระยา) เข้ามาผสม ($A_r=3.18-6.06$) เป็นที่น่าสังเกตว่าประชากรส่วนใหญ่มีค่า heterozygosity ค่อนข้างสูง ($H_o=0.633-0.763$; $H_e=0.593-0.834$) พบการ introgress ของพันธุกรรมบางส่วนจากประชากรแม่น้ำโขง ส่วนประชากรธรรมชาติมีความหลากหลายของอัลลีลต่ำ ($A_r=4.89-5.98$) และไม่แตกต่างจากประชากรโรงเพาะฟัก

ผลการศึกษาชี้แสดงว่าประชากรปลาสวายในโรงเพาะฟักในประเทศไทย มีพันธุกรรมของปลาแม่น้ำโขงมาผสม ซึ่งอาจทำให้สูญเสียเอกลักษณ์ทางพันธุกรรม ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับลักษณะที่ดีบางลักษณะ เช่นการปรับตัวเข้ากับสภาพประเทศไทย ความต้านทานโรค ฯลฯ จึงควรหลีกเลี่ยงการนำปลาสวายจากแหล่งอื่นเข้ามาผสมเพิ่มเติม

รายงานเรื่องนี้ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ดังนี้

Na-Nakorn, U., Moeikum, T. 2009. Genetic diversity of domesticated stocks of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage 1878), in Thailand: Relevance to broodstock management regimes. *Aquaculture* 297: 70-77

5.2 Performance and genetic diversity of wild and hatchery stocks of striped catfish

Pangasianodon hypophthalmus in Vietnam

ในปัจจุบันประเทศไทยเวียดนามส่งออกปลาสวายจากการเพาะเลี้ยงปีละหลายแสนตัน ทั้งนี้โดยอาศัยลูกปลาจากธรรมชาติเป็นหลัก นอกจากนั้นเริ่มมีความสนใจที่จะนำสายพันธุ์ปลาสวายจากธรรมชาติมาเพาะเลี้ยงให้เกิดการ domestication ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องศึกษาสถานะภาพปัจจุบันของปลาสวายเหล่านี้ เพื่อประโยชน์ในการวางแผนต่อไป ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ *microsatellite* 5 ตำแหน่ง ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาสวายจากฟาร์มเลี้ยง 4 แห่ง และจากแหล่งน้ำธรรมชาติ 3 ประชากร ซึ่งเก็บจากแม่น้ำโขง และแม่น้ำ Bassac เมื่อ พ.ศ. 2548 และจากอีก 1 ประชากรเก็บจากแม่น้ำ Bassac ในปี 2549 ผลการศึกษาไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลาแต่ละประชากร (ผลจาก F_{ST} และ model-based clustering) การวิเคราะห์ AMOVA แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างระหว่างประชากรธรรมชาติและประชากรจากฟาร์ม ทั้งๆที่ได้เก็บปลาเหล่านี้มาเพาะในโรงเพาะฟักประมาณ 1-2ชั่วอายุมาแล้ว ความหลากหลายทางพันธุกรรมก็ไม่แตกต่างกันระหว่างประชากรธรรมชาติ และประชากรเลี้ยง (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, $H_e=0.62-0.64$ ในปลาธรรมชาติ และในปลาเลี้ยงเท่ากับ $A=4.60-5.20$; $A_r=4.10-4.83$; $A_e=2.80-3.11$; $H_o=0.61-0.66$; $H_e=0.61-0.64$) ผลการศึกษาแสดงว่า เกษตรกรได้นำปลาจากธรรมชาติจำนวนมาก มาใช้เป็นประชากรเริ่มต้น จึงทำให้ไม่เกิดความแตกต่างทางพันธุกรรม ระหว่างปลาธรรมชาติ และปลาเลี้ยง นอกจากนั้นแล้วยังสรุปได้ว่า การ domesticate ยังเพิ่งเริ่มต้น จึงสามารถนำวิธีการที่ถูกต้องเข้าไปใช้ได้ทันที

รายงานฉบับนี้ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ ดังนี้

Ha, H.P., Nguyen, T.T.T., Poompuang, S. and Na-Nakorn, U. 2009. Microsatellites revealed no genetic differentiation between hatchery and contemporary wild populations of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage 1878) in Vietnam. *Aquaculture* 291: 154-160.

5.3 Improvement of African Catfish *Clarias gariepinus* Performance by Strain Crossing

ปลาดุกยักษ์ (African catfish, *Clarias gariepinus*) เป็นปลาพื้นเมืองของทวีปอาฟริกา ได้ถูกนำมาเลี้ยงทั่วโลก เพราะการเจริญเติบโตสูง และค่อนข้างทนต่อโรค ในประเทศไทยนั้น ปลาดุกยักษ์ แท้ๆ ไม่ได้รับความนิยมจากผู้บริโภค เพราะเนื้อมีสีขาวและมีความมันน้อย เกษตรกรจึงได้นำปลาดุกยักษ์ (เทศผู้) มาผสมข้ามกับปลาดุกอุยเทศเมีย ให้ลูกที่เรียกว่า “บิ๊กอุย” ซึ่งในปัจจุบันเลี้ยงกันแพร่หลายมาก ทำให้ผลผลิตปลาดุกสูงถึง 500000 ตัน/ปี อย่างไรก็ตามในปัจจุบันเกษตรกรสังเกตว่า ปลาดุกยักษ์มีอัตราการเจริญเติบโตต่ำลง และมีความเป็นไปไม่ได้ว่า พันธุกรรมอาจเสื่อมโทรมลง เนื่องจากพ่อแม่พันธุ์เริ่มต้นมีจำนวนน้อย ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการปรับปรุงพันธุกรรมของปลาดุกยักษ์ โดยการนำปลาต่างประชากรมาผสมข้าม เพื่อให้ได้ลูกผสมที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และอาจมีลักษณะทางเศรษฐกิจดีขึ้นด้วย

ในการศึกษาใช้ไพรเมอร์สำหรับ microsatellite 6 ตำแหน่ง ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาดุกยักษ์ จากโรงเพาะฟัก 4 แห่ง ได้แก่ สุพรรณบุรี อ่างทอง นครปฐม และนครสวรรค์ ผลการศึกษาพบว่า ปลา 4 ประชากรนี้ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม (นครปฐม-นครสวรรค์ และ สุพรรณบุรี-อ่างทอง) ชัดเจนตามลักษณะพันธุกรรม โดยมีค่า $F_{ST} = 0.1444$ ($P < 0.01$), $R_{ST} = 0.2195$ ($P < 0.01$) ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรมีค่าปานกลาง ($A = 4.67-12.17$; $A_e = 3.15-5.80$; $A_r = 4.67-9.65$; $H_o = 0.50-0.69$; $H_e = 0.67-0.80$) ดังนั้นจึงเลือกตัวแทนแต่ละกลุ่มประชากรมาผสมข้ามกัน โดยใช้ประชากร อ่างทอง ผสมกับนครปฐม (จำนวนพ่อแม่เพศผู้ เพศเมียอย่างละ 9 ตัว/ประชากร) ลูกผสมที่ได้มีค่าทางอิมมูโนวิทยา (mean phagocytosis) ดีขึ้นกว่าค่าเฉลี่ยของพ่อแม่ (heterosis = 70.97%; $P < 0.01$) อย่างไรก็ตามลักษณะอื่นๆ (ความยาวลำตัว และน้ำหนัก, ค่าความต้านทานจำเพาะต่อ *Aeromonas hydrophila*-antibody titre , phagocytic index และ ลักษณะเกี่ยวกับการสืบพันธุ์ในเพศผู้) ไม่แตกต่างระหว่างลูกผสมกับเฉลี่ยของพ่อแม่

ถึงแม้ว่าลักษณะหลายลักษณะไม่ได้ดีขึ้น แต่ลูกผสมจะเป็นประโยชน์ในแง่ที่น่าจะมีความหลากหลายสูงกว่าพ่อแม่ ประกอบกับค่าทางอิมมูโนที่ดีขึ้นเล็กน้อย ก็แสดงให้เห็นศักยภาพของลูกผสมในการผลิตลูกปลาคุณภาพดีได้

รายงานฉบับนี้ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ ดังนี้

Wachirachaiarn, A., W. Rungsin, P. Srisapoom and U. Na-Nakorn. 2009. Crossing of African catfish (*Clarias gariepinus*) strains based on strain selection using genetic diversity data. Aquaculture 290: 53-60.

5.4 Genetic Impacts of the Dissemination of the GIFT Strain Nile Tilapia in Thailand

ปลานิลเป็นปลาพื้นเมืองของทวีปอาฟริกา แต่ได้ถูกนำไปเลี้ยงในทวีปต่างๆทั่วโลก ในประเทศไทยนั้นปลานิลถูกนำเข้ามาตั้งแต่ปี พ.ศ.2508 และตั้งแต่นั้นมาก็ได้มีการเลี้ยงเป็นการค้า ภายใต้ชื่อสายพันธุ์ จิตรลดา ในปี 2540 ได้มีการนำปลานิลปรับปรุงพันธุ์ (GIFT=Genetically Improved Farmed Tilapia) เข้ามาเลี้ยงแพร่หลายในประเทศไทย ปลานิลสายพันธุ์นี้มีการเจริญเติบโตดี และมีลักษณะลำตัวสวย อย่างไรก็ตามเกษตรกรไทยบางส่วนยังคงเลี้ยงปลาสายพันธุ์จิตรลดาอยู่เช่นเดิม

มีความเป็นไปได้มากกว่าปลาสายพันธุ์ GIFT ที่นำเข้ามานี้ หากไม่มีการจัดการพันธุ์กรรมที่ดี อาจเกิดความเปลี่ยนแปลง ไปในทางที่ไม่ต้องการได้ นอกจากนั้นแล้ว สายพันธุ์ GIFT อาจทำให้ปลาสายพันธุ์จิตรลดา ที่เลี้ยงอยู่ในฟาร์มต่างๆปนเปื้อน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาทั้งสองสายพันธุ์

ในการศึกษาใช้ microsatellite primer 14 คู่ ประชากรที่นำมาศึกษาประกอบด้วย พ่อแม่ปลาจากฟาร์มที่เลี้ยงปลาสายพันธุ์ GIFT 4 ฟาร์ม และฟาร์มที่เลี้ยงสายพันธุ์พื้นเมือง (จิตรลดา) 2 ฟาร์ม ใช้ประชากรเทียบเคียงจากแหล่งต่างๆ คือ (1) ปลาสายพันธุ์ GIFT ชั่วอายุที่ 9 (2) สายพันธุ์จิตรลดา (3) และ (4) ประชากรปลานิลจาก Ivory Coast และ Uganda (5) ปลาหมอเทศ *O. mossambicus* และ (6) ปลา *O. aureus*

ผลการศึกษาพบว่าปลาสายพันธุ์ GIFT จากฟาร์ม 3 ใน 4 ฟาร์ม ยังคงรักษาความเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ โดยความหลากหลายทางพันธุกรรมไม่ลดลง นี่แสดงถึงการจัดการพ่อแม่พันธุ์ที่ถูกต้อง ปลาสายพันธุ์ GIFT จากโรงเพาะฟัก 1 แห่งเกิดการปนเปื้อนกับปลาสายพันธุ์จิตรลดา ในทำนองเดียวกัน การปนเปื้อนจากสายพันธุ์ GIFT สู่สายพันธุ์จิตรลดาก็เกิดขึ้น เป็นที่น่าแปลกใจที่พบว่าประชากร GIFT ตั้งเดิมมีการปนเปื้อนจากพันธุกรรมปลาหมอเทศ ซึ่งมีผลต่อเนื่องให้เกิดการปนเปื้อนในลักษณะเดียวกันนี้ ในประชากรปลาสายพันธุ์จิตรลดาในฟาร์มหนึ่งที่ปนเปื้อนกับ GIFT อย่างไรก็ตามพบว่าการปนเปื้อนมีผลให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมมีค่าสูงขึ้น

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ประชากรพ่อแม่พันธุ์ปลานิลในประเทศไทย มีความหลากหลายค่อนข้างสูง ซึ่งเป็นข้อดี ที่จะส่งผลดีต่อการเพาะเลี้ยงปลานิลของไทย การปนเปื้อนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้น แม้จะทำความหลากหลายมีค่าเพิ่มขึ้น แต่ก็ควรระวังว่าลักษณะภายนอกอาจเปลี่ยนแปลงไป ทั้งนี้เพราะสายพันธุ์ GIFT และจิตรลดา มีลักษณะต่างกันอย่างมาก การปนเปื้อนจากปลาหมอเทศและปลา *O. aureus* เป็นสิ่งที่ควรติดตาม เพราะอาจก่อให้เกิดผลเสียต่อสายพันธุ์ได้

นอกจากนั้นแล้ว การศึกษานี้ยังมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาประชากรปลานิลที่อาศัยในแหล่งน้ำของไทย ทั้งนี้เพราะปลาเหล่านี้เป็นผลผลิตสำคัญที่หล่อเลี้ยงชีวิตของชาวประมงสมัครเล่นจำนวนมาก จากการศึกษาในหลายประเทศ พบว่าผลผลิตปลานิลในแหล่งน้ำส่วนใหญ่ลดลง โดยมีสาเหตุจากการสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมเนื่องจากประชากรเริ่มต้นมีไม่มาก ทั้งยังถูกจับไปจะเป็นปริมาณมากนอกจากนั้นการปนเปื้อนทางพันธุกรรมจากปลาหมอเทศก็มีส่วนทำให้ผลผลิตลดลง

ในการศึกษาที่ใช้ microsatellite primer 14 คู่ ศึกษาประชากรปลานิลในธรรมชาติจาก 3 แหล่ง คือ บึงบรเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ อ่างเก็บน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี และบึงสามร้อยยอด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในการศึกษาที่ใช้ประชากรเทียบเคียง ได้แก่ ประชากรปลานิลจิตรลดา (ON-CD), ปลานิลสายพันธุ์ GIFT ชั่วอายุที่ 9 และปลาหมอเทศจากประเทศอิตาลี ผลการศึกษาแสดงว่า ประชากรปลานิลในอ่างเก็บน้ำทั้ง 3 แห่งมาจากปลาสายพันธุ์จิตรลดา แต่พบการปนเปื้อนทางพันธุกรรมจากสายพันธุ์ GIFT ในปลาประชากรจากบึงบรเพ็ด และบางพระ ส่วนประชากรสามร้อยยอด พบการปนเปื้อนจากปลาหมอเทศ ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรมีค่าสูงในประชากร บางพระ ($A_r = 7.99$, $H_o = 0.75$) ค่อนข้างต่ำในประชากรบึงบรเพ็ด ($A_r = 5.71$, $H_o = 0.62$) และสามร้อยยอด ($A_r = 5.78$, $H_o = 0.71$)

ผลการศึกษาแสดงว่าปลาในอ่างเก็บน้ำบางพระซึ่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง จะสามารถปรับตัวได้ดีเมื่อสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลง อย่างไรก็ตามยังมีความจำเป็นต้องจัดการเพื่อให้มี effective population size สูงอยู่เสมอ ส่วนปลาในอีก 2 แหล่งน้ำ ควรจัดการให้มีความหลากหลายเพิ่มขึ้น โดยนำปลาสายพันธุ์ต่างกัน (เช่น GIFT) มาปล่อยลงในแหล่งน้ำนั้น

รายงานฉบับนี้กำลังส่งไปตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ ดังนี้

- (1) Sukmanomon, S., Kamonrat, W., Poompuang, S., Nguyen, T.T.T., Bartley, D.M., May, B., Na-Nakorn, U. submitted manuscript. Genetic changes, intra- and interspecific introgression in farmed Nile tilapia in Thailand. A manuscript submitted to Aquaculture, September 2011.
- (2) Sukmanomon, S., Senanan, W., Kapuscinski, A.R., Na-Nakorn, U. submitted manuscript. Genetic diversity of feral populations of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Thailand and evidences of genetic introgression. A manuscript submitted to Fisheries Science, September 2011

6. โครงการที่ได้รับทุนสนับสนุนบางส่วนจาก โครงการเมธีวิจัยอาวุโส

6.1 Novel Microsatellites for Multiplex PCR of the Humpback Grouper, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes, 1828), and Application for Broodstock Management

ปลากะรังหน้างอน [*Chromileptes altivelis* (Valenciennes, 1828)] ได้กลายเป็นอาหารทะเลที่ได้รับความนิยม และมีราคาสูงโดยเฉพาะในเอเชีย (Pierre et al. 2008) ทำให้มีการจับปลาดังกล่าวจากธรรมชาติอย่างหนัก จนมีจำนวนลดลงอย่างน่าเป็นห่วง ด้วยเหตุนี้ กรมประมง โดย ศูนย์วิจัยพัฒนาประมงชายฝั่งระยอง จึงได้พยายามศึกษาวิจัย จนสามารถเพาะปลาชนิดนี้ได้สำเร็จ (เรณู ยาชิโร และคณะ, 2551) อย่างไรก็ตาม การเพาะใช้วิธีกระตุ้นให้ปลาวางไข่ แบบเลียนแบบธรรมชาติ แล้วเก็บรวบรวมลูกปลามาอนุบาล การเพาะพันธุ์ในลักษณะนี้ มักจะให้ค่า N_e ต่ำกว่าที่ควรจะเป็น ด้วยสาเหตุหลายประการเช่น พ่อแม่พันธุ์อาจไม่วางไข่ทุกตัว การผสมพันธุ์อาจไม่เป็นไปในสัดส่วน 1:1 และลูกจากพ่อแม่แต่ละคู่ มีอัตราการรอดไม่เท่ากัน (Brown et al., 2005)

ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาผลของการผสมพันธุ์ปลากะรังหน้างอน ซึ่งหากพบปัญหาที่จะนำไปสู่การลดลงของค่า N_e ก็จะวางแผนการจัดการพ่อแม่พันธุ์ที่ถูกต้องต่อไป ก่อนที่ความผิดพลาดจะดำเนินไปหลายชั่วอายุ จนทำให้ยากแก่การแก้ไข

ในการศึกษาเหล่านี้จำเป็นต้องใช้เครื่องหมายพันธุกรรม microsatellite อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าไม่สามารถใช้ไพรเมอร์ของปลาเก๋ชนิดอื่นๆ กับปลา *C. altivelis* นี้ได้ จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาไพรเมอร์ใหม่ขึ้น

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ 3 ประการ คือ (1) การศึกษาผลทางพันธุกรรมของการผสมพันธุ์ปลากะรังหน้างอน ประชากรพ่อแม่พันธุ์ของ ศูนย์วิจัยพัฒนาประมงชายฝั่งระยอง (2) เพื่อวางแผนการจัดการพันธุกรรมพ่อแม่พันธุ์เพื่อรักษาระดับความหลากหลายทางพันธุกรรม และหลีกเลี่ยงการผสมเลือดชิด (3) ทำการพัฒนาไพรเมอร์จำนวน 8 คู่ที่จำเพาะกับปลา *Cromileptes altivelis*

อุปกรณ์และวิธีการโดยย่อ

เก็บตัวอย่างครีบกะรังหน้างอน ประชากรพ่อแม่พันธุ์ 2 ชุด ชุดแรกจำนวน 20 ตัว (P, parent) เป็นพ่อแม่ปลาที่เจริญพันธุ์แล้วเป็นส่วนใหญ่ ของศูนย์วิจัยพัฒนาประมงชายฝั่งระยอง (รายละเอียดตามตารางที่ 9) และติดเครื่องหมาย pit-tag แล้ว ชุดที่ 2 เป็นลูกที่ได้จากการผสมพันธุ์ปลาในชุด P ในปี พ.ศ. 2551 (G1) โดยการเพาะพันธุ์นั้นทำโดยการฉีดฮอร์โมน ในปลาเพศเมีย 2 ตัว และปลาเพศผู้ 5 ตัว แล้วปล่อยลงบ่อปูนที่ขังพ่อแม่พันธุ์ทั้งหมดไว้ รวบรวมไข่นำมาฟักในอุปกรณ์ฟัก โดยรวบรวมต่อเนื่องไปประมาณ 10 วัน ซึ่งปลาจะหยุดวางไข่ ประชากรนี้มีจำนวนตัวอย่าง 120 ตัว ส่วนประชากรที่ 3 เป็นปลาที่มีศักยภาพจะเป็นพ่อแม่พันธุ์ (PP) จำนวน 118 ตัว

ทำการพัฒนาไพรเมอร์สำหรับ microsatellite ของปลา *C. altivelis* จำนวน 8 คู่ จากนั้นนำไปศึกษา จีโนไทป์ของปลาตัวอย่าง

นำ multilocus genotype ทดสอบความเบี่ยงเบนจากสมมติ Hardy-Weinberg ของตัวอย่างแต่ละกลุ่ม คำนวณค่า exact P ด้วยวิธี Markov chain คำนวณค่า F_{IS} ของแต่ละประชากร คำนวณค่าที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร [ความถี่อัลลีล, ค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง (average number of alleles per locus) และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต และค่าทางทฤษฎี (observed and expected heterozygosities, H_o และ H_e ตามลำดับ)] การเปรียบเทียบค่าความหลากหลายแต่ละค่าระหว่างประชากรใช้วิธี t -test ในกรณีที่มีการทดสอบหลายๆครั้งในข้อมูลชุดเดียวกัน จะปรับค่า critical value ด้วยวิธี sequential Bonferroni correction คำนวณค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (pairwise genetic relatedness- r_{xy} ; Ritland estimator) คำนวณค่าจำนวนพ่อแม่ทางพันธุกรรม (effective population size- N_e) ด้วยวิธี maximum likelihood

ทดสอบการเกิดคอขวด (recent bottleneck) ซึ่งหมายถึงการลดจำนวนพ่อแม่ทางพันธุกรรมอย่างฉับพลัน และทดสอบการกระจายตัวอย่างอิสระของจีโนไทป์ (linkage disequilibrium) ด้วยวิธี exact test (Markov chain: dememorization: 1000; batches: 100; iterations per batch: 1000)

เพื่อศึกษาความแตกต่างระหว่างประชากรในภาพรวม ทำการคำนวณค่า F statistics (F_{ST} , F_{IT} และ F_{IS}) ทดสอบนัยสำคัญทางสถิติของค่าแต่ละค่า ด้วยวิธี bootstrapping จากนั้นทดสอบความแตกต่างระหว่างประชากรโดยการเปรียบเทียบการกระจายตัวของความถี่อัลลีล ตามวิธี Fisher's exact test

ผลการศึกษาและวิจารณ์ผลโดยย่อ

สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ทั้งสิ้น 8 คู่ นำไปศึกษาความหลากหลายของประชากรได้ผลดังนี้ ประชากรทั้งสามประชากรไม่อยู่ในสมดุลฮาร์ดีไวนเบิร์ก โดย P และ $G1$ เบี่ยงเบนจากสมมติลงไปทิศทางที่มีเฮตเทอโรไซโกตมากกว่าค่าทางทฤษฎี ($F_{IS} = -0.134$ และ -0.118 ตามลำดับ) ส่วนประชากรพ่อแม่พันธุ์รุ่นใหม่ (PP) เบี่ยงเบนจากสมมติไปในทิศทางมีโฮโมไซโกตมากกว่าค่าทางทฤษฎี ($F_{IS} = 0.017$)

ไม่พบ genetic disequilibrium ในประชากรพ่อแม่พันธุ์รุ่นแรก (P) แต่ในประชากรรุ่นลูก ($G1$) พบ genetic disequilibrium ระหว่าง 7 คู่จีโนไทป์ และในประชากรพ่อแม่พันธุ์รุ่นใหม่ (PP) พบ 13 คู่จีโนไทป์ จากจำนวนทั้งสิ้น 21 คู่ ไม่พบว่ามีคอขวดของ N_e อย่างทันทีทันใด (bottleneck) ในประชากรทั้ง 3 ประชากร

ความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรแสดงไว้ในตารางที่ 10 ประชากรพ่อแม่พันธุ์มีความหลากหลายของอัลลีลระดับปานกลาง โดยค่าจำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง โดยจัดว่ามีค่าสูงเมื่อเทียบกับรุ่นลูก โดยเฉพาะเมื่อได้นำค่าความถี่อัลลีลมาถ่วง ค่า A_e ของพ่อแม่พันธุ์สูงเกือบเป็น 2 เท่าของรุ่นลูก ค่าจำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่งที่เป็นอิสระจากจำนวนตัวอย่าง (A_r) ก็แสดงแนวโน้มเช่นเดียวกัน ส่วนค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต และค่าทางทฤษฎีก็แสดงแนวโน้มเช่นเดียวกัน ส่วนประชากรพ่อแม่พันธุ์รุ่นใหม่ (PP) นั้นมีความหลากหลายของอัลลีลในภาพรวมค่อนข้างต่ำกว่าพ่อแม่

พันธุ์รุ่นแรก โดยเฉพาะอย่างยิ่งค่าความหลากหลายของอัลลีลที่ถ่วงด้วยความถี่อัลลีล และค่าที่เป็นอิสระจากจำนวนตัวอย่างมีค่าต่ำกว่าพ่อแม่รุ่นแรก ค่าเฮตเทอโรไซโกติของ PP มีค่าค่อนข้างต่ำกว่าพ่อแม่พันธุ์รุ่นแรกเช่นเดียวกัน

ค่า F_{ST} มีค่าค่อนข้างสูงและแตกต่างจากศูนย์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F_{ST} = 0.1415$, $CI_{95\%} = 0.0905 - 0.1864$) ทุกคู่ประชากรมีพันธุกรรมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรมีค่าต่ำกว่าพ่อแม่พันธุ์รุ่นแรก (P) กับรุ่นลูก (G1) ($D = 0.0781$) ส่วนประชากรพ่อแม่พันธุ์รุ่นใหม่ มีพันธุกรรมแตกต่างจาก P และ G1 ในระดับค่อนข้างสูง ($D = 0.1078$ และ 0.1891 ตามลำดับ)

ค่า N_e ที่คำนวณได้จากวิธี genetic disequilibrium มีค่าเท่ากับ 30 ตัว สำหรับประชากรพ่อแม่พันธุ์รุ่นแรก 13.8 ตัว สำหรับลูกรุ่นที่ 1 และ 18 ตัว สำหรับพ่อแม่พันธุ์รุ่นใหม่ ส่วนการคำนวณด้วยค่า heterozygote excess ได้ค่า N_e เท่ากับ 10.3, infinity และ 18.2 สำหรับ พ่อแม่พันธุ์รุ่นแรก ลูกรุ่นที่ 1 และพ่อแม่พันธุ์รุ่นใหม่ ตามลำดับ

ค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม r_{xy} ภายในพ่อแม่พันธุ์รุ่นแรก (P) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.0303 ± 0.2289 พ่อแม่พันธุ์รุ่นที่ 2 (G1) มีค่า r_{xy} เฉลี่ยเท่ากับ 0.0107 และค่า r_{xy} ระหว่าง P กับ G1 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ -0.1370 ± 0.2208

ประชากรทั้งสามประชากรไม่อยู่ในสมดุลฮาร์ดีไวนเบิร์ก ในกรณีของพ่อแม่พันธุ์ P นั้นแม้ในภาพรวมจะมีการเบี่ยงเบนจากสมดุล แต่เมื่อพิจารณาผลที่ microsatellite แต่ละตำแหน่ง พบว่ามีการเบี่ยงเบนที่ 2 จาก 8 ตำแหน่งเท่านั้น จึงไม่น่าจะเป็นการเบี่ยงเบนที่เกิดจากลักษณะของประชากรจริงๆ ส่วนในรุ่นลูกความเบี่ยงเบนอาจเกิดจากการผสมพันธุ์ปลาที่มีพันธุกรรมแตกต่างกันมาก ส่วนประชากรพ่อแม่พันธุ์รุ่นใหม่ (PP) เบี่ยงเบนไปในทิศทางที่มีโฮโมไซโกตมากกว่าค่าคาดหวัง น่าจะเกิดจากการที่ประชากรนี้ประกอบด้วยปลามากกว่า 1 ประชากร หรือที่เรียกว่า Wahlund effect ลักษณะเช่นนี้ไม่มีผลเสียต่อการใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์

ลูกรุ่นที่ 1 (G1) มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำกว่าพ่อแม่พันธุ์ การที่ความหลากหลายต่ำลงแสดงว่าลูกเหล่านี้ได้มาจากพ่อแม่พันธุ์จำนวนน้อย จากการคำนวณค่า N_e มีค่าเท่ากับ 13.8 ตัว ซึ่งเป็นค่าที่ค่อนข้างสูงกว่าที่คาดไว้ ดังนั้นอาจจะอนุมานได้ว่าคงจะมีพ่อแม่ปลานอกเหนือจากตัวที่ฉีดฮอร์โมน ถูกกระตุ้นให้ผสมพันธุ์วางไข่ด้วย การที่ความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำกว่าชุดพ่อแม่พันธุ์ จึงไม่ควรใช้ปลารุ่นนี้ชุดเดียวเป็นพ่อแม่พันธุ์ หากจะใช้ควรเพิ่มความหลากหลายโดยใช้ลูกที่ได้จากพ่อแม่ตัวอื่นๆมาผสมเข้ากัน

สำหรับประชากรพ่อแม่พันธุ์รุ่นใหม่ (PP) นั้น มีพันธุกรรมแตกต่างจากประชากรพ่อแม่พันธุ์ชุดแรก และลูกรุ่นที่ 1 มาก จึงสามารถนำมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ได้ ปลาเก่านั้นมีข้อจำกัดในเรื่องการเปลี่ยนแปลง ทำให้มีปลาเพศใดเพศหนึ่งมากและมีเพศตรงกันข้ามน้อย สำหรับ *C. altivelis* จะเจริญพันธุ์เป็นเพศเมีย แล้วจึงเปลี่ยนเป็นเพศผู้เมื่ออายุมากขึ้น ในขณะที่พ่อแม่พันธุ์รุ่นแรก (P) เริ่มกลายเป็นเพศผู้ในเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจึงอาจมีปัญหาขาดปลาเพศเมียในอนาคต แนวทางหนึ่งในการแก้ปัญหา คือ ใช้ประชากรพ่อแม่พันธุ์รุ่นใหม่ซึ่งมีอายุน้อยกว่าเป็นฝ่ายแม่ได้

ในการจัดการพันธุกรรมพ่อแม่พันธุ์ให้คงมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงในระยะยาวนั้น สามารถทำได้หลายแนวทาง อย่างไรก็ตามในทุกแนวทางจำเป็นต้องจัดการให้มี N_e สูง เนื่องจากในการผสมพันธุ์แบบสุ่มนั้น N_e จะเป็นปัจจัยกำหนดการเกิดการผสมเลือดชิดโดยตรง และแม้แต่การจัดการโดยการจับคู่ตามค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ก็จำเป็นต้องมี N_e สูงพอเพื่อจะรักษาความหลากหลายของอัลลีลไว้ จึงควรตระหนักว่า N_e นอกจากจะขึ้นกับจำนวนพ่อแม่พันธุ์แล้ว ยังขึ้นกับวิธีการผสมพันธุ์และความแปรปรวนของขนาดครอบครัว (variance of family size) โดยควรผสมแยกเป็นคู่ๆ (single pair mating) และนำลูกจากแต่ละคู่ผสมจำนวนเท่าๆกันมาเป็นพ่อแม่พันธุ์ และจากความสำเร็จของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา *C. altivelis* แบบแช่แข็ง จะทำให้สามารถเพาะพันธุ์ปลาชนิดนี้ได้ตามคู่ผสมที่กำหนดได้มากขึ้น

รายงานเรื่องนี้ได้ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ดังนี้

Na-Nakorn, U., Yashiro, R., Wachirachaikarn, A., Pansaen, N. 2010. Novel microsatellites for multiplex PCRs of the Humpback grouper, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes, 1828), and application for broodstock management. *Aquaculture* 306: 57 – 62. (2010 IF = 1.925)

ตารางที่ 9 ข้อมูล พ่อแม่พันธุ์ปลาเก๋า *Cromileptes altivelis* ณ วันที่ 22 กุมภาพันธ์ 2551 เมื่อทำการเก็บตัวอย่าง

หมายเลข	ID	น้ำหนักตัว (กก.)	ความยาวลำตัว (ซม.)	เพศ	ที่มา	หมายเหตุ
1	113626537A	1.4	ไม่ได้วัด	ไม่ทราบ	ไม่ทราบ	
2	1153251712A	1.7	41.0	ไม่ทราบ	ไม่ทราบ	
3	116926537A	1.0	38.0	ไม่ทราบ	ไม่ทราบ	
4	116926363A	1.4	44.0	ไม่ทราบ	ไม่ทราบ	
5	122714483A	1.6	44.0	ผู้	จ.ระยอง	ใช้เป็นแม่พันธุ์
6	137677674A	1.5	45.0	ผู้	อินโดนีเซีย	
7	TN*005*094*519	2.3	50.0	ผู้	ไม่ทราบ	
8	137973373A	3.9	59.0	ผู้	เวียดนาม	ใช้เป็นแม่พันธุ์
9	115312174A	1.2	ไม่ได้วัด	เมีย	ไม่ทราบ	
10	116949252A	1.4	42.0	ไม่ทราบ	ไม่ทราบ	
11	137924143A	4.7	60.0	ผู้	อินโดนีเซีย	ใช้เป็นพ่อพันธุ์
12	115248140A	2.3	50.0	ผู้	อินโดนีเซีย	ใช้เป็นพ่อพันธุ์
13	122676585A	1.6	43.0	ผู้	ไม่ทราบ	
14	TN*002*286*789	1.8	47.0	เมีย*	อินโดนีเซีย	ใช้เป็นพ่อพันธุ์*
15	122746574A	2.0	46.0	ผู้	ไม่ทราบ	ใช้เป็นพ่อพันธุ์
16	114935152A	1.3	39.5	ไม่ทราบ	ไม่ทราบ	
17	114945251A	1.4	41.0	ไม่ทราบ	ไม่ทราบ	
18	TN*005*373*890	1.8	45.5	ผู้	จ.พังงา	ใช้เป็นพ่อพันธุ์
19	1227964654A	1.6	43.0	ไม่ทราบ	ไม่ทราบ	
20	115325497A	1.6	43.5	ไม่ทราบ	ไม่ทราบ	

หมายเหตุ: * หมายเลข 14 พบว่ามีไข่ในวันเก็บตัวอย่าง อาจเกิดจากการเปลี่ยนเพศ

ตารางที่ 10 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลาเก๋า *Cromileptes altivelis* (Valenciennes, 1828) ในโรงเพาะฟัก; N = จำนวนตัวอย่าง; A = ค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง; A_e = ค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งที่ถ่วงด้วยความถี่อัลลีล; A_r = ค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งที่ถ่วงด้วยขนาดตัวอย่าง; H_o = ค่าสังเกต heterozygosity; H_e = ค่า heterozygosity จากการคำนวณ; F_{IS} = fixation index, * แสดงว่าไม่อยู่ในสมดุล Hardy-Weinberg; r_{xy} = ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเฉลี่ย

สต็อก	N	A	A_e	A_r	H_o	H_e	F_{IS}	r_{xy}
พ่อแม่ (P)	20	7.00 ± 5.13	4.11 ± 2.44	$7.00 \square 5.13$	0.76 ± 0.24	0.67 ± 0.22	-0.134*	-0.0416
ลูกรุ่น 2551 (G1)	120	5.38 ± 2.83	2.70 ± 1.43	4.03 ± 1.55	0.57 ± 0.41	0.51 ± 0.27	-0.118*	0.0097
ปลารุ่นที่มี ศักยภาพเป็นพ่อแม่พันธุ์ (PP)	118	7.75 ± 4.06	3.18 ± 1.57	5.31 ± 2.47	0.58 ± 0.33	0.59 ± 0.25	0.017*	0.0107
ภาพรวม	86	6.71 ± 1.21	3.33 ± 0.72	5.45 ± 1.49	0.64 ± 0.11	0.59 ± 0.08	-0.078	

6.2 Loss of Genetic Variation of *Phalacrodon bleekeri* (Günther, 1864) in the Hatchery Stocks as Revealed by the Newly Developed Multiplex PCR Microsatellites

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัย “สถานะภาพการเลี้ยงปลาไทยในจังหวัดชัยนาท” โดยได้รับทุนวิจัยจาก ฝ่ายเกษตร สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย อย่างไรก็ตามผลการศึกษาแสดงว่า จำเป็นต้องศึกษาสถานะภาพทางพันธุกรรมของพ่อแม่พันธุ์ปลาแดง ที่เลี้ยงอยู่ในศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดจังหวัดชัยนาท และจำเป็นต้องพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรม microsatellite เพื่อใช้กับปลาชนิดนี้ จึงจำเป็นต้องใช้ทุนวิจัยส่วนหนึ่งจากโครงการการประยุกต์ใช้พันธุศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพ เพื่อการพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน-II (เมธีวิจัยอาวุโส 2550) ไปสมทบ มีรายละเอียดการศึกษา ดังนี้

ปลาแดง *Phalacrodon bleekeri* เป็นปลาพื้นเมืองที่ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคเป็นอย่างสูง อย่างไรก็ตามผลผลิตปลาแดงในปัจจุบันได้มาจากปลาธรรมชาติทั้งสิ้น ดังนั้นในสภาพสิ่งแวดล้อมที่เสื่อมโทรมลง ประกอบกับการจับปริมาณมาก ๆ ในแต่ละปี ทำให้เกิดความกังวลว่าปลาชนิดนี้อาจสูญพันธุ์ได้ด้วยเหตุนี้กรมประมงจึงได้ศึกษาวิธีการเพาะพันธุ์ปลาชนิดนี้ โดยศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดชัยนาท ได้เพาะพันธุ์ปลาชนิดนี้ และมีพ่อแม่พันธุ์อยู่ในโรงเพาะฟัก 2 รุ่น โดยได้ใช้ลูกปลาจากสต็อกเหล่านี้ปล่อยลงแม่น้ำเจ้าพระยา เพื่อเพิ่มผลผลิตปลาชนิดนี้ต่อไป

อย่างไรก็ตามโดยปกติพ่อแม่ปลาในโรงเพาะฟักมักมีความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลง เนื่องจากสาเหตุสำคัญ คือ การนำลูกจากพ่อแม่พันธุ์จำนวนน้อยไปเป็นพ่อแม่ในรุ่นถัดไป และเนื่องจากความหลากหลายทางพันธุกรรมสำคัญต่อความสามารถในการปรับตัวต่อสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป จึงมีความจำเป็นต้องศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรโรงเพาะฟักเหล่านี้ นอกจากนั้นแล้วยังศึกษาความสำเร็จของการปล่อยปลาแดงลงสู่แม่น้ำ

ในการศึกษานี้จำเป็นต้องใช้เครื่องหมายพันธุกรรม microsatellites ซึ่งมีความเหมาะสมในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม เพราะมีคุณสมบัติ neutral การเก็บตัวอย่างไม่จำเป็นต้องฆ่าปลา และมีความหลากหลายสูง จึงได้ทำการพัฒนา microsatellite primers ซึ่งสามารถวิเคราะห์พร้อมๆ กันได้หลาย primer หรือที่เรียกว่า multiplex PCRs

อุปกรณ์และวิธีการโดยย่อ

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากส่วนครีบทหางพ่อแม่ปลาแดงในโรงเพาะฟักของศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดชัยนาท 2 ประชากร ได้แก่ ประชากรที่ได้จากการเพาะพันธุ์ในปี 2542 และ 2549 จำนวนตัวอย่าง 39-40 ตัว และเก็บตัวอย่างจากปลาธรรมชาติในแม่น้ำเจ้าพระยาบริเวณหน้าศูนย์จำนวน 39 ตัว

นำตัวอย่างมาสกัด DNA จากนั้นนำไปพัฒนา primer สำหรับ microsatellite ของปลาแดงจำนวน 7 คู่ จากนั้นนำไปศึกษา จีโนไทป์ของปลาตัวอย่าง อย่างไรก็ตามพบว่า primer 1 คู่ เกิด linkage disequilibrium ในทุกประชากร จึงได้ตัดออก 1 คู่ เหลือที่นำมาใช้ในการศึกษาเพียง 6 คู่

นำ multilocus genotype ทดสอบความเบี่ยงเบนจากสมมูล Hardy-Weinberg คำนวณค่า exact P ด้วยวิธี Markov chain คำนวณค่าแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร [ความถี่อัลลีล, ค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต และค่าทางทฤษฎี] เปรียบเทียบค่าความหลากหลายแต่ละค่าระหว่างประชากรใช้วิธี t -test

ทดสอบการกระจายตัวอย่างอิสระของจีโนไทป์ (linkage disequilibrium) ด้วยวิธี exact test เพื่อศึกษาความแตกต่างระหว่างประชากรในภาพรวม ทำการคำนวณค่า F statistics (F_{ST} , F_{IT} และ F_{IS}) ทดสอบนัยสำคัญทางสถิติของค่าแต่ละค่า ด้วยวิธี bootstrapping จากนั้นทดสอบความแตกต่างระหว่างประชากรโดยการเปรียบเทียบการกระจายตัวของความถี่อัลลีล ตามวิธี Fisher's exact test ศึกษา contributions ของปลาจากโรงเพาะฟักต่อประชากรธรรมชาติ ด้วยวิธี Bayesian assignment

ผลการศึกษาและวิจารณ์ผลโดยย่อ

สามารถพัฒนา microsatellite primers ได้ 7 คู่ ตามตารางที่ 11 โดยสามารถทำปฏิกิริยาได้พร้อมกันเป็น 2 ชุด แต่นำมาใช้ในการศึกษาเพียง 6 คู่

ประชากรธรรมชาติอยู่ในสมมูล Hardy-Weinberg ส่วนประชากรโรงเพาะฟักเบี่ยงเบนจากสมมูลในลักษณะที่มี homozygote มากกว่าที่ควรจะเป็น ซึ่งคาดว่าจะเป็นผลจากการที่สุ่มตัวอย่างมาน้อยเกินไป ไม่ใช่ผลของการปะปนกันของประชากรมากกว่า 1 ประชากร และการผสมเลือดชิด (เพราะพบ heterozygote excess ที่บาง locus) ไม่พบ genetic disequilibrium ระหว่างคู่ loci ในประชากรธรรมชาติ และประชากรปี 2542 ส่วนประชากร ปี 2549 พบ disequilibrium ระหว่าง 4 คู่ loci

ความหลากหลายของอัลลีล (จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง)ของประชากรโรงเพาะฟักต่ำกว่าประชากรธรรมชาติ 1.5 เท่า (ตารางที่ 12) โดยที่ heterozygosity ไม่แสดงความแตกต่าง ซึ่งแสดงว่าเกิด genetic drift ขึ้น ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการที่การเพาะพันธุ์ได้ผลไม่ดีนัก จึงได้ลูกปลาจากพ่อแม่ไม่กี่คู่มาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์

F_{ST} มีค่าเท่ากับ 0.086 และแตกต่างจากศูนย์อย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าประชากรอย่างน้อยคู่หนึ่งมีความแตกต่างกัน ($CI_{95} = 0.130 - 0.052$) ทุกประชากรมีพันธุกรรมแตกต่างกัน โดยประชากรโรงเพาะฟักจะคล้ายคลึงกันมากที่สุด

Bayesian assignment จำแนกปลาแต่ละตัวจากประชากรธรรมชาติลงในกลุ่มประชากรธรรมชาติ 100% แสดงว่าประชากรโรงเพาะฟักที่มีการปล่อยลงในแหล่งน้ำก่อนหน้านี้ ไม่ได้มีส่วนใน genepool ของประชากรธรรมชาติเลย

ผลการศึกษาแสดงว่า ประชากรปลาแดงในโรงเพาะฟักไม่เหมาะที่จะใช้ปล่อยแหล่งน้ำ เพราะพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไปแล้ว นอกจากนั้นยังมีความหลากหลายต่ำ แต่ประชากรทั้งสองนี้อาจมีประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยง โดยควรเพิ่มความหลากหลายโดยนำประชากรธรรมชาติมาผสม ซึ่งถึงแม้จะเป็นการย้อนกระบวนการ domestication แต่จำเป็นต้องทำเพื่อความยั่งยืนของประชากรโรงเพาะฟัก

ตารางที่ 11 ลักษณะของ microsatellite primers 7 คู่ ที่พัฒนาจาก DNA ของปลาแดง ข้อมูลได้จากการวิเคราะห์ในปลา 78 ตัว

Primer name	Accession number	Repeat sequence	Primer details	Predicted product size	Observed product range	Allele number	Expected heterozygosity
<i>PBL06</i>	GU306058	(GA) ₉ N(GA) ₉	F 5'CCATCTAGTAGGGGTCCGGTA3' R 5'TAGCTTGTGCGGTTTTCTGA3'	150	133-171	14	0.906
<i>PBL10</i>	GU306057	(GT) ₂₅	F 5'GGCTCAGTTATAAACCCGACA3' R 5'AGGATGACCCTCATCACTCTG3'	203	181-223	17	0.902
<i>PBL17</i>	GU306059	(GAA) ₈	F 5'TGTAAGCAAAGCTGTGAGCAA3' R 5'GGCGGGCAACAAAGTTTAAT3'	231	220-235	5	0.588
<i>PBL21</i>	GU306060	(GT) ₉	F 5'TCTGAAGCCGCCTTTTAGTT3' R 5'GAAGGATCCACTGCCTGGTA3'	183	204-250	24	0.927
<i>PBL24</i>	GU306061	(GA) ₁₅	F 5'TGTGTGTTCTGACATGGGAAA3' R 5'CCCAATGGAAAAATAGGAACAA3'	249	242-276	15	0.893
<i>PBL26</i>	GU306062	(GA) ₆₃	F 5'CCAGTCCAGGTATAACAAGCAG3' R 5'AGGAACATGTTTGGGTCTCG3'	227	235-279	18	0.848
<i>PBL33</i>	GU306063	(CT) ₂₄	F 5'CTCAGAGGCCTCACAGCATT3' R 5'AATCGCGTTTCTTTGCATT3'	178	156-194	16	0.889

ตารางที่ 12 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาแดง ประชากรโรงเพาะฟักและประชากรธรรมชาติ n = จำนวนตัวอย่าง; A = ค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง; A_e = ค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งที่ถ่วงด้วยความถี่อัลลีล; H_o = ค่าสังเกต heterozygosity; H_e = ค่า heterozygosity จากการคำนวณ; ค่าในส้อมเดียวกันกำกับด้วยอักษรต่างกัน แสดงว่าแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.01$)

ประชากร	n	A	A_e	H_o	H_e
ธรรมชาติ	39	13.00 ± 4.65^a	7.29 ± 2.67^a	0.84 ± 0.14^a	0.84 ± 0.12^a
พ่อแม่ปลา 2542	39	8.00 ± 2.00^b	4.83 ± 1.61^b	0.75 ± 0.11^a	0.79 ± 0.07^a
พ่อแม่ปลา 2549	40	7.17 ± 1.84^b	3.80 ± 1.39^b	0.70 ± 0.23^a	0.70 ± 0.15^a
ภาพรวม	118	9.39 ± 3.16	5.31 ± 1.79	0.76 ± 0.07	0.78 ± 0.07

รายงานเรื่องนี้ได้ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ดังนี้

Wachirachaikarn, A., Prakoon, W., Nguyen, T.T.T., Prompakdee, W., Na-Nakorn, U. *in press*. Loss of genetic variation of *Phalacrodon bleekeri* (Günther, 1864) in the hatchery stocks revealed by newly developed microsatellites. *Aquaculture*, in press

ผลผลิต (OUTPUT) ของโครงการ

1. งานที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

ระดับนานาชาติ

- (1) Wachirachakarn, A., W. Rungsin, P. Srisapoom and U. Na-Nakorn. 2009. Crossing of African catfish (*Clarias gariepinus*) strains based on strain selection using genetic diversity data. *Aquaculture* 290: 53-60. (2009 IF=1.925) (เอกสารแนบ 1)
- (2) Ha, H.P., Nguyen, T.T.T., Poompuang, S. and Na-Nakorn, U. 2009. Microsatellites revealed no genetic differentiation between hatchery and contemporary wild populations of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage 1878) in Vietnam. *Aquaculture* 291: 154-160. (2009 IF=1.925) (เอกสารแนบ 2)
- (3) Na-Nakorn, U., Moeikum, T. 2009. Genetic diversity of domesticated stocks of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage 1878), in Thailand: Relevance to broodstock management regimes. *Aquaculture* 297: 70-77 doi:10.1016/j.aquaculture.2009.09.014 (2009 IF = 1.925) (เอกสารแนบ 3)
- (4) Prakoon, W., Tunkijjanukij, S., Nguyen, T.T.T., Na-Nakorn, U. 2010. Spatial and temporal genetic variation of green mussel, *Perna viridis* in the Gulf of Thailand and implication for aquaculture. *Marine Biotechnology* 12:506–515; DOI 10.1007/s10126-009-9234-x (2010 IF = 2.9) (เอกสารแนบ 4)
- (5) Kitcharoen, N., Rungsin, W., Koonawootrittiron, S., Na-Nakorn, U. 2010. Selection of brooders from the early maturing freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Mann 1879) resulted in better growth rate of offspring than those selected from the late maturing. *Aquaculture* 306: 362 – 364. (2010 IF = 2.04) (เอกสารแนบ 5)
- (6) Na-Nakorn, U., Yashiro, R., Wachirachakarn, A., Pansaen, N. 2010. Novel microsatellites for multiplex PCRs of the Humpback grouper, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes, 1828), and application for broodstock management. *Aquaculture* 306: 57 – 62. (2010 IF = 2.04) (เอกสารแนบ 6)
- (7) Karaked, T., Poompuang, S., Na-Nakorn, U., Kamonrat, W., Hallerman, E.M. 2011. DNA microsatellite-based evaluation of early growth performance among strains of

freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* de Man. Aquaculture 311: 115-122.

(เอกสารแนบ 7)

- (8) Sriphairoj, K., Klinbu-nga, S., Kamonrat, W., Na-Nakorn, U. 2010. Species identification of four economically important Pangasiid catfishes and related species using SSCP markers. Aquaculture 308 (SUPPL. 1): S47 – S50. (2010 IF = 2.04) (เอกสารแนบ 8)
- (9) Kitcharoen, N., Rungsin, W., Koonawootrittiron, S., Na-Nakorn, U. 2011. Heritability for growth traits in Giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Mann 1879) based on BLUP method. Aquaculture Research 2011: 1-7. Doi:10.1111/j.1365-2109.2011.02796.x (2010 IF = 2.04) (เอกสารแนบ 9)
- (10) Wachirachaiarn, A., Prakoon, W., Nguyen, T.T.T., Prompakdee, W., Na-Nakorn, U. *in press*. Loss of genetic variation of *Phalacrodon bleekeri* (Günther, 1864) in the hatchery stocks revealed by newly developed microsatellites. Aquaculture, in press (2010 IF = 2.04) (เอกสารแนบ 10)

ระดับชาติ

- (1) สิทธิชัย สะทะโชติ, เกตุณภัส ศรีไพโรจน์ และ อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2553. ลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจของปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*) ปลาเผา (*Pangasius bocourti*) และลูกผสม (*P. hypophthalmus* X *P. bocourti*), หน้า 210-217 ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48, สาขาประมง. 3-5 กุมภาพันธ์ 2553. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. (เอกสารแนบ 11)

2. ผลงานวิจัยที่ส่งเพื่อตีพิมพ์ และต้นฉบับ

- (1) Sukmanomon, S., Senanan, W., Kapuscinski, A.R., **Na-Nakorn, U.** submitted manuscript. Genetic diversity of feral populations of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Thailand and evidences of genetic introgression. A manuscript submitted to **Fisheries Science**, September 2011 (เอกสารแนบ 12)
- (2) Sukmanomon, S., Kamonrat, W., Poompuang, S., Nguyen, T.T.T., Bartley, D.M., May, B., **Na-Nakorn, U.** submitted manuscript. Genetic changes, intra- and interspecific introgression in farmed Nile tilapia in Thailand. A manuscript submitted to **Aquaculture**, September 2011. (เอกสารแนบ 13)
- (3) Rungsin, W., Swatdipong, A., **Na-Nakorn, U.** Submitted ms. Development stages of androgenic glands in Giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* De Mann,

1879 in relation to size and success rate of andrectomization in small and large size prawn” a manuscript submitted to **Aquaculture** (6th December 2010) (เอกสารแนบ 14)

- (4) Senanan, W., Sornkeaw, S., Pechsiri, J, **Na-Nakorn, U.**, Saenin, N., Yashiro, R. Submitted manuscript. Relatedness of commercial broodstock populations of Asian seabass (*Lates calcarifer*) inferred from microsatellite genetic markers. **Aquaculture** (เอกสารแนบ 15)

- (5) **Na-Nakorn, U.**, Jintasathaporn. 2011. Current status and prospects of farming the Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Mann 1879) in Thailand. **Aquaculture Research**, submitted manuscript. (review article) (เอกสารแนบ 16)

3. หนังสือ

Proceedings จากการประชุม Tenth International Symposium on Genetics in Aquaculture, ตีพิมพ์ในวารสาร Aquaculture Vol. 308 Supplement 1, 2010 (เอกสารแนบ 17)

4. เอกสารเผยแพร่

ไม่มี

5. การเผยแพร่ผลงานวิจัยในที่ประชุมวิชาการ

5.1 ระดับนานาชาติ

- (1) ศาสตราจารย์ ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร นำเสนองานวิจัยเรื่อง Application of the Neofemale Technology for a Production of All-male Freshwater Prawn: A Challenge for Commercialization ในการประชุม World Aquaculture Society 2008 ระหว่างวันที่ 20-23 พฤษภาคม 2551 ณ Busan Exhibition & Convention Center กรุงปูซาน ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี
- (2) ดร.ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ เสนอผลงานภาคบรรยายเรื่อง Transcriptome Analysis in Androgenic Glands of Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) for Development of All-male Production ในการประชุม The 10th International Symposium on Genetics in Aquaculture (ISGA X) ซึ่งจัดระหว่างวันที่ 22 – 26 มิถุนายน 2552 ณ โรงแรมโซฟิเทลเซ็นทาราแกรนด์ กรุงเทพฯ
- (3) ดร.เกตุณภัส ศรีไพโรจน์ เสนอผลงานภาคบรรยายเรื่อง Species Identification of Pangasiidae fish using AFLP-SSCP markers ในการประชุม The 10th International

Symposium on Genetics in Aquaculture (ISGA X) ซึ่งจัดระหว่างวันที่ 22 – 26 มิถุนายน 2552 ณ โรงแรมโซฟิเทลเซ็นทาราแกรนด์ กรุงเทพฯ

- (4) **น.ส.ศรียรรยา สุขมโนมนต์** เสนอผลงานภาคโปสเตอร์เรื่อง Genetic Diversity of Feral Nile Tilapia Populations in Thailand and An Evidence of Hybridization ในการประชุม The 10th International Symposium on Genetics in Aquaculture (ISGA X) ซึ่งจัดระหว่างวันที่ 22 – 26 มิถุนายน 2552 ณ โรงแรมโซฟิเทลเซ็นทาราแกรนด์ กรุงเทพฯ
- (5) **น.ส.นิสรา กิจเจริญ** เสนอผลงานภาคโปสเตอร์เรื่อง Heritability for Growth Traits in Giant Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii* de Mann 1879 ในการประชุม The 10th International Symposium on Genetics in Aquaculture (ISGA X) ซึ่งจัดระหว่างวันที่ 22 – 26 มิถุนายน 2552 ณ โรงแรมโซฟิเทลเซ็นทาราแกรนด์ กรุงเทพฯ
- (6) **Mr. Ha Phouc Hung** เสนอผลงานภาคโปสเตอร์เรื่อง Microsatellites revealed no genetic differentiation between hatchery and contemporary wild populations of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage 1878) in Vietnam ในการประชุม The 10th International Symposium on Genetics in Aquaculture (ISGA X) ซึ่งจัดระหว่างวันที่ 22 – 26 มิถุนายน 2552 ณ โรงแรมโซฟิเทลเซ็นทาราแกรนด์ กรุงเทพฯ
- (7) **น.ส.วรางคณา พระคุณ** เสนอผลงานภาคโปสเตอร์เรื่อง Spatial and Temporal Genetic Variation of Green Mussel, *Perna viridis* in the Gulf of Thailand and Implication for Aquaculture ในการประชุม The 10th International Symposium on Genetics in Aquaculture (ISGA X) ซึ่งจัดระหว่างวันที่ 22 – 26 มิถุนายน 2552 ณ โรงแรมโซฟิเทลเซ็นทาราแกรนด์ กรุงเทพฯ
- (8) **น.ส.ทักษิณา เหมยคำ** เสนอผลงานภาคโปสเตอร์เรื่อง Genetic diversity of domesticated stocks of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* in Thailand relevance to broodstock management regimes ในการประชุม The 10th International Symposium on Genetics in Aquaculture (ISGA X) ซึ่งจัดระหว่างวันที่ 22 – 26 มิถุนายน 2552 ณ โรงแรมโซฟิเทลเซ็นทาราแกรนด์ กรุงเทพฯ
- (9) **น.ส.สุภาภรณ์ สอนแก้ว** เสนอผลงานภาคโปสเตอร์เรื่อง Mitochondrial DNA variation of cultured and wild populations of Asian seabass (*Lates calcarifer*) in Thailand ในการประชุม The 10th International Symposium on Genetics in Aquaculture (ISGA X) ซึ่งจัดระหว่างวันที่ 22 – 26 มิถุนายน 2552 ณ โรงแรมโซฟิเทลเซ็นทาราแกรนด์ กรุงเทพฯ
- (10) **ดร.เกตุณัฏฐ์ ศรีไพโรจน์** เสนอผลงานภาคบรรยายเรื่อง Growth, carcass characteristics and nutrition value of striped catfish *Pangasianodon*

hypophthalmus, Asian catfish *Pangasius bocourti* and their hybrid. ในการประชุม the 9th ASIAN FISHERIES & AQUACULTURE FORUM (9AFAF), Shanghai Ocean University, Shanghai, China, 21–25 April 2011.

5.2 ระดับชาติ

- (1) น.ส.นิสรา กิจเจริญ เสนอผลงานวิจัยเรื่อง Estimation of Heritability of Growth Traits in Giant Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) ในการประชุมประจำปีของโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก ณ โรงแรม Royal Palm Beach Resort พัทยา 3-5 เมษายน 2552 และได้รับเลือกเป็น 1 ใน 5 งานวิจัยเด่นเพื่อแถลงข่าวต่อสื่อมวลชน
- (2) ดร.เกตุภัส ศรีไพโรจน์ เสนอผลงานภาคบรรยาย เรื่อง ลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจของปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*) ปลาแพะ (*Pangasius bocourti*) และลูกผสม (*P. hypophthalmus* X *P. bocourti*) ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48 สาขาประมง 3-5 กุมภาพันธ์ 2553 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

6. จัดการประชุมวิชาการประจำปีของโครงการ 3 ครั้ง

ครั้งที่ 1 ระหว่างวันที่ 30 กรกฎาคม-1 สิงหาคม 2551 ณ ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี มีนักวิชาการ นิสิต นักศึกษาจากสถาบันการศึกษาต่างๆ เข้าร่วมประชุมรวมทั้งสิ้น 38 คน มีการบรรยายพิเศษ 2 เรื่อง โดย ดร.ศิริวุธ กลิ่นบุหงา ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ในหัวข้อ Molecular Studies of Genes and Proteins Involving Reproductive Maturation of the Giant Tiger Shrimp *Penaeus monodon* และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิฑูรย์ ธีระโสภณ สถาบันอณูชีววิทยาและพันธุศาสตร์ บรรยายในหัวข้อ “การศึกษา RNAi ในกุ้ง”

ครั้งที่ 2 เป็นการจัดประชุมร่วมกับการประชุมนานาชาติเรื่อง The 10th International Symposium on Genetics in Aquaculture (ISGA X) ซึ่งจัดระหว่างวันที่ 22 – 26 มิถุนายน 2552 ณ โรงแรมโซฟิเทลเซ็นทาราแกรนด์ กรุงเทพฯ นักวิจัยในโครงการร่วมเสนอผลงานภาคบรรยาย 3 เรื่อง และภาคโปสเตอร์ 7 เรื่อง ผู้เข้าประชุมทั้งสิ้น 291 คน เป็นนักวิชาการต่างชาติ 199 คน

ครั้งที่ 3 ในวันที่ 20 ธันวาคม 2553 ณ ห้องบรรยาย ชั้น 3 คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มีนักวิชาการ นิสิต นักศึกษาจากสถาบันการศึกษาต่างๆ เข้าร่วมประชุมรวมทั้งสิ้น 68 คน มีการบรรยายพิเศษ 2 เรื่อง โดย ดร.ศิริวุธ กลิ่นบุหงา ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ในหัวข้อ ความเข้าใจเชิงลึกของระบบ

การสืบพันธุ์กึ่งกอลด้าเพสเมีย และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศกร คุณวุฒิฤทธิ์
บรรยายในหัวข้อ “Genome Selection”

7. การใช้ประโยชน์ผลงานวิจัยเชิงพาณิชย์

- (1) ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิกรม รังสิษฐ์ นักวิจัยในโครงการ ได้จัดฝึกอบรมถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตลูกกุ้งก้ามกรามเพศผู้ล้วนโดยการทำให้ลายต่อม androgenic ระหว่างวันที่ 23-25 พฤศจิกายน 2550 มีผู้เข้ารับการฝึกอบรม 25 คน
- (2) ศาสตราจารย์ ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิกรม รังสิษฐ์ ลงนามความร่วมมือในการวิจัยต่อยอดในโครงการ “การผลิตลูกกุ้งก้ามกรามเพศผู้ล้วนโดยการทำให้ลายต่อม androgenic” กับบริษัท Power Prawn Producer Company Ltd.

8. ผลงานอื่นๆ

ได้พัฒนา microsatellite primers สำหรับปลากะรังหางอน และปลาแดง โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้ deposit ไว้ในฐานข้อมูล GenBank ดังมีรายละเอียดดังตารางที่ 13 และ 14

ตารางที่ 13 ชื่อไพรเมอร์ที่พัฒนาจากดีเอ็นเอของปลาแดง *Phalacrodon bleekeri* accession number ลักษณะของ repeat motifs และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์

ชื่อไพรเมอร์	Accession number	ลักษณะของ repeat motifs	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์
1. PBL06	GU306058	(GA) ₉ N(GA) ₉	F 5'CCATCTAGTAGGGGTCCGGTA3' R 5'TAGCTTGTGCGGTTTTCTGA3'
2. PBL10	GU306057	(GT) ₂₅	F 5'GGCTCAGTTATAAACCCGACA3' R 5'AGGATGACCCTCATCACTCTG3'
3. PBL17	GU306059	(GAA) ₈	F 5'TGTAAGCAAAGCTGTGAGCAA3' R 5'GGCGGGCAACAAAGTTTAAT3'
4. PBL21	GU306060	(GT) ₉	F 5'TCTGAAGCCGCCTTTTAGTT3' R 5'GAAGGATCCACTGCCTGGTA3'
5. PBL24	GU306061	(GA) ₁₅	F 5'TGTGTGTTCTGACATGGGAAA3' R 5'CCCAATGGAAAAATAGGAACAA3'
6. PBL26	GU306062	(GA) ₆₃	F 5'CCAGTCCAGGTATAACAAGCAG3' R 5'AGGAACATGTTTGGGTCTCG3'
7. PBL33	GU306063	(CT) ₂₄	F 5'CTCAGAGGCCTCACAGCATT3' R 5'AATCGCGTTTCTTTGCATT3'

ตารางที่ 14 ชื่อไพรเมอร์ที่พัฒนาจากดีเอ็นเอของปลากะรังหางอน *Chromileptes altivelis*
accession number ลักษณะของ repeat motifs และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์

ชื่อไพรเมอร์	Accession number	ลักษณะของ repeat motifs	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์
1. CAL02	GU238316	(GT) ₅ N(GT) ₇	F 5'GTCGCCTGAGACAAGGACTC3' R 5'GGACAGAGCGAGCTGGTAAC3'
2. CAL03	GU238317	(TAGA) ₁₃	F 5'TGCATCATCAGTCAACATAAACA3' R 5'TTTCTGGCGTTTGCTCTCTT3'
3. CAL07	GU238320	(GGAT) ₁₀	F 5'TGGATGATGATGGGAGATGG3' R 5'ATCCCTCCAATCAACTATGCTT3'
4. CAL09	GU238318	(GT) ₇ (GA) ₁₄	F 5'GATCCTTTGCTGCCACCTT3' R 5'TCGCCACTGATGAAGCTATG3'
5. CAL13	GU238319	(CT) ₂₉	F 5'CGAAAAGAGCAAAGCCATGT3' R 5'GCCAGGTGACAACAGTGAAG3'
6. CAL28	GU238313	(CA) ₉	F 5'TGTCTTGGCATTGTTGTTTG3' R 5'GTGTCACCTTGCCCACTGTA3'
7. CAL33	GU238314	(GA) ₃ CA(GA) ₁₈	F 5'ATGGATCCTCACCAAGAACG3' R 5'CAGACATGAAGGCAAGGACA3'
8. CAL44	GU238315	(CT) ₂₈	F 5'TGTCAGGTATTGTATTGCTGTCTG3' R 5'AACTGGCTTGCTGTGTGTC3'

9.รายชื่อนักวิจัยที่เพิ่มตำแหน่งทางวิชาการระหว่างโครงการ

ชื่อ-สกุล	ตำแหน่งปัจจุบัน	วันที่อนุมัติ
ผศ.ดร.สุภาวดี พุ่มพวง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	รองศาสตราจารย์	30 ตุลาคม 2550

10. รายชื่อนิสิตในโครงการและสถานภาพเมื่อสิ้นสุดโครงการ

ชื่อนิสิต	สาขาวิชา สถาบัน	สถานภาพ
(1) นายวิกรม รังสินธุ์ (ปริญญาเอก)	สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ยังไม่จบ
(2) น.ส.นิสรา กิจเจริญ (ปริญญาเอก)	สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	จบการศึกษา
(3) นายรัชพล การะเกตุ (ปริญญาเอก)	สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	จบการศึกษา
(4) น.ส.ศรีจรรยา สุขมนอนต์ (ปริญญาเอก)	สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ยังไม่จบ (รอ การตีพิมพ์)
(5) นางอุไร กุลบุญ (ปริญญาเอก)	สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ยังไม่จบ
(6) น.ส.อัญลักษณ์ วชิรไชยการ (ปริญญาเอก)	สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ยังไม่จบ
(7) น.ส.สุภาภรณ์ ศรีแก้ว (ปริญญาโท)	สาขาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัย บูรพา	จบการศึกษา
(8) น.ส.วรางคณา พระคุณ (ปริญญาโท)	สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	จบการศึกษา

11. หัวหน้าโครงการเป็นวิทยากรรับเชิญบรรยายในระดับนานาชาติ

- (1) ศาสตราจารย์ ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร รับเชิญบรรยายเรื่อง Genetic Diversity of Fishes in Mekong River and Concern on Conservation ในงานประชุมนานาชาติ Sustaining fish diversity, fisheries and aquacultures in the Mekong Basin จัดโดย มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี วันที่ 3 กันยายน 2551
- (2) ศาสตราจารย์ ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร ได้รับเชิญเป็น keynote speaker บรรยายเรื่อง Genetic Diversity of Fishes in Mekong River and Concern on Conservation ในการประชุม Fifth World Fisheries Congress ณ เมือง Yokohama 20-24 October 2008
- (3) ศาสตราจารย์ ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร ได้รับเชิญบรรยายเรื่อง Use and Exchange of Aquatic Resources for Food and Aquaculture: *Clarias* Catfish ในการประชุมเชิงปฏิบัติการ International Workshop on Use and Exchange of Aquatic Resources จัดโดย Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific ร่วมกับ FAO ณ The Tide Resort บางแสน ระหว่างวันที่ 31 มีนาคม – 2 เมษายน 2552
- (4) ศาสตราจารย์ ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร บรรยายเรื่อง Update on Genetics of Mekong Giant Catfish ในการประชุม The Fourth Meeting of the Mekong Giant Catfish Working Group จัดโดย the Technical Advisory Body for Fisheries Management in the Mekong Basin วันที่ 7 เมษายน 2552 จังหวัดอุดรธานี
- (5) ศาสตราจารย์ ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร ได้รับเชิญจาก คณะกรรมการจัดการประชุม Asian Pacific Aquaculture 2011 (in conjunction with Giant Prawn 2011) เพื่อเป็นวิทยากรรับเชิญบรรยายเรื่อง “GIANT FRESHWATER PRAWN CULTURE IN THAILAND: HOW TO ENHANCE THE COMPETITIVENESS OF THE BUSINESS?” ในการประชุม ระหว่างวันที่ 17 – 20 มกราคม 2554 ณ โรงแรม Le Meridian, Kochi ประเทศอินเดีย
- (6) ศาสตราจารย์ ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร ได้รับเชิญจาก คณะกรรมการจัดการประชุม the ASEAN-SEAFDEC Conference on Sustainable Fisheries for Food Security Towards 2020 วันที่ 13-17 มิถุนายน 2554 ณ โรงแรม Sofitel Centara Grand, กรุงเทพฯ โดยเป็นผู้ทรงคุณวุฒิร่วมอภิปรายและนำเสนอรายงานเรื่อง A bottleneck in fish seed production in SEAsia: Genetic aspects

(7) ศาสตราจารย์ ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร ได้รับเชิญจาก คณะกรรมการจัดการประชุม THIRD INTERNATIONAL CONFERENCE ON SUSTAINABLE ANIMAL AGRICULTURE FOR DEVELOPING COUNTRIES, SAADC2011 จัดขึ้น ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, จังหวัดนครราชสีมา ระหว่างวันที่ 26-29 กรกฎาคม 2554 นำเสนอเรื่อง Researches Required for Aquaculture in Developing Countries

12. รางวัลที่ได้รับระหว่างรับทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย

ศาสตราจารย์ ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร ได้รับรางวัล “นักวิจัยดีเด่นแห่งชาติ” สาขาเกษตรศาสตร์ และชีววิทยา ประจำปี 2550 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

13. นักวิจัยในโครงการที่ได้รับรางวัล

ไม่มี

14. อื่น ๆ

เกียรติประวัติในระดับนานาชาติ

(1) ศาสตราจารย์ ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร เป็นประธานจัดการประชุมระดับนานาชาติเรื่อง The 10th International Symposium on Genetics in Aquaculture (ISGA X) ระหว่างวันที่ 22 – 26 มิถุนายน 2552 ณ โรงแรมโซฟิเทลเซ็นทาราแกรนด์ กรุงเทพฯ มีนักวิชาการจาก 41 ประเทศ เข้าร่วมประชุมจำนวน

(2) ศาสตราจารย์ ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร และ รองศาสตราจารย์ ดร.สุภาวดี พุ่มพวง เป็น บรรณาธิการรับเชิญ ของวารสาร Aquaculture ในการจัดทำ Proceedings ของการประชุม นานาชาติ The 10th International Symposium on Genetics in Aquaculture (ISGA X) ซึ่งจะตีพิมพ์เป็น Special issue ของวารสาร Aquaculture

(3) อ.ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ เป็น referee ของวารสาร Aquaculture ในการจัดทำ Proceedings ของการประชุมนานาชาติ The 10th International Symposium on Genetics in Aquaculture (ISGA X) ซึ่งจะตีพิมพ์เป็น Special issue ของวารสาร Aquaculture

กิจกรรมอื่น ๆ

- จัดการประชุมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง “Applications of mitochondrial DNA for the studies on genetic diversity of aquatic animals” ในวันที่ 24 มกราคม 2551 โดยมี **Dr.Thuy Nguyen** จาก Networks of Aquaculture Centres in Asia-Pacific เป็นวิทยากร มี ผู้เข้าร่วมการประชุม 16 คน ประกอบด้วยนิสิตบัณฑิตศึกษาศาखाเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะ ประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 13 คน; อาจารย์จากมหาวิทยาลัยทักษิณ 2 คน และ นักศึกษาปริญญาเอกจากมหาวิทยาลัยสุรนารี 1 คน

- โครงการร่วมกับภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก สกว
จัดการบรรยาย เรื่อง Genetic research in rainbow trout using clonal lines โดย
Professor Gary Thorgaard จาก Washington State University ในวันที่ 21
พฤศจิกายน 2550 มีผู้เข้าฟัง รวมทั้งสิ้น 38 คน



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aqua-online

Crossing of African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), strains based on strain selection using genetic diversity data

Anyalak Wachirachaikarn^a, Wikrom Rungsin^b, Prapansak Srisapoome^c, Uthairat Na-Nakorn^{c,*}

^a Interdisciplinary Program in Genetic Engineering, Graduate School, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

^b Department of Zoology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

^c Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 July 2008

Received in revised form 22 January 2009

Accepted 24 January 2009

Keywords:

Clarias gariepinus

Cross breeding

Genetic diversity

Hatchery stock

ABSTRACT

African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), was introduced to Thailand for aquaculture in 1987. The stocks have been maintained without genetic management, which may be responsible for the deterioration of economically important traits observed by farmers. One possible solution is crossbreeding between genetically distinct strains. The present study employed six microsatellite loci to elucidate genetic diversity of four African catfish strains in Thailand (Suphanburi, Angthong, Nakornpathom and Nakornsawan). The results revealed two distinct groups of strains (Nakornpathom-Nakornsawan and Suphanburi-Angthong) as shown by F_{ST} of 0.1444 ($P < 0.01$), R_{ST} of 0.2195 ($P < 0.01$) and a phylogenetic tree. Genetic variation within populations was moderate ($A = 4.67$ – 12.17 ; $A_e = 3.15$ – 5.80 ; $A_r = 4.67$ – 9.65 ; $H_o = 0.50$ – 0.69 ; $H_e = 0.67$ – 0.80). Crossbreeding between a representative population of the two genetically distinct groups (Angthong and Nakornpathom, nine males and nine females from each strain) showed improved mean phagocytosis activity of the crossbreds over the mean of the parents (heterosis = 70.97%; $P < 0.01$). Nevertheless, no differences between the crossbreds and the parents were observed in other traits, including body weight and length, the specific immune response to *Aeromonas hydrophila* (antibody titre) at the peak of response, phagocytic index and male reproductive performance. It was surmised that the immune genetic variation within the crossbreds was increased and may be responsible for the slight enhancement of the immune response. The variation of the MHC class I gene of the crossbred was higher than one parental line, but was not different from the other parental line.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), has been introduced outside its native range due to its advantages for aquaculture, e.g. fast growth and tolerance to diseases. The ability to hybridize with native species and produce superior hybrids (e.g., Nukwan et al., 1990; Rahman et al., 1995) has broadened the introduction of this species in SE Asia. The African catfish was introduced to Thailand in 1987 (Na-Nakorn, 2001), and since then it has significantly contributed to the annual aquaculture production of the country either as a pure species or in the form of a hybrid with *C. macrocephalus* (e.g., 146,000 tones in 2006; FAO, 2006).

Recently, farmers noticed deteriorating performance of the African catfish, for example, decline of growth, sperm quality and disease resistance, and increased occurrence of abnormal bodies and testes, etc. (Pun Sawatpanit, Pun Panpla Farm, pers. comm.). Although such phenomena may be partially caused by environmental factors, genetic deterioration is a likely explanation. Although information is unavailable, the founder stock of the African catfish strain in Thailand could have been small, as reported for other fish species [e.g., 38 founders for

Oreochromis niloticus (Damrongratana and Kessenchai, 1966) and 26 bay scallop, *Argopecten irradians*, introduced from USA to China (Wang et al., 2007)]. Thus genetic deterioration is likely to have occurred due to genetic drift (e.g. 20% loss of alleles in the bay scallop introduced to China (Wang et al., 2007)] and inbreeding (Kincaid, 1976a, 1976b, 1983). To increase the genetic variation, wild or genetically divergent populations should be introduced for crossbreeding (Schonhuth et al., 2003). While the reintroduction of wild stocks may be not be cost-effective for a species of low economic value like *C. gariepinus*, Goyard et al. (2008) recommended, based on empirical data for the Pacific blue shrimp (*Penaeus stylirostris*), that simple crossing between genetically differentiated introduced captive stocks, which suffer from inbreeding, results in performance improvement by heterotic effect or by recovery of the F_1 from inbreeding. Similarly, Shikano and Taniguchi (2002) provided evidence that crossing of genetically different strains (high genetic distance between strains measured by neutral molecular markers) of guppy (*Poecilia reticulata*) resulted in significant heterosis of fitness-related traits.

A preliminary study based on mitochondrial DNA suggested that two strains of African catfish have been introduced to Thailand. One originated from the Central African Republic and was consecutively transferred to Russia, Vietnam, Laos and Thailand. The other strain

* Corresponding author. Tel.: +66 2 5792924; fax: +66 2 5610990.

E-mail address: ffisurn@ku.ac.th (U. Na-Nakorn).

originated from Egypt and was transferred to PR China and Thailand (Li et al., 2000). The sequence of introductions supports the hypotheses that one or more genetic bottlenecks influenced genetic variation in the respective stocks. There is no information on whether the strains are completely mixed or retain their genetic distinctness. The most efficient way to differentiate the stocks is by using a highly polymorphic neutral genetic marker although such differences may not reflect differences of quantitative traits.

At present, microsatellite markers are the marker of choice for studies on genetic diversity. One of their advantages is high resolution for population genetic differentiation (Wright and Bentzen, 1994; O'Connell and Wright, 1997). They have been widely used to differentiate hatchery stocks in many fish species, e.g. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and crossbreds (Rowena et al., 2004); Atlantic salmon (*Salmo salar*) (McConnell et al., 1995; Letcher and King, 1999); common carp (*Cyprinus carpio* L.) (Thai et al., 2007); brown trout (*Salmo trutta* L.) (Aho et al., 2006) and Japanese scallops (*Patinopecten yessoensis*) (Li et al., 2007). Therefore, in this study we used microsatellite markers to differentiate hatchery stocks of African catfish.

This paper includes two consecutive studies. The first one aimed to identify genetically distinct strains of African catfish in Thailand and to quantify their genetic variation. The second study aimed to improve strains of the African catfish by crossbreeding of genetically distinct strains. The growth performance and traits related to disease resistance of the crossbred fish were assessed compared to those of the parental strains.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection and DNA extraction

Fin-clip samples of African catfish broodstock were collected from four farms in Thailand (Table 1). We selected farms that had been operating for more than 10 years and where the broodstock in each farm had been separately managed. The individual samples were kept in 99% ethanol and delivered to the Fish Genetics Laboratory, Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok. DNA extraction was performed using the standard phenol chloroform method (Taggart et al., 1992) with slight modification. The DNA was stored in TE buffer at 4 °C.

2.2. Scoring of microsatellite

Six microsatellite loci, *Cga01*, *Cga02*, *Cga03*, *Cga06*, *Cga09* and *Cga10* were amplified from the individual DNA samples using the primers developed by Galbusera et al. (1996). Each 10 µl total reaction contained 5–10 ng of DNA templates, 0.25 pmol each of the forward and reverse primers, 1X PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 100 µM dNTP, and 0.2 unit of *Taq* DNA Polymerase (Fermentas). The PCR reactions were performed in a PTC-100TM Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.) employing PCR profiles as follows: predenaturation at 95 °C for 5 min; followed by 35 cycles of: 30 s denaturation at 95 °C, 30 s of annealing at 52–56 °C and 1 min extension at 72 °C; followed by 72 °C final extension for 5 min prior to storage at 4 °C.

Table 1
Sampling locations for hatchery stocks of African catfish in Thailand.

Population names and abbreviation	Locations	Sample size
Suphanburi (SP)	Tamo Farm, Amphur Sriprajant, Suphanburi Province	65
Angthong (AT)	Siray Farm, Amphur Wisetchaicharn, Angthong Province	30
Nakornpathom (NP)	Pun Panpla Farm, Amphur Mueng, Nakornpathom Province	16
Nakornsawan (NS)	Narong Farm, Amphur Choomsaeng, Nakornsawan Province	33

Electrophoreses were performed in 4.5–6% polyacrylamide gel and visualization was performed by silver staining. Scoring of allele size was based on the M13 ladder (Promega).

2.3. An experiment on strain crossing of African catfish

2.3.1. The strains used and the artificial breeding

Two African catfish populations, from Angthong (AT) and Nakornpathom (NP) provinces, were selected for the crossbreeding experiment based on their genetic distinctness and the availability of the gravid brooders. Four crosses were performed using a total of eighteen brooders (1:1 male:female) each from the AT and NP populations. The gravid female brooders were injected with 30 µg/kg buserellin acetate (LHRHa) (Suprefact) and 5 mg/kg dopamine antagonist (motilium), while 10 µg/kg buserellin acetate and the same amount of dopamine antagonist were injected into male brooders. At 10–12 h after the injections, the eggs from each female were stripped, separated into two portions and each portion was fertilized with sperm solution squeezed from the ground testes of either a male from the same strain or the others. The fertilized eggs from each full-sib family were incubated in a hatching bowl equipped with a water flow-through system. Hatching commenced at about 24 h after fertilization and then the fry belonged to the same cross-type were pooled and the cross-types were named as follow, ATxAT, NPxNP, ATxNP (female AT mated with male NP) and NPxAT (female NP mated with male AT).

2.3.2. Experimental design and fish rearing

After yolk absorption, the hatchlings were fed with cladocerans (*Moina* spp.) until 2 weeks of age when they reached a length of about 1 cm. Then they were transferred to fiberglass tanks (70 cm in diameter, 35 cm water depth) at a stocking density of 200 fry/tank with three replications and fed a commercially available diet (Charoenphakaphand Com., Ltd.) containing 25% protein. After 5 weeks of rearing, they were transferred to nylon-net cages (2 m×1.5 m, 1.0 m water depth) at 120 fish/cage with three replications and fed the same diet. Feeding was made to satiation twice a day throughout the experiment which is a normal practice in the catfish farms.

2.3.3. Measurements

Three categories of performance data were collected, namely, growth and survival, immune response, and variation of the major histocompatibility complex class I (MHC class I). The measurements for the growth parameters of total length and body weight were made at 5, 10 and 14 weeks of age. Survivors were enumerated at 5 and 14 weeks and survival rates were calculated accordingly. The stocking density was equalized to 80 fish/cage after the enumeration at week 5.

2.3.4. Measurement of the immune response

After the last measurement (week 14) the fish from the three replications were pooled within each cross-type. Then 60 fish were taken from each cross-type and separately stocked in a 1.8 m² concrete tank for further study on immune response. A negative control group for immune response was established by taking 15 fish from each cross and pooled in a 1.8 m² concrete tank.

To study phagocytosis abilities of the peripheral blood leukocytes, the peripheral blood leukocytes (PBLs) were isolated from a pooled blood sample of three individuals/cross, counted by Haemocytometer and adjusted to a concentration of 2×10⁶ cells/ml. Then each of the PBL samples was dropped on three cover slips and incubated for 2 h at 25 °C in a chamber. Then a yeast suspension (2×10⁸ cells/ml) was added to each chamber. After 1 h of incubation at 25 °C, the cells were stained with Diff-Quick dye, and phagocytic activity (PA) and phagocytic index (PI) were calculated following the method of Puangkaew et al. (2004) with slight modification.

The antibody titre (measured by bacterial agglutination assay), was measured in six individuals/cross or the control group with two

replications/individual. The brief protocol was as follows. A formalin-killed *Aeromonas hydrophila* vaccine prepared by a conventional method (reviewed by Newman, 1993) was intraperitoneally injected into the experimental fish (6 months of age). The booster injection was performed at 5 weeks after the first injection. At the same time, the negative control fish were injected with 0.85% normal saline mixed with an equal volume of the antigen. Then a blood sample was drawn from a common cardinal vein (Michael et al., 1994) of each individual fish and the antibody titre was measured using the agglutination test in which a serial two-fold dilution of serum was made using 0.85% normal saline. Then 50 µl of the antigen was added into each serum dilution. The antibody titres were expressed as the reciprocal of the highest serum dilution giving positive agglutination.

2.3.5. Polymorphism of the alpha region of the MHC class I gene

Due to the lack of primers for the study on polymorphism of MHC class I in African catfish, we designed a new primer pair. The methods of primer design will appear elsewhere. The total RNA of the experimental fish (four individuals/cross) was extracted using TRIZOL reagent (Invitrogen) and purified. Then it was transcribed into the first-strand cDNA using SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). The PCR reactions primed by the newly designed primer were performed with an initial denaturation step of 5 min at 95 °C; following by 35 cycles of; denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 57 °C for 30 s and extension at 72 °C for 1 min; and completed with a final extension at 72 °C for 5 min. The PCR products were electrophoresed on 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide. Then they were eluted from the gel and purified. The purified PCR products were subsequently cloned into pGEM-T Easy vector (Promega) using the ligation reaction containing 0.5 µl pGEM-T Easy vector, 5 µl insert gene (PCR product purified), 2.5 µl 1X ligation buffer and 1 µl T4 ligase incubated at 4 °C overnight. Then the plasmids were transformed into host cells (*Escherichia coli* JM109) by heat shock transformation. The white colonies were selected in the presence of X-gal and IPTG in LB agar with ampicillin. The recombinant plasmids were purified using the alkaline lysis method (modified from Sambrook and Russell, 2001) and confirmed by DNA sequencing with M13 forward and M13 reverse primers.

The amplicons were confirmed to be the alpha region of the MHC class I gene by comparing each determined sequence with the alpha region of the MHC class I sequences of fishes available in GenBank using the BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The results showed that all of the amplicons were the alpha region of the MHC class I. Then they were aligned using the CLUSTAL W program, and gene diversity was estimated using MEGA version 4.0 (Tamura et al., 2007) and Arlequin version 3.01 (Excoffier et al., 2005).

2.3.6. Gonosomatic index (GSI) and sperm quality

At 25 months old, 5–11 male fish from each cross type were weighed and sacrificed. The individual testes were removed and weighed. Then the GSI was calculated as testes weight as a percentage of body weight.

Sperm quality was estimated by assessing three parameters, percentage of motile sperm, motility duration and progressivity. Sperm was dropped onto a drop of water on a dry slide. Then the motile and non-motile spermatozoa were enumerated under a compound microscope using 400x magnification. The average percentage of motile sperm was calculated based on a total of 100 spermatozoa/field and three fields/individual. Concurrently, the duration from the time the sperm was dropped onto the water until all spermatozoa stopped moving was recorded as motile duration. The sperm progressivity was evaluated by giving scores ranging 1–4, wherein 1 was assigned for the most inert samples and 4 for the most active samples.

Sperm concentration was measured by diluting sperm of each individual in water at 1:300. Then the spermatozoa were enumerated under a compound microscope (400x magnification) using haemocytometer. The sperm concentration was calculated by multiplying sperm number with a dilution factor and 10⁴.

2.4. Data analyses

2.4.1. The microsatellite data

The microsatellite genotypes were used to calculate allele frequencies [facilitated by POPGENE version 1.31 (Yeh et al., 1999)]. The program GENEPOP version 3.4 (Raymond and Rousset, 1995) was used to perform the test for conformation to Hardy Weinberg equilibrium. The presence of null alleles was tested using the program MICROCHECKER (Oosterhout et al., 2004) and then the genotype frequencies of populations with null alleles were adjusted accordingly. The adjusted genotype frequencies were used for calculation of genetic variation within populations, comprising the mean number of alleles per locus (*A*), mean effective number of alleles across loci (*A_e*), and observed and expected heterozygosity per population (*H_o* and *H_e*) using POPGENE version 1.31. In order to eliminate the effect of sample size confounding the mean number of alleles per locus, the mean allelic richness (*A_r*) was calculated using the program FSTAT version 2.9.3.2 (Goudet, 2001). The genetic disequilibrium between each pair of loci was tested using the program GENEPOP version 3.4. The occurrence of genetic bottleneck was tested using the program BOTTLENECK version 1.2.02 (Cornuet and Luikart, 1996).

Then genetic diversity between populations was estimated wherein the presence of population structuring was assessed based on the *F* statistics (*F_{ST}*, *F_{IS}* and *F_{IT}*) calculated by the program FSTAT version 2.9.3.2. *R_{ST}* which is more powerful than *F_{ST}* because it utilizes information on allele size in the estimation of population differentiation (Slatkin, 1995; Goodman, 1997) was also estimated using the same program. Then the genetic differentiation between populations was estimated using the GENEPOP program. The Cavalli-Sforza and Edwards (1967) genetic distance was calculated and subsequently used to reconstruct a UPGMA tree employing the program PHYLIP version 3.63 (Felsenstein, 1993).

2.4.2. The crossing experiment data

Mean of total length, body weight, survival rates and the parameters for the immune responses, phagocytic index (PI), phagocytic activity (PA) and antibody titre (Ab titre) were analyzed using one-way analysis of variance run by the SPSS program, and the means were compared using the Bonferroni test provided by the *ad hoc* program.

The normal distribution test indicated that the data on sperm quality were not normally distributed. Therefore, the mean comparison was performed using the Chi-square test (Sokal and Rohlf, 1995). Mean GSI, which showed normal distribution, was analyzed and compared as described in the previous section.

Heterosis was calculated for each trait using the following equation,

$$\text{Heterosis(H)} = \frac{\text{mean of crossbreds} - \text{mean of parents}}{\text{mean of parents}} \times 100$$

(Falconer and Mackay, 1996).

3. Results

3.1. Genetic diversity of African catfish strains in Thailand

Microsatellite genotype frequencies of three (AT, NP and SP) of four populations did not conform to Hardy–Weinberg equilibrium, with a

Table 2

Carvalli-Sforza and Edwards (1967) chord distance between strains of African catfish in Thailand.

Populations	SP	AT	NP
SP	*		
AT	0.036	*	
NP	0.125	0.083	*
NS	0.144	0.138	0.108

SP = Suphanburi, AT = Angthong, NP = Nakornpathom, NS = Nakornsawan.

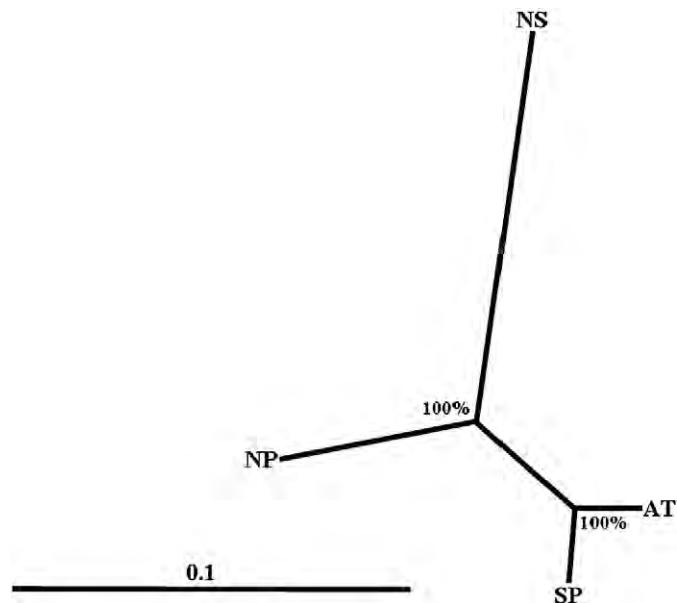


Fig. 1. A phylogenetic tree (UPGMA) based on Carvalli-Sforza and Edwards (1967) chord distance among four strains of *C. gariepinus* in Thailand. SP = Suphanburi, AT = Angthong, NP = Nakornpathom, NS = Nakornsawan.

tendency towards homozygote excess as revealed by Fisher's Exact test. The test for null alleles showed the presence of null alleles at two loci, *Cga01* and *Cga02*. Therefore, the genotypes of these loci were adjusted accordingly in the three populations. After the adjustment, the three populations still showed departure from HWE. A recent bottleneck was observed in the SP, NP and NS population. Linkage disequilibrium was observed only in NP (*Cga01* with all loci except for *Cga03*, *Cga02* and *Cga09*, *Cga06* and *Cga09*, and *Cga06* and *Cga10*) and SP (*Cga01* and *Cga02*, *Cga01* and *Cga09*, *Cga02* and *Cga06*, and *Cga02* and *Cga09*). This finding would not suggest physical linkage on a chromosome, but rather the effects of having more than one subpopulations in a sample.

The F_{ST} value ($F_{ST} = 0.144 \pm 0.026$, $P < 0.01$) and R_{ST} ($R_{ST} = 0.2195$, $P < 0.01$) showed that population structure existed among the populations of African catfish included in the present study. The

UPGMA tree based on the Carvalli-Sforza and Edwards chord distance (Table 2) separated the four populations into two distinct clusters, NP-NS and AT-SP, with 100% bootstrap value (Fig. 1).

The genetic variation within populations (shown in Table 3) was likely to be different between the two clusters of populations revealed by the UPGMA tree. AT and SP showed relatively higher allele diversity (A , A_e and A_r) than NP and NS. The expected heterozygosity showed the same tendency, whereas the observed heterozygosity was not different across populations. Within each cluster, genetic variation within populations was not different ($P > 0.05$).

Therefore we selected AT and NP to represent each genetically distinct group and used them in the crossbreeding experiment.

3.2. Performances of the crossbreds and parental strains

3.2.1. Growth and survival

The crossbred offspring and the parental strains did not show any differences in body weight, total length and survival rates at 5 and 14 weeks old (Table 4). Significant differences were shown for body weight at 10 weeks old, when the body weight of the NPxAT (female x male) cross was lower than that of the others. The total length showed the same tendency, although the difference was significant only between the NPxAT and AT strain. We did not enumerate the experimental fish at 10 weeks old in order to minimize handling of the fish during a period of low water temperature.

3.2.2. Immune-related traits

The reciprocal crosses and the parental strains showed similar responses to vaccination throughout the 12 weeks of study, except for week two (1 week after the first vaccination) when AT strain showed the highest Ab titre, and week 10 (5 weeks after booster) when the reciprocal crosses showed significantly lower Ab titre than the parental strains (Fig. 2). The profile of the response fluctuated after the first vaccination, but after the booster (in week 5) every group showed a rising Ab titre in weeks 7 and 8 and a gradual decline afterward.

The phagocytic activity (PA), which is a nonspecific immune response, was highest for the cross between female AT x male NP ($51.8 \pm 3.6\%$; $P < 0.05$), although it was not significantly different from that of the reciprocal cross (48.9 ± 2.3 ; $P > 0.05$), while the latter did not show any difference from the AT strain (Fig. 3). It is noteworthy that the AT strain which showed a relatively high specific immune response had

Table 3
Genetic variation within populations of four hatchery strains of African catfish in Thailand.

Population	N	A	A_e	A_r	H_o	H_e	F_{IS}
SP	64.0	9.33 ± 5.32^a	4.26 ± 1.52^a	6.92 ± 2.98^{ab}	0.64 ± 0.48^a	0.75 ± 0.09^{ab}	0.144
AT	29.5	12.17 ± 6.50^a	5.80 ± 3.00^a	9.65 ± 4.57^a	0.60 ± 0.47^a	0.80 ± 0.11^a	0.250
NP	16.0	4.67 ± 1.51^b	3.62 ± 1.19^{ab}	4.67 ± 1.51^b	0.50 ± 0.40^a	0.73 ± 0.09^{ab}	0.244
NS	33.0	6.0 ± 2.28^b	3.15 ± 0.97^b	5.17 ± 1.81^b	0.69 ± 0.10^a	0.67 ± 0.11^b	−0.041
Overall	142.5	16.67 ± 7.25	6.00 ± 1.67	9.34 ± 2.62	0.62 ± 0.34	0.84 ± 0.34	

A = mean number of alleles per locus; A_e = mean effective number of alleles per locus, A_r = mean allelic richness; H_o = mean observed heterozygosity per individual, H_e = expected heterozygosity per individual; SP = Suphanburi, AT = Angthong, NP = Nakornpathom, NS = Nakornsawan.

Means in the same column superscripted by different letters were significant different ($P < 0.01$).

Table 4
Mean body weight, total length and survival rate of the reciprocal crosses of African catfish and their parental strains measured at 5, 10 and 14 weeks old and heterosis.

Crosses (female x male)	5 weeks			10 weeks			14 weeks		
	Weight (g)	Length (cm)	Survival (%)	Weight (g)	Length (cm)		Weight (g)	Length (cm)	Survival (%)
ATxNP	4.76 ± 1.16^a	6.44 ± 0.35^a	60.2 ± 11.1^a	50.13 ± 33.94^a	16.13 ± 4.24^{ab}		124.55 ± 40.87^a	25.39 ± 3.17^a	88.3 ± 11.7^a
NPxAT	4.78 ± 0.98^a	6.25 ± 0.78^a	63.4 ± 7.4^a	31.68 ± 33.23^b	15.34 ± 6.08^b		126.87 ± 47.17^a	24.85 ± 3.53^a	96.0 ± 3.6^a
ATxAT	4.57 ± 1.38^a	6.55 ± 1.63^a	66.8 ± 6.4^a	57.78 ± 28.28^a	16.96 ± 0.35^a		133.32 ± 46.52^a	25.66 ± 3.46^a	92.2 ± 7.5^a
NPxNP	4.76 ± 2.52^a	6.31 ± 1.41^a	66.4 ± 8.2^a	47.54 ± 5.66^a	16.22 ± 1.06^{ab}		123.22 ± 46.94^a	25.19 ± 3.40^a	82.2 ± 6.9^a
Heterosis	2.14%	−1.24%	−7.2%	−22.31%	−5.12%		−2.00%	−1.21%	5.67%

Survival rate was not investigated at 10 weeks, ATxNP = the crossbreds between female AT and male NP; NPxAT = the crossbreds between female NP and male AT; ATxAT = pure Angthong strain; NPxNP = pure Nakornpathom strain.

Means in the same column superscripted by different letters were significant different ($P < 0.01$).

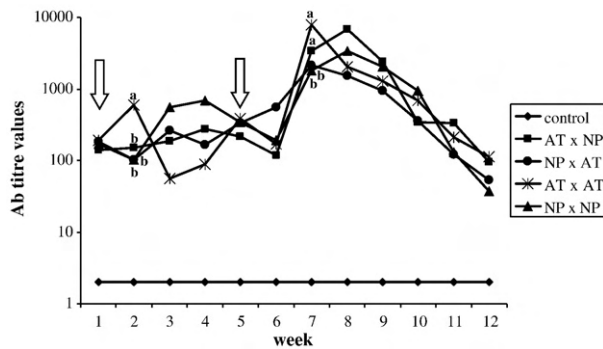


Fig. 2. Profiles of antibody titres of the parental strains and crossbreds of *C. gariepinus* after challenge with formalin-killed *A. hydrophila* vaccine. Mean antibody titre was not different between cross types except for weeks 2 and 10, where the difference is denoted by different letters. ATxNP = the crossbreds between female AT and male NP; NPxAT = the crossbreds between female NP and male AT; ATxAT = pure Angthong strain; NPxNP = pure Nakornpathom strain, Arrows denoted first vaccination and booster at 5 weeks.

inferior PA compared to the reciprocal crosses. However, all strains and crosses showed no statistical difference ($P > 0.05$) in phagocytic index (PI) (9.0 ± 0.4 to $19.7 \pm 11.9\%$).

3.2.3. Polymorphism of the alpha region of the MHC class I gene

The specific primer for the MHC class I gene of African catfish was designed for the first time based on 20 partial sequences of this region (GenBank Accession numbers EU714302–EU714321). Among the 4 fish analyzed per cross, 8 haplotypes were observed for ATxAT and 6 for NPxNP, while the reciprocal crossbreds showed 7 and 5 haplotypes. The number of polymorphic sites was high in ATxAT and the crossbreds (214–219 sites), while it was only 167 sites in NPxNP. The variation of the alpha region of the MHC class I gene in terms of both gene diversity over loci and mean number of pairwise differences was not different ($P > 0.01$) between the reciprocal crossbreds and ATxAT, but they were higher than that of NPxNP (Table 5).

3.2.4. GSI and sperm quality

The averaged GSI of the male fish of the 4 groups (range 0.58 ± 0.16 to $0.94 \pm 0.17\%$) was not statistically different among groups, and neither were the parameters for sperm quality (Fig. 4).

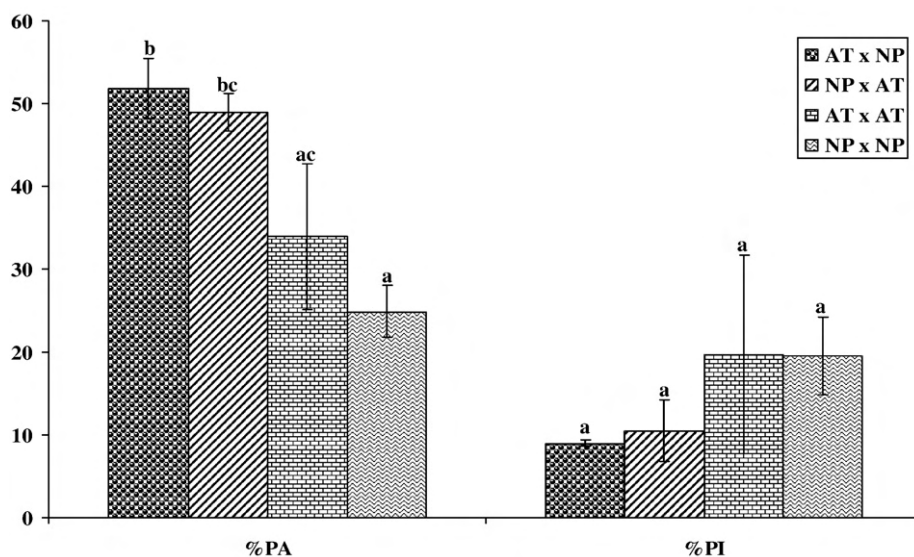


Fig. 3. Histograms showing phagocytic activity (PA) and phagocytic index (PI) of the parental strains and crossbreds of *C. gariepinus*. Vertical lines indicate standard deviation; significant difference between means is indicated by different letters; means of PI were not statistically different ($P > 0.01$); ATxNP = the crossbreds between female AT and male NP; NPxAT = the crossbreds between female NP and male AT; ATxAT = pure Angthong strain; NPxNP = pure Nakornpathom strain.

Table 5

Number of haplotypes of the MHC class I gene, number of polymorphic sites, average gene diversity over loci and averaged number of pairwise differences of the reciprocal crosses of African catfish and their parental strains.

Crosses	ATxAT	NPxNP	ATxNP	NPxAT
No. of haplotypes	8	6	7	5
No. of polymorphic sites	214	167	219	215
Average gene diversity over loci	0.18 ± 0.10^a	0.13 ± 0.07^b	0.17 ± 0.09^{ab}	0.18 ± 0.10^a
Mean no. of pairwise differences	101.46 ± 48.44^a	70.75 ± 33.88^b	95.43 ± 45.58^{ab}	98.25 ± 46.92^a

ATxNP = the crossbreds between female AT and male NP; NPxAT = the crossbreds between female NP and male AT; ATxAT = pure Angthong strain; NPxNP = pure Nakornpathom strain. Means in the same column superscripted by different letters were significant different ($P < 0.01$).

3.3. Heterosis

The heterosis of growth traits and survival rates varied considerably (-22.31 to 2.14% for body weight; -5.12 to -1.21% for length; -7.2 to 5.67% for survival rate). Due to insignificant differences between the crossbred and parents for most traits, the heterosis of those traits was considered as not existing. Similar results were obtained for antibody titre and phagocytic index (heterosis was between -56.58 to 85.29% for antibody titre and -50.38% for phagocytic index). Only the heterosis for phagocytic activity was high (70.97%), and the difference between parents and crossbreds was significant ($P < 0.05$). Likewise, heterosis of GSI and sperm quality was considered as not existing.

4. Discussion

4.1. Genetic differences between strains of African catfish

Microsatellite DNA variation revealed genetic differentiation between every population pair and separation of the populations into two groups. It is hypothesized that each group was founded from different populations originating from Central African Republic and Egypt (Li et al., 2000). In addition, genetic drift and limited gene flow between groups could have contributed to the differences (Allendorf and Luikart, 2007).

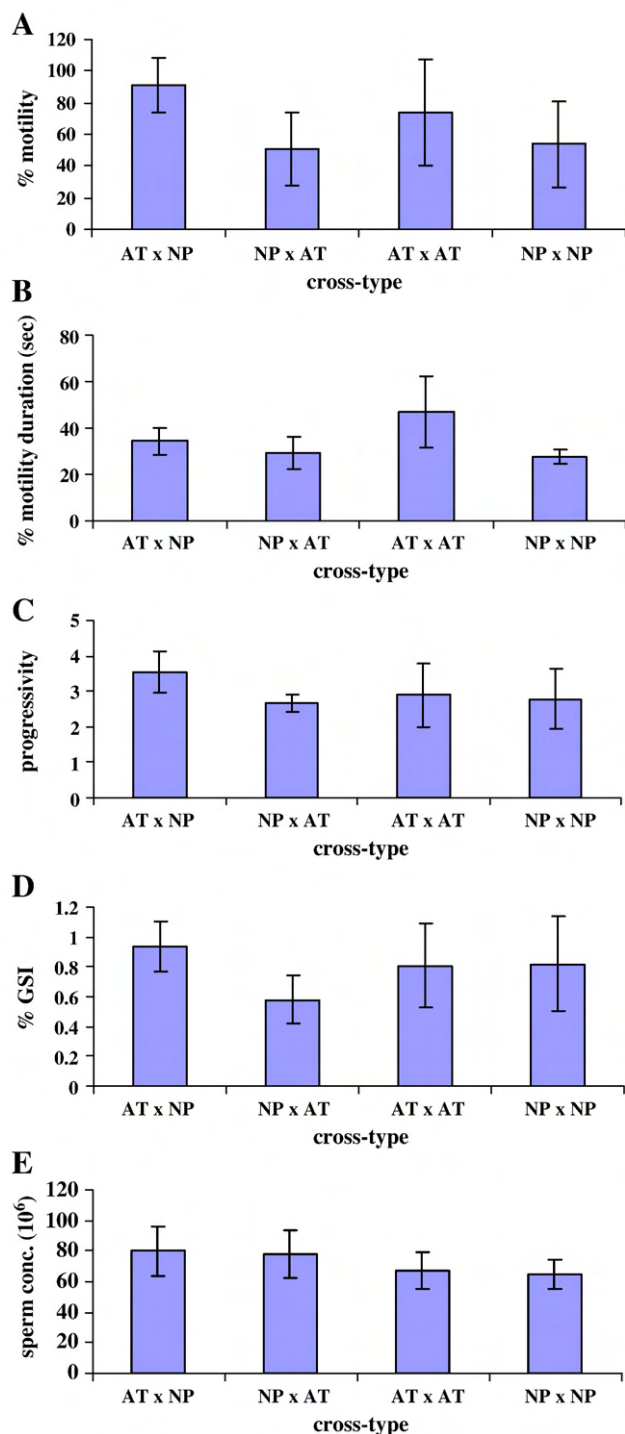


Fig. 4. Histograms showing mean values of (A) percent of motile sperm (%motility), (B) motility duration (seconds), (C) progressivity (score 1 to 4; 1 is the weakest and 4 is the most active spermatozoa), (D) gonosomatic index (%GSI), and (E) sperm concentration ($\times 10^6$) of four cross types of African catfish in Thailand. Means were not statistically different ($P > 0.01$); ATxNP = the crossbreds between female AT and male NP; NPxAT = the crossbreds between female NP and male AT; ATxAT = pure Angthong strain; NPxNP = pure Nakornpathom strain.

4.2. Inbreeding and Wahlund effect

In general, homozygote excess is explained either by a presence of null alleles, mixing of more than one random mating population (Wahlund effect) or inbreeding (Hedrick, 1985). In this study, after the data were adjusted to correct for the impact of null alleles (Oosterhout

et al., 2004), three populations still remained in HWE disequilibrium. AT showed homozygote excess but without genetic disequilibrium which suggested no recent mixing of populations. Therefore, it was inferred that the homozygote excess of AT was a signature of inbreeding. In contrast, both homozygote excess and genetic disequilibrium were observed in NP and SP, and the Wahlund effect may have been an issue. However, due to the history of the populations that likely were retained with small effective population size (N_e), inbreeding could have been an additional cause of the homozygote excess in NP and SP.

4.3. Genetic variation

Overall, the genetic variation of the hatchery populations of African catfish in Thailand varied considerably between population groups. Allelic diversity was relatively high for AT and SP and low for NP and NS (average A for freshwater fishes = 9.1, De Woody and Avise, 2000). The observed heterozygosity was moderate compared to the average for freshwater fishes ($H_o = 0.54$, De Woody and Avise, 2000), while the expected H was similar to that of the wild African catfish ($H_e = 0.78$, Filip Volkaert, Katholieke University, Leuven, pers. comm.). In general, loss of genetic variation is common among hatchery populations (e.g., in turbot (*Scophthalmus maximus*) (Coughlan et al., 1998), common carp (*Cyprinus carpio*) (Kohlmann et al., 2005), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Aho et al., 2006), barramundi (*Lates calcarifer*) (Frost et al., 2006), Japanese scallop (Li et al., 2007) and bay scallop (Wang et al., 2007)), often caused by a bottleneck occurring during the founding event and resulting in allele loss (Allendorf and Phelps, 1980). Then, if N_e is continuously small, inbreeding is likely to occur, resulting in reduction of heterozygosity (Falconer and Mackay, 1996). AT had the highest genetic variation in terms of allelic diversity (based on A_e and A_r) which suggests that it was founded with larger N_e than the other populations, but that the subsequent N_e was not sufficient to avoid increased inbreeding. Although a signature of population mixing was observed in NP and SP, which implied that there may have been recent introductions from genetically different populations, they did not increase genetic variation. This may be explained by the introductions being from populations with low genetic variation.

4.4. The crossbreeding experiment

The information from microsatellites revealed that the parental strains used for this study had a history of inbreeding. However, there was no evidence for the deterioration of aquaculture traits or “inbreeding depression” in these strains despite the farmers’ belief to the contrary. Inbreeding depression has been observed in many aquatic species, e.g. a reduction of growth and survival rate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Kincaid, 1983), common carp (*Cyprinus carpio*) (Moav and Wohlfarth, 1968), salmon (*Salmo salar*) (Ryman, 1970), and channel catfish (*Ictalurus punctatus*) (Bondari and Dunham, 1987); and a reduction of growth rate in the Tahitian strain of *P. styrostris* (Bierne et al., 2000), although the expression of inbreeding depression is to some degree environment-specific (Pray et al., 1994). Therefore, the present result may not have revealed inbreeding depression of all traits (except phagocytic activity) in AT and NP because the performance of the crossbreds did not improve after recovery from inbreeding. Theoretically, the adverse effects of inbreeding may be relieved by selection (either natural or artificial) against homozygous deleterious genotypes (Falconer and Mackay, 1996) or because the test environments were not conducive for expression of inbreeding depression. This is supported by the review of Crnokrak and Barretta (2002) showing that an inbreeding depression was purged after several generations, resulting in a rebound in fitness, and also by a report on strains of *P. styrostris* that were subjected to several generations of inbreeding, but still retained their growth performance (Goyard et al., 2008). Likewise,

the improvement of phagocytic activity of the crossbreds may be explained by either a recovery from inbreeding or heterosis.

In this experiment, we also expected advantageous heterosis to emerge from a mating between genetically distant populations (Falconer and Mackay, 1996; Shikano and Taniguchi, 2002). We were unable to breed between the most genetically distant populations (SP and NS and AT and NS) due to the unavailability of broodstock from NS.

Heterosis was not observed for most traits (growth, survival, antibody titre and phagocytic index) except for phagocytic activity. This was in accordance with the results of crossbreeding reported for a wide range of species. For example, no heterosis was observed for growth in the diallel crosses between 4 strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Horstgen-Schwark et al., 1986), growth of crossbreds between 3 strains of walking catfish (*Clarias macrocephalus*) (Na-Nakorn, 2000), survival and growth of crossbreds between 2 strains of chinook salmon (*O. tshawytscha*) (Cheng et al., 1987) and growth of 1 out of 6 crosses of *Oreochromis shiranus* strains (Maluwa and Gjerde, 2006). In contrast, heterotic effect was evident for the majority of traits (9 out of 12 traits) in the crosses between farmed and wild chinook salmon (Bryden and Heath, 2004); body weight of 5 of 6 crosses of *O. shiranus* strains (Maluwa and Gjerde, 2006), and growth in the cross between inbred domesticated Hawaiian and Tahitian strains of *P. styrostris* (Goyard et al., 2008).

Heterosis depends largely on whether the traits are under the dominant genetic variation (Falconer and Mackay, 1996) and the magnitude of genetic differentiation between parental strains (Shikano and Taniguchi, 2002; reviewed by Fjalestad, 2005). However, the results of crossing are unpredictable, and thus need empirical experiments (Falconer and Mackay, 1996). Therefore, the lack of heterosis in most traits in this study was not unexpected.

Although the crossbreds were not superior to the parents in most traits, they were expected to increase in genetic variation, which may be responsible for the improved phagocytic activity, which is a fitness-related trait (Shikano and Taniguchi, 2002). Although numbers were small, the crossbreds exhibited slightly increased variation at the alpha region of MHC class I over one of the parental lines. Thus, they may improve specific immune response to viruses (Van Musiwinkel et al., 1999; Grimholt et al., 2003; Landis et al., 2008).

4.5. Recommendations

4.5.1. Broodstock management

For maintaining genetically distinct stocks for further utilization, the genetic differentiation between the two groups (NP-NS and SP-AT) should be maintained by avoiding broodstock translocation between them. Genetic variation within populations may be increased by introduction of broodstock from other populations within a group. More importantly, N_e should be maximized (Falconer and Mackay, 1996) or at least kept at 45–50 (Tave, 1993) to avoid further inbreeding.

4.5.2. Implication for aquaculture

Among the four African catfish strains included in this study, AT and SP showed the highest genetic variation and thus they are a good option for a genetic improvement program. However, it should be noted that genetic variation at neutral loci does not ensure variation of quantitative traits (e.g. Overturf et al., 2003; Borrell et al., 2004), which is the basis of long-term response to selection (Falconer and Mackay, 1996). Alternatively, to ensure the recovery from genetic drift and inbreeding we would suggest the introduction of new stock(s) of African catfish for crossbreeding with the locally adapted stocks, providing that the introduced stock(s) have been properly domesticated and/or genetically improved.

Although the crossbreds performed similarly to the parental strains in most traits, the phagocytic activity of the crossbreds was better than that of the parental strains. Therefore, we suggest using the crossbred for culture which is widely practiced in north-eastern provinces of Thailand (Na-Nakorn, 2001). However, the effect of $G \times E$ should be considered because genetic variance other than the additive

genetic variance is sensitive to the environment (reviewed by Fjalestad, 2005). Moreover, for the purpose of using African catfish as a male parent to hybridize with *C. macrocephalus*, the performance of the interspecific hybrid will be studied by our group before the crossbreds African catfish are released to catfish hatcheries.

Acknowledgements

The authors appreciate the funding support from Thailand Research Fund through the project “Application of Genetics and Biotechnology for Sustainable Development of Aquaculture—II,” Senior Research Scholar 2007 awarded to UN. A partial support was provided by “Thesis and Dissertation Support Fund”, Graduate School, Kasetsart University. We thank Miss Srijanya Sukmanomon, Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University for the support on data analyses. English grammar check was provided by Mr. Adrian Hillman, Graduate School, Kasetsart University.

References

- Aho, T., Rönkä, J., Piironen, J., Björklund, M., 2006. Impacts of effective population size on genetic diversity in hatchery reared brown trout (*Salmo trutta* L.) populations. *Aquaculture* 253, 244–248.
- Allendorf, F.W., Phelps, S.R., 1980. Loss of genetic variation in a hatchery stock of cutthroat trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* 109, 537–543.
- Allendorf, F.W., Luikart, G., 2007. *Conservation and the Genetics of Populations*. Blackwell Publishing, Malden, UK.
- Bierne, N., Beuzart, I., Vonau, V., Bonhomme, F., Bédie, E., AQUACOP, 2000. Microsatellite associated heterosis in hatchery propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture* 184, 203–219.
- Bondari, K., Dunham, R.A., 1987. Effects of inbreeding on economic traits of channel catfish. *Theor. Appl. Genet.* 74, 1–9.
- Borrell, Y.J., Pineda, H., McCarthy, I., Vázquez, E., Sánchez, J.A., Lizana, G.B., 2004. Correlations between fitness and heterozygosity at allozyme and microsatellite loci in the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Heredity* 92, 585–593.
- Bryden, C.A., Heath, D.D., 2004. Performance and heterosis in farmed and wild Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) hybrid and purebred crosses. *Aquaculture* 235, 249–261.
- Cavalli-Sforza, L.L., Edwards, A.W.F., 1967. Phylogenetic analysis: model and estimate procedures. *Evolution* 21, 550–570.
- Cheng, K.M., McCallum, I.M., McKay, R.L., March, B.E., 1987. A comparison of survival and growth of two strains of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and their crosses reared in confinement. *Aquaculture* 67, 301–311.
- Cornuet, J.M., Luikart, G., 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144, 2001–2014.
- Coughlan, J.P., Imsland, A.K., Galvin, P.T., Fitzgerald, R.D., Naevdal, G., Cross, T.F., 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.
- Crnokrak, P., Barretta, S.C.H., 2002. Perspective: purging the genetic load: a review of the experimental evidence. *Evolution* 56 (12), 2347–2358.
- Damrongratana, S., Kessenchai, P., 1966. *Tilapia niloticus* Linnaeus. Report presented to the King on March 17, 1966. Department of Fisheries, Bangkok (in Thai).
- De Woody, J.A., Avise, J.C., 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *J. Fish Biol.* 56, 461–473.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin version 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform.* 1, 47–50 Online.
- FAO, 2006. Fishstat Plus Version 2.30. <http://www.fao.org/fi/statist/FISHPUS.asp>, April 1, 2008.
- Falconer, D.S., Mackay, T.F.C., 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*. Longman, Essex, UK.
- Felsenstein, J., 1993. PHYLIP (Phylogeny Interference Package) Version 3.5c. Distributed by the Author. Department of Genetics. University of Washington, Seattle, USA. URL: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>.
- Fjalestad, K.T., 2005. Breeding strategies. In: Gjedrem, T. (Ed.), *Selection and Breeding Programs in Aquaculture*. Springer, Netherlands, pp. 145–159.
- Frost, L.A., Evans, B.S., Jerry, D.R., 2006. Loss of genetic diversity due to hatchery culture practices in barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture* 261, 1056–1064.
- Galbusera, P., Volckaert, F.A., Hellemans, B., Ollevier, F., 1996. Isolation and characterization of microsatellite markers in the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Mol. Ecol.* 5, 703–705.
- Goodman, S.J., 1997. RSTCALC: a collection of computer programs for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and determining their significance. *Mol. Ecol.* 6, 881–885.
- Goudet, J., 2001. FSTAT, a Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices (version 2.9.3). 2003. Available at <http://www2.unil.ch/izea/softwares/fstat.html>.
- Goyard, E., Goarant, C., Ansquer, D., Brun, P., de Decker, S., Dufour, R., Galinié, C., Peignon, J., Pham, D., Vourey, E., 2008. Cross breeding of different domesticated lines as a simple way for genetic improvement in small aquaculture industries: heterosis and inbreeding effects on growth and survival rates of the Pacific blue shrimp *Penaeus (Litopenaeus) styrostris*. *Aquaculture* 278, 43–50.

- Grimholt, U., Larsen, S., Nordmo, R., Midtlyng, P., Kjoeglum, S., Storset, A., Saeb, S., Stet, R.J.M., 2003. MHC polymorphism and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*); facting pathogens with single expressed major histocompatibility class I and class II loci. *Immunogenetics* 55, 210–219.
- Hedrick, P.W., 1985. *Genetics of Populations*. Jones and Bartlett Publishers, Inc., Boston.
- Horstgen-Schwark, G., Fricke, H., Langholz, H.J., 1986. The effect of strain crossing on the production performance in rainbow trout. *Aquaculture* 57, 141–152.
- Kincaid, H.L., 1976a. Effects of inbreeding on rainbow trout populations. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 105, 273–280.
- Kincaid, H.L., 1976b. Inbreeding in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Board Can.* 33, 2420–2426.
- Kincaid, H.L., 1983. Inbreeding in fish populations used for aquaculture. *Aquaculture* 33, 215–227.
- Kohlmann, K., Kersten, P., Flajshans, M., 2005. Microsatellite-based genetic variability and differentiation of domesticated, wild and feral common carp (*Cyprinus carpio* L.) populations. *Aquaculture* 247, 253–266.
- Landis, E.D., Purcell, M.K., Thorgaard, G.H., Wheeler, P.A., Hansen, J.D., 2008. Transcriptional profiling of MHC class I genes in rainbow trout infected with infectious hematopoietic necrosis virus. *Mol. Immunol.* 45, 1646–1657.
- Li, Q., Xu, K., Yu, R., 2007. Genetic variation in Chinese hatchery populations of the Japanese scallop (*Patinopecten yessoensis*) inferred from microsatellite data. *Aquaculture* 269, 211–219.
- Li, Y., Helleman, B., Pouyaud, L., Volkaert, F.A.M., 2000. Origin and Genetic Diversity of Aquacultured Catfish (*Clarias gariepinus*) in SE Asia. A Poster Presented at “the Catfish Asia Workshop”. 9–20 June, 2000, Bogor, Indonesia.
- Letcher, B.H., King, T.L., 1999. Targeted stock identification using multilocus genotype ‘familyprinting’. *Fish. Res.* 43, 99–111.
- Maluwa, A.O., Gjerde, B., 2006. Genetic evaluation of four strains of *Oreochromis shiranus* for harvest body weight in a diallel cross. *Aquaculture* 259, 28–37.
- McConnell, S.K., O'Reilly, P., Hamilton, L., Wright, J.M., Bentzen, P., 1995. Polymorphic microsatellite loci from Atlantic salmon (*Salmo salar*): genetic differentiation of North American and European populations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, 1863–1872.
- Michael, R.D., Srinivas, S.D., Sailendri, K., Muthukkaruppan, V.R., 1994. A rapid method for repetitive bleeding in fish. *Indian J. Exp. Biol.* 32, 838–839.
- Moav, R., Wohlfarth, W.G., 1968. Genetic improvement of yield in carp, in: *proceedings of the World Symposium on Warm-water Pond Fish Culture*. FAO Fish. Rep. No. 44, 12–29.
- Na-Nakorn, U., 2000. *Aquaculture Genetics*, (2nd ed.). The Kasetsart University Press, Bangkok. 203 pp. (In Thai).
- Na-Nakorn, U., 2001. *Clarias spp.: Breeding and Culture*, Second ed. The Kasetsart University Press, Bangkok. (In Thai).
- Newman, S.G., 1993. Bacterial vaccines for fish. *Ann. Rev. Fish Dis.* 3, 145–185.
- Nukwan, S., Tangtrongpiros, M., Lawanyawut, K., Veerasidith, P., 1990. Cross breeding between *Clarias macrocephalus* and *Clarias gariepinus*. *Proceedings of the 28th Kasetsart University Conference*, 29–31 January 1990. Kasetsart University, Bangkok, pp. 553–567.
- O'Connell, M., Wright, J.M., 1997. Microsatellite DNA in fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.* 7, 331–363.
- Oosterhout, C.V., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P., 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4, 535–538.
- Overturf, K., Casten, M.T., LaPatra, S.L., Rexroad III, C., Hardy, R.W., 2003. Comparison of growth performance, immunological response and genetic diversity of five strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 217, 93–106.
- Pray, L.A., Schwartz, J.M., Goodnight, C.J., Stevens, L., 1994. Environmental dependency of inbreeding depression: implications for conservation biology. *Conserv. Biol.* 8, 562–568.
- Puangkaew, J., Kiron, V., Somamoto, T., Okamoto, N., Satoh, S., Takeuchi, T., Watanabe, T., 2004. Non-specific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 25–39.
- Rahman, M.A., Bhadra, A., Begum, N., Islam, M.S., Hussain, M.G., 1995. Production of hybrid vigour through crossbreeding between *Clarias batrachus* Linn. and *Clarias gariepinus* Bur. *Aquaculture* 138, 125–130.
- Raymond, M., Rousset, F., 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49, 1280–1283.
- Rowena, M., Romana-Eguia, R., Ikeda, M., Basiao, Z.U., Taniguchi, N., 2004. Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA analysis. *Aquaculture* 236, 131–150.
- Ryman, N., 1970. A genetic analysis of recapture frequencies of released young of salmon (*Salmo salar*). *Hereditas* 65, 159–160.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schonhuth, S., Luikart, G., Doadrio, I., 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.
- Shikano, T., Taniguchi, N., 2002. Relationships between genetic variation measured by microsatellite DNA marker and fitness-related trait in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Aquaculture* 209, 77–90.
- Slatkin, M., 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139, 457–462.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1995. *Biometry*, Third ed. W.H. Freeman and Company, New York.
- Taggart, J.B., Hynes, R.A., Prodöhl, P.A., Ferguson, A., 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *J. Fish Biol.* 40, 963–965.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599.
- Tave, D., 1993. *Genetics for Fish Hatchery Managers*, Second ed. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Thai, B.T., Burrige, C.P., Austin, C.M., 2007. Genetic diversity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in Vietnam using four microsatellite loci. *Aquaculture* 269, 174–186.
- Van Musiwinkel, W., Wiegertjes, G., Stet, R., 1999. The influence of environmental and genetic factors on the disease resistance of fish. *Aquaculture* 172, 103–110.
- Wang, L., Zhang, H., Song, L., Guo, X., 2007. Loss of allele diversity in introduced populations of the hermaphroditic bay scallop *Argopecten irradians*. *Aquaculture* 271, 252–259.
- Wright, J.M., Bentzen, P., 1994. Microsatellites: genetic markers for the future. *Rev. Fish Biol. Fish.* 4, 384–388.
- Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T., 1999. POPGENE Version 1.31. Microsoft Window-Based Software for Population Genetics Analysis. University of Alberta and Centre for International Forestry Research, Alberta, Canada. URL: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/index.htm>.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aqua-online

Microsatellites revealed no genetic differentiation between hatchery and contemporary wild populations of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage 1878) in Vietnam

Hung Phuoc Ha^{a,b}, Thuy Thi Thu Nguyen^c, Supawadee Poompuang^d, Uthairat Na-Nakorn^{d,*}

^a Faculty of Aquaculture and Fisheries, Can Tho University, Cantho, Vietnam

^b Graduate School, Kasetsart University, Jatujak, Bangkok, Thailand

^c Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific (NACA), Kasetsart University Campus, Jatujak, Bangkok, Thailand

^d Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Jatujak, Bangkok, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 November 2008

Received in revised form 5 March 2009

Accepted 9 March 2009

Keywords:

Striped catfish

Pangasianodon hypophthalmus

Hatchery stocks

Domestication

Genetic diversity

ABSTRACT

Aquaculture of the striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage 1878), in Vietnam has become one of the fastest growing primary food production sectors in the world. Although a demand on quantity of fingerlings is currently reached, it is likely that the long term quality of the stocks may be uncertain due to lacking of genetic broodstock management measures. The present study employed five microsatellite loci to investigate levels of genetic variation of the striped catfish of the current wild stocks as well as of the selected hatcheries in Vietnam. The study included four hatchery populations and two wild populations spawned in 2005 in the Mekong and Bassac Rivers, and one wild population (spawned in 2006) in the Bassac River. The results showed no genetic differentiation among populations as revealed by F_{ST} and a model-based clustering method. AMOVA also showed no genetic differentiation between pooled wild and pooled hatchery populations while variation within groups was significant. 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. There were no evidences for recent genetic bottleneck in all populations. Therefore it is implied that the hatchery stocks of striped catfish in Vietnam were founded from sufficient numbers of brooders and current population size is large. The domestication process is in an early stage.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Domestication selection whereby genetic changes occur in hatcheries due to natural selection on fitness and reproductive traits under a human-controlled environment (Doyle, 1983), is an unavoidable process that occurs in hatcheries as a result of captive breeding of aquatic animals for generations. It entails genetic changes caused by either selection, reduction of effective population size (number of broodstocks contributing to a succeeding generation, N_e), inbreeding or combinations of these events (Doyle, 1983). Despite limited documentation, most domesticated aquatic animals have showed changes of various traits towards adaptation to captive conditions (Gjedrem, 2005), for example, improved reproductive success of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Osure and Phelps, 2006). Therefore, domestication is essential for good aquaculture stocks. However, deterioration of traits is also observed, e.g. reduction of survival rate

and increasing of abnormality rate of *Heterobranchius longifilis* after four generations of domestication (Agnèsè et al., 1995), and reduction of growth of Nile tilapia after 50 years of domestication (Brummett et al., 2004), if no rigorous broodstock management is applied.

Loss of genetic variation of hatchery stocks is a common phenomenon which has been reported in many species [e.g., turbot, *Scophthalmus maximus* (Coughlan et al., 1998); common carp, *Cyprinus carpio* (Kohlmann et al., 2005); Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* (Sekino et al., 2002); Atlantic salmon, *Salmo salar* (Skaala et al., 2004); Kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus* (Luan et al., 2006)]. This is mainly due to a small founder population and ultimately small effective population size (N_e) (Falconer and Mackay, 1996). As such, it is essential that a proper broodstock management plan is implemented in order to ensure successful domestication.

Striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*), also sometimes referred to as sutchi catfish, is a strict freshwater migratory species of the family Pangasiidae and native to the Chao Phraya and Mekong river basins (Rainboth, 1996; Robert and Vidthayanon, 1991). The species is also found in the Ayeyawady basin of Myanmar. Aquaculture of this species has been developed in Thailand for more than 30 years

* Corresponding author. Tel.: +66 2 5792924; fax: +66 2 5610990.
E-mail address: ffisum@ku.ac.th (U. Na-Nakorn).

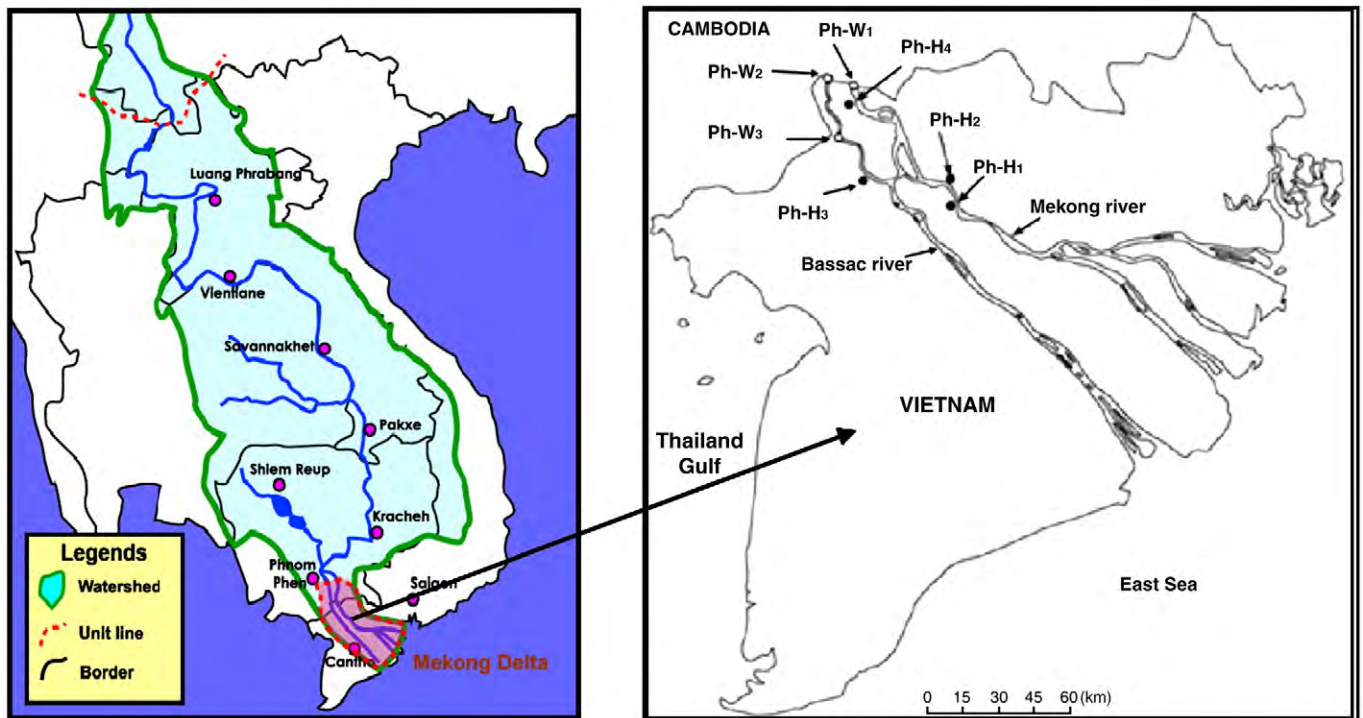


Fig. 1. A map showing sampling locations for striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in Vietnam.

and domesticated stock(s) originated from wild stocks in Chao Phraya River have been established. Aquaculture of the striped catfish in Vietnam has reached commercial scale due to the success of artificial propagation of the Vietnamese stocks of striped catfish in 1996's (Trong et al., 2002; Cacot et al., 2002). The striped catfish aquaculture business has become one of the fastest growing primary food production sectors in the world. Approximately 1.2 million tonnes of this species were produced in 2007 and exported to over 100 countries in the world.

Although currently the supply of striped catfish seed in Vietnam is totally dependent on the operations of hatcheries (270 million *Pangasiid* fry and fingerlings produced annually) (Van Zalinge et al., 2002; Thang, 2006), issues of genetic management of broodstock have not been addressed (Ha et al., 2008). This poses potential risks associate with losing genetic variation and potential inbreeding, which may hamper the domestication process (Schonhuth et al., 2003). Therefore, the information on genetic diversity of these hatchery and wild stocks is urgently required in order to sustain the quality of broodstock.

Hitherto there are a limited number of studies that addresses the questions relating to genetic variability of the striped catfish. So et al. (2006a) revealed no significant population genetic structure based on mitochondrial DNA-RFLP markers. The follow up study using the hyper-variable marker, microsatellite DNA, revealed three genetically

sympatric populations with high level of genetic diversity (So et al., 2006b).

The present study aimed at investigating levels of genetic variation of the striped catfish of the current wild stocks as well as of selected hatchery stocks in Vietnam using microsatellite DNA markers. Implications for management of broodstock will also be discussed.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection

Fin clip samples of 391 individuals of *P. hypophthalmus* were collected from brooder populations reared in four hatcheries located in An Giang and Dong Thap Provinces, two wild populations spawned in 2005 in the Mekong and Bassac Rivers, and one wild population (spawned in 2006) in the Bassac River in Vietnam. Sampling was undertaken between June and August, 2006. Details of sampling localities, sample codes and sample sizes are presented in Fig. 1 and Table 1.

Due to problems associated with species identification at the fry stage, the wild fry of striped catfish were collected as a mixed catfish stock from natural habitats and reared in earthen ponds until they reached weight of approximately 50 g. Then they were identified and fin clip samples (approximately 2 cm²) were collected.

Table 1

Detail of samples, population abbreviations, population names, locations, latitude and longitude, population type and sample size of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in Vietnam.

Pop. abbreviation	Pop. name	Location	Longitude/latitude	Pop. type	N
PhH1	Nguyen Van Mung's hatchery	Sa Dec, Dong Thap	10°22'37"N 105°42'33"E	Hatchery	52
PhH2	Dong Thap Fish Seed Center	Cao Lanh, Dong Thap	10°17'14"N 105°46'2"E	Hatchery	52
PhH3	Nguyen Van Tung's hatchery	Chau Phu, An Giang	10°34'36"N 105°14'08"E	Hatchery	58
PhH4	Tran Van Hoang's hatchery	Vinh Hoa, An Giang	10°52'00"N 105°10'59"E	Hatchery	51
PhW1	Mekong River (spawned in 2005)	Vinh Xuong, An Giang	10°54'15"N 105°10'46"E	Wild	50
PhW2	Bassac River (spawned in 2005)	Phu Huu, An Giang	10°55'04"N 105°05'42"E	Wild	51
PhW3	Bassac River (spawned in 2006)	Con Tien, An Giang	10°44'15"N 105°07'46"E	Wild	77

Pop. = populations, N = sample size.

2.2. DNA extraction and microsatellite DNA analyses

Total DNA was extracted from individual caudal-fin samples through standard phenol-chloroform method (Taggart et al., 1992) with slight modification. The DNA samples were screened for DNA variation at five microsatellite loci: Pg1*, Pg2*, Pg3*, Pg13*, and Pg14* (Na-Nakorn et al., 2006). The polymerase chain reactions (PCR) were performed using a Px2 Thermal Cycler (Thermo Electron Corporation, USA). Each PCR reaction comprised of 10 ng of DNA template, 1× PCR Tag buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM dNTPs, 0.25 μM of each reverse and forward primer; and 0.2 unit of Taq DNA polymerase. The temperature profile of the PCR was; 94 °C for 3 min of an initial denaturing cycle followed by 35 cycles of 94 °C denaturation for 30 s, a 52–60 °C annealing for 30 s (varied according to primers), a 72 °C extension cycle for 1 min; followed by a final extension step at 72 °C for 5 min. Then each PCR product (2–3 μl) was electrophoresed in 4.5% acrylamide gel, which was fixed and stained with silver nitrate.

2.3. Data analysis

Within population genetic variation parameters such as allele frequency, average number of alleles per locus (A_r) and allelic richness (A_r) were estimated using FSTAT software for windows version 2.9.3 (Goudet, 2002). Effective number of alleles per locus (A_e) was estimated using POPGENE version 1.32 (Yeh et al., 2000). To test the between populations difference of A_r , A_e , H_o , H_e , non-parametric t -tests (Sokal and Rohlf, 1995) were performed using Microsoft Excel for Windows.

To test for deviation from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), and fixation index (F_{is}) (Weir and Cockerham, 1984) were estimated using GENEPOP version 4.0 (Raymond and Rousset, 1995). The exact probability (Fisher's method) of significant deviation from HWE was estimated using Markov chain method (dememorization = 1000; batches = 100; iterations per batch = 5000). Levels of significance for this test were adjusted using sequential Bonferroni correction (Rice, 1989). Due to significant homozygote excess occurring in all populations, tests for null alleles were performed using MICROCHECKER version 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004) and the genotype frequencies were adjusted accordingly.

Genotypic disequilibrium between pairs of loci was tested employing GENEPOP version 4.0 (Raymond and Rousset, 1995). A reduction of effective population size, genetic bottleneck, was tested for each population using two approaches; a comparison of expected heterozygosity computed from the existing alleles with observed heterozygosity by a program BOTTLENECK version 1.2.02 (Cornuet and Luikart, 1999), and the M -statistic values (M = total number of alleles, k /overall range in allele size, r) calculated using ARLEQUIN version 3.11 (Excoffier et al., 2000), where bottleneck occurs if $M < 0.68$ (Garza and Williamson, 2001).

To evaluate the extent of differences within and among populations, the Wright's F -statistics values (F_{is} , F_{ST} , F_{IT}) and (F_{SC} , F_{CT} — when comparing differentiation within and between pooled hatchery samples and pooled wild samples) were estimated using Molecular

Analysis of Variance (AMOVA) implicated in ARLEQUIN version 3.11 (Excoffier et al., 2000). F_{ST} was tested against zero by bootstrapping over samples performed using FSTAT version 2.9.3 (Goudet, 2002).

We also employed a model-based clustering method for inferring population structure using the program STRUCTURE version 2.2 (Pritchard et al., 2000) (Burn-in and Markov chain Monte-Carlo lengths of 10,000; $K = 10$; and with each given K the mean likelihood over 20 runs). The best number of cluster, K was decided according to the *ad hoc* statistic ΔK based on the rate of change in the log probability of data between the successive K values (Evano et al., 2005).

Genetic distances of Cavalli-Sforza and Edwards (1967) between populations were calculated using the PHYLIP program package, version 3.67 (Felsenstein, 1993). An UPGMA phylogenetic tree was reconstructed based on the genetic distance data using the same program. The reliability of the dendrogram was estimated by calculating bootstrapping (1000 replicates) implemented by PHYLIP program package. The dendrogram was visualized in TreeView, version 1.6.6 (Page, 1996).

3. Results

3.1. Deviation from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) and linkage disequilibrium

Fisher's exact tests for departures of HWE revealed deviation from HWE towards homozygote excess for all seven populations. As such, the data set was checked for the presence of null alleles which existed in all populations. Thus, the genotype frequencies were adjusted according to the suggestion made by MICROCHECKER. After the adjustment, five populations did not conform to HWE ($P < 0.05$). However, after sequential Bonferroni correction only PhH4 significantly deviated from HWE, despite a conformation to HWE of four of the five loci tested. Linkage disequilibrium was not observed in all populations after sequential Bonferroni correction.

3.2. Genetic variation within population and population bottleneck

All parameters for genetic variation (Table 2) 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 and neither was the genetic variation among populations within groups of hatchery or wild populations. The number of private alleles over seven populations was relatively low (one in hatchery populations; three in wild populations) (data not shown).

No evidences for recent genetic bottleneck in all populations were found through the sign test, standard difference test, and Wilcoxon sign-rank test. The results were supported by the M -statistic values of each population ($M = 0.820$ – 0.916) which were higher than 0.68 ($M < 0.68$ suggests a bottleneck effect, Garza and Williamson, 2001).

Table 2

Summary statistics for genetic variation of wild and hatchery populations of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in Vietnam.

Pop.	N	Allele diversity			Heterozygosity		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
All pop.	356 ± 47.5	6.80 ± 3.19	4.75 ± 1.64	3.04 ± 1.19	0.64 ± 0.14	0.63 ± 0.14	

Population abbreviation as in Table 1; A = average number of alleles per locus; Pop. = populations, N = sample size, A_r = allelic richness; A_e = effective number of alleles per locus; H_o = observed heterozygosity; H_e = expected heterozygosity; F_{is} = fixation index; * denotes statistically different from 0 ($P < 0.0014$).

Table 3

Analysis of molecular variance (AMOVA) of pooled hatchery populations and pooled wild populations of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in Vietnam.

Source of variation	Sum of squares	Variance components	Percentage variation	Fixation indices	P-value
Among groups	0.618	−0.005	−0.319	−0.019 (F_{CT})	0.998
Among populations within groups	11.100	0.007	0.450	0.004 (F_{SC})	0.018
Among individuals within populations	529.301	−0.030	−1.937	−0.003 (F_{IS})	0.917
Within individuals	567.000	1.598	101.806	−0.018 (F_{IT})	0.871
Total	1108.020	1.570			

3.3. Genetic diversity among populations

Wright's analysis for extent of differentiation among populations, value of F_{ST} over five loci, demonstrated no genetic differentiation among populations ($F_{ST} = 0.003$; $CI_{95\%} = -0.001-0.006$). Similarly, the analysis of molecular variance (AMOVA) revealed no difference between pooled hatchery populations and pooled wild populations ($F_{CT} = -0.019$, $P = 0.998$). However, there was significant differentiation within group ($F_{SC} = 0.004$, $P = 0.018$). The variation among individuals within populations was insignificant ($F_{IS} = -0.003$, $P = 0.917$) (Table 3).

A test for genetic differentiation between populations based on Fisher's exact test showed significant difference between 10 population pairs ($P < 0.05$) but they were not significantly different after sequential Bonferroni correction. Pairwise F_{ST} values (Table 4) showed significant differentiation between PhH3 and PhH1 and PhH4 and PhH3 after sequential Bonferroni correction.

3.4. Genetic distance

Cavalli-Sforza and Edwards (1967) chord distance between pairs of populations (Table 4) ranged from 0.0084 (of PhH3–PhW1) to 0.0201 (of PhH1–PhH4). The genetic distance among wild populations was 0.0173–0.0194, and it was 0.0131–0.0201 among hatchery populations.

3.5. Cluster analysis and UPGMA dendrogram

The log probabilities $\ln P(X|K)$ associated with different numbers of genetic clusters K , calculated from STRUCTURE analysis of 391 individuals of striped catfish showed the highest value at $K = 1$ ($\ln P(X|K) = -4323.4$), and the lowest value at $K = 5$ ($\ln P(X|K) = -4763.5$). Calculation of ΔK revealed that ΔK was highest at $K = 2$ and $K = 5$. However, in both cases the values of cluster membership were very low (0.136–0.675 in case of $K = 3$ and 0.067–0.439 in case of $K = 5$) and no clear patterns of clustering were observed.

The UPGMA dendrogram (Fig. 2) revealed grouping of PhH3 and PhW1, and PhH1, PhH2 and PhW2 and PhW3 appeared the most distant population. Notably the temporal samples of Bassac River (PhW2 and

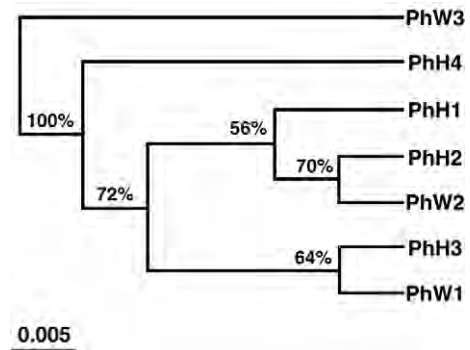


Fig. 2. The UPGMA dendrogram based on Cavalli-Sforza and Edwards genetic distance among seven populations of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in Vietnam.

PhW3) were distantly placed in the dendrogram. Most of the internal nodes were supported by bootstrap values (56%–72%).

4. Discussion

4.1. Genetic diversity within striped catfish populations and an implication on N_e

Genetic variation of striped catfish in Vietnam was characterized by low allele diversity compared to the averages for freshwater fish ($A = 9.1 \pm 6.1$ averaged across 13 species, De Woody and Avise, 2000), marine fish ($A = 19.9 \pm 6.6$ averaged across 12 species, De Woody and Avise, 2000) and for striped catfish populations in Cambodian Mekong River ($A_r = 7.9-10.4$; sample size = 47.0–59.9; So et al., 2006a). However, the observed and expected heterozygosity was moderate; slightly higher than the average for freshwater fish ($H = 0.54 \pm 0.25$ averaged across 13 species, De Woody and Avise, 2000), and slightly lower than marine fish ($H = 0.77 \pm 0.19$ averaged across 12 species, De Woody and Avise, 2000) and the striped catfish populations in Cambodian Mekong ($H_e = 0.757$, So et al., 2006a).

In general, a small number of alleles is a signature of bottleneck (Nei et al., 1975; Allendorf and Phelps, 1980; Norris et al., 1999) which, in the case of a wild population, may occur due to population isolation or dramatic reduction of effective population size. While in hatchery populations, using small numbers of founders easily cause allele loss (Irvin et al., 1998; Skaala et al., 2004; Innes and Elliott, 2006). However, according to the present results, no sign of bottleneck was observed in either wild or hatchery populations. Moreover, the migratory behavior of wild striped catfish (Robert and Vidthayanon, 1991), large occupying habitats (Touch, 2000), and large census number ($20-30 \times 10^6$, So and Nao, 1999) likely favored its high genetic variation. The relatively high H_e , which directly relates to effective population size, especially of the natural populations, provided support for having a current large wild population size. In addition the previous study conducted by So et al. (2006a) revealed high allelic richness of the Bassac populations (PhW2 and PhW3, $A_r = 10.3$, $n = 57$) based on different sets of microsatellites. Therefore, the small number of alleles may be caused by other reasons, e.g., an artifact of using primers from different species (So et al., 2006a). This explanation was partially supported by the study on genetic diversity of striped catfish in the Chao Phraya River and Mekong River using the same set of primers which resulted in similar allelic richness ($A_r = 4.8-5.9$; Na-Nakorn, unpublished data) as the present study while heterozygosity was higher ($H_o = 0.61-0.79$) than the present result. It may be argued that, as the wild samples were collected as fry, they may have comprised of a few full-sib families rather than representatives of the whole population (Na-Nakorn et al., 2004) and resulted in low average number of alleles per locus. Due to an absence of homozygote excess in the wild populations it was confirmed that the samples were good representatives of the wild stocks.

Table 4

The pairwise F_{ST} values (below diagonal) and Cavalli-Sforza and Edwards (1967) genetic distances (Weir and Cockerham, 1984) (above diagonal) among seven populations of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in Vietnam.

	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	–

Population abbreviation as in Table 1, * denotes significantly different from 0 (sequential Bonferroni correction).

The relatively high H_e of hatchery populations implied that the populations relied on a large number of breeding individuals (effective population size, N_e). Generally, Vietnamese farmers kept a large number of striped catfish brooders [approximately from hundreds to over a thousand fish in each farm (Ha et al., 2008)]. Although the census number of the stock fall in a range for sufficient N_e to enable sustainable hatchery stocks [e.g., 45–50 (Tave, 1993); >100 for salmonids (Gjerde, 1993; Jøstad and Naevdal, 1996)], the actual number of brooders that contributed to recruitment of broodstock (current N_e) in succeeding generations (Ha et al., 2008) remains unknown. The moderate H_e observed in the present study indicates that sufficient N_e was applied.

Generally, domestication is often accompanied by decline of genetic variation (relative to wild populations) due to genetic drift, selection and inbreeding [e.g. a reduction of allele diversity and heterozygosity of domesticated stocks of Japanese flounder, Sekino et al., 2002; a reduction of level of AFLP polymorphisms and heterozygosities of domesticated channel catfish (*Ictalurus punctatus*) strains, Simmons et al., 2006; negative correlation between time since domestication and genetic variation of brown trout (*Salmo trutta*), Aho et al., 2006; etc.]. The underlying reasons for retaining genetic variation of domesticated stocks of striped catfish in this study was due mainly to large N_e used in the hatcheries and short domestication history.

4.1.1. No genetic differentiation between wild and domesticated stocks

Genetic differentiation between wild and domesticated stocks has been observed in many freshwater and marine species [e.g. in Nile tilapia (Hassanien and Gilbey, 2005); common carp (Thai et al., 2007); Atlantic salmon (Norris et al., 1999; Skaala et al., 2004); brown trout (Hansen et al., 2000; Heggenes et al., 2002); rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Silverstein et al., 2004); barfin flounder, *Verasper moseri* (Ortega-Villaizán Romo et al., 2005); channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Simmons et al., 2006), Asian seabass, *Lates calcarifer* (Ze et al., 2006)], because of founder effect and/or inbreeding that occurred during domestication due to reduction of effective population size. In the present study no differentiation was observed between hatchery and wild stocks as indicated by AMOVA. This is also supported by the results of cluster analysis as the likelihood of having only one genetic stock for all populations under study was the highest and no clustering evidence was found. This agreed well with the short domestication history (approximately one to two generations; Ha et al., 2008) of these hatchery populations. Moreover, it supported our previous statement that the populations were founded with sufficient N_e so that no genetic drift (random changing of gene frequencies) occurred. In addition, Ha et al. (2008) observed reintroduction of wild striped catfish into some hatchery stocks due to preference of grow-out farms on wild seeds. This practice may be an additional reason responsible for the lack of differentiation between wild and hatchery stocks (Schonhuth et al., 2003).

The important concern on genetic impacts of aquaculture escapees included compromised genetic variation of local stocks following cross breeding with aquaculture escapees possessing low genetic variation, and loss of genetic integrity if the escapees are from genetically differentiated populations. Thereby, the present result implied that the current domesticated stocks of striped catfish in Vietnam may have limited potential impacts to local genetic diversity because they were not genetically different from the wild stocks in terms of allele frequencies distribution and level of genetic variation.

4.1.2. Lack of genetic differentiation of wild stocks

The lacking of genetic differentiation of the wild stocks of striped catfish in Vietnam was in accordance with their migratory behavior and the previous study of So et al. (2006a), for samples collected from feeding grounds. However, significant genetic differentiation was reported for spawning samples that comprised of sympatric popula-

tions having differential spawning times (So et al., 2006a). Such samples were not included in the present study because the samples were collected as fry.

4.1.3. Genetic similarity and dissimilarity suggested by the phylogenetic dendrogram

Despite a lack of significant population differentiation, the phylogenetic tree suggested noticeable genetic similarity between some hatchery stocks and the wild populations (e.g. PhH3 with PhW1, PhH1 and PhH2 with PhW2) which may reflect the origin of the stocks. On the contrary, dissimilarity was shown in the dendrogram among the wild populations collected from Bassac River in 2005 and 2006 and the population from the Mekong River. Therefore, this result as well as the sufficient genetic variation within hatchery and wild populations revealed by AMOVA suggested that the genetic diversity between populations (especially hatchery populations) should be considered and incorporated into broodstock management plan.

4.1.4. Implications for aquaculture

Although the results, especially the moderate N_e and a lack of bottleneck, implied that the hatchery stocks were founded with sufficient N_e which is a key factors determining long-term diversity of the domesticating stocks (Waples, 2002), an impact of relatively low allelic richness, namely, compromised adaptability (Allendorf and Phelps, 1980; Shikano and Taniguchi, 2002), should be of concern. Moreover, genetic variation (especially A) likely is reduced as domestication progresses [e.g. losing of 0.1 allele/generation for brown trout (Aho et al., 2006); a reduction from 7.7 to 4.7 alleles/locus for turbot (Coughlan et al., 1998); unchanged H with 46% reduction of A relative to wild stock of common carp (Kohlmann et al., 2005)]. As such, measures to increase or maintain A should be performed, e.g. an introduction of more brooders from the wild stocks. It is also very important that the recruitment should be done during the early stage of domestication otherwise it will hamper the domestication process (Schonhuth et al., 2003). It is unfortunate that the Cambodian and Vietnamese Governments have banned the collection of wild striped catfish since 1994 and 2001, respectively; and as such in order to maintain A it is advisable to use all genetic materials available on farms for breeding purposes.

Although the diversified genetic variation at neutral loci (e.g. microsatellites) may not guarantee variation at loci controlling economic traits (Halliburton, 2004), genetic diversity among hatchery stocks is required to obtain genetically diverse lines for accommodating varying aquaculture environments. Despite the lacking of genetic differentiation revealed by F_{ST} , sufficient variation within groups of hatchery or wild populations was shown by AMOVA and may reflect certain genetic dissimilarity which was supported by the phylogenetic dendrogram. Therefore, it is advisable to maintain the genetic integrity of each hatchery stock by avoiding translocation between the presumed genetic groups revealed in the dendrogram. Concurrently, a study aimed at comparing performance of the stocks should be undertaken so that the broodstock management can be operated for maximum achievement rather than being based on information from neutral loci alone.

Genetic monitoring should be performed on a regular basis on the domesticated stocks in order to facilitate the management aimed at avoiding loss of genetic diversity. Furthermore, artificial selection which is an efficient tool to improve performances of domesticated strains (e.g. 12–17% improvement of growth of Genetically Improved Farmed Tilapia-GIFT strain over 5 generations, Dey and Gupta, 2000; 20–30% improvement of body weight in channel catfish over 3 generations, Rezk et al., 2003; 3.6–18.4% improvement of resistance to Taura syndrome virus in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, Argue et al., 2002; also see reviews by Gjerdrem, 2005 for genetic improvement of salmonids) will be applied shortly to striped catfish in Vietnam (Dan and Griffiths, 2007). The selection program has a

tendency to compromise genetic variation relative to the random bred strains as has been shown for channel catfish (Mickett et al., 2003), thus confirms the necessity of genetic monitoring.

There may be also genetically diverse hatchery stocks which are not examined under the present study. According to So et al. (2006a) there were genetically differentiated populations of striped catfish in Mekong River caused by differential spawning time and some hatcheries may have recruited these as broodstock. Genetic inventory is needed to explore the possibility of obtaining more genetically diverse broodstock.

5. Conclusion

In conclusion, the genetic variation within populations of both hatchery and wild striped catfish in Vietnam is moderate as revealed by heterozygosity based on microsatellite markers, which thus implied relatively large population size. However, the allelic diversity was relatively low without evidence for genetic bottleneck. No genetic differences were found between hatchery and the wild stocks. As such, the domestication process is thought to be at a very early stage. The hatchery stocks of striped catfish in Vietnam were founded from sufficient numbers of brooders which hence may promote the sustainability of the stocks provided that good broodstock management practices are in place.

Acknowledgements

Financial support was mainly from Thailand Research Fund awarded to Uthairat Na-Nakorn under the Senior Research Scholar Program 2007 through the project RTA 5080013. The technical assistance of Ms. Srijanya Sukmanomon and Ms. Phinyada Sompuech was greatly appreciated. The authors would like to thank the Vietnam Ministry of Education, Dr. Nguyen Anh Tuan, Rector of Can Tho University (CTU), a leader of Higher Education Project at Cantho University for the granting of a Ph.D. scholarship to Hung Phuoc Ha. Thanks to Dr. Nguyen Thanh Phuong, Dean of College of Fisheries and Aquaculture, Can Tho University and the hatchery's owners for their support in sample collection. Hung Phuoc Ha appreciates the warmest hospitality and support of students and staff of Aquatic Genetic Laboratory, Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries during his stay in Kasetsart University.

References

- Agnès, J.F., Otémeé, Z.J., Gilles, S., 1995. Effects of domestication on genetic variability, survival and growth rate in a tropical Siluriform: *Heterobranchius longifilis* Valenciennes 1840. *Aquaculture* 131, 197–204.
- Aho, T., Rönn, J., Piironen, J., Björklund, M., 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., Phelps, S.R., 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., Angoni, D.E., Poumogne, V., 2004. On-farm and on-station comparison of wild and domesticated Cameroonian populations of *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 242, 157–164.
- Cacot, P., Legendre, M., Dan, T.Q., Tung, L.T., Liem, P.T., Mariojouis, C., Lazard, J., 2002. Induced ovulation of *Pangasius bocourti* (Sauvage, 1880) with a progressive hCG treatment. *Aquaculture* 213, 199–206.
- Cavalli-Sforza, L.L., Edwards, A.W., 1967. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *Am. J. Hum. Genet.* 19, 233–257.
- Cornuet, J.M., Luikart, G., 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., Imsland, A.K., Galvin, P.T., Fitzgerald, R.D., Naevdal, G., Cross, T.F., 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: Bonadad-Reantaso, M.G. (Ed.), Assessment of freshwater fish seed resources for sustainable aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper No. 501. FAO, Rome, pp. 625–628.
- De Woody, J.A., Avise, J.C., 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., Regnaut, S., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14, 2611–2620.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 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., Mackay, T.F.C., 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., Williamson, E.G., 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Mol. Ecol.* 10, 305–318.
- Gjerde, B., 1993. Breeding and selection. In: Heen, K., Monahan, R.L., Utter, F. (Eds.), *Salmon Aquaculture*. Fishing News Books, Cambridge USA, pp. 187–208.
- Gjedrem, T., 2005. Selection and Breeding Programs in Aquaculture. Springer, Dordrecht.
- 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., Ann, 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.
- Hansen, M.M., Ruzzante, D.E., Nielsen, E.E., Mensberg, K.D., 2000. Microsatellite and mitochondrial DNA polymorphism reveals life-history dependent interbreeding between hatchery and wild brown trout (*Salmo trutta* L.). *Mol. Ecol.* 9, 583–594.
- Hassanien, H.A., Gibbey, J., 2005. Genetic diversity and differentiation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) revealed by DNA microsatellites. *Aquac. Res.* 36, 1450–1457.
- Heggenes, J., Røed, K.H., Høyheim, B., Rosef, L., 2002. Microsatellite diversity assessment of brown trout (*Salmo trutta*) population structure indicate limited genetic impact of stocking in a Norwegian alpine lake. *Ecol. Freshw. Fish* 11, 93–100.
- Innes, B.H., Elliott, N.G., 2006. Genetic diversity in a Tasmanian hatchery population of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) compared with its Canadian progenitor population. *Aquac. Res.* 37, 563–569.
- Irvin, S.D., Wetterstrand, K.A., Hutter, C.M., Aquadro, C.F., 1998. Genetic variation and differentiation at microsatellite loci in *Drosophila simulans*: evidence for founder effects in New World population. *Genetics* 150, 777–790.
- Jøstad, K.E., Nævdal, G., 1996. Breeding and genetics. In: Pennel, W., Barton, B.A. (Eds.), *Principles of Salmonid Culture*. Elsevier, Amsterdam, pp. 655–725.
- Kohlmann, L., Kersten, P., Flajshans, M., 2005. Microsatellite-based genetic variability and differentiation of domesticated, wild and feral common carp (*Cyprinus carpio* L.) populations. *Aquaculture* 247, 253–266.
- Luan, S., Kong, J., Wang, Q.Y., 2006. Genetic variation of wild and cultured populations of the Kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* (Bate 1888) using microsatellites. *Aquac. Res.* 37, 785–792.
- Mickett, K., Morton, C., Feng, J., Li, P., Simmons, M., Cao, D., Dunham, R.A., Liu, Z., 2003. Assessing genetic diversity of domestic populations of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in Alabama using AFLP markers. *Aquaculture* 228, 91–105.
- Na-Nakorn, U., Kamonrat, W., Ngamsiri, T., 2004. Genetic diversity of walking catfish, *Clarias macrocephalus*, in Thailand and evidence of genetic introgression from introduced farmed *C. gariepinus*. *Aquaculture* 240, 145–163.
- Na-Nakorn, U., Sriphairoj, K., Sukmanomon, S., Poompuang, S., Kamonrat, W., 2006. Polymorphic microsatellite from DNA of the endangered Mekong giant catfish, *Pangasianodon gigas* (Chevey) and cross-species amplification in three species of *Pangasius*. *Mol. Ecol. Notes* 6, 1174–1176.
- Nei, M., Maruyama, T., Chakraborty, R., 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29, 1–10.
- Norris, A.T., Bradley, D.G., Cunningham, E.P., 1999. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations. *Aquaculture* 180, 247–264.
- Ortega-Villaizán Romo, M., Suzuki, S., Ikeda, M., Nakajima, M., Taniguchi, N., 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*). *Fish. Sci.* 71, 1120–1130.
- Osure, G.O., Phelps, R.P., 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., Stephens, M., Donnelly, P.J., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959.
- Rainboth, W.J., 1996. Fishes of the Cambodian Mekong. FAO identification sheets for fishery purposes. Food and Agriculture Organization, Rome.
- Raymond, M., Rousset, F., 1995. GENEPOP Version 4.0: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. 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.
- Robert, T.R., Vidhayanon, C., 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*, vol. 143, pp. 97–144.
- Schonhuth, S., Luikart, G., Doadrio, I., 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., Harab, M., Taniguchi, N., 2002. Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 213, 101–122.
- Shikano, T., Taniguchi, N., 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., Rexroad III, C.E., King, T.L., 2004. Genetic variation measured by microsatellites among three strains of domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquac. Res.* 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* 252, 133–146.
- Skaala, Ø., Høyheim, B., Glover, K., Dahle, G., 2004. Microsatellite analysis in domesticated and wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): allelic diversity and identification of individuals. *Aquaculture* 240, 131–143.
- So, N., Nao, T., 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.
- So, N., Van Houdt, J.K.J., Volckaert, F.A.M., 2006a. Genetic diversity and population history of the migratory catfishes *Pangasianodon hypophthalmus* and *Pangasius bocourti* in the Cambodian Mekong River. *Fish. Sci.* 72, 469–476.
- So, N., Maes, G.E., Volckaert, F.A.M., 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., Rohlf, F.J., 1995. *Biometry*, third ed. W.H. Freeman and Company, U.S.A.
- Taggart, J.B., Hynes, R.A., Prodohl, P.A., Ferguson, A., 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from *salmonid* fishes. *J. Fish Biol.* 40, 963–965.
- Tave, D., 1993. *Genetics for fish hatchery managers*, second ed. Van Nostrand-Reinhold, New York.
- Thai, T.B., Burridge, C.P., Austin, C.M., 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. J. 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., Hao, N.V., Griffiths, D., 2002. Status of *Pangasiid* aquaculture in Viet Nam. MRC Technical Paper No. 2. Mekong River Commission, Phnom Penh. ISSN: 1683-1489.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P., 2004. MICROCHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4, 535–538.
- Van Zalinge, N., Sopha, L., Bun, N.P., Kong, H., Jorgensen, J.V., 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, S.R., McCullough, D.R. (Eds.), *Population Viability Analysis*. University of Chicago Press, Chicago, pp. 147–168.
- Weir, B.C., Cockerham, C.C., 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38, 1358–1370.
- Yeh, F.C., Boyle, T., Yang, R.C., 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., Lin, G., Lo, L.C., Xu, Y.X., Feng, F., Chou, R., Yue, G.H., 2006. Genetic analysis of seabass stocks using novel polymorphic microsatellites. *Aquaculture* 256, 167–173.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aqua-online

Genetic diversity of domesticated stocks of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage 1878), in Thailand: Relevance to broodstock management regimes

Uthairat Na-Nakorn^{a,*}, Thakkina Moeikum^{a,b}^a Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Chatujak, Bangkok 10900, Thailand^b Graduate School, Kasetsart University, Chatujak, Bangkok 10900, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 June 2009

Received in revised form 15 September 2009

Accepted 20 September 2009

Keywords:

Striped catfish

Pangasianodon hypophthalmus

Hatchery stock

Thailand

Genetic diversity

ABSTRACT

Thai stocks of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage 1878), have a relatively long domestication history (>20 generations) that began with fish of Chaophraya River origin. The genetic diversity of this species was studied in six hatchery populations with two different broodstock management regimes (without introduction of either wild or domesticated stocks vs. with occasional introduction of either original or non-original populations) and in three wild populations (from the Chaophraya River and its tributary and from the Mekong River). The results, based on five microsatellite loci, revealed high allele diversity of the hatchery populations ($A_r = 6.53$ – 8.06) with the introduction of non-original stock (from the Mekong population) relative to those with the introduction of original stock (from the Chaophraya population) or without introduction ($A_r = 3.18$ – 6.06). Notably, heterozygosity was high in the majority of populations ($H_o = 0.633$ – 0.763 ; $H_e = 0.593$ – 0.834). Genetic introgression from the Mekong population was observed in every population, as revealed by Bayesian population assignment. The wild populations showed unexpectedly low allele diversity ($A_r = 4.89$ – 5.98) and were not genetically differentiated from the hatchery populations (as revealed by AMOVA).

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The booming catfish culture and export industry in Vietnam [the export value increased by 42.9% over 8 years, reaching \$US 1.6 billion in 2008 (Hau, 2008)] has drawn global attention to striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage 1878), one of the major species within this industry. The stocks used for culture in Vietnam were recently introduced from wild populations of the Mekong River (Ha et al., 2008), yet genetic change did not occur (Ha et al., 2009). Genetic variation within populations of hatchery and wild populations of striped catfish in Vietnam are relatively homogenous and moderate (allelic richness, $A_r = 4.10$ – 5.06 ; $H_o = 0.61$ – 0.66 ; $H_e = 0.61$ – 0.64). In contrast, striped catfish, which have been bred in captivity in Thailand since 1967 (Boonbrahm et al., 1967; Sidthimonk and Pinyoying, 1968) and now are domesticated (from Chaophraya stock), have not reached the commercial scale of culture (e.g., annual production was only 28,000 t in 2006; FAO, 2006) and the product is locally consumed without exportation. According to anecdotal information, a major drawback of the culture business of this species in Thailand is the deteriorated traits of the stock(s) (e.g., slow growth and yellow meat), which may have been the result of domestication.

Altering species traits via domestication can be either desirable or undesirable. For example, reduction of survival rate and increase of the abnormality rate of *Heterobranchius longifilis* (Agnèse et al., 1995) and reduced growth performance (Brummett et al., 2004) and improved breeding success (Osure and Phelps, 2006) of domesticated Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, depended on broodstock management regimes.

Domestication may lead to genetic deterioration of stocks due to genetic drift, inbreeding, and selection (direct or indirect) if poor broodstock management is applied (Doyle, 1983; Falconer and Mackay, 1996). Allendorf and Phelps (1980) reported that the most apparent signature of domestication was allele loss caused by genetic drift which has been reported in a wide range of aquatic species (e.g., *H. longifilis*, Agnèse et al., 1995; turbot, *Scophthalmus maximus*, Coughlan et al., 1998; Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, Sekino et al., 2002; common carp, *Cyprinus carpio*, Kohlmann et al., 2005; Nile tilapia, *O. niloticus*, Aho et al., 2006; kuruma prawn, *Marsupeneus japonicus*, Luan et al., 2006; and Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, Appleyard and Ward, 2006). In contrast, Falconer and Mackay (1996) stated that the effect of genetic drift on heterozygosity was minor.

Due to concern about genetic deterioration, some striped catfish hatcheries in Thailand introduced novel stocks, e.g., from wild Mekong population(s), and bred them with domestic stocks to increase genetic variation (Boplanarong Farm, pers. comm.). The introduction of genetically distinct stocks increased the mean heterozygosity of a

* Corresponding author. Tel./fax: +66 2561 0990.
E-mail address: ffisum@ku.ac.th (U. Na-Nakorn).

farmed population of African catfish, *Clarias gariepinus* (Van der Bank et al., 1992; Grobler et al., 1997); retained the genetic variation of Siamese fighting fish (Meejui et al., 2005), and improved the mean phagocytosis activity and variation at the alpha region of the MHC class I gene over those of parental strains of African catfish (Wachirachaikarn et al., 2009). However, introduction of nonlocal stocks may result in loss of the genetic integrity of local stocks which may have some advantageous traits (e.g., disease resistance and hardiness).

Limited data are available about the genetic diversity of striped catfish. So et al. (2006a) studied the mitochondrial DNA among wild populations of striped catfish in the Cambodia Mekong River and found no evidence of population structure. Later, the presence of cryptic wild populations was revealed using microsatellite DNA markers (So et al., 2006b). Ha et al. (2009) reported genetic homogeneity between domesticated and wild stocks of striped catfish in Vietnam, whereas genetic variation within populations was moderate. Prior to this study, information about the genetic diversity of the Thai stock of striped catfish was limited. No studies have been performed on the Chaophraya stocks, except for those introduced from Thailand to Bangladesh. Of those, based on three polymorphic isozyme loci the mean number of alleles per locus (1.3 ± 0.3) was low and they showed moderate heterozygosity (0.06 ± 0.05) (Barua et al., 2004). Therefore, this study was conducted to explore the genetic diversity of six hatchery stocks and three wild populations from the Mekong and Chaophraya Rivers and a tributary. The objectives of the study were to quantify the genetic variation within populations of hatchery stocks having different stock introduction histories and to assess the impacts of stock translocation on the genetic integrity of the Chaophraya stocks. Based on the results, we provide recommendations on genetic broodstock management of striped catfish in Thailand. Moreover, the information obtained in this study will facilitate efficient use of these stocks for further genetic improvement. More importantly, the use and exchange of genetic resources have captured global interest and the mutual benefit of owners and users of the resources is an important issue (Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, 2009). As such, genetic diversity data would be very useful for ownership clarification and for monitoring of translocation impacts.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection

In this study, six populations of striped catfish broodstock were sampled from hatcheries with a long history (> 10 years) of fingerling production and that varied in their broodstock recruitment practices (see Table 1 and Fig. 1). Three wild populations were sampled as well: two from the Chaophraya River Basin and one from the Mekong River. Due to the low incidence of adult wild fish caught by fishermen, the wild samples (1–3 kg) were collected from ponds and cages stocked with wild mixed Pangasiid catfishes. Table 1 provides details about the sampling localities and sample sizes. A piece of caudal fin tissue (approximately 50 mg) was cut from individual fish and preserved in 95% alcohol until DNA extraction was performed.

2.2. DNA extraction and amplification

The DNA extraction procedure described by Taggart et al. (1992) with slight modification was used in this study. Each individual DNA sample then was used as a template in PCR reactions primed by each of five microsatellite primer pairs (Pg-1, Pg-2, Pg-3, Pg-13, and Pg-14) developed for *Pangasianodon gigas* (Na-Nakorn et al., 2006). Each 20 µl reaction mixture contained 10 ng DNA template, 10 × PCR buffer (100 mM Tris-HCl pH 9.0, 500 mM KCl), 0.5 pmol each of the forward and reverse primers, 0.2U Tag DNA polymerase, and distilled water.

Table 1

Details of sampling locations, population abbreviation, history of the stocks and sample sizes of striped catfish in Thailand.

Pop. abbrev.	Sampling localities/name and location of hatcheries	History of stocks	Sample sizes
PC 1	Pocharoen Farm, Amphur Muang, Chachoengsao Province (male)	Newly recruited (3–4 generations) from Mekong River, used as male brooders for cross breeding with PC 2	40
PC 2	Pocharoen Farm, Amphur Muang, Chachoengsao Province (female)	Originally recruited from domesticated Chaophraya River stock from a hatchery in Nakornsawan Province, used as female brooders for cross breeding with PC 1	40
SP	Songpinong Farm, Amphur Songpinong, Suphanburi Province (male and female)	Broodstock of mixed origin comprising of domesticated stock introduced from a hatchery in Nakornsawan Province some 10 years ago and wild Chaophraya River stock and possibly some introduced wild Mekong River population.	50
NI	Nakornsawan Fisheries Research and Development Institute, Amphur Muang, Nakornsawan Province	Originally domesticated from wild population of Chaophraya River stock for about 20 generations (40 years) with occasional reintroduction of wild Chaophraya River population.	46
NR	Boplanarong Farm, Choomsang District, Nakornsawan Province	Founded from NI stock with some newly introduced wild Mekong River population.	56
HS	Hereshare Farm, Choomsang District, Nakornsawan Province	Founded from NI stocks about 30 years ago without any introduction.	52
AY-W	Chaophraya River, Sena District, Ayudhya Province (lat.14°19'32"N/long.100°24'25"E)	Wild population collected from a pond stocked with fingerling of wild origin.	51
UT-W	Sakaekrang River, Muang District, Uthaitani Province (lat.15°17'46"N/long.100°4'40"E)	Wild population collected from a pond stocked with fingerling of wild origin.	20
NP-W	Mekong River, Muang District, Nakornphanom Province (lat.17°23'45"N/long.104°47'58"E)	Wild population collected from a cage stocked with fingerling of wild origin.	20
		Total	375

PCR profiles were generated as follows: denaturation at 94 °C for 3 min; 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s; optimum annealing temperature for each primer (52–60 °C) for 30 s; extension at 72 °C for 1 min; and a final extension at 75 °C for 5 min. Next, 5 µl of loading buffer (0.1% bromophenol blue, 0.1% xylene cyanol FF, 0.5 M EDTA pH 8, and 99% formamide) was added to each PCR product and stored at 4 °C until the next step. Scoring of the PCR products was done by electrophoresis on 4.5% polyacrylamide gel and subsequent silver staining. Sizes of the PCR products were determined relative to the M13 sequence ladder.

2.3. Test for Mendelian inheritance of microsatellites

Due to a concern about null alleles (alleles yielding no PCR products), which often occur with cross-species amplification, three full-sib families (a male and a female parent and 20 offspring/family) of striped catfish were used to test for Mendelian inheritance of the alleles recognized by the primers. DNA extraction, PCR amplification, and scoring procedures were the same as previously described. The χ^2 test was used to test the departure of the segregation ratio in offspring against the expected ratio.

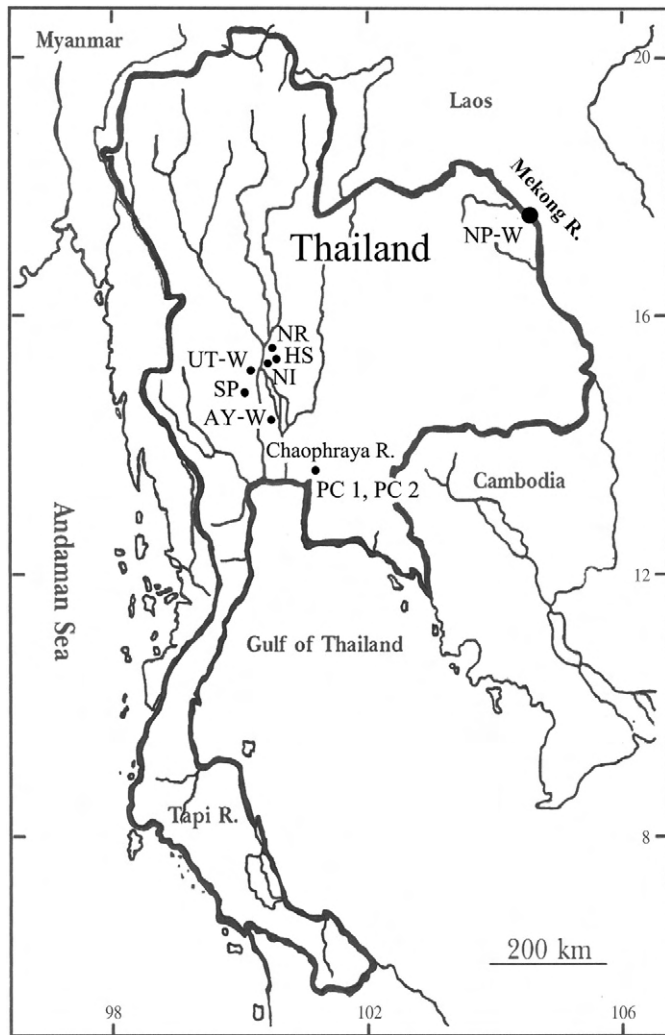


Fig. 1. A map showing sampling sites of hatchery and wild populations of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) collected in Thailand. Population abbreviation as in Table 1.

2.4. Data analyses

The genotypic distributions of each population across five loci were tested for departure from the Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) using Genepop version 3.4 (Raymond and Rousset, 2003). Exact *P* values were estimated using the Markov chain method (dememorization: 1000; batches: 100; iterations per batch: 1000) (Guo and Thompson, 1992). The inbreeding coefficient then was calculated using FSTAT 1.2 (Goudet, 1995). To describe genetic variation within a population, allele frequencies, average number of alleles per locus, and observed and expected heterozygosities were calculated using POPGENE version 1.31 (Yeh et al., 1997). To correct for a bias due to sample size, allelic richness was calculated as the average number of alleles per locus per population based on the smallest sample size using FSTAT version 2.9.3.2 (Goudet, 2002; updated from Goudet, 1995). Next, a *t*-test (Archie, 1985) was used to test the differences in genetic variation among populations. For all multiple tests, *P* values were corrected using a sequential Bonferroni correction (Rice, 1989). The average pairwise genetic relatedness (r_{xy} ; Ritland estimator) among individuals within populations was calculated using the MARK computer program, written by KR in FORTRAN95 for Windows, available at <http://www.genetics.forestry.ubc.ca/ritland/programs.html>.

The distortion from independent segregation of genotypes (linkage disequilibrium) was tested using the exact test (Markov chain: dememorization: 1000; batches: 100; iterations per batch: 1000) (Guo and Thompson, 1992) facilitated by Genepop version 3.4 (Raymond and Rousset, 2003). A recent significant reduction of effective population size (bottleneck) was tested using the program Bottleneck version 1.2.02 (Cornuet and Luikart, 1997).

Genetic diversity among populations was determined by the following methods. First, to elucidate the existence of population differentiation, *F* statistics (F_{ST} , F_{IT} and F_{IS}) were calculated using FSTAT (Goudet, 1995). Each parameter was tested against zero by a bootstrapping method. Differences in distributions of allele frequencies between populations were tested using Fisher's exact test in Genepop version 3.4 (Raymond and Rousset, 2003).

To quantify hierarchical genetic variation (between hatchery and wild populations and between populations within groups and within a population), the analyses of molecular variance (AMOVA) was performed following Excoffier et al. (1992) using the program Arlequin version 2.0 (Schneider et al., 2000).

Cavalli-Sforza and Edwards' (1967) chord distance was calculated to show genetic distance between population pairs using the program PHYLIP version 3.6, followed by construction of a phylogenetic dendrogram (neighbor joining) (Felsenstein, 1993). A bootstrap value at each node was also provided.

2.5. Individual assignment

To elucidate the contribution of wild stocks to the genetic composition of the hatchery stocks, Bayesian individual assignment was performed on multilocus genotypes of hatchery individuals against individual genotypes of wild populations using GENECLASS version 2 (Cornuet et al., 1999) (criterion: Rannala and Mountain, 1997; threshold: 0.05). We also included a wild population from the Mekong River in Vietnam provided by Ha et al. (2009) as a referenced population.

3. Results

3.1. Test for Mendelian inheritance of five microsatellite loci

Five microsatellites developed for *P. gigas* showed no distortion of the genotypic ratio from the Mendelian ratio in all three full-sib families of *P. hypophthalmus* ($\chi^2 = 0.05$ –7.8 for Pg-1; 0.01–0.45 for Pg-2; 0.05–1.25 for Pg-3; 0.5 for Pg-13, and 0.05–0.58 for Pg-14; $\chi^2_{0.05, df1} = 3.84$, $\chi^2_{0.05, df2} = 5.99$, $\chi^2_{0.05, df3} = 7.82$). As such, null alleles were not expected in this study.

3.2. Departure from the Hardy–Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium

Among the six hatchery populations, three (PC 1, PC 2, and NI) departed from HWE at one of the five loci ($P < 0.002$, Bonferroni correction); SP, HS, and NR did not conform to HWE at two, three, and four loci, respectively. Most of the locus-wise disequilibrium was in the direction of homozygote excess. Among the three wild populations, only AY showed distortion of the genotype distribution from HWE at one locus (Pg-14). This locus showed the highest frequency of departure from HWE (observed in four of the nine populations studied) towards either homozygote excess or homozygote deficiency. Nevertheless, the tests performed across loci showed that all but two populations (UT-W and NP-W) did not conform to HWE, and most of the populations were skewed towards homozygote excess (except for PC 2 and NI). Linkage disequilibrium was observed in only two populations (between Pg-1 and Pg-13 and Pg-3 and Pg-13 for NR; between Pg-3 and Pg-13 for NI).

3.3. Bottleneck tests and average r_{xy}

A significant Wilcoxon test and the shift-mode of allele frequency distribution showed that a recent bottleneck had occurred in one hatchery population (PC 2). Surprisingly, the same tests indicated that two wild populations (UT-W and NP-W) also showed signs of a bottleneck. The average pairwise relatedness (r_{xy}) between individuals within populations was low and ranged between -0.036 (UT-W) and 0.000 (PC 2). The r_{xy} values for the wild population (from -0.007 to -0.036) were lower than those of the hatchery populations (from -0.014 to 0.000).

3.4. Genetic variation within populations

The average number of alleles per locus (A) varied considerably among the six hatchery populations. The highest A was observed in NR (11.0 ± 1.9) followed by SP (8.6 ± 1.8), whereas PC 2 had the lowest A (3.6 ± 0.8). The wild populations had a relatively low A (between 5.0 ± 0.9 and 7.4 ± 1.3) compared to those of the hatchery populations. The effective number of alleles per locus, which refers to A weighted for allele frequencies, was low relative to A due to the presence of alleles with low frequencies. Likewise, allelic richness, which is A adjusted for sample size (see allelic richness in Table 2), showed the same trend. Observed heterozygosity (H_o) did not vary much among populations (range = 0.61 – 0.79), although the values were statistically different among populations. The H_o of wild and hatchery populations fell within the same range (Table 2). Remarkable variation was found for expected heterozygosity (H_e): it was highest for NR and SP (0.83 and 0.78 , respectively) and lowest for PC 2 (0.59).

3.5. Genetic diversity among populations

3.5.1. F_{ST} and analysis of molecular variance (AMOVA)

The overall F_{ST} was 0.167 and was significantly greater than 0 ($CI_{95\%} = 0.121$ – 0.197). The AMOVA revealed no genetic differentiation between hatchery and wild population groups [$F_{CT} = 0.022$; P (random value $\geq$ observed value) = 0.0772]. The results did not change when a single or all possible combinations of hatchery populations were removed from the analyses, with the exception of one case: when NI was removed [$F_{CT} = 0.028$; P (random value $\geq$ observed value) = 0.04301]. Across all nine populations, 82.4% of the variation occurred within populations ($P = 0.0000$), 15.4% among populations within groups ($P = 0.0000$), and 2.17% among groups ($P = 0.0772$). Population differentiation was significant for every population pair ($P < 0.0014$, Bonferroni correction).

3.5.1. Genetic distance and phylogenetic dendrogram

Table 3 shows genetic distance (D) between populations. Among the hatchery populations, D ranged between 0.059 (PC 1 and SP) and

0.178 (PC 2 and NI), whereas D among wild populations was low and ranged between 0.035 (AY-W and UT-W) and 0.053 (NP-W and UT-W). D between wild and hatchery populations (0.055 to 0.148) fell within the same range as D among hatchery populations.

The neighbor joining tree (Fig. 2) revealed a separation between wild Thai populations and hatchery populations (bootstrap value = 94%). The nodes among the hatchery populations and an outgroup from Vietnam were not supported by bootstrap values (range 46 – 64%). Genetic similarity was observed between NR and NI (bootstrap value = 64%), HS and SP (bootstrap value = 46%), and PC 1 and PC 2 (bootstrap value = 50%). Notably, the Vietnam wild population was placed among the hatchery populations despite the low bootstrap value (58%).

3.5.2. Individual assignment

Among the three wild populations and the outgroup from Vietnam, only NP-W and Vietnam were unambiguously assigned to the original populations, whereas 88.23% and 85% of AY-W and UT-W were correctly assigned. However, if only the individuals assigned with a score exceeding 90% were considered, there were no incorrect assignments of wild individuals. All of the hatchery populations consisted mainly of fish of Chaophraya origin (either AY-W or UT-W) (Table 4). Notably, PC 1, which was recorded as being of pure Mekong origin, consisted mainly of Chaophraya fish (71.63%). PC 2, which was recorded as being pure Chaophraya, contained 26.63% NP-W. Among the other hatchery populations that consisted of both Chaophraya and Mekong fish, only SP and NR contained a remarkable amount of NP-W (39.17% and 41.95% , respectively).

4. Discussion

A departure from the Hardy–Weinberg expectation in hatchery populations was common because they have been exposed to one or a combination of forces, namely selection, genetic drift, migration (introduction), inbreeding due to small population size, and non-random mating (Falconer and Mackay, 1996). Homozygote excess occurs for many reasons, such as inbreeding, mixing of genetically distinct populations (the Wahlund effect) (Hedrick, 1999; Allendorf and Luikart, 2007), selection against heterozygotes (Falconer and Mackay, 1996), sampling of members of a few families (Allendorf and Luikart, 2007), and the presence of null alleles (i.e., alleles without PCR products) (O'Connell and Wright, 1997). Although it is impossible to clarify the underlying mechanism(s) for homozygote excess in all cases based on the present data, there were sufficient reasons to disregard most of the explanations. For example, inbreeding was unlikely to have occurred; if it had, homozygote excess should have been observed at every locus. In addition, null alleles did not exist in this study, as revealed by the inheritance test, and low genetic relatedness among individuals within populations (r_{xy}) suggested

Table 2

Genetic variation within populations (A = average number of alleles/locus, A_e = average number of alleles/locus weighted for allele frequencies, A_r = allelic richness, average number of alleles/locus based on the same sample size, H_o = observed heterozygosity; H_e = expected heterozygosity) of six hatcheries and three wild populations of striped catfish.

Populations	N	Allele diversity			Heterozygosity		F_{IS}	P
		A	A_e	A_r	H_o	H_e		
PC1	40	6.8 ± 2.0^{ab}	4.1 ± 1.0^a	5.5 ± 1.4^a	0.64^c	0.75^a	0.152	0.000
PC2	40	3.6 ± 0.8^d	2.4 ± 0.2^b	3.2 ± 0.6^b	0.66^c	0.59^e	-0.115	0.000
SP	50	8.6 ± 1.8^{ac}	4.7 ± 1.2^{ac}	6.5 ± 1.6^{ac}	0.69^c	0.78^{ac}	0.117	0.000
NI	46	5.8 ± 1.9^{be}	3.9 ± 1.5^a	5.1 ± 1.7^a	0.74^c	0.72^b	-0.024	0.000
NR	56	11.0 ± 1.9^c	6.0 ± 1.4^c	8.1 ± 0.9^c	0.76^c	0.83^c	0.085	High. sign.
HS	52	7.6 ± 1.5^{ab}	3.9 ± 0.5^a	6.1 ± 0.9^a	0.63^a	0.75^a	0.155	High. sign.
AY-W	51	5.0 ± 0.9^e	4.2 ± 1.1^a	4.9 ± 0.9^a	0.72^c	0.75^a	0.045	0.000
UT-W	20	7.4 ± 1.3^{ab}	3.8 ± 0.4^a	5.9 ± 0.9^a	0.61^a	0.76^{ac}	0.195	0.0026
NP-W	20	5.2 ± 1.6^{be}	3.6 ± 1.1^a	4.9 ± 1.6^a	0.79^b	0.72^b	-0.094	0.1427
overall	41.7	6.8 ± 1.5	4.1 ± 0.9	5.6 ± 1.2	0.69	0.74		

F_{IS} = inbreeding coefficient and departure from the Hardy–Weinberg equilibrium was denoted by $P < 0.01/5$. The data in the same column superscripted with different letters were statistically significant ($P < 0.01$).

Table 3
Genetic distance [Cavalli-Sforza and Edwards (1967) chord distance] between hatchery and wild populations of striped catfish in Thailand.

Populations	PC 1	PC 2	SP	NI	NR	HS	UT-W	AY-W
PC 2	0.098	–						
SP	0.059	0.104	–					
NI	0.135	0.178	0.122	–				
NR	0.142	0.176	0.140	0.089	–			
HS	0.071	0.151	0.087	0.159	0.150	–		
UT-W	0.095	0.112	0.088	0.144	0.166	0.097	–	
AY-W	0.055	0.111	0.073	0.139	0.166	0.073	0.035	–
NP-W	0.063	0.101	0.076	0.148	0.168	0.118	0.053	0.041

that all of the samples included representatives of a population rather than only a few family members.

The obvious homozygote excess of the NR population (at 4 of 5 loci) may be attributed to mixing of more than one genetically distinct population in one sample (Hedrick, 1999; Allendorf and Luikart, 2007); this premise is supported by the presence of non-random association of loci (genotype disequilibrium). Similarly, according to the fish farm's records, the obvious distortion of allele frequencies from HWE in the HS population (at 3 of 5 loci) may be a signature of population mixing, although genetic disequilibrium was not observed. Departure from HWE of PC 1 and AY-W may be an artifact of small sample size because the skewness was observed only at the loci having a high number of alleles (23 alleles of *Pg-3* showed HWE distortion in PC1, and 24 alleles of *Pg-14* in AY-W) and hence resulted in sampling errors.

The recent bottleneck observed for the PC 2 population suggested that a severe reduction of population size occurred. Usually bottleneck is always accompanied by homozygote excess, but in PC 2 distortion from HWE was towards heterozygote excess. Therefore, we surmised that this population could have been derived from the crossing of genetically distinct stocks with a small number of parents. Nevertheless, the absence of genetic disequilibrium in PC 2, which may be due to the low power of the test caused by small sample size, compromised the robustness of our explanation.

4.1. Genetic diversity and broodstock management regimes

The ultimate goal of broodstock management practices is to sustain genetic variation within populations, which is crucial for further adaptation to a changing environment (Allendorf and Luikart,

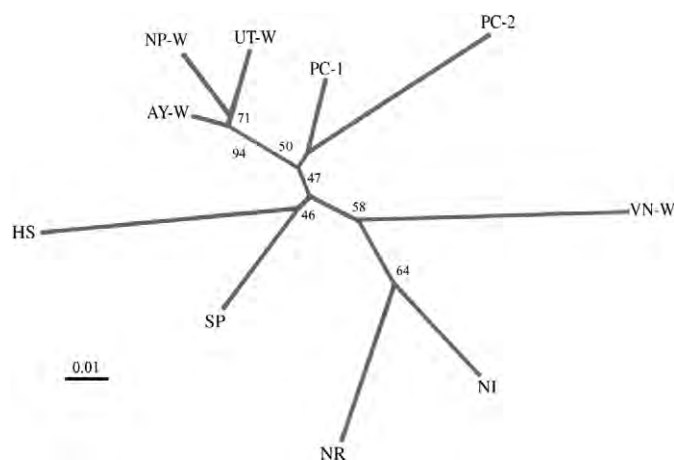


Fig. 2. A phylogenetic dendrogram of hatchery and wild populations of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in Thailand. VN-W is a population from Mekong River in Vietnam of which data were provided by Ha et al. (2009). Population abbreviation as in Table 1.

Table 4
The number of individuals from each population assigned as first rank (%-1st rank) to a base population (AY-W, UT-W, NP-W and Vietnam) and number of individuals assigned to the base population with a score exceeding 90% (% score > 90%).

population	%1st rank				%1st rank and score > 90%			
	AY-W	UT-W	NP-W	Vietnam ^a	AY-W	UT-W	NP-W	Vietnam ^a
PC 1	66.33	5.30	28.36	0.01	35.00	5.00	5.00	0
PC 2	33.05	40.25	26.63	0.03	5.00	25.00	12.50	0
SP	42.82	18.02	39.17	0.00	30.00	4.00	24.00	0
NI	48.41	38.12	13.45	0.02	21.74	8.69	4.35	0
NR	1.83	56.14	41.95	0.08	0	42.85	12.50	0
HS	19.29	65.45	15.20	0.06	9.80	33.33	5.88	0

^a Data obtained from Ha et al. (2009).

2007). Although the presence of a relationship between levels of genetic variation at neutral loci and traits is still controversial [e.g., a positive correlation between average heterozygosity and resistance to increased salinity in the guppy, *Poecilia reticulata* (Shikano and Taniguchi, 2002); a positive correlation between heterozygosity, allelic distance (square of the difference of the number of repeat units), and fecundity and gonosomatic index, but not with other traits in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Heath et al., 2002); lack of correlation between genetic variation and IHNV titers and survival of rainbow trout (Overturf et al., 2003), etc.], high genetic variation at neutral loci likely favors high variation of genes controlling traits.

In this study we used a genetic variation of wild stocks derived from the same primer sets (e.g., AY-W, UT-W, NP-W, and those from Ha et al., 2009) as references to avoid a possible artifact of using primers developed from other species (which leads to reduction of polymorphism of primers; Ellegren et al., 1995; see details in Ha et al., 2009). As such, we observed greater genetic variation (especially allele diversity) in NR and, to a lesser extent, in SP compared to the wild populations ($A_r = 4.9$ – 5.9 in Thai populations, present study; 4.54 – 5.06 in Vietnam populations, Ha et al., 2009), while the remaining populations (except PC 2 which showed low genetic variation) showed a similar level of genetic variation with those of wild stocks.

Although long domestication history always is negatively related to the average numbers of alleles per locus (e.g., Agnès et al., 1995; Coughlan et al., 1998; Sekino et al., 2002; Kohlmann et al., 2005; Aho et al., 2006; Appleyard and Ward, 2006; Luan et al., 2006), theoretically genetic variation, especially allele diversity, may be retained by using a large number of contributing broodstock (N_e) (Falconer and Mackay, 1996; Allendorf and Luikart, 2007). In reality, it is likely that all of these hatchery stocks were founded with a small N_e due to the high fecundity of striped catfish female (e.g., 170,000–2,575,000 eggs/female, Sidthimong and Pinyoying, 1968); thus, a sufficient number of fingerlings could be obtained from a few females. Moreover, a skewed sex ratio (2–5 males/female, Boonbrahm et al., 1967; Sidthimong and Pinyoying, 1968) of brooders used for artificial breeding results in the further reduction of N_e (Falconer and Mackay, 1996). Therefore, the capacity for retaining allele diversity (or even increasing it, as in the cases of NR and SP) relative to the wild populations was more likely due to the introduction of genetically distinct stocks, which was confirmed by the farms' records, except for the case of HS. Moreover, our results revealed that incorporating genetically distinct stocks (e.g., Mekong stocks) into domesticated stocks resulted in increased allele diversity (e.g., SP and NR). The introduction of genetically distinct stock(s) may have occurred recently (or repeatedly) in NR, as indicated by the severe excess of homozygotes (see previous discussion) and genetic disequilibrium, while the latter was not observed for SP. Reintroduction of wild stocks to elevate genetic variation is an acceptable practice for broodstock management (Schonhuth et al., 2003), although drawbacks of the domestication process were expected [e.g., resuming aggressive behavior of

offspring after mating wild males with an inbred strain of ayu, *Plecoglossus altivelis* (Iguchi and Mogi, 2007)]. Furthermore, introduction of a non-founder wild population, which occurred for NR and SP, could lead to the loss of genetic integrity and compromised local adaptability of the stock. The assignment test results revealed the possible introduction from other stocks (hatchery or wild) in hatcheries, although such introductions were not recorded in the farms' records; this issue will be discussed in a later section.

4.2. Lack of genetic differentiation between hatchery and wild populations

Generally, genetic alterations that occur in domesticated stocks due to genetic drift, inbreeding, and selection are relatively unavoidable, and effects such as genetic differentiation between wild and hatchery stocks is common provided sufficient time for domestication has elapsed (e.g., common carp, *C. carpio*, Kohlmann et al., 2005; Atlantic salmon, *Salmo salar*, Skaala et al., 2005; channel catfish, *Ictalurus punctatus*, Simmons et al., 2006). Unlike the Vietnamese stocks of striped catfish, for which hatchery and wild stocks were genetically homogenous due to a short domestication history (Ha et al., 2009), the hatchery stocks of Chaophraya striped catfish have experienced a long domestication history. Thus, the genetic homogeneity between wild and hatchery stocks observed in the present study was unexpected. Despite limited documentation, the Chaophraya River and its tributaries and the Mekong River seem to have been invaded by a large number of aquaculture escapees of Chaophraya River origin (Naruepol Sukumasavin, pers. comm.) as well as by released hatchery-produced striped catfish (Nakhonsawan Fisheries Station, 1982; Chainat Inland Fisheries Development Center, 2003; Nakhonsawan Inland Fisheries Development Center, 2004; Uthathani Inland Fisheries Station, 2005). As such, extensive introgression of hatchery fish genomes into wild stocks may have occurred and compromised the genetic differentiation between wild and either local hatchery stocks [e.g., a reduction of genetic differentiation among hatchery and wild stock of brown trout (*Salmo trutta*) in the stocked Skjern River, Denmark (Hansen, 2002)] or translocated stocks [e.g., a significant and negative correlation between numbers of coho salmon (*Oncorhynchus kisuth*) transferred among rivers and pairwise genetic differentiation between rivers in the Puget Sound area, Washington, USA (Eldridge and Naish, 2007)]. In addition, the introduction of wild fish into the hatcheries enhanced the degree of genetic homogeneity between the two groups (e.g., Ryman and Laikre, 1990; Waples and Do, 1994; Cagigas et al., 1999; Schonhuth et al., 2003). Nevertheless, owing to small number of microsatellite loci used, their high polymorphism (O'Connell and Wright, 1997) and relatively small sample size, Type II error (failure to detect existing difference) may have occurred. In our study, the allelic diversity of the wild stocks was unexpectedly low compared with the average for freshwater fishes ($A = 9.1 \pm 6.1$ averaged across 13 species, De Woody and Avise, 2000) and for striped catfish populations in the Cambodian Mekong River based on different primer sets ($A_r = 7.9$ – 10.4 ; sample size = 47.0–59.9; So et al., 2006a). Nevertheless, it was commensurate with those of the Cambodian Mekong population based on the same primer sets ($A = 4.80$ – 6.20 ; $A_r = 4.54$ – 5.06 ; $A_e = 2.86$ – 3.20 ; $H_o = 0.62$ – 0.65 ; $H_e = 0.62$ – 0.64 , Ha et al., 2009). Although we assumed that the use of heterologous primer sets was responsible for the relatively low genetic variation found in this study, it is also possible that low genetic variation of the wild populations may be partly attributable to other factors (e.g., introgression with the restocked hatchery populations and/or aquaculture escapees and decline of N_e due to overexploitation and habitat alteration).

It is noteworthy that the wild populations showed a certain level of genetic integrity, as shown by the clustering of the wild populations into one group. A clustering of a Mekong River population

(NP-W) with other populations from the Chaophraya River was not unexpected because, although they currently are disconnected, the Chaophraya and Mekong Rivers once were connected by an ancient course way (Kottelat, 1989); this explains the similarity of aquatic fauna in these two river systems (e.g., *Clarias batrachus*, Attha-insi et al., 2001; *C. macrocephalus*, Na-Nakorn et al., 2004). Notably, the recent bottleneck observed in wild populations was presumably caused by an artifact of small sample size (Cornuet and Luikart, 1997).

4.3. Loss of genetic integrity of Chaophraya local populations

The assignment of wild individuals to populations other than their own suggested that the power of the assignment was relatively low; this may be due to the limited number of loci used in this study. However, when only the assignments with scores exceeding 90% were considered, no incorrect assignment occurred among the wild populations. Therefore, we used this 90% criterion for our interpretation of the data.

It was clear that all local hatchery populations were contaminated with wild Thai Mekong populations regardless of population history, but they were not all contaminated by the Vietnam population. The proportion of NP-W found in the hatchery populations agreed well with the history of most populations; a remarkable proportion of NP-W was observed in SP and NR into which NP-W fish were intentionally introduced as broodstock; the proportion was low in hatcheries without such a record of introduction (NI and HS). However, the assignment tests revealed a possible mislabeling of PC 1 and PC 2: PC 1, which was recorded as a purely introduced Mekong population, contained only 5% NP-W, whereas PC 2, which was supposed to be of pure Chaophraya origin, contained as high a proportion of NP-W as NR. Furthermore, the data also suggested that interbreeding of PC 1 and PC 2 occurred, as indicated by their clustering into a group. We surmised that unnoticeable introduction of NP-W stocks may have occurred in the hatcheries without records of such an introduction, presumably by recruitment of introgressed stocks from other hatcheries.

4.4. Implications for broodstock management

Genetic introgression from the Mekong gene pool (NP-W) into Chaophraya hatchery stocks is of great concern because it may have detrimental effects [e.g., compromise performance of local stocks due to outbreeding depression (e.g., reduced fitness of crossbred large mouth bass, *Micropterus salmoides*, Cooke and Philipp, 2005; Edmands, 1999; also see reviews by Bentzen and Thodesen, 2005; Bekkevold et al., 2006 and McClelland and Naish, 2007)] and adversely impact wild Chaophraya stocks. Furthermore, domestication of the Chaophraya stocks, although it occurred without artificial selection, may have had positive impacts on certain traits, as has been demonstrated in many aquatic species [e.g., improvement of economically important traits such as reproduction success of domesticated Nile tilapia (Osure and Phelps, 2006); fillet yield of Eurasian perch, *Perca fluviatilis*, (Mairesse et al., 2007); maturation and weight gain of brown tiger shrimp, *Penaeus esculentus* (Keys and Crocos, 2006), and feed efficiency and energy allocation of coho salmon (Neely et al., 2008)]. As such, the genetic integrity of relatively pure Chaophraya stocks (HS, NI, and PC 1) should be maintained.

Nevertheless, despite the relatively high allelic richness of HS, NI, and PC1 ($A_r = 5.1 \pm 1.7$ – 6.1 ± 0.9), the low effective number of allele per locus (A_e) in these populations ($A_e = 3.9 \pm 1.5$ – 4.1 ± 1.0) indicated the great possibility of allele loss in succeeding generations unless large population sizes are used [e.g., 45–50 (Tave, 1993); >100 for salmonids (Gjerde, 1993; Jøstad and Nævdal, 1996)]. In addition, the presence of private alleles in a wild Chaophraya population (Pg-

13.239* and Pg-14.285* in UT-W; data not shown) suggested the possibility of increasing allele diversity by reintroduction of UT-W.

Due to the increasing value of striped catfish aquaculture, genetic techniques should be applied to improve economically useful traits [e.g., 12–20% improved growth rate from 1 to 2 generations of selection in channel catfish (*I. punctatus*) (Dunham and Smitherman, 1983; Bondari, 1983), 20–30% improved growth rate from three generations in channel catfish (Rezki et al., 2003), 12–17% improved growth rate per generation in Nile tilapia (Eknath et al., 2007); 25% and 3.6–18.4% improvement of growth and resistance to Taura syndrome virus of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Argue et al., 2002), 8.4% and 26.86% length and weight gain after seven generations of selection in *Fenneropenaeus chinensis* (Wang and Wang, 2005)]. Therefore, it is urgent to evaluate the performances of striped catfish stocks in terms of important commercial traits such as growth, disease resistance, and fillet ratio so that these stocks can be efficiently exploited as genetic resources for genetic improvement.

Good broodstock management practices, such as using large N_e , minimizing variance of family size, using single pair mating, and maintaining genetic integrity of stocks, should be practiced by farmers. Precise records and tagging of broodstock should be promoted to avoid unintentional mismanagement (e.g., the unintentionally mixing of PC 1 and PC 2).

Acknowledgements

This study was supported by a grant from the Thailand Research Fund awarded to Uthairat Na-Nakorn under the Senior Research Scholar Program 2007 (project RTA 5080013). We thank Jitraporn Fongisara for technical assistance and Ha Phouc Hung for permission to use the data for the wild striped catfish population in Vietnam. We are grateful to the farmers for their permission to take fin-clip samples from their valuable broodstock.

References

- Agnès, J.F., Otémeé, Z.J., Gilles, S., 1995. Effects of domestication on genetic variability, fertility, survival and growth rate in a tropical siluriform: *Heterobranchius longifilis* Valenciennes 1840. *Aquaculture* 131, 197–204.
- Aho, T., Rönn, J., Piironen, J., Björklund, M., 2006. Impacts of effective population size on genetic diversity in hatchery reared brown trout (*Salmo trutta* L.) populations. *Aquaculture* 253, 244–248.
- Allendorf, F.W., Phelps, S.R., 1980. Loss of genetic variation in a hatchery stock of cutthroat trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* 109, 537–543.
- Allendorf, F.W., Luikart, G., 2007. Conservation and the Genetics of Populations. Blackwell Publishing, MA, USA.
- Appleyard, S.A., Ward, R.D., 2006. Genetic diversity and effective population size in mass selection lines of Pacific oyster. *Aquaculture* 254, 148–159.
- Archie, J.W., 1985. Statistical analysis of heterozygosity data: independent sample comparisons. *Evolution* 39, 623–637.
- 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.
- Attha-ansi, A., Na-Nakorn, U., Ngamwongchon, S., Pichitkul, P., 2001. Genetic Diversity of *Clarias batrachus* in Thailand. Proceedings of The 39th Kasetsart University Conference, Fisheries Section, Bangkok, pp. 113–120. In Thai.
- Barua, S., Alam, M.S., Khan, Md.M., Simonsen, V., 2004. Genetic variation in four hatchery population of Thai Pangas, *Pangasius hypophthalmus* of Mymensingh region in Bangladesh using allozyme marker. *Pakis. J. Biol. Sci.* 7 (2), 144–149.
- Bekkevold, D., Hansen, M.M., Nielsen, E.E., 2006. Genetic impact of gadoid culture on wild fish populations: predictions, lessons from salmonids, and possibilities for minimizing adverse effects. *ICES J. Mar. Sci.* 63, 198–208.
- Bentzen, H.B., Thodesen, J., 2005. Genetic interactions between farmed and wild fish, with examples from the Atlantic salmon case in Norway. In: Gjedrem, T. (Ed.), *Selection and Breeding Programs in Aquaculture*. Springer, Netherlands, pp. 319–334.
- Bondari, K., 1983. Response to bidirectional selection for body weight in channel catfish. *Aquaculture* 33, 73–81.
- Boonbrahm, M., Tarnchananukit, W., Chuapoehek, W., 1967. Induced spawning of pond-reared Pla Sawai, *Pangasius pangasius* (Hamilton) by pituitary hormone injections. *Thai Fish. Gazet.* 20 (3), 337–358.
- Brummett, R.E., Angoni, D.E., Pouomogne, V., 2004. On-farm and on-station comparison of wild and domesticated Cameroonian populations of *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 242, 157–164.
- Cagigas, M.E., Vazquez, E., Blanco, G., Sanchez, J.A., 1999. Genetic effects of introduced hatchery stocks on indigenous brown trout (*Salmo trutta* L.) populations in Spain. *Ecol. Freshw. Fish* 8, 141–150.
- Cavalli-Sforza, L.L., Edwards, A.W., 1967. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *Am. J. Hum. Genet.* 19, 233–257.
- Chainat Inland Fisheries Development Center, 2003. Annual Report 1996–2000. Freshwater Fisheries Division, Department of Fisheries. Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok.
- Cooke, S.J., Philipp, D.P., 2005. Influence of local adaptation and interstock hybridization on the cardiovascular performance of largemouth bass *Micropterus salmoides*. *J. Exp. Biol.* 208, 2055–2062.
- Cornuet, J.M., Luikart, G., 1997. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144, 2001–2014.
- Cornuet, J.M., Piry, S., Luikart, G., Estoup, A., Solignac, M., 1999. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics* 153, 1989–2000.
- Coughlan, J.P., Imsland, A.K., Galvin, P.T., Fitzgerald, R.D., Naevdal, G., Cross, T.F., 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.
- De Woody, J.A., Avise, J.C., 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *J. Fish Biol.* 56, 461–473.
- Doyle, R.W., 1983. An approach to the quantitative analysis of domestication selection in aquaculture. *Aquaculture* 33, 167–185.
- Dunham, R.A., Smitherman, R.O., 1983. Response to selection and realized heritability for body weight in three strains of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, grown in earthen ponds. *Aquaculture* 33, 89–96.
- Edmunds, S., 1999. Heterosis and outbreeding depression in interpopulation crosses spanning a wide range of divergence. *Evolution* 53, 1757–1768.
- Eknath, A.E., Bentsen, H.B., Ponzone, R.W., Rye, M., Nguyen, N.H., Thodesen, J., Gjerd, B., 2007. Genetic improvement of farmed tilapia: composition and genetic parameters of a synthetic base population of *Oreochromis niloticus* for selective breeding. *Aquaculture* 273, 1–14.
- Eldridge, W.H., Naish, K.A., 2007. Long-term effects of translocation and release numbers of fine-scale population structure among coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Mol. Ecol.* 16, 2407–2421.
- Ellegren, H., Primmer, C.R., Sheldon, B.C., 1995. Microsatellite evolution: directionality or bias. *Nature Genetics* 11, 360–362.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479–491.
- FAO, 2006. Fishstat Plus Version 2.30. <http://www.fao.org/fi/statist/FISHTPLUS.asp>. April 10, 2009. Available source.
- Falconer, D.S., Mackay, T.F.C., 1996. Introduction to Quantitative Genetics. Longman, Essex.
- Felsenstein, J., 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.5 c. Distributed by the author. Department of Genetic, University of Washington, Seattle, USA.
- Gjerde, B., 1993. Breeding and selection. In: Heen, K., Monahan, R.L., Utter, F. (Eds.), *Salmon Aquaculture*. Fishing News Books, Cambridge USA, pp. 187–208.
- Goudet, J., 1995. FSTAT (ver. 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J. Heredity* 86, 485–486.
- Goudet, J., 2002. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.1). Available from <http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html>.
- Grobler, J.P., Hoffman, L.C., Prinsloo, J.F., 1997. A comparison of allozyme heterozygosity and life history variables in four strains of African catfish (*Clarias gariepinus*). *South Afr. J. Aquat. Sci.* 23 (1), 31–41.
- Guo, S.W., Thompson, E.A., 1992. Performing the exact test of Hardy–Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48, 361–372.
- Ha, H.P., 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. *Aquacult. Asia Mag.* 4, 23–25.
- Ha, H.P., Nguyen, T.T.T., Poompuang, S., Na-Nakorn, U., 2009. Microsatellites revealed no genetic differentiation between hatchery and contemporary wild populations of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage 1878) in Vietnam. *Aquaculture*. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.03.017.
- Hansen, M.M., 2002. Estimating the long-term effects of stocking domesticated trout into wild brown trout (*Salmo trutta*) populations: an approach using microsatellite DNA analysis of historical and contemporary samples. *Mol. Ecol.* 11, 1003–1015.
- Hau, N.P., 2008. Sustainable Development of Pangasius Farming: View of the Producers. The 1st Pangasius Aquaculture Dialogue Workshop in Hochiminh City. 11 March 2008. Viet Nam Association of Seafood Exporters and Producers (VASEP). <http://www.worldwildlife.org/what/globalmarkets/aquaculture>.
- Heath, D.D., Bryden, C.A., Shrimpton, J.M., Iwama, G.K., Kelly, J., Heath, J.W., 2002. Relationship between heterozygosity, allelic distance (dz), and reproduction traits in Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59, 77–84.
- Hedrick, P.W., 1999. Genetics of Population, 2nd ed. Jones and Bartlett Publisher, Sudbury, Massachusetts.
- Iguchi, K., Mogi, M., 2007. Effect of introducing wild paternity on stock performance of hatchery-reared ayu. *Fish. Sci.* 73, 845–850.
- Jøstad, K.E., Nævdal, G., 1996. Breeding and genetics. In: Pennel, W., Barton, B.A. (Eds.), *Principles of Salmonid Culture*. Elsevier, Amsterdam, pp. 655–725.
- Keys, S.J., Crocos, P.J., 2006. Domestication, growth and reproductive performance of wild, pond and tank-reared brown tiger shrimp *Penaeus esculentus*. *Aquaculture* 257, 232–240.

- Kohlmann, K., Kersten, P., Flajshans, M., 2005. Microsatellite-based genetic variability and differentiation of domesticated, wild and feral common carp (*Cyprinus caprio* L.) populations. *Aquaculture* 247, 253–266.
- Kottelat, M., 1989. Zoogeography of The Fishes from Indochinese Inland Waters with An Annotated Check-list. Bulletin Zoologisch Museum, Universiteit Van Amsterdam. Vol.12, No.1, 56 pp.
- Luan, S., Kong, J., Wang, Q.Y., 2006. Genetic variation of wild and cultured populations of the Kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* (Bate 1888) using microsatellites. *Aquac. Res.* 37, 785–793.
- Mairesse, G., Thomas, M., Gardeur, J.-N., Brun-Bellut, J., 2007. Effects of dietary factors, stocking biomass and domestication on the nutritional and technological quality of the Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *Aquaculture* 262, 86–94.
- McClelland, E.K., Naish, K.A., 2007. What is the fitness outcome of crossing unrelated fish populations? A meta-analysis and an evaluation of future research directions. *Conserv. Genet.* 8, 397–416.
- Meejui, O., Sukmanomon, S., Na-Nakorn, U., 2005. Allozyme revealed substantial genetic diversity between hatchery stocks of Siamese fighting fish, *Betta splendens* in the province of Nakornpathom, Thailand. *Aquaculture* 250, 110–119.
- Na-Nakorn, U., Kamonrat, W., Ngamsiri, T., 2004. Genetic diversity of walking catfish, *Clarias macrocephalus*, in Thailand and evidence of genetic introgression from introduced farmed *C. gariepinus*. *Aquaculture* 240, 145–163.
- Na-Nakorn, U., Sriphairoj, K., Sukmanomon, S., Poompuang, S., Kamonrat, W., 2006. Polymorphic microsatellite from DNA of the endangered Mekong giant catfish, *Pangasianodon gigas* (Chevey) and cross-species amplification in three species of *Pangasius*. *Mol. Ecol. Notes* 6, 1174–1176.
- Nakornsawan Fisheries Station, 1982. Annual Report 1982. Inland Fisheries Division, Department of Fisheries. Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok.
- Nakhonsawan Inland Fisheries Development Center, 2004. Annual Report 2003. Inland Fisheries Division, Department of Fisheries. Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok.
- Neely, K.G., Myers, J.M., Hard, J.J., Shearer, K.D., 2008. Comparison of growth, feed intake, and nutrient efficiency in a selected strain of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and its source stock. *Aquaculture* 283, 134–140.
- Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, 2009. Genetics and biodiversity: Expert Meeting on the Use & Exchange of Aquatic Genetic Resources Relevant for Food and Agriculture. Available at <http://www.enaca.org/modules/news/article.php?storyid=1820>, Down load on 11 April, 2009.
- O'Connell, M., Wright, J.M., 1997. Microsatellite DNA in fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.* 7, 331–363.
- Osore, G.O., Phelps, R.P., 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.
- Overturf, K., Casten, M.T., LaPatra, S.L., Rexroad III, C., Hardy, R.W., 2003. Comparison of growth performance, immunological response and genetic diversity of five strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 217, 93–106.
- Rannala, B., Mountain, J.L., 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9197–9221.
- Raymond, M., Rousset, F., 2003. Genepop 3.4., an updated version of Genepop V.1.2 (1995): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 86, 248–249.
- Rezk, M.A., Smitherman, R.O., Williams, J.C., Nichols, A., Kucuktas, H., Dunhama, 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 statistical tests. *Evolution* 43, 223–225.
- Ryman, N., Laikre, L., 1990. Effects of supportive breeding on the genetically effective population size. *Conserv. Biol.* 5, 325–329.
- Schneider, S., Roessli, D., Excoffier, L., 2000. ARLEQUIN Version 2.000. A Software For Population Genetics Data Analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Schönhuth, S., Luikart, G., Doadrio, I., 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., Hara, M., Taniguchi, N., 2002. Genetic diversity within and between hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* assessed by means of microsatellite and mitochondrial DNA sequencing analysis. *Aquaculture* 213, 101–122.
- Shikano, T., Taniguchi, N., 2002. Relationships between genetic variation measured by microsatellite DNA markers and a fitness-related trait in guppy (*Poecilia reticulata*). *Aquaculture* 209, 77–90.
- Sidthimongk, A., Pinyoying, S., 1968. Induced Spawning of Pla sawai, *Pangasius sutchi* by the application of pituitary hormone treatment. Technical Report No. 5 (September, 1968), Inland Fisheries Division, Department of Fisheries, Bangkok.
- 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* 252, 133–146.
- Skaala, Ø., Taggart, J.B., Gunnes, K., 2005. Genetic differences between five major domesticated strains of Atlantic salmon and wild salmon. *J. Fish Biol.* 67, 118–128.
- So, N., Van Houdt, J.K.J., Volckaert, F.A.M., 2006a. Genetic diversity and population history of the migratory catfishes *Pangasianodon hypophthalmus* and *Pangasius bocourti* in the Cambodian Mekong River. *Fish. Sci.* 72, 469–476.
- So, N., Maes, G.E., Volckaert, F.A.M., 2006b. High genetic diversity in cryptic stocks of the migratory striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus* in the Mekong River. *Heredity* 96, 166–174.
- Taggart, J.B., Hynes, R.A., Prodöhl, P.A., Ferguson, A., 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *J. Fish Biol.* 40, 963–965.
- Tave, D., 1993. Genetics for Fish Hatchery Managers, second ed. Van Nostrand-Reinhold, New York.
- Uthaitani Inland Fisheries Station, 2005. Annual Report 2005. Inland Fisheries Research and Development Bureau. Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok.
- Van der Bank, F.H., Grobler, J.P., du Preez, H.H., 1992. A comparative biochemical genetic study of three populations of domesticated and wild African catfish (*Clarias gariepinus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 101B (3), 387–390.
- Wachirachaiarn, A., Rungsin, W., Srisapoome, P., Na-Nakorn, U., 2009. Crossing of African catfish (*Clarias gariepinus*) strains based on strain selection using genetic diversity data. *Aquaculture* 290, 53–60.
- Wang, Q.Y., Wang, Q., 2005. Recent trends in China's aquaculture industry. *Aquac. Asia Pacific* 1, 18–20.
- Waples, R.S., Do, C., 1994. Genetic risk associated with supplementation of Pacific salmonids: captive broodstock programs. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 51 (Suppl.), 310–329.
- Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T., Ye, Z.H., Mao, J.X., 1997. POPGENE, the User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis. University of Alberta, Canada, Molecular Biology and Biotechnology Centre.

Spatial and Temporal Genetic Variation of Green Mussel, *Perna viridis* in the Gulf of Thailand and Implication for Aquaculture

Warangkana Prakoon · Suriyan Tunkijjanukij ·
Thuy T. T. Nguyen · Uthairat Na-Nakorn

Received: 17 February 2009 / Accepted: 2 October 2009
© Springer Science + Business Media, LLC 2009

Abstract The culture of green mussel (*Perna viridis*) in the Gulf of Thailand depends on natural spat which are believed to come from spawning grounds adjacent to major river mouths. In the present paper, genetic diversity of spatial and temporal populations of green mussel in the Gulf of Thailand was investigated using five microsatellite loci. The results showed moderate genetic variation of all 11 populations (averaged number of alleles per locus, $A=10.4$ – 12.2 ; effective number of alleles per locus, $A_e=5.36$ – 6.59 ; mean allelic richness, $A_r=10.23$ – 12.06 ; observed heterozygosity, $H_o=0.52$ – 0.63 , and expected heterozygosity, $H_e=0.66$ – 0.73) without significant differences among populations. No sign of bottleneck or genetic disequilibrium was observed. Genetic differentiation among spatial populations was low

($F_{ST}=0.0046$, $CI_{0.95}=0.0020$ – 0.0083 for the samples collected in January, 2007, and $F_{ST}=0.0088$, $CI_{0.95}=0.0010$ – 0.0162 for the samples collected in July, 2007) while temporal variation was significant as revealed by the analysis of molecular variance. Multidimensional scaling separated temporal population groups with minor exception. The assignment test revealed that most of the recruits were from other populations.

Keywords Genetic diversity · *Perna viridis* · Temporal variation

Introduction

The bivalves *Perna viridis* which is often referred to as the green mussel, occurs naturally in Asian coastal waters from across the Indo-Pacific encompassing the Persian Gulf, India, Malaysia, Papua New Guinea, and the South Pacific islands and to the north to Japan (Benson et al. 2001). The green mussel has been attracting a lot of attention as a potential organism for commercial aquaculture (Parulekar et al. 1982; Hickman 1992; Rajagopal et al. 1998), due to its fast growing characteristics and relatively high level of tolerance to many environmental factors. Aquaculture of green mussel is rapidly expanding, with only 69,000 tonnes produced in 1995 and reaching more than 300,000 tonnes in 2006 (FAO 2006).

In Thailand, green mussel is known to occur in six main river mouths which drain into the Gulf of Thailand, namely Chao Phraya River (CY) in Bangkok, Bangpakong River (BK) in Chacheongsao, Tachin River (TC) in Samut Sakorn, Meklong River (MK) in Samut Songkhram and Tapi River (TP) in Surat Thani Province (Fig. 1). Aquaculture of green mussel in Thailand dates back to 1950s, and currently,

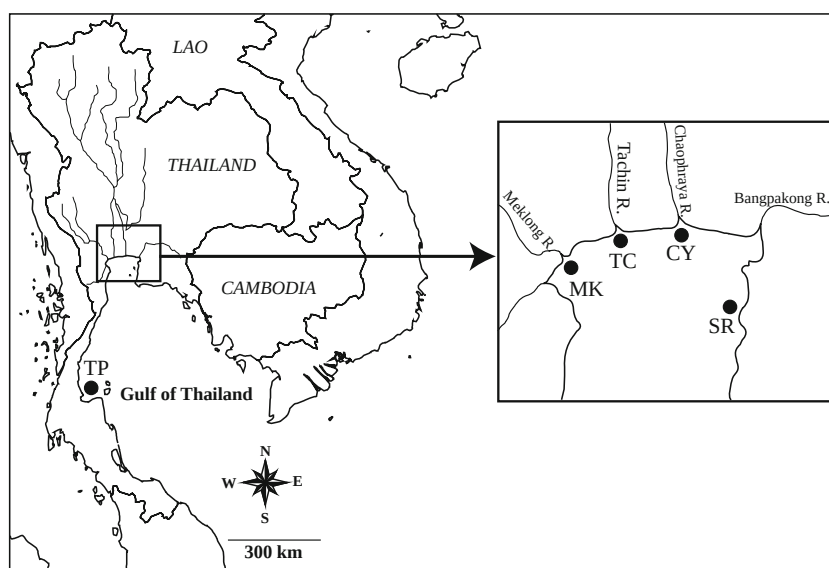
W. Prakoon
Department of Aquaculture, Graduate School,
Kasetsart University,
Chatujak,
Bangkok 10900, Thailand

U. Na-Nakorn (✉)
Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries,
Kasetsart University,
Chatujak,
Bangkok 10900, Thailand
e-mail: ffishum@ku.ac.th

S. Tunkijjanukij
Department of Marine Science, Faculty of Fisheries,
Kasetsart University,
Chatujak,
Bangkok 10900, Thailand

T. T. T. Nguyen
Network of Aquaculture Centres in Asia Pacific,
Kasetsart University Campus,
Chatujak,
Bangkok 10900, Thailand

Fig. 1 A map of the Gulf of Thailand showing sampling locations of green mussel; population abbreviation as in Table 1



green mussel farming focuses in only several areas such as Sriracha Bay in Chonburi, Klongdan, in Samut Prakarn, and Bandon Bay in Surat Thani Province (Intharachart and Ploypradup 2002). Mussel culture in Thailand relies entirely on the collection of natural spat using ropes or poles. The majority of farms use local spat for culture while approximately a half of the spat cultured in Surat Thani Province were transplanted from local populations in the upper gulf (Wangvoralak et al. 2006). The green mussel culture produced about 257,087 tonnes (FAO 2006), accounting for more than 90% of world green mussel production. Although green mussel tolerates a wide range of environmental parameters (Rajagopal et al. 2006), decreasing salinity during rainy season often caused mass mortality of mussel (Sivalingam 1977; AQUACOP and de Gaillande 1979; Coeroli et al. 1984). This often occurred in the upper gulf of Thailand (Sriraja Fisheries Station Undate), and the experimental result showed 100% mortality of green mussel exposed to low salinity (5 and 10 ppt.) within 72 h (Raochai 2004). The annual occurrence of mass mortality and heavy exploitation of green mussel raise concern on losing genetic variation due to a reduction of effective population size.

Information on genetic diversity of green mussel is limited. A report based on allozyme showed high genetic variation of eight populations of green mussel along the coast of Peninsular Malaysia ($H_o=0.108\text{--}0.334$; $H_e=0.133\text{--}0.303$). Population structuring existed with moderate F_{ST} (0.149; Yap et al. 2002). Recently, microsatellite primers were developed from DNA of green mussel by Lin et al. (2007), and five of them were used in this study. Microsatellite markers were popular for their highly polymorphic nature, neutrality, and requirement of only small amount of tissue samples (reviewed by O'Connell and Wright 1997).

The purposes of the present study were to assess status of populations of green mussel which may be depleted due to various causes, e.g. heavy exploitation and mass mortality, by looking at genetic variation within populations. We also would like to investigate if genetic differentiation exists among spatial and temporal populations. Finally, we expected to identify information on recruitment pattern of green mussel in the Gulf. The information obtained would contribute to a better understanding of green mussel resources and hence, benefit management of mussel culture activities in the Gulf of Thailand leading to sustainability.

Materials and Methods

Sampling Locations

Samples of green mussel, *P. viridis* were collected from five river mouths, four in the upper Gulf of Thailand and one from Tapi River mouth in southern Thailand and one major culture area in Sriracha Bay (SR; details for sampling localities are in Table 1 and Fig. 1). From each sampling site 40–50 adult green mussels were collected twice (except for Tapi River mouth), in January 2007 and July 2007, which represented the two main spawning seasons, the January samples representative of the young of July 2006 spawning season and the July 2007 samples that of October 2006. Although the samples were collected from mussel farms, the samples were from natural settlements on poles without any translocation. A small amount of adductor muscle was collected and preserved in 95% ethanol and kept at 4°C until required.

Table 1 Sampling localities of green mussel samples, latitude, and longitude, timing of collection, population abbreviation, and sample sizes

Localities	Latitude/ longitude	Population abbreviation	Collection time	Shell size (cm)	Sample sizes
Tapi River mouth, Surat Thani Province	9°16'35.45"N 99°25'00.12"E	TP-1	Jan. 2007	8–9	50
Meklong River mouth, Samut Songkhram Province	13°21'26.5"N 100°00'57.51"E	MK-1 MK-2	Jan. 2007 Jul. 2007	6–7 3–5	48 47
Tachin River mouth, Samut Sakorn Province	13°27'40.99"N 100°19'45.76"E	TC-1 TC-2	Jan. 2007 Jul. 2007	6–7 3–5	46 46
Chao Phraya River (CY) mouth, Samut Prakarn Province	13°28'54.93"N 100°32'39.95"E	CY-1 CY-2	Jan. 2007 Jul. 2007	7–8 1–3	41 50
Bangpakong River mouth, Chachoengsao Province	13°25'46.35"N 100°55'52.77"E	BK-1 BK-2	Jan. 2007 Jul. 2007	8–9 2–4	46 44
Sriraja Bay, Chon Buri Province	13°07'07.65"N 100°52'14.53"E	SR-1 SR-2	Jan. 2007 Jul. 2007	8–9 3–6	46 46

DNA Extraction and Amplification

For each sample, approximate 30 g of adductor muscle was digested with proteinase K, and DNA was extracted using the standard phenol–chloroform methods modified from Taggard et al. (1992). Then, the individual DNA sample was amplified in polymerase chain reactions primed by each of five primer pairs, AGM03, AGM05, AGM07, AGM09, and AGM12 developed from DNA of *P. viridis* by Lin et al. (2007). Each 10- μ l reaction contained 1 $\times$ PCR buffer, 1.5 mM dNTPs, 0.2 μ M forward and reverse primers, 0.5 Unit Taq polymerase, 25–30 ng DNA template and 2–2.5 mM MgCl₂. PCR profiles comprised of the following steps: 5 min at 94°C, 20 s at annealing temperature of 55–61°C, 2 min at 72°C, 35 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at each annealing temperature and 30 s at 72°C and 5 min at 72°C. PCR reactions were performed in PTC-100MP Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc). The PCR products were then electrophoresed on 4.5% polyacrylamide gel and stained with silver nitrate. Alleles were visualized after silver staining, and allele sizes were determined relative to M13 sequence ladder.

Data Analyses

Due to the concern that there are no apparent geographic barriers between the presumed populations of green mussel in the Gulf of Thailand and the high dispersal ability of the larvae, a model-based clustering method for inferring population structure was performed using the program STRUCTURE version 2.2 (Pritchard et al. 2000; burn-in and Markov chain Monte Carlo lengths of 10,000; $K=8$ for the January 2007 samples and $K=7$ for the July 2007 samples, and with each given K the mean likelihood was obtained over 20 runs). The best number of cluster, K was decided according to the ad hoc statistic ΔK based on the

rate of change in the log probability of data between the successive K values (Evano et al. 2005).

Each population was tested for conformation to Hardy–Weinberg equilibrium (HWE), and the linkage disequilibrium test was performed using Genepop version 3.4 (Raymond and Rousset 1995). However, the results showed departure of all but one population from HWE towards homozygote excess. Therefore, the program Micro-Checker version 2.2.3 (Oosterhout et al. 2004) was employed to test for the presence of null alleles which often cause homozygote excess. Then, allele frequencies were adjusted according to suggestion made by Micro-Checker.

A recent occurrence of bottleneck, significant reduction of effective population size, was tested using the program Bottleneck version 1.2.02 (Cornuet and Luikart 1997). Random association of genotypes (genetic disequilibrium) was tested using Genepop version 3.4 (Raymond and Rousset 1995), and the exact P value was estimated by Markov chain method (Dememorization, 1,000; batches, 100; iterations per batch, 1,000; Guo and Thompson 1992). Critical values were adjusted for multiple tests using sequential Bonferroni correction (Hochberg 1988; Rice 1989).

Genetic variation within populations were calculated using the program Popgene version 1.13 (Yeh et al. 1999) and FSTAT version 2.9.3.2 (Goudet 2001). Parameters such as mean number of alleles per locus (A), mean effective number of alleles per locus (A_e), allelic richness (average number of alleles per locus based on smallest sample size, A_r), observed heterozygosity per individual (H_o) and expected heterozygosity per individual (H_e).

To test for population structuring the F -statistics (F_{IS} , F_{IT} , and F_{ST}) were calculated using Arlequin version 3.01 (Excoffier et al. 2006). The analysis of molecular variance (AMOVA) was performed to quantify the variance between groups (temporal variation) and variance among popula-

tions within groups (spatial variation) using the program Arlequin version 3.01. Then, population differentiation was tested between each population pair using Genepop version 3.4. Pairwise F_{ST} between populations was calculated, and their significance was tested using Arlequin version 3.01 (Excoffier et al. 2006).

Cavalli-Sforza and Edwards (1967) chord distance was calculated between population pairs using PHYLIP version 3.63 (Felsenstein 1993). In order to evaluate correlation between genetic distance and geographic distance, Mantel's test was performed using TFGPA version 1.3 (Miller 1997).

To understand the overall genetic relationship of the populations the multidimensional scaling (MDS) was conducted based on genetic distance values facilitated by the program SYSTAT (Wilkinson et al. 1992). The UPGMA dendrogram was reconstructed based on the genetic distance matrix using the PHYLIP program package, version 3.67. Then, the reliability of the dendrogram was estimated by calculating bootstrapping values (1,000 replicates) facilitated by PHYLIP program package. The dendrogram was visualized in TreeView, version 1.6.6 (Page 1996).

Multilocus genotypes of individuals in each population collected in July 2007 were assigned to those of the populations collected in January 2007 using GeneClass2 (assignment threshold, 0.05; criteria for computation, Bayesian method of Rannala and Mountain 1997; resampling algorithm: Paetkau et al. 2004; minimum number of simulated individuals, 1,000; Piry et al. 2004).

Results

Cluster Analysis

The log probabilities $\ln P(X|K)$ associated with different numbers of genetic clusters K , based on the analyses of 277 individuals of green mussels collected in January 2007 showed the highest value at $K=7$ ($\ln P(X|K)=5002.27$), and ΔK was also highest at the same number of K ($\Delta K=4.864$). While the samples collected in July 2007 (a total of 233 individuals) showed highest $\ln P(X|K; -4275.23)$ and ΔK (2.406) at $K=3$. However, the clustering patterns were not clear for both analyses. Therefore, we performed further analyses based on the original grouping according to sampling sites.

Hardy–Weinberg Equilibrium, Bottleneck Tests, and Genotype Disequilibrium

Due to departure from Hardy–Weinberg equilibrium ($P<0.0009$, sequential Bonferroni correction) of the majority of populations, the data were tested for a presence of null

alleles. Null alleles were detected at five loci, at AGM03; AGM05 in ten of 11 populations (except for MK-1); at AGM07 in CP-1, BP-1, 2, and MK-2; at AGM09 and AGM12 in TC-1 and BK-2. However, after the data were adjusted according to the suggestion made by the program, the overall test results were still unchanged wherein ten of 11 populations (except for SR-2) did not conform to HWE towards homozygote excess. It was noteworthy that the locuswise tests revealed that only two loci, AGM03 (observed in three populations) and AGM05 (observed in eight populations) contributed to departure from HWE. In addition, there was no sign of recent bottleneck and genotypes disequilibrium (data not shown) in every population.

Genetic Variation Within Populations

The populations of green mussel in the Gulf of Thailand had moderate genetic variation (Table 2), and differences in parameters were not observed among populations (t test, $P>0.01/54$), and average number of alleles per locus ranged from 10.40 ± 5.86 to 12.20 ± 7.36 ; allelic richness ranged from 10.23 ± 5.68 to 12.06 ± 7.23 ; observed heterozygosity ranged from 0.52 ± 0.21 to 0.63 ± 0.18 and expected heterozygosity ranged from 0.66 ± 0.32 to 0.73 ± 0.27 . However, the average effective number of alleles/locus was relatively small (ranged from 5.36 ± 3.74 to 6.59 ± 4.49) due to a presence of alleles with low frequencies (data not shown).

Genetic Variation Between Populations

The overall population subdivision was revealed by the F_{ST} of 0.0095 (bootstrap $P_{0.95}=0.0043$ –0.0156). Likewise, F_{ST} among each temporal group of populations was statistically significant ($F_{ST}=0.0046$, $CI_{0.95}=0.0020$ –0.0083 for the samples collected in January 2007, and $F_{ST}=0.0088$, $CI_{0.95}=0.0010$ –0.0162 for the samples collected in July 2007).

The AMOVA showed that the variation between temporal groups accounted for 1.23% of total variation and was statistically significant ($P=0.00000$). Variation between populations within groups contributed the least (0.37%, $P=0.04203$) while the largest proportion of total variation (98.40%) occurred within populations ($P=0.00000$).

A majority of significantly different genetic tests occurred between temporal groups (15 of 30 pairs as detailed in Table 3), while the difference between populations within each group was minimal, one (BK-1 and SR-1) of 15 population pairs among samples collected in January, 2007 and three (TC-2 and BK-2, SR-2 and BK-2 and SR-2 and TC-2) among samples collected in July, 2007. Pairwise F_{ST} revealed significant differences between temporal

Table 2 Genetic diversity within populations of eleven populations of green mussel representing six populations collected from different localities and five populations representing temporal populations of five localities

Population	A	A_e	A_r	H_o	H_e
TP-1	11.20±6.76	5.92±4.68	10.77±6.51	0.52±0.22	0.66±0.32
MK-1	11.80±6.90	5.72±3.98	11.49±6.60	0.59±0.25	0.70±0.26
MK-2	11.60±6.70	5.82±3.51	11.35±6.42	0.57±0.19	0.73±0.26
TC-1	11.40±6.73	6.15±4.13	11.16±6.63	0.54±0.29	0.70±0.30
TC-2	11.60±6.80	5.86±4.40	11.38±6.63	0.59±0.22	0.70±0.30
CY-1	10.80±5.50	5.44±3.55	10.80±5.50	0.58±0.11	0.73±0.22
CY-2	12.00±7.04	6.35±4.77	11.62±6.69	0.63±0.18	0.72±0.25
BK-1	11.00±7.21	5.99±5.04	10.80±7.01	0.54±0.23	0.68±0.31
BK-2	12.20±7.36	6.59±4.49	12.06±7.23	0.58±0.27	0.73±0.27
SR-1	11.20±5.98	5.64±4.05	11.10±5.94	0.52±0.21	0.67±0.30
SR-2	10.40±5.86	5.36±3.74	10.23±5.68	0.62±0.23	0.70±0.28
Mean	11.38±0.53	5.90±0.37	11.16±0.50	0.57±0.04	0.70±0.02

Note: A mean number of alleles per locus, A_e effective number of alleles per locus, A_r allelic richness, H_o observed heterozygosity, H_e expected heterozygosity (population abbreviation as in Table 1). The t tests revealed no difference of each genetic variation parameter among populations ($P>0.01/54$, Bonferroni correction)

groups in eight population pairs, but differences were not observed within each temporal group based on pairwise F_{ST} . It should be noted that differences between temporal samples within a location were observed for TC (based on population differentiation test), BK (based on pairwise F_{ST}) and SR (based on both tests).

Genetic Distance and Multiple Dimensional Scaling

Genetic distance between populations within or between temporal groups fell in the same range (0.013–0.021 for January, 2007 samples; 0.015–0.032 for July, 2007 samples and 0.015–0.028 between populations collected at different times; Table 3). MDS (stress value=0.107; $R^2=0.889$; Fig. 2) separated populations into two groups almost entirely according to collection times except for two populations, TC-1 and MK-2, which were grouped with different temporal groups.

Correlation Between Genetic Distance and Geographic Distance

Mantel's test showed no correlation between genetic distance and geographic distance between populations of green mussel, correlation coefficient $r=0.1445$ ($P>0.05$) for samples collected in January 2007 and $r=0.4302$ ($P>0.05$) for samples collected in July 2007.

Population Assignment

In order to identify the most likely origins of population recruitment, Bayesian assignment was used to assign

individuals of each population collected in July 2007 to populations collected in January 2007 based on multilocus genotypes. The result is shown in Table 4 wherein self-recruitment was observed only for MK. The other four populations were likely recruited from other populations either nearby or far away.

Discussion

Heterozygote Deficiency of all but one Population

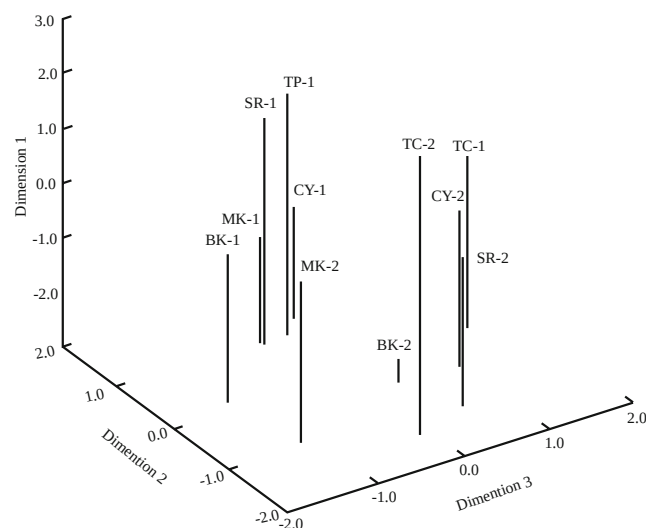
In general, departure from HWE towards homozygote excess may be explained by one or combinations of the following mechanisms; inbreeding, positive assortative mating, mixing of genetically distinct populations in a sample (Wahlund effect) and selection against heterozygotes or particular alleles (Falconer and Mackay 1996). In addition, presence of null allele, alleles that produce no PCR products, also cause heterozygote deficiency (O'Connell and Wright 1997). However, in marine bivalves, especially species with high dispersal ability, not all of these mechanisms are accounted for heterozygote deficits. In green mussel, inbreeding and positive assortative mating unlikely occurs because of broadcast mating and high dispersal ability of larvae (reviewed by Rajagopal et al. 2006). Furthermore, in the present study, a problem associated with null alleles has been fixed by adjusting allele frequencies as suggested by the MICRO-CHECKER program. Wahlund effect was not observed as indicated by absence of genotype disequilibrium (Falconer and Mackay 1996). Selection which was shown for allozymes in bivalves [e.g. at the leucine aminopeptidase

Table 3 Genetic distance, Cavalli-Sforza and Edward (1967) and pairwise F_{ST} between populations of green mussel in Thailand

Population	TP	MK-1	MK-2	TC-1	TC-2	CP-1	CP-2	BK-1	BK-2	SR-1	SR-2
TP		0.018	0.022	0.015	0.019	0.017	0.018	0.016	0.028	0.015	0.026
MK-1	0.00384		0.016	0.018	0.027	0.013	0.017	0.013	0.017	0.017	0.018
MK-2	0.02850	0.01092		0.021	0.020	0.017	0.017	0.017	0.022	0.020	0.017
TC-1	0.00959	-0.00069	0.00392		0.024	0.020	0.015	0.021	0.021	0.019	0.020
TC-2	0.01364 ^a	0.00986	-0.00157	0.00341		0.027	0.018	0.021	0.032	0.023	0.021
CP-1	0.00721	-0.00145	-0.00184	-0.00690	-0.00049		0.016	0.020	0.025	0.021	0.016
CP-2	0.01965	0.00175	-0.00468	0.00472	0.00216	-0.00128		0.021	0.021	0.020	0.015
BK-1	0.00535	0.00261	0.01031	0.00133	0.00239	0.00487	0.01128		0.022	0.019	0.020
BK-2	0.05433 ^a	0.02829 ^a	0.00757	0.00957	0.02171	0.01342	0.01575	0.02643 ^a		0.027	0.022
SR-1	-0.00589	-0.00419	0.01970	0.00501	0.00906	0.00353	0.01259	0.00380	0.04729 ^a		0.025
SR-2	0.04053 ^a	0.02173	-0.00337	0.01910	-0.00048	0.00691	0.00219	0.01815 ^a	0.02287	0.03045 ^a	

Cavalli-Sforza and Edward (1967; above diagonal) and pairwise F_{ST} between populations of green mussel in Thailand. A population pair with significant genetic differentiation ($P < 0.0009$, sequential Bonferroni correction) was marked by the italicized F_{ST} values

^a Denotes significant difference of pairwise F_{ST} , $P < 0.0009$, sequential Bonferroni correction

**Fig. 2** Multidimensional scaling based on genetic distance matrix of green mussel populations in Thailand; population abbreviation as in Table 1

locus in the blue mussel, *Mytilus edulis*, reviewed by Hellberg et al. (2002)], is also a possible explanation for the departure from HWE in the present study. Selection on neutral loci may occur through the linkage of the neutral loci with a locus under selection forces (Slatkin 1995), which, in this case, may be the environmental pollutants (see more details in following discussion). Alternatively, our results showed that the departure from HWE was relatively specific to loci with high number of alleles (e.g. AGM05 showed heterozygote deficiency in eight of 11 populations). Therefore, despite the fact that heterozygote deficit is common among bivalves (e.g. Ríos et al. 2002; Ravago-Gotanco et al. 2007; Cassista and Hart 2007; Diz and Presa 2008), we believed that heterozygote deficit in this study was partly due to insufficient sample size for the locus with high allele number.

Genetic Variation Within Populations

Despite heavy exploitation (e.g. >250,000 tonnes were harvested annually) and frequent mass mortality due to low salinity during the rainy season, substantial genetic variation within populations of green mussel in the Gulf of Thailand was still retained and was commensurate with those reported for green mussel in Singapore (based on 36 individuals scored at ten microsatellite loci; number of alleles/locus, $A=11.7$; observed heterozygosity, $H_o=0.65$; expected heterozygosity, $H_e=0.69$, Lin et al. 2007) and other wild populations of shellfishes of similar life history, e.g. *Mytilus galloprovincialis* ($A=11.9$, $H_e=0.77$, Diz and Presa 2008), oyster (*Crassostrea gigas*; $A=10.6$; $H_o=0.521$; Sekino et al. 2003), European oyster (*Ostrea edulis*; $A=$

Table 4 Results of Bayesian assignment of populations collected in July 2007 to base populations collected in January 2007

Assigning populations	Population of origin-1	Percentage (%)	Population of origin-2	Percentage (%)	Population of origin-3	Percentage (%)
MK-2	MK-1	98.01	BK-1	1.92	CY-1	0.08
TC-2	TP-1	99.00	BK-1	0.94		
CY-2	TC-1	99.18	CY-1	0.44	MK-1	0.38
BK-2	MK-1	100.00				
SR-2	CY-1	99.99				

14.92, $H_o=0.736$, Vercaemer et al. 2003), green abalone (*Haliotis fulgens*; $A=13.33$; $H_o=0.715$, Gutierrez-Gonzalez et al. 2007) and Japanese scallop (*Patinopecten yessoensis*) ($A=7.9$, $H_o=0.52$, $H_e=0.67$; Li et al. 2007). Therefore, despite lacking baseline data for genetic variation of green mussel in the area studied presently, a failure to detect bottleneck (significant reduction of effective population size) suggests that heavy exploitation and mass mortality did not cause genetic degradation of green mussels in the Gulf of Thailand. Our results agree with farmers' practice whereby the green mussels were harvested when about 8 months old (Intharachart and Ploypradup 2002) when first spawning already took place at about 2 months old (Niemsab 1975). Therefore, they already contributed genetic materials to the next generation prior to harvesting. Similarly, mass mortality due to low salinity had limited impacts on genetic variation. This may be explained by asynchronous occurrence of mass mortality in each area. As such, the depleted population(s) is recovered by the recruits from other areas. This explanation is supported by a report that recruitment of green mussel in the Gulf of Thailand was from other sources (Prakoon et al., present study) and also low genetic differentiation among spatial populations observed in this study.

The current genetic variation indicated substantial adaptive potential of green mussel populations in the Gulf of Thailand. Hence, this may ensure sustainability of green mussel culture provided that environmental factors are within the optimal range. In general, number of alleles per locus is more important than heterozygosity because high number of alleles allow better adaptability of populations to changing environment (Allendorf 1986; Allendorf and Luikart 2007). Furthermore, loss of allele diversity is hard to recover (theoretically two mechanisms are involved, genetic introgression from other populations and mutation which requires 10^4 generations to generate novel microsatellite allele in mammal, Frankham et al. 2002), while heterozygosity, although relates with effective population size (N_e), can be recovered if N_e increases in subsequent generations (Falconer and Mackay 1996). The relatively low effective number of alleles per locus indicated that there were many alleles with low frequencies and thus will easily become extinct if bottleneck occurs.

Population Structure

The model-based approach failed to re-cluster the samples, although a new number of populations was suggested. This was because of low level of population structuring indicated by low F_{ST} that compromised the power of this method (Pritchard et al. 2000).

Low level of genetic differentiation among spatial populations of green mussel in the Gulf of Thailand ($F_{ST}=0.0046$ and 0.0088 respective to January and July samples compared with the average of 0.062 reported for 57 marine species; Waple 1998) was in accordance with its early life history as planktonic larvae and the small geographic distance between populations. Although green mussel is a sedentary species, its larvae have lengthy planktonic stages (about 3 to 4 weeks, reviewed by Rajagopal et al. 2006), thus enhancing gene flow among local populations by dispersal of larvae triggered by sea currents. As such, like other marine invertebrates, population differentiation is minimal (e.g. lack or very low population structure of planktonic-developing gastropods, *Littorina scutulata* and *Littorina plena*, compared with that of the direct developed congeneric gastropods, *Littorina subrotundata*; Kyle and Boulding 2000; the same level of genetic differentiation of two species of coral possessing different reproductive modes and larval types but with equivalent larval dispersal (Miller and Ayre 2008)). Among the samples collected in January, only BK-1 and SR-1, only 22 km apart, showed substantial genetic differentiation. Such difference also occurred for the cohort collected in July and thus supported that genetic differentiation existed. The population assignment showed that BK-2 was recruited from MK-1 suggesting that genetic differentiation observed here was caused by differences of recruits rather than other causes, e.g. historic geographic event or limitation of current gene flow between adjacent populations (reviewed by Kyle and Boulding 2000) or post-settlement selection (Diz and Presa 2008). In addition, it is also possible that an active process affected by some factors (e.g. boundary-layer hydrodynamics and algal waterborne compounds, Dobretsov and Wahl 2008) have played a role in shaping the settlement pattern which may eventually lead to population differentiation.

It may also be possible that the seasonal sea currents, moving clockwise (during May–June) and counterclockwise (during Nov–Jan; NEDECO 1965 cited after Putikiatkajorn 1998) accounted for a lack of genetic differentiation between TP and the upper gulf's populations located more than 450 km apart. The study conducted on the scallop, *Mimachlamys senatoria* which is mostly sedentary with pelagic larvae, in the Gulf of Thailand showed significant genetic difference between a population collected from the upper gulf and one from Prachuab Kirikhan, 255 km apart (Na-Nakorn, unpublished data). Therefore, we surmise that the TC population may be of upper gulf origin and was transferred for aquaculture. This practice is common due to insufficient spat being available in Tapi River mouth (Wangvoralak et al. 2006).

It is likely that a genetic structure of green mussel was inconsistent with the stepping-stone genetic model, wherein genetic distance correlates with geographic distance, rather, it followed the “chaotic genetic patchiness” where genetic differentiation among spatial populations was very low, and genetic differentiation of different cohorts was significant (reviewed by Hellberg et al. 2002).

Possible Impacts of Marine Pollutants on Genetic Diversity

Owing to pollutants found in the Gulf of Thailand [e.g. polychlorinated biphenyl, linear alkylbenzenes, hopanes, polycyclic aromatic hydrocarbons (Boonyatumanond et al. 2007), 1.2 mg of cadmium, 0.78 mg of chromium, 9.85 mg of copper, 1.09 mg of lead and 2.78 mg of manganese per kg dry weight of green mussel (Ruangwises and Ruangwises 1998)], it has been our concern that they may impact genetic diversity of the green mussel in this study. Recent reports showed the effects of pollutants on genetic variation of aquatic animals based on different marker types, for example, decline of allozyme heterozygosity of chub (*Leuciscus cephalus*) collected from polluted part of small river system (Larno et al. 2001); higher allozyme variation of green mussel exposed to pollutants (Yap et al. 2004); reduction of AFLP heterozygosity of the harpacticoid copepod, *Attheyella crassa* exposed to copper but not of the group exposed to natural contaminants (Gardeström et al. 2008); decline of microsatellite allelic diversity and heterozygosity of the midge (*Chironomus riparius*) strains exposed to selection for tributyltin resistance (Nowak et al. 2009); decline of d^2 (the square of the difference in repeat units between two alleles at one locus) and increase genetic relationship between individual of the intertidal crab, *Pachygrapsus marmoratus* exposed to heavy metal pollutants (Fratini et al. 2008). The impacts were attributed to reduction of effective population sizes (e.g. Nowak et al. 2009) and selection (e.g. Yap et al. 2004). Selection on a

microsatellite occurs if it closely links with a selected locus, whereby the results on genetic variation vary according to any of the following types of selection; a reduction on variance of allele size due to background selection (a selected locus is deleterious) and hitch-hiking selection (a selected locus is selectively favorable) and increase variance of allele size due to overdominance at a selected locus (Slatkin 1995). For example, Nielsen et al. (2006) demonstrated hitch-hiking selection, with a strong support of statistical analyses (Lewontin–Krakauer test and $\ln R\theta$ test), at about 25% of microsatellite loci in Atlantic cod, *Gadus morhua* which resulted in elevated genetic differentiation and low variability. Nevertheless, based on the present data, whether and how the contaminants impact genetic diversity of the green mussel populations in the upper gulf is still uncertain and hence needs follow-up study using sufficient number of loci (e.g. >10 loci), good sample collection plan, and appropriate data analyses (for details see Beaumont and Balding 2004; Beaumont 2005; Nielsen et al. 2006).

Temporal Variation and Sources of Recruits

Temporal variation observed for TC, BK, and SR populations may be explained by the following reasons: (1) recruitment from different genetic distinct population(s), (2) selection at early life stage, (3) small chance of fertilization and survival during pelagic phase (reviewed by Hellberg et al. 2002). Population assignment suggested that TC2 could have been recruited from larvae of TP. Likewise, recruits of CY was from TC, BK from MK, and SR from CY. However, due to the possibility of spats transplant from the upper gulf to TP (Wangvoralak et al. 2006), the analysis was rerun without TP. We found that the most likely source population of TC was BK-1 (data not shown). Recruitment from other source was possible in marine shellfish, e.g. *Goniodoris nodosa* (Lambert et al. 2003; reviewed by Larson and Julian 1999). Notably, in this study, most of the recruitment was not from the adjacent population. It is possible that mass mortality may occur more seriously in some populations (e.g. MK) than the others. Consequently, the abundance of larval decline hence allows for settlement of larvae from other distant origins.

Conclusion and Implication for Aquaculture

In conclusion, the populations of green mussel in the Gulf of Thailand had substantial within-population genetic variation which implied limited adverse impacts from heavy exploitation and frequent mass mortality. They were genetically distinct in space and time, wherein the magnitude of genetic differentiation did not conform to geographic distances. The overall population structure likely

follows the “chaotic genetic patchiness”. In addition, the genetic data showed that most of the recruits were from different sources.

The magnitude of genetic variation within population suggested that culture of green mussels in the Gulf of Thailand is potentially sustainable. However, due to low effective number of alleles per locus, bottlenecks should be strictly avoided; otherwise, severe allele loss will occur and compromise adaptability of populations. Therefore, we would suggest that an estimation of carrying capacity of the gulf and also at each culturing spot, and the expansion of mussel culture in this area should be planned accordingly. Monitoring of pollutants in the culture areas is required to ensure not only food safety but also avoid the potential impacts of the pollutants on genetic diversity. Genetic monitoring is also essential and would provide insight information on current status of populations so that measures can be launched to cope with potential problems.

Acknowledgements This study was supported by two sources, Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific (NACA) and the Thailand Research Fund (through the project “Application of Genetics and Biotechnology for Sustainable Development of Aquaculture—II”, Senior Research Scholar 2007 awarded to UN). We appreciated the support from farmers and scientists from Department of Fisheries, Ministry of Agriculture, and Cooperatives, Thailand on sample collection and the Director General of NACA, Prof. Sena S. De Silva for his initiative and encouragement. The comments regarding impacts of pollutants on genetic diversity and the provision of relevant literatures from an anonymous referee that improved the quality of the manuscript are greatly appreciated.

References

- Allendorf FW (1986) Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. *Zoo Biol* 5:181–190
- Allendorf FW, Luikart G (2007) Conservation and the genetics of populations. Blackwell Publishing, MA, USA
- AQUACOP, de Gaillande D (1979) Spat production and culture of the green mussel, *Mytilus viridis* in France Polynesia. In Vakily JM (ed) The biology and culture of mussels of the genus *Perna*. ICLARM Studies and Reviews 17, ICLARM, Manila, pp 9–10
- Beaumont MA (2005) Adaptation and speciation: what can Fst tell us? *Trends Ecol Evol* 20(8):435–440
- Beaumont MA, Balding DJ (2004) Identifying adaptive genetic divergence among populations from genome scans. *Mol Ecol* 13:969–980
- Benson AJ, Marelli DC, Frischer ME, Danforth JM, Williams JD (2001) Establishment of the green mussel, *Perna viridis* (Linnaeus 1758) (Mollusca: Mytilidae) on the west coast of Florida. *J Shellfish Res* 20:21–29
- Boonyatumanond R, Wattayakorn G, Amano A, Inouchi Y, Takada H (2007) Reconstruction of pollution history of organic contaminants in the upper Gulf of Thailand by using sediment cores: first report from Tropical Asia Core (TACO) project. *Mar Pollut Bull* 54:554–565
- Cassista MC, Hart MW (2007) Spatial and temporal genetic homogeneity in the Arctic surfclam (*Mactromeris polynyma*). *Mar Biol* 152:569–579
- Cavalli-Sforza LL, Edwards AW (1967) Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *Am J Hum Genet* 19:233–257
- Coeroli M, de Gaillande D, Landret JP, AQUACOP (D. Coatanea) (1984) Recent innovation of molluscs in French Polynesia. *Aquaculture* 39:45–67
- Cornuet JM, Luikart G (1997) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001–2014
- Diz AP, Presa P (2008) Regional patterns of microsatellite variation in *Mytilus galloprovincialis* from the Iberian Peninsula. *Mar Biol* 154:277–286
- Dobretsov S, Wahl M (2008) Larval recruitment of the blue mussel *Mytilus edulis*: the effect of flow and algae. *J Exper Mar Ecol* 355:137–144
- Evano G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol Ecol* 14:2611–2620
- FAO (2006) Fish stat plus version 2.30. Available at: <http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS.asp>
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2006) Arlequin version 3.0: an integrated Software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47–50
- Falconer DS, Mackay TFC (1996) Introduction to quantitative genetics, 4th edn. Longman, Essex
- Felsenstein J (1993) PHYLIP (Phylogeny Interference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge
- Fratini S, Zane L, Ragionieri L, Cannicci S (2008) Relationship between heavy metal accumulation and genetic variability decrease in the intertidal crab *Pachygrapsus marmoratus* (Decapoda: Grapsidae). *Estuar Coast Shelf S* 79:679–686
- Gardeström J, Dahl U, Kotsalainen O, Maxson A, Elfving T, Grahm M, Bengtsson B, Breitholtz M (2008) Evidence of population genetic effects on long-term exposure to contaminated sediments—a multi-endpoint study with copepods. *Aquat Toxicol* 86:426–436
- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3) 2003. Available at <http://www2.unil.ch/izea/softwares>
- Guo SW, Thompson EA (1992) Performing the exact test of Hardy–Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics* 48:361–372
- Gutierrez-Gonzalez JL, Cruz P, Rio-Portilla MAD, Perez-Enriquez AR (2007) Genetic structure of green abalone (*Haliotis fulgens*) population off Baja California, Mexico. *J Shellfish Res* 26:839–846
- Hellberg ME, Burton RS, Neigel JE, Palumbi SR (2002) Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bull Mar Sci* 70(Suppl):273–290
- Hickman RW (1992) Mussel cultivation. In: Gosling E (ed) The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture. Elsevier, Amsterdam, pp 465–511
- Hochberg Y (1988) A sharper Bonferroni procedure for multiple tests of significance. *Biometrika* 75:800–802
- Intharachart A, Ploypradup P (2002) A study on production of green mussel raft culture. In Proceedings of Kasetsart University Annual Conference, Fisheries Section, Kasetsart University, Bangkok, pp 509–515 (in Thai)
- Kyle CJ, Boulding EG (2000) Comparative population genetic structure of marine gastropods (*Littorina* spp.) with and without pelagic larval dispersal. *Mar Biol* 137:835–845

- Lambert WJ, Todd CD, Thorpe JP (2003) Genetic population structure of two intertidal nudibranch molluscs with contrasting larval types: temporal variation and transplant experiments. *Mar Biotechnol* 142:461–471
- Larno V, Laroche J, Launey S, Flammarion P, Devaux A (2001) Responses of chub (*Leuciscus cephalus*) populations to chemical stress, assessed by genetic markers, DNA damage and cytochrome P4501A induction. *Ecotoxicology* 10:145–158
- Larson RJ, Julian RM (1999) Spatial and temporal genetic patchiness in marine populations and their implications for fisheries management. *CalCOFI Rep* 40:94–99
- Li Q, Xu K, Yu R (2007) Genetic variation in Chinese hatchery populations of the Japanese scallop (*Patinopecten yessoensis*) inferred from microsatellite data. *Aquaculture* 253:229–237
- Lin G, Feng F, Yue GH (2007) Isolation and characterization of polymorphic microsatellites from Asian green mussel (*Perna viridis*). *Mol Ecol Notes* 7:1036–1038
- Miller MP (1997) Tools for population genetic analyses (TFPGA) version 1.3. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Arizona
- Miller KJ, Ayre DJ (2008) Population structure is not a simple function of reproductive mode and larval type: insights from tropical coral. *J Anim Ecol* 77:713–724
- NEDECO (1965) Cited after Putikiatkajorn P (1998) MS Thesis, Graduate School, Burapha University, Chon Buri. (in Thai)
- Nielsen EE, Hansen MM, Meldrup D (2006) Evidence of microsatellite hitch-hiking selection in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): implications for inferring population structure in nonmodel organisms. *Mol Ecol* 15:3219–3229
- Niemsab P (1975) Effects of environment on growth of green mussel *Mytilus viridis* Linn. MS Thesis, Department of Marine Science, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok. (in Thai)
- Nowak C, Vogt C, Pfenninger M, Schwenk K, Oehlmann J, Streit B, Oetken M (2009) Rapid genetic erosion in pollutant-exposed experimental chironomid populations. *Environ Pollut* 157:881–886
- O'Connell M, Wright JM (1997) Microsatellite DNA in fishes. *Rev Fish Biol Fish* 7:331–363
- Oosterhout CV, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535–538
- Page RDM (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biological Sciences* 12:357–358
- Paetkau D, Slade R, Burden M, Estoup A (2004) Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Mol Ecol* 13:55–65
- Parulekar AH, Dalal SG, Ansari ZA, Harkantra SN (1982) Environmental physiology of raft-grown mussels in Goa, India. *Aquaculture* 29:83–93
- Piry S, Alapetite A, Cornuet JM, Paetkau D, Baudouin L, Estoup A (2004) GENECLASS2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *J Hered* 95(6):536–539
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959
- Rajagopal S, Venugopalan VP, Nair KVK, Van der Velde G, Jenner HA, Den Hartog C (1998) Reproduction, growth rate and culture potential of the green mussel, *Perna viridis* (L.) in Edaiyur backwaters, east coast of India. *Aquaculture* 162:187–202
- Rajagopal S, Venugopalan VP, van der Velde G, Jenner HA (2006) Greening of the coast: a review of the *Perna viridis* success story. *Aquat Ecol* 40:273–297
- Rannala B, Mountain JL (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:9197–9221
- Raochai S (2004) Effects of low salinity on mortality of green-lipped mussel (*Perna viridis* Linnaeus). *Thai Fish Gazette* 57(3):229–233
- Ravago-Gotanco RG, Magsino RM, Juinio-Menez MA (2007) Influence of the north equatorial current on the population genetic structure of *Tridacna crocea* (Mollusca: Tridacnidae) along the eastern Philippine seaboard. *Mar Ecol Prog Series* 336:161–168
- Raymond M, Rousset F (1995) Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 86:248–249
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43:223–225
- Rios C, Sanz S, Saavedra C, Pena JB (2002) Allozyme variation in populations of scallops, *Pecten jacobaeus* (L.) and *P. maximus* (L.) (Bivalvia: Pectinidae), across the Almería-Oran front. *J Exp Mar Biol Ecol* 267:223–244
- Ruangwises N, Ruangwises S (1998) Heavy metals in green mussels (*Perna viridis*) from the Gulf of Thailand. *J Food Protect* 61:94–97
- Sekino M, Hamaguchi M, Aranishi F, Okashi K (2003) Development of novel microsatellite DNA markers from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Mar Biotechnol* 5:227–233
- Sivalingam PM (1977) Aquaculture of the green mussel, *Mytilus viridis* Linnaeus, in Malaysia. *Aquaculture* 11:297–312
- Slatkin M (1995) Hitchhiking and associative overdominance at a microsatellite locus. *Mol Biol Evol* 12(3):473–480
- Sriraja Fisheries Station. Undate. Culture and processing of green mussel. Technical Paper, Sriraja Fisheries Station, Kasetsart University Research and Development Institute, Bangkok. (in Thai)
- Taggart JB, Hynes RA, Prodöhl PA, Ferguson A (1992) A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *J Fish Biol* 40:963–965
- Vercaemer B, Spence K, Kenchington E, Mallet A, Harding J (2003) Assessment of genetic diversity of the European oyster (*Ostrea edulis*) in Nova Scotia using microsatellite markers. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Science No. 2453, Department of Fisheries and Oceans, Dartmouth. pp 30
- Wangvoralak S, Kaewnoen M, Ajijmangkool S, Srisomvongse C (2006) Study on culture pattern, using of woods and cost-benefit analysis in green mussel (*Perna viridis*) culture: a case study in Chachoengsao and Surat Thani province. In Proceedings of 44th Kasetsart University Annual Conference: Fisheries Section. Kasetsart University, Bangkok, pp. 501–509 (in Thai)
- Waple RS (1998) Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *J Heredity* 89:438–450
- Wilkinson L, Hill M, Weln JP, Birkenbeuel GK (1992) SYSTAT for windows Statistics, Version 5.0 Edition. Evanston, IL: SYSTAT, Inc. 751 pp
- Yap CK, Tan SG, Ismail A, Omar H (2002) Genetic variation of the green-lipped mussel *Perna viridis* (L.) (Mytilidae: Mytiloida: Mytilicae) from the West Coast of Peninsular Malaysia. *Zoological Studies* 41:376–387
- Yap CK, Tan SG, Ismail A, Omar H (2004) Allozyme polymorphisms and heavy metal levels in the green-lipped mussel *Perna viridis* (Linnaeus) collected from contaminated and uncontaminated sites in Malaysia. *Environ Int* 30:39–46
- Yeh FC, Yang RC, Boyle T (1999) POPGENE version 1.31. Microsoft window-based software for population genetics analysis, University of Alberta and Centre for International Forestry Research, Alberta, Canada



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aqua-online



Short communication

Selection of brooders from early maturing freshwater prawns (*Macrobrachium rosenbergii*) results in faster growth rates of offspring than in those selected from late maturing prawns

Nissara Kitcharoen^a, Skorn Koonawootrittiron^b, Uthairat Na-Nakorn^{c,d,*}

^a Department of Aquaculture, Graduate School, Kasetsart University, Bangkok, Thailand 10900

^b Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok, Thailand 10900

^c Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok, Thailand 10900

^d Center for Advanced Studies in Agriculture and Food, National Research University Program, Kasetsart University, Bangkok, Thailand 10900

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 March 2010

Received in revised form 1 June 2010

Accepted 13 June 2010

Keywords:

Negative selection

Giant freshwater prawn

Macrobrachium rosenbergii

Early maturing

ABSTRACT

In the giant freshwater prawn (GFP), unintentional negative selection may have occurred when farmers recruited brooders from late maturing females instead of from those that matured first (Doyle et al., 1983). In this study, we provided empirical evidence that selection made from early maturing female freshwater prawns yielded offspring that grew faster than did those from females selected from the later maturing batches. Sixteen full sibling families were produced and separately reared. When they reached maturation, gravid females were removed and separately divided into four batches according to time to maturity. Within family selection, with a 10% selection proportion was then performed within each batch. The females were simultaneously mated with males from different families within a batch. Growth comparison of offspring between batches showed that the offspring of the females selected from the first batch were larger in carapace length (CL) and body weight (BW) than those from later batches.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The giant freshwater prawn (GFP), *Macrobrachium rosenbergii* (de Mann, 1879), is a very important species for aquaculture, with an average annual production of more than 200,000 tonnes as of 2007. The majority (>90%) of GFP comes from the People's Republic of China, Thailand, and India (FAO, 2009). Thailand has been producing GFP since 1975 and gradually developing aquaculture technology. Annual production grew from less than 0.6 metric tonnes in 1975 to 32,583 tonnes in 2004, with a slight decline to 27,650 metric tonnes in 2007 (FAO, 2009). Thailand remains among the three world leaders in GFP production (New, 2005).

Despite a long culture history, relatively little attention has been devoted to broodstock management and genetic improvement of GFP (Uraiwan et al., 2002; Thanh et al., 2009). Some practises have had adverse impacts on the stocks. For example, based on calculations, Doyle et al. (1983) reported unintentional negative selection for growth with a selection intensity estimated at 2.6 g/generation, when farmers in Thailand selected gravid females from the late maturing prawn instead of the early matured ones, which may grow faster. There has been no empirical data to validate this report, while farmers

have continued old practises until recently (FAO, 2002; Limsuwan and Jantharattakul, 2004). Our study was conducted to provide empirical data for selecting females from early maturing versus late maturing females. If these results support those of Doyle et al. (1983), this may convince the farmers to perform proper broodstock recruitment; thus, benefiting the local GFP stock in Thailand.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of brooders and establishment of the parental generation

GFP brooders were collected from Pasaak Chonlasidith Dam, Lop Buri Province, Thailand. The brooders originated from the local stock released by the Thai Department of Fisheries and were checked for two viruses, MrNV (*M. rosenbergii* nodavirus) and XSV (extra small virus) by RT-PCR. Eight males were successfully mated to 16 females at a ratio of one male to two females following a single pair-mating scheme. The larvae of each family (16 full-sib families, 8 half-sib families) were separately reared in each 250-L tank, fed with brine shrimp (*Artemia* spp.) 3 times daily until 14 days after reaching the post-larval (PL) stage. Afterwards, 400 PL from each family were transferred to 2 concrete tanks (2 × 1 × 0.5 m³), with each tank stocked with 200 prawns per family fed with commercially available pellets (Charoenpokphand).

* Corresponding author. Tel.: +66 662 5792924; fax: +66 662 5610990.
E-mail address: ffisum@ku.ac.th (U. Na-Nakorn).

2.2. Separation and selection of gravid females into four batches

We considered the presence of eggs at the females' pleopods (termed "gravid female") as a sign of maturation because a female will develop and release the eggs to the pleopods for attachment, regardless of mating. When the first gravid female was observed in each family, it was removed from the tank and kept separately in an aquarium (25 cm × 50 cm × 25 cm water depth). Similarly, gravid females from the same family were sequentially collected. Due to the small number of gravid females that appeared in some families, the collection time was expanded to 2 months to obtain sufficient numbers of females for selection (at least 20 females per family). Prior to selection, immature and gravid females were individually measured for carapace length (CL), body length (BL), and total length (TL) to the nearest millimetre (mm). Each female batch was subjected to a within family selection (proportion of selection = 10%). Subsequent harvests and selections were performed during the 8th, 9th, 10th, and 11th month. This procedure resulted in four batches of selected females.

2.3. Comparison of offspring from the four batches of females

2.3.1. Mating

After the selected gravid females discarded their eggs, they were reared until the eggs developed and the females were gravid again. Following this, they were mated with a blue-claw male, taken at random from a different family, using the rotational crossing scheme (Kincaid, 1977). It should be noted that due to a very low heritability of growth of the male freshwater prawn (Malecha, 1983; Malecha et al., 1984), using a random male would not affect the selection results.

Due to the necessity to synchronise the mating between the four female batches, only the gravid females available at that time were used. This resulted in 17, 18, 10 and 1 full-sib offspring for batches 1–4, respectively.

2.3.2. Experimental design and measurements

To compare growth performance between offspring of the four female batches, each family of offspring was separately reared in 1 × 2 m² concrete tanks, where each tank represented a replication. The nursing and rearing procedures were the same as previously described. Measurements were performed 2 months after reaching the PL stage, where 40 prawns per tank were sampled and measured for CL and body weight (BW).

2.3.3. Data analyses

The Monte-Carlo randomisation test (500,000 randomisations at 99% confidence limit) was performed to compare CL, BL, and TL of the immature and mature females from each maturation batch. The same test was employed to test the difference in CL and BW between the two-month-old offspring of different spawning batches. The analyses were facilitated using the PopTools™ program (Hood, 2002).

In order to test a hypothesis of whether farmers who grow the offspring from the selected brooders of the first maturing batch will get higher average growth rates than (1) if they took PLs at random from all batches, or (2) if they took PLs from the last batch, which represents the perceived farmer behavior, we generated 50,000 random sets of data using PopTool. The *P*-value of the first hypothesis is the fraction of the 50,000 random samples in which the mean of the first 680 (representing batch 1 offspring) exceeds the overall mean by the amount actually observed (observed difference between batch 1 and the overall mean). Likewise, the *P*-value of the hypothesis 2 is the fraction of the 50,000 random samples in which the mean of the first 680 individuals exceed the mean of the last batch.

Table 1

Mean carapace length (CL), body length (BL) and total length (TL) of mature and immature female giant freshwater prawns in each maturing batch. Means (column for the same maturing batch superscripted with different letters) are significantly different (*P* < 0.001); *n* = sample size.

Maturing batch	Maturation	n	CL (mm)	BL (mm)	TL (mm)
1	Mature	312	26.22 ^a	53.56 ^a	105.46 ^a
	Immature	309	21.36 ^b	44.49 ^b	87.55 ^b
2	Mature	277	26.20 ^a	53.96 ^a	108.30 ^a
	Immature	197	21.98 ^b	44.49 ^b	87.89 ^b
3	Mature	142	26.31 ^a	53.52 ^a	103.88 ^a
	Immature	104	24.18 ^b	49.40 ^b	96.57 ^b
4	Mature	20	26.65 ^a	53.18 ^a	105.59 ^a
	Immature	98	23.27 ^b	47.06 ^b	91.77 ^b

3. Results

First maturation occurred 6–7 months after reaching the PL stage and involved 18.18–21.43% of females in each family (mean = 19.46 ± 1.81%). The second maturing batch, which was observed in month 8, included 31.49 ± 1.14% of all females (range 29.79–33.68%), whereas 14.11 ± 0.91% matured in month 9 (range 12.63–16.00%) and 17.66 ± 2.31% (range 14.74–22.67%) matured during months 10–11. However, during months 10–11, some females had not reached maturation.

We found that the matured females were larger than immature individuals of the same sex, as shown by the significantly higher (*P* < 0.001; Table 1) CL, BL, and TL for every maturing batch. It is likely that there was a threshold size for maturation when the females reached maturation at CL (26.22–26.65 mm), BL (53.18–53.96 mm), and TL (103.88–108.30 mm) (Table 1).

The Monte-Carlo randomisation test revealed significant differences in the mean CL and BW among the offspring of the selected females from different batches (Table 2). Whereas the offspring of the first batch were the heaviest in BW, their CL was longer than those of the second and fourth batches but was not significantly different from that of the third batch.

The offspring of the first maturing batch grew at least 6.00% (CL) and 14.94% (BW) faster than the offspring of random females (*P* = 0.000) and at least 53.28% (CL) and 127.27% (BW) faster than those of late maturing females (*P* = 0.000).

4. Discussion

This study provided empirical data supporting the estimation by Doyle et al. (1983) that the selection of gravid females from the first maturing batch results in fast growing offspring relative to those obtained from selection on the late maturing females. Hence, the result demonstrated that this method of broodstock recruitment in Thailand was incorrect. The farmers preferred to select brooders from late maturing females because they were relatively large. However, the present study showed that the late maturing females grew slower than

Table 2

Mean carapace length (CL) and body weight (BW) of giant freshwater prawn offspring of selected females from four different maturing batches. Means in a column superscripted with different letters are significantly different (*P* < 0.05). The upper and lower values provided by the Monte-Carlo randomisation test are offset in parentheses.

Maturing batch	CL (mm)	BW (gm)
1	10.76 ± 0.10 ^a (10.49–11.03)	1.00 ± 0.02 ^a (0.94–1.06)
2	9.66 ± 0.10 ^b (9.39–9.93)	0.79 ± 0.02 ^b (0.74–0.84)
3	10.39 ± 0.13 ^a (10.08–10.70)	0.86 ± 0.03 ^b (0.79–0.92)
4	7.02 ± 0.43 ^d (6.39–7.02)	0.44 ± 0.08 ^c (0.33–0.44)

early maturing females and produced slower growing offspring. Therefore, the broodstock practise resulted in a negative selection for growth. Our result is supported by the study reported by Ra'anan et al. (1991), who showed that female GFP matured when they reached a threshold size range. Such a threshold was clearly shown in the present study, regardless of age, where first maturing females had carapace lengths of 26.22–26.65 mm, body lengths of 53.18–53.96 mm, and total lengths of 103.88–108.30 mm. The relationship of maturing time and size was also reported in other crustaceans, for example, the fiddler crab *Uca cumulanta* (Pralon and Negreiros-Fransozo, 2008), and implied that fast growing individuals matured earlier. In addition, the correlation between growth rate and maturing time has been well documented in fishes, for example, Atlantic cod, *Gadus morhua* (Holdwal and Beamish, 1985); cod, *Hippoglossus hippoglossus* (Godo and Hang, 1999); and Atlantic salmon, *Salmo salar* (Baum et al., 2004; Guerrero-Tortolero and Bromage, 2008).

Although growth of the offspring declined consistent with the first timing batch of maturing females, the offspring from the third batch of matured females exhibited better growth than those from the second and fourth batches. This may have been due to the presence of early, first maturing females missed during initial size selection and passed to a portion of the third female batch. After their eggs are discarded, females spawned again after two molting cycles, a period of four weeks (Okumura and Aida, 2001; FAO, 2002).

Although the maturation of GFP females was relatively size specific (Ra'anan et al., 1991), the frequency of the size distribution was normal, allowing for selection to be performed. A concern, however, was that using early maturing prawns as brooders might result in the selection of prawns that stop growing at an early age. Ra'anan et al. (1991) showed that even though the growth rates of females declined and did not cease after maturation, the faster growing females retained their growth potential as compared to the slow growing females.

Acknowledgements

This research was supported by Thailand Research Fund (the Senior Research Scholar Program 2007: project RTA 5080013 awarded to U. Na-Nakorn); the Royal Golden Jubilee-Ph.D. scholarship awarded to Nissara Kitcharoen; Kasetsart University for the project entitled "Application of Genetics and Biotechnology for the Development of Freshwater Prawn Culture"; and the National Research University Program. We would like to thank Associate Professor Wikrom Rungsin and Mr. Suwinai Pannkao

for technical assistance. We thank the anonymous referees for their invaluable comments especially on the improvement of the analysis which significantly improved the manuscript.

References

- Baum, D., Laughton, R., Armstrong, J.D., Metcalfe, N.B., 2004. Altitudinal variation in the relationship between growth and maturation rate in salmon parr. *J. Anim. Ecol.* 73, 23–260.
- Doyle, R.W., Singholka, S., New, M.B., 1983. Indirect selection for genetic change: a quantitative analysis illustrated with *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 30, 237–247.
- FAO, 2002. Farming freshwater prawns. A manual for the culture of the giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). FAO FISHERIES TECHNICAL PAPER 428.
- FAO, 2009. Fishstat Plus Version 2.302009 Available source <http://www.fao.org/fi/statist/FISOF/FISHPLUS.asp>, February, 2009.
- Godo, O.R., Hang, T., 1999. Growth rate and sexual maturity in cod (*Gadus morhua*) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *J. Northw. Alt. Fish. Sci.* 25, 115–123.
- Guerrero-Tortolero, D.A., Bromage, N., 2008. Growth and maturation of Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations with different grilse proportions under natural photoperiod and superimposed night time light. *Aquaculture* 285, 63–66.
- Holdwal, D.A., Beamish, F.W.H., 1985. The effect of growth rate, size, and season on oocyte development and maturity of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *J. Exp. Mar. Biol. Eco.* 85, 3–19.
- Hood, G., 2002. Poptools 3.1.0. <http://www.cse.csrto.au/CDG/poptools/index.htm>.
- Kincaid, H.L., 1977. Rotational line crossing: an approach to reduction of inbreeding accumulation in trout brood stocks. *Prog. Fish Cult.* 39, 179–181.
- Limsuwan, C., Jantaratkul, P., 2004. Shrimp Aquaculture Business in Thailand. National Research Council of Thailand, Bangkok. In Thai.
- Malecha, S.R., 1983. Crustacean genetics and breeding: overview. *Aquaculture* 33, 395–413.
- Malecha, S.R., Masuno, S., Onizuka, D., 1984. The feasibility of measuring the heritability of growth pattern variation in juvenile freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture* 38, 347–363.
- New, M.B., 2005. Freshwater prawn farming: global status, recent research and a glance at the future. *Aquacult. Res.* 36, 210–230.
- Okumura, T., Aida, K., 2001. Effects of bilateral eyestalk ablation on molting and ovarian development in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish. Sci.* 67, 1125–1135.
- Pralon, B.G.N., Negreiros-Fransozo, M.L., 2008. Relative growth and morphological sexual maturity of *Uca cumulanta* (Crustacea: Decapoda: Ocypodidae) from a tropical Brazilian mangrove population. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 88, 569–574.
- Ra'anan, Z., Sagi, A., Wax, Y., Karpus, I., Hulata, G., Kuris, A., 1991. Growth, size rank, and maturation of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: analysis of marked prawn in an experimental population. *Biol. Bull.* 181, 379–368.
- Thanh, N.M., Ponzoni, R.W., Nguyen, N.H., Vu, N.T., Barnes, A., Mather, P.B., 2009. Evaluation of growth performance in a diallel cross of three strains of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in Vietnam. *Aquaculture* 287, 75–83.
- Uraivan, S., Sumanojitraporn, S., Ampolsak, K., 2002. Genetic improvement for growth in giant freshwater prawn 1. Estimating heritability and within family selection. Proceedings of the 40th Kasetsart University Annual Conference (Animals and Fisheries Section). Kasetsart University, Bangkok, pp. 632–640.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aqua-online

Novel microsatellites for multiplex PCRs in the Humpback grouper, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes, 1828), and applications for broodstock management

Uthairat Na-Nakorn^{a,*}, Renoo Yashiro^b, Anyalak Wachirachakarn^c,
Warangkana Prakoon^a, Nipon Pansaen^b

^a Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Chatujak, Bangkok 10900, Thailand

^b Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok, Thailand

^c Interdisciplinary Program in Genetic Engineering, Graduate School, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 February 2010

Received in revised form 18 May 2010

Accepted 21 May 2010

Keywords:

Humpback grouper

Cromileptes altivelis

Multiplex PCRs

Effective population size

Communal spawning

ABSTRACT

The Humpback grouper, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes, 1828), is one of the most valuable reef fishes, especially in Southeast Asia. It was recently listed by the IUCN as vulnerable due to its rapid decline in abundance. In an attempt to reduce exploitation of wild fingerlings, captive breeding has been performed either with or without hormone injection, and the brooders allowed to communally spawn. These actions have raised concerns regarding the reduction of effective population size by various factors related to communal spawning. In the present study, the first sets of microsatellite primers for two panels of multiplex PCRs (triplex and pentaplex) were developed from the DNA of *C. altivelis*. These primers were employed for parentage analysis and evaluation of genetic variation of three stocks: a parental stock (P, $n = 20$); the first generation offspring (G1, $n = 120$, age = 4 months); and an unrelated potential broodstock (PP, $n = 118$). The parentage analysis showed that among 20 brooders (P), two females and five males contributed to the genetic composition of G1. We observed multiple paternity, demonstrating that each female mated with two or three males. Moreover, the family contribution was skewed, and G1 was dominated by a single full-sib (87.50%). These factors likely resulted in low effective population size and may enhance inbreeding in successive generations. Genetic variation was studied based on seven loci (a locus was removed from the analysis due to physical linkage) and showed that the potential broodstock had slightly lower genetic variation relative to the parental stock. However, genetic distance and genetic relatedness estimator (r_{xy}) indicated that the stock was sufficiently diverse from the parental stock; therefore, this stock may be used as female parents for P, which will be dominated by males as the stock grows older. Due to high r_{xy} between some pairs of P and PP, the breeding pairs should be carefully selected based on low genetic relatedness to avoid inbreeding.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Good broodstock management is essential for sustainability of aquaculture stocks. Minimal knowledge of genetic considerations has resulted in the loss of genetic variation (Allendorf and Phelps, 1980; Agnèse et al., 1995; Coughlan et al., 1998; Sekino et al., 2002; Luan et al., 2006; Simmon et al., 2006; Horreo et al., 2008) and inadvertent alteration of traits. Examples of these changes include increased fry deformity and reduced survival rate in *Heterobranchius longifilis* (Agnèse et al., 1995), declines in growth in domesticated Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Brummett et al., 2004), delays in seaward migration of masu salmon, *Oncorhynchus masou* (Koyama et al.,

2007), and reductions in reproductive fitness in wild environment of steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Araki et al., 2007).

In general, loss of genetic variation is primarily caused by using a small number of broodstock, either at the founding event or in successive generations (intentional and un-intentional) as well as selection (Allendorf and Luikart, 2007). When a small number of brooders are used, genetic drift (random change of allele frequencies) occurs initially, and inbreeding will eventually occur. As a consequence, a majority of domesticated stocks are characterised by loss of genetic variation, especially allele loss and deterioration of traits due to inbreeding depression.

The level of inbreeding is expressed by the inbreeding coefficient (F), which is determined by the effective population size (N_e : the number of broodstock that contributes to genetic composition of the stock) according to the formula, $\Delta F = 1/2 N_e$, where ΔF is the current coefficient of inbreeding (Falconer and Mackay, 1996). N_e is determined by the number of parents; however, it also depends on

* Corresponding author. Tel./fax: +66 2 5610990.

E-mail address: ffisurn@ku.ac.th (U. Na-Nakorn).

the sex ratio of the parents, the mating scheme (single pair mating or pooled gametes), and the proportion of representatives of each family (variance of family size). Un-intentional decreases in N_e always occurs due to hatchery practices such as communal spawning, which results in low N_e due to multiple sires or dams, the skewness of family representation, and the spawning failure of some brooders (Brown et al., 2005; Frost et al., 2006; Peterson et al., 2008; Trippel et al., 2009).

The fish of the subfamily Epinephalinae (grouper) have considerable economic value in tropical and subtropical regions. In particular, live fish are highly priced in Southeast Asia (Sadovy et al., 2008), e.g., US\$ 8–11 kg⁻¹ for *Epinephelus coioides* and US\$ 80–95 kg⁻¹ for *Cromileptes altivelis* (Williams et al., 2005). This high price has led to overexploitation of these fish and increased aquaculture. Artificial breeding of *C. altivelis* was first achieved by Tang et al. (1979), who injected brooders with hormones, e.g., a luteinising hormone releasing hormone (LHRH) analogue or human chorionic gonadotropin (hCG), followed by group spawning in tanks. Next, the fertilised eggs were collected and incubated; however, the contributions of each brooder could not be determined and may have impacted the reduction of N_e . To date, the impact of such practices on N_e has not been evaluated for *C. altivelis* and may be detrimental to the domestication program in the long term.

Microsatellite DNA, which consists of tandemly repeated nucleotides (O'Connell and Wright, 1997), is among the best molecular markers for the evaluation of mating success and other issues related to broodstock management (Liu and Cordes, 2004). Its codominance and high number of polymorphisms allow for genetic differentiation between closely related populations (Li et al., 2004; Hara and Sekino, 2007; Peterson and Ardren, 2009; Na-Nakorn and Moeikun, 2009) and efficient parentage analysis (Brown et al., 2005; Frost et al., 2006; Peterson et al., 2008; Trippel et al., 2009). These analyses require in-fatal tissue samples; therefore, it is suitable studies of valuable broodstock. However, the major shortcoming of microsatellites is the requirement of prior knowledge of the nucleotide sequences of its flanking regions for primer design. To date, although relatively large numbers of microsatellite primers have been developed for Serranids (e.g., *Plectropomus maculatus*, Zhu et al., 2005; *Epinephelus guttatus*, Ramírez et al., 2006; *Epinephelus fuscoguttatus*, Lo and Yue, 2007; *Epinephelus lanceolatus*, Zeng et al., 2008; *Epinephelus septemfasciatus*, Zhao et al., 2009), no specific primers have been developed for *C. altivelis*. Furthermore, for intensive scoring of microsatellites, primers for multiplex polymerase chain reactions (PCR), which allows for the simultaneous scoring of more than one microsatellite locus, are essential because they significantly reduce the cost and the error rate caused by humans (Neff et al., 2000; Navarro et al., 2008).

Therefore, the present study had three objectives: 1) to evaluate the impact of communal spawning of *C. altivelis* on N_e ; 2) to develop useful primers for multiplex PCR of DNA of *C. altivelis*; and 3) to elucidate genetic diversity of *C. altivelis* stocks that will establish a domestication program in Thailand. The results will help to increase our understanding of genetic alterations caused by hatchery practices and will facilitate efficient domestication programs of this species and others species that possess similar biology.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection and DNA extraction

Fin tissue from three captive stocks of *C. altivelis* reared at Rayong Brackishwater Research and Development Institute, Rayong Province, Thailand, were collected in February 2007. The stocks included a parental stock (P) comprised of 20 pit-tagged adult fish collected from various locations with an average body weight (BW) of 1.87 ± 0.90 kg and body length (BL) of 45.64 ± 5.95 cm (1–4.7 kg BW; 38–60 cm BL), 120 P offspring (4 months old; ≈ 10 –15 cm BL) obtained from a

breeding in October 2007 (two females and five males were injected with LHRH analogue and communally stocked with the un-injected brooders, followed by continuous mass spawning for 10 days, and eggs were collected daily and pooled in a hatching tank), and 118 untagged potential parents (PP), comprised of a majority of natural fingerlings in Trad Province and introduced fish of unknown origin (BW was 0.57 ± 0.19 kg and BL was 32.42 ± 3.43 cm).

A piece of caudal fin (20–50 mg) was individually collected and preserved in 90% ethanol until DNA extraction following the protocol developed by Taggart et al. (1992). The DNA samples were used for development of microsatellite primers and subsequent scoring of microsatellite loci.

2.2. Development of microsatellite primers and multiplex PCRs

Enriched partial DNA libraries were constructed from DNA of a *C. altivelis* individual following the method described by Li et al. (2007). Briefly, individual genomic DNA was digested with *RsaI*, ligated to 21 bp and 25 bp *MluI* adapters, purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen), and amplified using a 21mer adaptor as a primer. PCR conditions and primer sequences follow the protocol by Edwards et al. (1996). The enriched DNA products were cloned using the pGEM[®]-T easy vector system I kit (Promega). Next, the plasmids were transformed into *E. coli* JM109 by heat shock transformation. The white colonies were selected in the presence of X-gal and IPTG in LB agar with ampicillin. The plasmids were extracted and multiplied using The illustra[™] Templiphi Amplification kit (GE Healthcare), and they were sent to Macrogen for sequencing using the BIG DYE 3.1 terminator mix on an ABI 377 Sequencer (Applied Biosystems).

Primers were designed using PRIMER v.3 (Rozen and Skaletsky, 2000) based on guidelines for multiplex primer design (Multiplex PCR Handbook 09/2002, Qiagen).

Each forward primer was 5' labelled with one of the following fluorescent dyes: NED, PET, FAM or VIC (Applied Biosystems) based upon allelic size range. Before using all primers together in a multiplex PCR, each primer pair was individually assessed on five DNA samples in order to corroborate correct amplification, allele size range and microsatellite identification.

For visualisation, the amplicons were analysed in 1% agarose gel electrophoresis and visualised by SYBR[®] Gold (Invitrogen) staining. Multiplex PCRs were performed using QIAGEN[®] Multiplex PCR kit (QIAGEN) using the PCR conditions and reactions according to the QIAGEN[®] Multiplex PCR handbook February 2008 (<http://www1.qiagen.com/literature/protocols/QIAGENMultiplexPCR.aspx>). Next, the PCR products were detected by the 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) and allelic sizes were evaluated using GeneMapper[®] software v.4.0 (Applied Biosystems).

2.3. Data analyses

To evaluate the information regarding polymorphisms of the newly developed microsatellites, the Polymorphic Information Content (PIC) was calculated for each microsatellite using the CERVUS version 3.0.3 program (Kalinowski et al., 2007). Next, the data based on seven microsatellite loci (*CAL44* was removed) were used for the following analysis. The genotypic distributions of each population across loci were tested for conformation to Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) using Genepop version 4.0 (Rousset, 2008). Exact *P* values were estimated using the Markov chain method (dememorisation: 1000; batches: 100; iterations per batch: 1000) (Guo and Thompson, 1992). FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001) was used to calculate the inbreeding coefficient (F_{IS}). Furthermore, parameters describing genetic variation within a population, allele frequencies, average number of alleles per locus, and observed and expected heterozygosities were calculated using Popgene version 1.32 (Yeh and

Boyle, 1999). Allelic richness, which is allele diversity independent of sample size, was calculated using FSTAT version 2.9.3 (Goudet, 2001). A *t*-test (Archie, 1985) was used to test the differences in genetic variation among populations. For all multiple tests, *P* values were corrected using a sequential Bonferroni correction (Hochberg, 1988; Rice, 1989). The average pairwise genetic relatedness (r_{xy} ; Ritland estimator) among individuals within populations was calculated using KINGROUP version 2_090501 (Kononov et al., 2004). The program N_e Estimator version 1.3 (Peel et al., 2004) was employed to estimate effective population size (N_e) based on heterozygote excess and genotype disequilibrium.

A recent bottleneck, significant reduction of effective population size, was tested using the Bottleneck version 1.2.02 program (Cornuet and Luikart, 1997). Also, the Wilcoxon sign-rank test was used to determine if a population exhibits a significant number of loci with heterozygote excess, assuming a two-phased model of mutation (TPM) as recommended in the program. In addition, the “mode-shift” indicator was employed to discriminate bottlenecked populations from stable populations. The independent segregation of genotypes (linkage disequilibrium) was tested using the exact test (Markov chain: dememorisation: 1000; batches: 100; iterations per batch: 1000) (Guo and Thompson, 1992) facilitated by Genepop version 4.0 (Rousset, 2008).

To reveal genetic diversity among populations, *F* statistics (F_{ST} , F_{IT} and F_{IS}) were calculated using TFGPA version 1.3 (Miller, 1997) to determine the existence of population differentiation. Each parameter was tested against zero by a bootstrapping method. Differences in distributions of allele frequencies between populations were tested using Fisher's exact test in Genepop version 4.0 (Rousset, 2008). Genetic distances between population pairs based on Cavalli-Sforza and Edwards' (1967) chord distance were calculated using the PHYLIP version 3.63 program (Felsenstein, 1993).

For the parentage analysis, the CERVUS 2.0 program (Marshall et al., 1998) was used to assign offspring (G1) to parents. We performed the tests according to two scenarios: 1) only the injected brooders (Female: 5, 8, and 14; Male: 11, 12, 15, and 18) participated in the mating; or 2) all available brooders with known sex participated in the mating. For each scenario, three tests were performed, paternity (only genotypes of male parents were known), maternity (only genotypes of female parents were known) and parent pair tests (with known genotypes of male and female parents). This program calculates likelihood ratios for paternity inference and defines a statistic *D* where critical values (confidence intervals at 80% and 95%) are generated by 100,000 cycles of bootstrapping from the allele frequencies of the broodstock.

3. Results

3.1. Microsatellite primers

Among the 210 positive clones, 30 were sequenced, and 12 of these clones contained microsatellites; however, only 10 sequences had sufficient flanking regions for primer design. The size ranges and the annealing temperature of the PCR reactions enabled the development of two multiplex PCR panels, a triplex comprising of *CAL03*, *CAL09* and *CAL44* (annealing temperature = 57 °C), and a pentaplex comprising *CAL02*, *CAL07*, *CAL13*, *CAL28* and *CAL33* (annealing temperature = 60 °C). The accession numbers for these primers are GU238313–GU238320 and other details are shown in Table 1. The repeat motifs were comprised of perfect (three loci), imperfect (two loci), compound dinucleotides (one locus), and tetranucleotide motifs (two loci). The number of alleles/locus ranged from two for *CAL02* to 20 for *CAL44* (Table 1). Furthermore, observed heterozygosities ranged from 0.35 (*CAL28*) to 0.95 (*CAL03*, *CAL13* and *CAL44*), and polymorphic information content (PIC) ranged from 0.149 for *CAL02* to 0.835 for *CAL03*.

3.2. Hardy–Weinberg equilibrium

Disequilibrium was observed at two loci in the parental stock (P), *CAL09* ($F_{IS} = 0.1390$, $P = 0.0012$) and *CAL13* ($F_{IS} = -0.4615$, $P = 0.0000$), and it was also observed at six loci in G1 (*CAL03*, *CAL07*, *CAL09* and *CAL44* towards heterozygote excess; *CAL13* and *CAL33* towards homozygote excess). Furthermore, disequilibrium was found at seven loci in PP (*CAL03*, *CAL07*, *CAL33* and *CAL44* towards heterozygote excess; *CAL09*, *CAL13* and *CAL28* towards homozygote excess) (Table 2). The exact test showed that the three stocks did not conform to HWE (data not shown). Null alleles were detected at *CAL13* and *CAL28* in G1 and PP; however, after the allele frequencies were adjusted for null alleles, the results of the HWE test did not change.

3.3. Genetic variation within populations

Overall, genetic variation of the three stocks was not significantly different (Table 3). However, decline of genetic variation of progenies relative to the parental stock was observed [i.e., allelic richness, which is an average mean number of alleles per locus independent of sample sizes was 4.03 ± 1.55 (G1) compared to 7.00 ± 5.13 (parental stock), and observed heterozygosity (H_o) was 0.57 ± 0.41 for progenies and was 0.76 ± 0.24 for the parent]. PP showed slightly lower genetic variation than P, but it was slightly higher than G1.

Table 1

Characteristics of eight microsatellite primers developed from DNA of *Cromileptes altivelis*; Note: *A* = mean number of alleles per locus, H_o = observed heterozygosity; H_e = expected heterozygosity; PIC = polymorphic information content; sample size = 258.

No.	Primer names	Accession number	Repeat sequence	Primer details	Observed product range	<i>A</i>	H_o	H_e	PIC
1	<i>CAL02</i>	GU238316	(GT) ₅ N(GT) ₇	F 5'GTCGCCTGAGACAAGGACTC3' R 5'GGACAGAGCGAGCTGGTAAC3'	238–242	2	0.45	0.41	0.149
2	<i>CAL03</i>	GU238317	(TAGA) ₁₃	F 5'TGCATCATCACTCAACATAAAC3' R 5'TTCTCGCGTTTGTCTCTT3'	193–269	17	0.95	0.90	0.835
3	<i>CAL07</i>	GU238320	(GGAT) ₁₀	F 5'TGGATGATGATGGGAGATGG3' R 5'ATCCCTCCAATCAACTATGCTT3'	135–165	6	0.85	0.76	0.702
4	<i>CAL09</i>	GU238318	(GT) ₇ (GA) ₁₄	F 5'GATCCTTTGCTGCCACCTT3' R 5'TCGCCACTGATGAAGCTATG3'	182–226	16	0.75	0.87	0.821
5	<i>CAL13</i>	GU238319	(CT) ₂₉	F 5'CGAAAAGAGCAAAGCCATGT3' R 5'GCCAGGTGACAACAGTGAAG3'	205–227	10	0.95	0.66	0.582
6	<i>CAL28</i>	GU238313	(CA) ₉	F 5'TGTCTTGCCATTGTGTTTG3' R 5'GTGTACCTTGGCCACTGTA3'	182–188	4	0.35	0.30	0.230
7	<i>CAL33</i>	GU238314	(GA) ₃ CA(GA) ₁₈	F 5'ATGGATCCTACCAAGAACG3' R 5'CAGACATGAAGCAAGGACA3'	176–184	5	0.85	0.64	0.647
8	<i>CAL44</i>	GU238315	(CT) ₂₈	F 5'TGTCAGGTATTGTATTGCTGTCTG3' R 5'ACACTGGCTTGTGTGTGTC3'	192–246	20	0.95	0.85	0.792

Table 2

Results of locus-wise Hardy–Weinberg test before and after the data were adjusted for null alleles.

Loci	F_{IS}			
	P	G1	PP	PP (adjusted for null allele)
CAL02	−0.1032	−0.0769	−0.0731	−0.0734
CAL03	−0.0587	−0.2767*	−0.0609*	−0.0609*
CAL07	−0.1235	−0.3435*	−0.1630*	−0.1630*
CAL09	0.1390*	−0.2451*	0.1126*	0.1126*
CAL13	−0.4615*	0.2776*	0.2001*	0.0705*
CAL28	−0.1565	1.0000*	0.8822*	0.7411*
CAL33	−0.3292	0.0133	−0.0950*	−0.0950*

* Significant deviation from Hardy–Weinberg equilibrium ($P < 0.05/7$, Bonferroni correction)

3.4. Bottleneck test and genetic disequilibrium

A recent bottleneck was revealed for P and PP [the Wilcoxon test, P (heterozygote excess) = 0.00977, 0.00195 for P and PP, respectively and the shifted mode]; G1 showed a sign of recent bottleneck according to the Wilcoxon test [P (heterozygote excess) = 0.0039], but the “mode-shift” indicator showed normal L-shape distribution. However, when the probabilities were corrected for multiple tests using Bonferroni correction ($P = 0.01/8$), the Wilcoxon test was not significant for all populations. Non random association of genotypes (genetic disequilibrium) between CAL07 and CAL44 was observed in all populations, which most likely indicated physical linkage between these loci. Therefore, we removed CAL44 from the analysis, which eventually led to the disappearance of genetic disequilibrium in the parental stock; however, seven and 13 locus pairs showed non random association in G1 and PP, respectively.

3.5. Genetic diversity between stocks

The F_{ST} (based on seven loci) was relatively high and significantly differed from 0 ($F_{ST} = 0.1415$, $CI_{95\%} = 0.0905–0.1864$). The exact test revealed genetic differentiation between every pair of stocks. Genetic distance between P and G1 was low ($D = 0.0781$); however, PP had a relatively large genetic distance between both P and G1 ($D = 0.1078$ and 0.1891, respectively).

3.6. Average genetic relatedness (r_{xy}) among individuals

The genetic relatedness (r_{xy}) within P varied considerably (range = −0.545 to 0.659; average = 0.030 ± 0.229), and 95 pairs showed genetic relatedness less than 0. The average r_{xy} within PP was 0.011 ± 0.301 (range −0.743 to 1), and the r_{xy} between P and PP ranged between −0.7187 and 0.7810, with an average of −0.137 $\pm$ 0.221.

Table 3

Genetic variation ($\pm$ SD) base on seven microsatellite loci of three stocks of *Cromileptes altivelis* (Valenciennes, 1828); P = parental stock; G1 = offspring spawned in year 2008; PP = potential parent; n = sample size; A = mean number of alleles per locus; A_e = mean effective number of alleles per locus; H_o = observed heterozygosity; H_e = expected heterozygosity; F_{IS} = inbreeding coefficient; r_{xy} = genetic relatedness.

Stock	n	A	A_e	A_r	H_o	H_e	F_{IS}	r_{xy}
P	20	7.00 ± 5.13	4.11 ± 2.44	7.00 ± 5.13	0.76 ± 0.24	0.67 ± 0.22	−0.134 ^a	−0.0416
G1	120	5.38 ± 2.83	2.70 ± 1.43	4.03 ± 1.55	0.57 ± 0.41	0.51 ± 0.27	−0.118 ^a	0.0097
PP	118	7.75 ± 4.06	3.18 ± 1.57	5.31 ± 2.47	0.58 ± 0.33	0.59 ± 0.25	0.017 ^a	0.0107
Overall	258	6.71 ± 1.21	3.33 ± 0.72	5.45 ± 1.49	0.64 ± 0.11	0.59 ± 0.08	−0.078	

^a Denoted significant deviation from Hardy–Weinberg equilibrium

3.7. Parentage analysis

The data from eight loci were used for this analysis. The critical delta for the maternity and paternity analyses were 1.23 and 0.62 (80% confidence), respectively; however, the critical value for the parent pair analysis where the sexes of candidate parents were known was 2.46. The analysis including only the hormone injected individuals (three females and four males) showed a low number of assigned offspring in all cases (33 when the male and the female parent were known; 48 and 94 in case of the known mother and father, respectively). Inclusion of all brooders (a total of 13 females and 7 males) increased the number of assigned individuals to 87 when both parents were known, 97 when only mothers were known and 79 when only fathers were known. The analysis also revealed that only one un-injected female (number 4) and one hormone injected (number 5) female, two un-injected males (numbers 6 and 7) and three hormone injected males (numbers 11, 12 and 18) involved in the mating. The variation of family contributions was high. For example, only one pair ($\varnothing 4 \times \sigma 11$) produced as many as 77 offspring, whereas the remaining four pairs ($\varnothing 4 \times \sigma 7$, $\sigma 18$; $\varnothing 5 \times \sigma 6$, $\sigma 12$) produced only 1–5 offspring/pair.

Due to the presence of null alleles at CAL13 and CAL28 as confirmed by the null allele test, we applied parentage tests using the data without these loci, but the assignment rates did not improve. Therefore, data from these two loci were included in the analyses.

3.8. Effective population size (N_e)

The N_e calculated from genetic disequilibrium was 30 individuals ($CI_{95\%} = 20.6–50.2$) for P, 13.8 individuals ($CI_{95\%} = 16.3–19.9$) for G1, and 18 individuals ($CI_{95\%} = 12.0–15.7$) for PP; however, the calculation based on heterozygote excess yielded N_e s of 10.3, infinity and 18.2 for P, G1 and PP, respectively.

4. Discussion

4.1. Novel primers for *Cromileptes altivelis*

The eight primer pairs reported in the present study were the first primer sets developed for *C. altivelis*. More importantly, these primers were capable of performing multiplex PCRs. They showed a moderate number of alleles per locus (10.00 ± 12.73) relative to other primers developed for other species of groupers, e.g., 3.42 ± 0.90 of *E. septemfasciatus* (Zhao et al., 2009); 4.50 ± 2.72 of *E. lanceolatus* (Zeng et al., 2008); 10.08 ± 4.54 of *E. fuscoguttatus* (Lo and Yue, 2007); 10.20 ± 3.79 of *P. maculatus* (Zhu et al., 2005); and 22.28 ± 10.39 of *E. guttatus* (Ramírez et al., 2006). The wide range of the average number of alleles/locus (2–20 alleles/locus) made them useful for numerous analyses. For example, the triplex panel was comprised mostly of highly polymorphic loci ($A = 16–20$ alleles/locus; $PIC = 0.792–0.835$); therefore, they are suitable for parentage analysis (O'Connell and Wright, 1997; Liu and Cordes, 2004). However, the pentaplex panel was comprised mostly of low polymorphic loci ($A = 2–10$ alleles/locus; $PIC = 0.149–0.702$), thus,

they were suitable for genetic diversity studies. In addition, multiplex PCR is advantageous over the single PCR method because it saves time, cost [e.g., a reduction of PCR consumables cost by 1/4 and 1/6 when using four (in a tetraplex, Neff et al., 2000) and 10 microsatellites (Navarro et al., 2008) than single ones] and minimises genotyping errors (Navarro et al., 2008). Although the locus-wise HWE tests showed divergence from HWE, they likely were population specific, rather than a reflection of non-Mendelian inheritance (caused by null alleles or scoring errors) of the loci. Nugroho et al. (1998) and Koedprang et al. (2007) showed appreciable cross amplification of microsatellites across grouper species, suggesting that these novel microsatellite primers may be useful for studies of other grouper species.

4.2. Genetic diversity of stocks

The three stocks did not conform to HWE; however, the deviation of P from HWE occurred at few loci (two of seven loci), which may be an artefact of the test. $G1$ originated from a small number of brooders, and genetic drift occurred and may lead to heterozygote excess (Luikart and Cornuet, 1999). Alternatively, homozygote excess of PP may be a signature of the Wahlund effect, implying that the founder of the stock (natural fingerling and the additional introduced fish) was comprised of genetically diverse groups (Hedrick, 1999).

4.2.1. Genetic variation of the progeny ($G1$) relative to the parent (P)

The t -tests failed to support the differences of genetic variation among stocks, which may be due to the compromised power of the test as a consequence of the large variation of polymorphisms among loci (e.g., number of alleles/locus = 2–17); however, the decline of genetic variation in the progeny ($G1$) relative to the parent (P) was obvious (23% reduction of A ; 25% reduction of H). The decline of genetic variation in the offspring was simply a result of genetic drift (Allendorf, 1986; Allendorf and Luikart, 2007), whereby only a small proportion of the brooders contributed to the offspring as shown by the parent assignment test, despite the absence of a bottleneck in $G1$. The present scenario always applies for the species in the early stage of breeding technology; therefore, reproductive success is limited and unpredictable. If the domestication process is to be continued without concern regarding losing genetic variation, the stock may eventually deteriorate. High genetic variation was believed to associate with the adaptive fitness in a changing environment (Frankel and Soule, 1981; Koljonen et al., 2002). Special attention should be given to the broodstock management plan of the current stock of *C. altivelis* in order to retain genetic variation.

4.2.2. Genetic variation of the potential parent

The potential parent (PP), primarily recruited from wild fish, showed relatively low genetic variation and low estimated N_e and was in accordance with the bottleneck detected by the mode-shift indicator. This finding implies that the stock should not be maintained alone because an inbreeding problem will be un-avoidable, rather it should be used for crossing with the original parental stock (P) to increase genetic variation. More importantly, the original stock (P) will soon face a shortage of females because *C. altivelis* fish mature as females and transform to males at a later stage (Heemstra and Randall, 1993). Therefore, PP would be an ideal solution to this problem because its fish were maturing and can serve as females.

4.3. Impacts of communal spawning on N_e of $G1$ and implication on broodstock management

The N_e of $G1$ varied considerably with estimation methods. The infinite N_e obtained from the heterozygote excess method may associate with small samples of loci or individuals (Luikart and Cornuet, 1999). Therefore, only the N_e calculated by the LD method

was relatively reliable, despite having very low precision based on the empirical data (reviews by Wang, 2005).

The N_e of $G1$ was extremely low and was attributed to many factors including the low success rate of the mating (participation of only seven of 20 brooders), the un-equal sex ratio of parents (two females: five males), multiple paternity, the un-equal contributions of each parents and/or the differential selection on full-sibs. It was our concern that 28% of the offspring were un-assigned, given the large variation of family sizes; however, they were assigned to small families (with 1–5 individuals/family), this factor may not significantly reduce variation of family sizes. The similar impact of communal spawning was shown in a number of fish species. For example, reduction of N_e occurred in gilthead seabream (*Sparus auratus*) (Brown et al., 2005), barramundi (*Lates calcarifer*) (Frost et al., 2006), and Atlantic cod, (*Gadus morhua*) (Herlin et al., 2008), while Trippel et al. (2009) reported a smaller number of successful spawners relative to a census number and un-equal contribution of each parent in haddock, *Melanogrammus aeglefinus*, without emphasising N_e .

The recommendations for enhancing N_e regarding communal spawning were made according to each of the following factors: 1) low success rate of breeding *C. altivelis* in the present study implied lacking of spawning readiness of the majority of brooders; and 2) the maturation of gametes may be enhanced by suitable nutrition and environments (e.g., controlled temperature, photoperiod; Mylonas et al., 2010), and these factors were unknown for *C. altivelis* and the majority of grouper species. These shortcomings necessitate the study of reproductive biology of this species in order to obtain more successful artificial propagation.

Based on our limited data, the un-equal contributions of each parent were obvious and were most likely associated with male size (the biggest contribution was from the biggest male of 4.7 kg BW). The association of size and breeding success was reported in gilthead seabream (Brown et al., 2005), implying that using a broodstock of similar size within each sex may enhance equal contributions of *C. altivelis* brooders. Nonetheless, the skewed family representation in this study may partially be a result of selective mortality among full-sibs, which unfortunately could not be tested in our study.

In addition, hatchery practices such as grading of pooled family larvae and pooling of larvae from different spawning events (e.g., different nights in case of barramundi; Frost et al., 2006) enhanced skewness of family sizes and reduced N_e . Thus, further studies are recommended to evaluate the impacts of detailed hatchery practices in *C. altivelis* in order to establish guidelines for good hatchery practices that will promote an increase of N_e .

The presence of some un-assigned individuals may be attributable to various factors such as low resolution of markers, null alleles (Marshall et al., 1998; McGoldrick et al., 2000; Castro et al., 2004), contamination from other batch of offspring, and mutation (Brohede et al., 2002; Castro et al., 2004). It was unfortunate that Mendelian inheritance could not be tested in this study because of un-availability of the known offspring–parent samples. Therefore, the problems regarding null alleles and mutations could not be overlooked; however, discarding the two loci with null alleles did not improve the assignment rates.

Acknowledgments

This study was supported by two funding sources, the Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Thailand, and the Thailand Research Fund (the Senior Research Scholar Program 2007: project RTA 5080013 awarded to U. Na-Nakorn.) We thank Dr. Sirawut Klinbunga, National Centre for Biotechnology and Genetic Engineering, Thailand, for the assistance on parentage analysis, and Kittipong Korntongkam for sample collection.

References

- Agnèse, J., Otémé, Z.J., Gilles, S., 1995. Effects of domestication on genetic variability, fertility, survival and growth rate in a tropical siluriform: *Heterobranchus longifilis* Valenciennes 1840. *Aquaculture* 131, 197–204.
- Allendorf, F.W., 1986. Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. *Zool. Biol.* 5, 181–190.
- Allendorf, F.W., Luikart, G., 2007. Conservation and the Genetics of Populations. Blackwell Publishing, MA, USA.
- Allendorf, F.W., Phelps, S.R., 1980. Loss of genetic variation in a hatchery stock of cutthroat trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* 109, 537–543.
- Araki, H., Ardren, W.R., Olsen, E., Cooper, B., Blouin, M.S., 2007. Reproductive success of captive-bred steelhead trout in the wild: evaluation of three hatchery programs in the Hood River. *Conserv. Biol.* 21, 181–190.
- Archie, J.W., 1985. Statistical analysis of heterozygosity data: independent sample comparisons. *Evolution* 39, 623–637.
- Brohede, J., Primmer, C.R., Møller, A., Ellegren, H., 2002. Heterogeneity in the rate and pattern of germline mutation at individual microsatellite loci. *Nucleic Acids Res.* 30, 1997–2003.
- Brown, R.C., Woolliams, J.A., McAndrew, B.J., 2005. Factors influencing effective population size in commercial populations of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture* 247, 219–225.
- Brummett, R.E., Angoni, D.E., Poumogne, V., 2004. On-farm and on-station comparison of wild and domesticated Cameroonian populations of *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 242, 157–164.
- Castro, J., Bouza, C., Presa, P., Pino-Querido, A., Riaza, A., Ferreira, I., Sánchez, L., Martínez, P., 2004. Potential sources of error in parentage assessment of turbot (*Scophthalmus maximus*) using microsatellite loci. *Aquaculture* 242, 119–135.
- Cavalli-Sforza, L.L., Edwards, A.W., 1967. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *Am. J. Hum. Genet.* 19, 233–257.
- Cornuet, J.M., Luikart, G., 1997. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144, 2001–2014.
- Coughlan, J.P., Imsland, A.K., Galvin, P.T., Fitzgerald, R.D., Naevdal, G., Cross, T.F., 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.
- Edwards, K.J., Barker, J.H.A., Daly, A., Jones, C., Karp, A., 1996. Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. *Biotechniques* 20, 758–760.
- Falconer, D.S., Mackay, T.F.C., 1996. Introduction to Quantitative Genetics, Fourth edition. Longman, Essex.
- Felsenstein, J., 1993. PHYLIP (Phylogeny Interference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetic, University of Washington, Seattle, USA.
- Frankel, O.H., Soule, M.E., 1981. Conservation and Evolution. Cambridge University Press, Cambridge.
- Frost, L.A., Evans, B.S., Jerry, D.R., 2006. Loss of genetic diversity due to hatchery culture practices in barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture* 261, 1056–1064.
- Goudet, J., 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3) 2003. Available at <http://www2.unil.ch/izea/softwares>.
- Guo, S.W., Thompson, E.A., 1992. Performing the exact test of Hardy–Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics* 48, 361–372.
- Hara, M., Sekino, M., 2007. Genetic differences between hatchery stocks and natural populations in Pacific abalone (*Haliotis discus*) estimated using microsatellite DNA markers. *Mar. Biotechnol.* 9, 74–81.
- Hedrick, P.W., 1999. Genetics of Population, 2nd ed. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, Massachusetts.
- Heemstra, P.C., Randall, J.E., 1993. FAO species catalogue. Groupers of the World (Family Serranidae, Subfamily Epinephelinae). FAO Fisheries Synopsis No. 125. FAO, Rome.
- Herlin, M., Delghandi, M., Wesmajervi, M., Taggart, J.B., McAndrew, B.J., Penman, D.J., 2008. Analysis of the parental contribution to a group of fry from a single day of spawning from a commercial Atlantic cod (*Gadus morhua*) breeding tank. *Aquaculture* 274, 218–224.
- Hochberg, Y., 1988. A sharper Bonferroni procedure for multiple tests of significance. *Biometrika* 75, 800–802.
- Horreo, J.L., Machado-Schiaffino, G., Griffiths, A., Bright, D., Stevens, J., Carcia-Vazquez, E., 2008. Identification of differential broodstock contribution affecting genetic variability in hatchery stocks of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 280, 89–93.
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L., Marshall, T.C., 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* 16, 1099–1106.
- Koedprang, W., Na-Nakorn, U., Nakajima, M., Taniguchi, N., 2007. Evaluation of genetic diversity of eight grouper species *Epinephelus* spp. based on microsatellite variations. *Fish. Sci.* 73, 227–236.
- Koljonen, M.L., Tähtinen, J., Säisä, M., Koskineniemi, J., 2002. Maintenance of genetic diversity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) by captive breeding programmes and the geographic distribution of microsatellite variation. *Aquaculture* 212, 69–92.
- Kononov, D.A., Manning, C., Henshaw, M.T., 2004. KINGROUP: a program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers. *Mol. Ecol. Notes* 4, 779–782.
- Koyama, T., Nagata, M., Miyakoshi, Y., Hayano, H., Irvine, J.R., 2007. Altered smolt timing for masu salmon *Oncorhynchus masou* resulting from domestication. *Aquaculture* 273, 246–249.
- Li, Q., Park, C., Endo, T., Kijima, A., 2004. Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery stocks of the Pacific abalone (*Haliotis discus*). *Aquaculture* 235, 207–222.
- Li, Y., Wongprasert, K., Shekhar, M., Ryan, J., Dierens, L., Meadows, J., Preston, N., Coman, G., Lyons, R.E., 2007. Development of two microsatellite multiplex systems for black tiger shrimp *Penaeus monodon* and its application in genetic diversity study for two populations. *Aquaculture* 266, 279–288.
- Liu, Z.J., Cordes, J.F., 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238, 1–37.
- Lo, L.C., Yue, G.H., 2007. Microsatellites for broodstock management of the Tiger grouper, *Epinephelus fuscoguttatus*. *Anim. Genet.* 39, 90–91.
- Luan, S., Kong, J., Wang, Q.Y., 2006. Genetic variation of wild and cultured populations of the Kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* (Bate 1888) using microsatellites. *Aquacult. Res.* 37, 785–792.
- Luikart, G., Cornuet, J., 1999. Estimating the effective number of breeders from heterozygote excess in progeny. *Genetics* 151, 1211–1216.
- Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L.E.B., Pemberton, J.M., 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* 7, 639–655.
- McGoldrick, D.J., Hedgecock, D., English, L.J., Baoprasertkul, P., Ward, R.D., 2000. The transmission of microsatellite alleles in Australian and North American stocks of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): selection and null alleles. *J. Shellfish Res.* 19, 779–788.
- Miller, M.P., 1997. Tools for Population Genetic Analyses (TPPGA) version 1.3. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Arizona.
- Mylonas, C.C., Fostier, A., Zanuy, S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 516–534.
- Na-Nakorn, U., Moeikun, T., 2009. Genetic diversity of domesticated stocks of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage 1878), in Thailand: relevance to broodstock management regimes. *Aquaculture* 297, 70–77.
- Navarro, A., Badilla, R., Zamorana, M.J., Pasamontes, V., Hildebrandt, S., Sánchez, J.J., Afonso, J.M., 2008. Development of two new microsatellite multiplex PCRs for three sparid species: gilthead seabream (*Sparus auratus* L.), red porgy (*Pagrus pagrus* L.) and redbanded seabream (*P. auriga*, Valenciennes, 1843) and their application to paternity studies. *Aquaculture* 285, 30–37.
- Neff, B.D., Fu, P., Gross, M.R., 2000. Microsatellite multiplexing in fish. *Trans. Am. Fish. Soc.* 129, 584–593.
- Nugroho, E., Takagi, M., Sugama, K., Taniguchi, N., 1998. Detection of GT repeats microsatellite loci and their polymorphism for grouper of the genus *Epinephelus*. *Fish. Sci.* 64 (5), 836–837.
- O'Connell, M., Wright, J.M., 1997. Microsatellite DNA in fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.* 7, 331–363.
- Peel, D., Ovenden, J.R., Peel, S.L., 2004. *N_e Estimator: Software for Estimating Effective Population Size*, version 1.3. Queensland government, Department of Primary Industries and Fisheries.
- Peterson, D.P., Ardren, W.R., 2009. Ancestry, population structure, and conservation genetics of Arctic grayling (*Thymallus arcticus*) in the upper Missouri River, USA. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 66 (10), 1758–1774.
- Peterson, J.L., Ibarra, A.M., Ramirez, J.L., May, B., 2008. An induced mass spawn of the hermaphroditic Lion-paw scallop, *Nodipecten subnodosus*: genetic assignment of maternal and paternal parentage. *J. Hered.* 99 (4), 337–348.
- Ramirez, M.A., Patricia-Acevedo, J., Planas, S., Carlin, J.L., Funk, S.M., McMillan, W.O., 2006. New microsatellite resources for groupers (Serranidae). *Mol. Ecol. Notes* 6, 813–817.
- Rice, W.R., 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43, 223–225.
- Rousset, F., 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.* 8, 103–106.
- Rozen, S., Skaletsky, H.J., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S., Misener, S. (Eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 365–386.
- Sadovy, Y., Thierry, C., Choat, J.H., Cabanban, A.S., 2008. *Cromileptes altivelis*. IUCN 2009. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.2. <<http://www.iucnredlist.org>>. Downloaded on 08 January 2010.
- Sekino, M., Hara, M., Taniguchi, N., 2002. Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 213, 101–122.
- Simmon, 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* 252, 133–146.
- Taggart, J.B., Hynes, R.A., Prodöhl, P.A., Ferguson, A., 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *J. Fish Biol.* 40, 963–965.
- Tang, H.C., Twu, J.Y., Su, W.C., 1979. Experiment on artificial propagation of the high-finned grouper, *Cromileptes altivelis*. *China Fish. Mon.* 324, 25–31.
- Trippel, E.A., Rideout, R.M., O'Reilly, P.T., Herbinger, C.M., Neil, S.R.E., Hamilton, L., 2009. Communal spawning leads to high potential for inbreeding in gadoid aquaculture. *Aquaculture* 296, 27–35.
- Wang, J., 2005. Estimation of effective population sizes from data on genetic markers. *Philos. Trans. R. Soc. B* 360, 1395–1409.
- Williams, K.C., Smith, D.M., Williams, I.H., Irvin, S.J., Barclay, M., 2005. ACIAR grouper grow-out feeds program and related CSIRO research. *Aquaculture Asia Magazine* January–March, 29–33. <http://www.fao.org/fishery/sidp/3,1/en>.
- Yeh, F.C., Boyle, T., 1999. POPGENE, version 1.32. The User Friendly Software for Population Analysis. University of Alberta and CIFOR, Edmonton.
- Zeng, H., Ding, S., Wang, J., Su, Y., 2008. Characterization of eight polymorphic microsatellite loci for the giant grouper (*Epinephelus lanceolatus* Bloch). *Mol. Ecol. Resour.* 8, 805–807.
- Zhao, L., Shao, C., Liao, X., Ma, H., Zhu, X., Chen, S., 2009. Twelve novel polymorphic microsatellite loci for the Yellow grouper (*Epinephelus awoara*) and cross-species amplifications. *Conserv. Genet.* 10, 743–745.
- Zhu, Z.Y., Lo, L.C., Lin, G., Xu, Y.X., Yue, G.H., 2005. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites from red coral grouper (*Plectropomus maculatus*). *Mol. Ecol. Notes* 5, 579–581.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aqua-onlineDNA microsatellite-based evaluation of early growth performance among strains of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* de ManThuchapol Karaket^a, Supawadee Poompuang^{a,*}, Uthairat Na-Nakorn^a,
Wongpathom Kamonrat^b, Eric M. Hallerman^c^a Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand^b Inland Fisheries Resources Research and Development Institute, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperative, Bangkok, 10903, Thailand^c Department of Fisheries and Wildlife Sciences, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA 24061, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 May 2010

Received in revised form 18 November 2010

Accepted 27 November 2010

Available online 2 December 2010

Keywords:

Assignment test

Freshwater prawn

Macrobrachium rosenbergii

Microsatellites

Strain evaluation

ABSTRACT

Microsatellite DNA markers were used to assess early growth performance among different strains of freshwater prawn under separate and communal rearing conditions. Two-hundred-and-twenty broodstock individuals from three prawn strains were collected and used as baseline populations for assignment tests. The exclusion-simulation approach was performed on different sets of one to seven microsatellite loci to determine the power of the assignment test. High accuracy of the test was obtained by using seven loci, with 90% correct assignment of individuals ($P < 0.05$). Simulations suggested that the use of four loci would substantially reduce the number of genotypes needed and the associated cost of genotyping while maintaining high assignment scores (88%, $P < 0.05$). The power of the assignment test was highly dependent on the degree of population differentiation (F_{ST}). Results of this study demonstrated that an assignment score of 100% was obtained when $F_{ST} > 0.1$. Post-larvae of the three baseline populations – including a commercial strain of foreign origin, a local hatchery strain and a wild population – were stocked in separate and communal tanks and cultured for 120 days. Significant differences in growth were observed among strains in both separate and communal rearing, with the commercial strain outperforming the hatchery populations. While communal rearing was proven an effective technique for comparing the growth of juvenile fishes, the approach may not be applicable for comparing the survival of juvenile prawns due to their cannibalistic nature.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The culture of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* has been established in Thailand for nearly 40 years. In 2008, Thailand was ranked the second major producer of freshwater prawn behind China (FAO, 2010). During the past several years, the rising demand for domestic consumption and export markets has led to rapid expansion of the industry, with production increasing from 2200 t in 1997 to 28,500 t in 2008 (FAO, 2010) and the total culture area increasing from 2200 ha in 1998 to 15,540 ha in 2007 (Department of Fisheries, 2007). Eighty percent of the prawn production was from the major farming area situated in the southwest of the ChaoPhraya Basin in central Thailand. Despite the expansion of the culture areas, inconsistent and low levels of production have been a major concern among prawn farmers. The genetic deterioration of prawn broodstocks was suggested as a probable cause of the declining yields (Chareontawee et al., 2007). To overcome the problem of low

production, efforts have been made to upgrade the existing broodstocks and to acquire a new stock to initiate the breeding program. Selection of the best strains is the first priority for ensuring high production and profitability of prawn farming. However, despite the importance of the strain selection, little or no research has been conducted to compare the performance of freshwater prawn strains in Thailand.

Strain evaluations are conducted to assess the performance of different genetic groups raised under common conditions and to determine the effects of genotype-by-environment ($G \times E$) interactions (Falconer and Mackay, 1996). Strain selection has become an integral part of the broodstock domestication and selective breeding programs. Many studies indicate that the accuracy of the strain evaluation depends on the variation of environmental factors, particularly on tank or pond conditions, which can have large effects on the expression of growth traits (Herbinger et al., 1999). Therefore, it is important to minimize the influence of confounding environmental effects by stocking animals in the same tanks or ponds. Wohlfarth and Moav (1985) introduced communal rearing as a technique to provide a common environment for strain evaluation of the common carp *Cyprinus carpio*. Communal rearing can reduce the

* Corresponding author. Tel.: +66 2 5792924; fax: +66 2 5613984.

E-mail address: supawadee.p@ku.ac.th (S. Poompuang).

cost of replicate ponds and was found to enhance the expression of phenotypic differences among strains of the common carp and other species such as channel catfish and tilapia (Tave, 2003).

In classical communal rearing, the animals are physically marked using external or internal tags to identify their strain or family of origin. However, for crustaceans, external tagging is inefficient due to tag loss during molting (Menasveta et al., 1994). Although several types of internal tags, e.g., elastomer dyes and passive integrated transponders, are available for crustaceans, their use is limited to juvenile and adult individuals, as demonstrated in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Godin et al., 1996), lobster *Homarus gammarus* (Linnane and Mercer, 1998) and crayfish *Cherax destructor* (Jerry et al., 2001). It is impractical to tag the animals at early life stages such as post-larvae (Arce et al., 2003; Jørstad et al., 2005). Microsatellite DNA polymorphisms have been used as genetic markers to eliminate the problems posed by physical tagging of early life stages of animals. Applications have been reported in many selective breeding programs for fish and shellfish. For example, microsatellites were used to establish the pedigrees of mixed families of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Herbinger et al., 1995) and Atlantic salmon *Salmo salar* (Herbinger et al., 1999; Norris et al., 2000), to estimate the heritability in the common carp *C. carpio* (Vandeputte et al., 2004), to assess the performance of the European lobster *H. gammarus* broodstocks (Jørstad et al., 2005), and to assign parentage relationship in the Kuruma shrimp *Penaeus japonicus* (Jerry et al., 2004) and tiger shrimp *P. monodon* (Jerry et al., 2006).

This study was designed to compare the growth and survival of post-larvae and juveniles among the three prawn strains that are widely cultured in the farming areas in central Thailand. The strain evaluation was performed under both separate and communal rearing conditions. Moreover, we examined the potential use of the microsatellite markers for the strain identification of prawn individuals in communal tanks. These microsatellites were developed for the genetic investigation of freshwater prawn in our previous study (Chareontawee et al., 2006). The results of this study will provide useful information on the expression of performance traits, which are critical for the nursery period of prawn farming.

2. Materials and methods

2.1. Nursing of prawn larvae

Post-larval prawn (PL30) of similar ages and sizes of the three strains were obtained from private hatcheries, including the CPP strain from Petchaburi province, the KSB strain from Supanburi province, and the SKL strain from a local hatchery in Nakorn Prathom province. The average body mass was 0.0087, 0.0077, and 0.0076 g for individuals of the CPP, KSB, and SKL strains, respectively. Prior to stocking in experimental tanks, the post-larvae were nursed separately for 30 days in 3000-l fiber glass tanks. Thereafter, 100 post-larvae from each strain were measured to determine average total length, carapace length and body weight. During the experiment, post-larvae were fed fresh *Artemia* nauplii and an artificial diet twice a day.

2.2. Experimental design

After 30 days of nursing, the post-larvae of each stock were randomly separated into two groups for communal and separate rearing experiments and stocked at a density of 100/m² in twelve concrete tanks (3 × 2 × 0.6 m). A plastic mosquito mesh was fixed vertically at the middle of each tank to increase the holding capacity. For communal rearing, 200 post-larvae from each strain were stocked together in each of the three concrete tanks. For separate rearing, 600 post-larvae from each strain were stocked in three single-strain tanks. Fifty percent of the water in the tanks was changed daily. Post-larvae

and juveniles in the single-strain tanks were sampled every four weeks to determine the growth and survival rates. In the communal-rearing tanks, growth was measured at the completion of the study (after 120 days). All remaining juveniles were collected and stored in individual tubes containing 99% ethanol for subsequent DNA extraction and microsatellite genotyping. The survival rates for each strain were calculated after the strain identification. Both communal and separate stocking experiments were conducted in the same greenhouse at Kamphaengsaen Fishery Research Station, Kasetsart University, Nakorn Pathom Province.

2.3. Statistical analysis

A two-factorial design was used to evaluate the results for the communal stocking experiment. The statistical model is as follows:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + S_j + TS_{ij} + e_{ijk}, \quad (1)$$

where Y_{ijk} , μ , T_i , S_j , and e_{ijk} are the record for the k th progeny, a common mean, the effect of the i th experimental tank, the effect of the j th strain, the effect of the ij th tank–strain interaction and the uncontrolled environmental and genetic deviation, respectively.

A nested design was used to evaluate the results for separate stocking, with the strain treated as a fixed effect and the tank nested within the strain as a random effect. The statistical model is as follows:

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + T_{(ij)} + e_{ijk}, \quad (2)$$

where Y_{ij} , μ , S_i , $T_{(ij)}$ and e_{ij} are the record of the j th progeny, a common mean, the effect of the i th strain, the effect of the j th tank which was nested in the i th strain and the uncontrolled environmental and genetic deviation, respectively.

The mean and standard error were estimated for all parameters (survival rate, body weight, body length and carapace length) for each strain and subjected to the one-way analysis of variance using the software package SAS (SAS Institute, 2003) to determine significant differences ($P < 0.05$) among strain means. The multiple comparison by Duncan's new multiple range test ($\alpha = 0.05$) was used to compare the means of survival and growth traits between the pairs of strains.

2.4. Microsatellite DNA genotyping

Swimmeret tissues of the prawn broodstock and the surviving 4-month old juvenile prawns in the communal rearing experiment were utilized for DNA extraction using a standard phenol-chloroform extraction procedure (Taggart et al., 1992). Samples of the prawn broodstock were genotyped at seven microsatellite loci (*Mbr-1*, *Mbr-2*, *Mbr-3*, *Mbr-5*, *Mbr-7*, *Mbr-8*, and *Mbr-10* with GenBank accession numbers DQ019863, DQ019864, DQ019865, DQ019867, DQ019869, DQ019870 and DQ019871, respectively) using the PCR conditions described by Chareontawee et al. (2006). The PCR reactions were performed in 15- μ l reactions which contained 10 ng template DNA, 0.3 μ M forward and reverse primers, 0.2 mM each dNTP, 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris–HCl (pH 9.0), 0.1% Triton X-100, and 1 unit of Taq DNA polymerase (Promega). The PCR profile was the initial denaturation at 94 °C for 3 min; 35 cycles of: 94 °C for 30 s, annealing temperature for 45 s, and 72 °C for 1 min; and 1 cycle of 72 °C for 7 min. Following the amplification, PCR products were mixed with 2.5 μ l of sequencing dye and heated for 5 min at 95 °C. The reaction mixtures were subjected to electrophoresis on a 5.5% denaturing polyacrylamide gel at 80 W for 3 h. The gel was denatured at 100 °C for 30 min before electrophoresis. Bands in the gel were visualized by silver staining. Allele sizes were estimated by comparison to an M13 sequence ladder.

Table 1

Genetic variability at seven microsatellite loci in three prawn strains, including sample size (*N*), total number of alleles (*A*), allelic richness (*A_r*), observed heterozygosity (*H_o*), expected heterozygosity (*H_e*), fixation index (*F_{is}*), and *P* value for test of Hardy–Weinberg expectations (HW). Bonferroni correction: *P* < 0.0071 (0.05/7).

Population (<i>N</i>)	Locus							Average across loci
	<i>Mbr-1</i>	<i>Mbr-2</i>	<i>Mbr-3</i>	<i>Mbr-5</i>	<i>Mbr-7</i>	<i>Mbr-8</i>	<i>Mbr-10</i>	
<i>CPP (95)</i>								
<i>A</i>	10	12	10	15	3	5	4	8.43 ± 4.5
<i>A_r</i>	9.4	9.96	9.12	11.74	2.99	5.00	3.99	7.46 ± 3.4
<i>H_o</i>	0.74	0.79	0.75	0.86	0.48	0.98	0.68	0.75 ± 0.16
<i>H_e</i>	0.81	0.78	0.81	0.81	0.45	0.74	0.69	0.71 ± 0.13
<i>F_{is}</i>	0.12	−0.008	0.104	−0.025	−0.079	−0.25	0.007	−0.017
HW	0.000	0.017	0.000	0.008	0.031	0.000	0.007	Highly sig.
<i>KSB (59)</i>								
<i>A</i>	18	12	19	20	6	5	8	12.57 ± 6.4
<i>A_r</i>	18.00	11.41	18.04	17.48	5.28	4.94	7.53	11.81 ± 6.0
<i>H_o</i>	0.85	0.74	0.81	0.88	0.42	0.60	0.81	0.73 ± 0.16
<i>H_e</i>	0.91	0.78	0.89	0.90	0.45	0.62	0.79	0.76 ± 0.17
<i>F_{is}</i>	0.091	0.091	0.112	0.022	0.139	0.107	0.010	0.077
HW	0.002	0.151	0.038	0.028	0.356	0.390	0.582	0.0003
<i>SKL (66)</i>								
<i>A</i>	16	17	26	20	6	7	11	14.71 ± 6.67
<i>A_r</i>	15.12	13.91	22.90	16.82	5.34	5.94	8.86	12.7 ± 6.3
<i>H_o</i>	0.98	0.75	0.96	0.95	0.70	0.50	0.75	0.79 ± 0.16
<i>H_e</i>	0.92	0.83	0.95	0.92	0.64	0.51	0.81	0.80 ± 0.15
<i>F_{is}</i>	−0.056	0.101	−0.006	−0.037	−0.094	0.038	0.065	0.001
HW	0.064	0.001	0.362	0.811	0.074	0.393	0.099	0.003

2.5. Genetic data analysis

The program MICRO-CHECKER version 2.2.0 (van Oosterhout et al., 2004) was used to test for the presence of the null alleles. Metrics of genetic variation within each of three strains – including mean number of alleles per locus (*A*), allelic richness (*A_r*), and observed (*H_o*) and expected (*H_e*) heterozygosities – were calculated using GENEPOP version 3.1c (Raymond and Rousset, 1995). Hardy–Weinberg expectations were tested by the exact *P* values and calculated by a Markov chain randomization method (Guo and Thompson, 1992) using GENEPOP version 3.1c. The TFPGA program (Miller, 1997) was used to calculate pair-wise *F_{ST}* values and *p*-values between all pairs of strains. The prawn samples of Myanmar origin (MYN) from the previous study by Chareontawee et al. (2007) was used as a reference population.

The assignment tests of the prawn individuals based on the multi-locus genotypes at seven loci were carried out on a total of 220 broodstock individuals from the three strains, which were used as the baseline populations. We utilized two contrasting assignment methods, a direct method and a simulation–exclusion method. Both assignment algorithms calculated a likelihood probability of an individual belonging to each of the possible source populations. The direct method originally developed by Paetkau et al. (1995) assigns the individual to the population of origin in which it has the highest likelihood of belonging compared to the likelihood that it is assigned to other populations, without providing confidence levels. The simulation–exclusion approach developed by Cornuet et al. (1999) determines the proportion of the correct assignment at user-defined threshold levels of significance. In this approach, up to 10,000 genotypes are generated based on the allele frequencies of the populations tested to obtain the expected distribution of the genotypes and the distribution of genotype likelihood values (Piry et al., 2004). The likelihood of a particular genotype belonging to a particular source population is compared with the distribution of likelihoods of the simulated genotypes. If the value is below a certain threshold level, the individual is excluded from that sample. In the present study, GENECLASS2 (Piry et al., 2004) was used to calculate the probability of belonging of individuals based on a Bayesian approach. Both direct and simulation–exclusion methods were performed among the three freshwater prawn strains and between the pairs of strains. In addition,

the assignment tests were carried out using different sets of microsatellite loci, ranging from one to seven loci in order to determine the number of loci needed to optimize between the genotyping cost and the power of the test. The genotype data from the prawn broodstock were used as the reference populations for the assignment of individual progeny in the communal rearing tanks. For each individual, the most likely strain of origin was determined based on the likelihood value and the score of an individual. The genetic diversity within each of the assigned strains was calculated using GENEPOP version 3.1c. The same program was used to test for deviations from Hardy–Weinberg expectations.

3. Results

3.1. Genetic variation among and within stocks

A total of 220 prawn broodstock (CPP = 95, KSB = 59, and SKL = 66) were genotyped at seven microsatellite loci (Table 1). All three prawn stocks exhibited relatively high genetic variation, with the average numbers of alleles per locus of 8.4, 12.6 and 14.7, and observed heterozygosities of 0.75, 0.73, and 0.79 for the CPP, KSB, and SKL strains, respectively. Null alleles were present at loci *Mbr-1* and *Mbr-3* in the CPP. The CPP stock showed significant departures from Hardy–Weinberg at three loci after applying a sequential Bonferroni correction. The overall estimate of *F_{ST}* (0.076) indicated statistically significant levels of differentiation among stocks. Significant pairwise *F_{ST}* values were observed for all strain comparisons (*P* < 0.05, Table 2). With the exception of the MYN stock (the out-group), the highest

Table 2

Genetic distance (below diagonal) and pair-wise *F_{ST}* (above diagonal) with *P* values among three prawn populations (CPP, KSB, and SKL). MYN is used as a reference population. Asterisk indicates significant differentiation (*P* < 0.05).

Population	CPP	KSB	SKL	MYN
CPP	–	0.093*	0.116*	0.154*
KSB	0.065	–	0.027*	0.155*
SKL	0.073	0.024	–	0.129*
MYN	0.122	0.125	0.110	–

Table 3

Strain assignment test results, showing the proportion of correct assignment of individuals using the Paetkau et al. (1995) direct (real assigned) method or the Cornuet et al. (1999) exclusion-simulation method with the probability of belonging to a population, based on seven (four) microsatellite loci. The overall F_{ST} values are 0.07 for seven loci and 0.08 for four loci.

Strain (N)	Direct (real assigned)	Correctly assigned (simulated)		
		P<0.05	P<0.01	P<0.001
Assignment for each strain				
CPP (95)	100 (100)	96.8 (97.9)	95.8 (97.9)	95.8 (97.9)
KSB (59)	98.3 (98.3)	76.3 (83.1)	74.6 (81.4)	74.6 (81.4)
SKL (66)	98.5 (92.4)	90.9 (83.3)	90.9 (83.3)	89.4 (83.3)
Total	99.2 (97.3)	89.5 (89.6)	88.6 (89.1)	88.2 (89.1)
Assignment between two strains				
CPP-KSB	100 (100)	100 (98.7)	98.7 (98.7)	98.7 (98.7)
CPP-SKL	100 (100)	98.7 (100)	98.7 (100)	98.7 (100)
KSB-SKL	98.4 (95.2)	84.8 (83.2)	84.0 (82.4)	83.2 (81.6)

genetic differentiation was observed between the CPP and the SKL stocks ($F_{ST} = 0.12$). When using the genotype data at four loci (*Mbr-1*, *Mbr-2*, *Mbr-3*, and *Mbr-5*), an overall F_{ST} value of 0.081 was obtained.

3.2. Assignment test results

The assignment test results are shown in Table 3. The Paetkau et al. (1995) direct method assigned 98 to 100% of the individual prawns to their correct strain of origin. Fig. 1 shows the plots of the log-likelihoods between the pairs of strains for direct assignment. For example, all 95 individuals of the CPP had higher values of the log-likelihood of assignment to the CPP than to the KSB. Similarly, between the CPP and SKL, 100% of the CPP individuals were assigned to their correct strain of origin, while between the KSB and SKL strains, the direct method assigned 98.4% of the prawn to the KSB strain. One of the 59 KSB individuals exhibited higher log-likelihood of assignment to the SKL than to the KSB. When the confidence levels were defined using the Cornuet et al. (1999) exclusion method, the overall proportions of correct individual assignment decreased from 90 to 88% at P -values < 0.05 , 0.01 , and 0.001 . The accuracy of the individual assignment using a P -value of 0.05 was highest for the CPP (96.8%), followed by the SKL (91%) and KSB (76.3%) strains. Because the PCR products were not amplified for some of the KSB samples, approximately 9.4% of the KSB genotypes were treated as missing data. The adjustment of allele frequencies due to the missing data reduced the power of the assignment test for this strain (data not shown). In addition, to detect genotyping errors due to slippage during PCR-

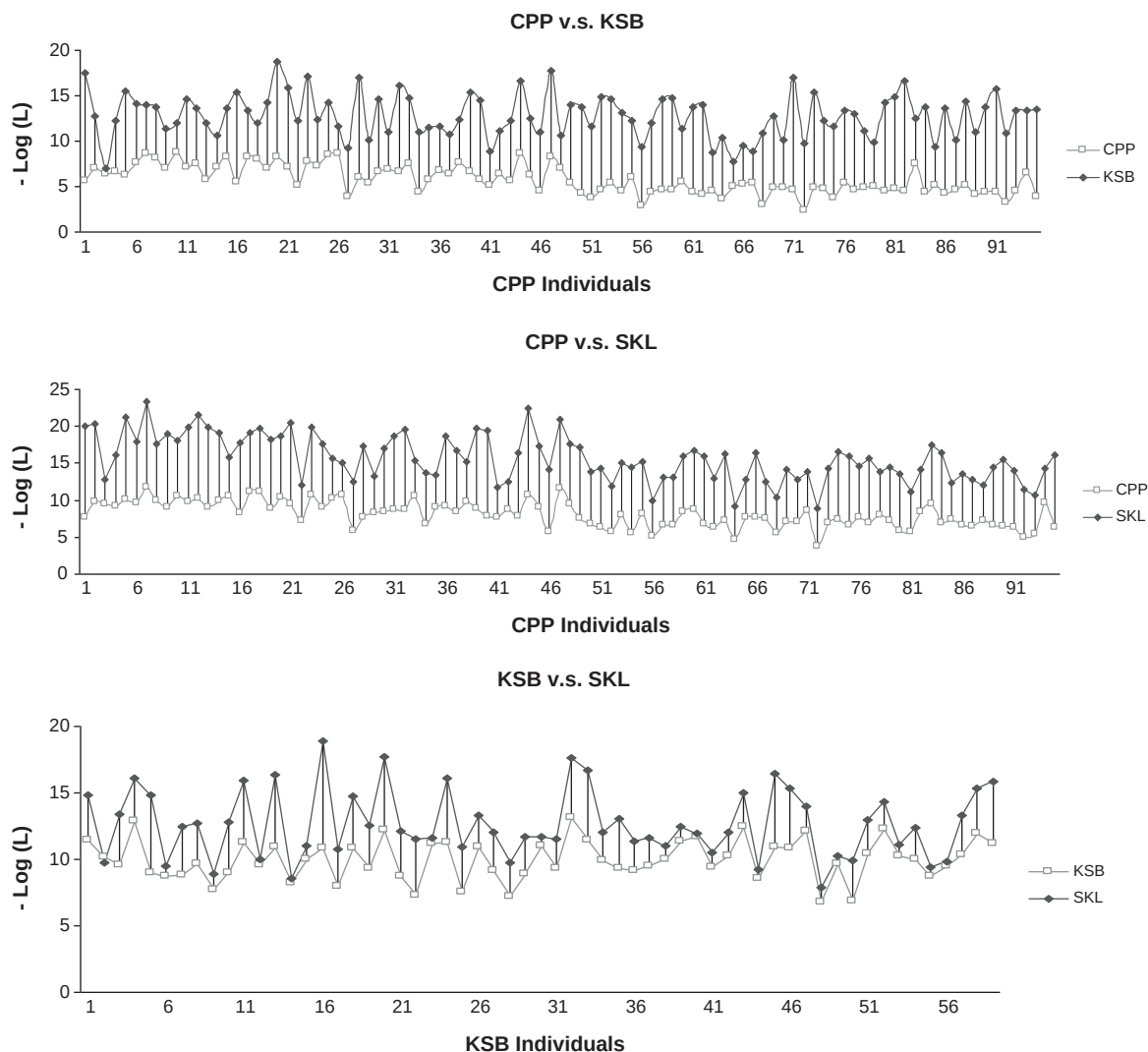


Fig. 1. Individual log likelihood, $-\log(L)$ for the direct assignment based on seven loci: between CPP and KSB, between CPP and SKL, and between KSB and SKL strains of giant freshwater prawn.

Table 4

Genetic variability at four microsatellite loci in three prawn strains from a communal rearing experiment, including sample size (*N*), total number of alleles (*A*), allelic richness (*A_r*), observed heterozygosity (*H_o*), expected heterozygosity (*H_e*), fixation index (*F_{is}*), and *P* value for test of Hardy–Weinberg expectations (HW). Bonferroni correction: $P < 0.0125$ (0.05/4).

Population (N)	Locus				Average across loci
	<i>Mbr-1</i>	<i>Mbr-2</i>	<i>Mbr-3</i>	<i>Mbr-5</i>	
<i>CPP (428)</i>					
<i>A</i>	10	10	10	15	11.25 ± 2.5
<i>A_r</i>	9.28	9.67	9.09	11.3	9.84 ± 1.01
<i>H_o</i>	0.75	0.79	0.78	0.86	0.79 ± 0.05
<i>H_e</i>	0.84	0.78	0.84	0.84	0.83 ± 0.03
<i>F_{is}</i>	0.107	−0.008	0.075	−0.025	0.038
HW	0	0.07	0	0.007	Highly sig.
<i>KSB (446)</i>					
<i>A</i>	10	11	18	20	15.25 ± 3.59
<i>A_r</i>	9.52	10.62	16.76	16.65	13.47 ± 3.66
<i>H_o</i>	0.93	0.92	0.93	0.88	0.92 ± 0.07
<i>H_e</i>	0.88	0.88	0.92	0.90	0.89 ± 0.05
<i>F_{is}</i>	−0.02	−0.016	−0.012	0.022	−0.004
HW	0.01	0.02	0.3025	0.008	0.008
<i>SKL (492)</i>					
<i>A</i>	13	15	26	20	18.50 ± 5.8
<i>A_r</i>	12.81	13.88	22.33	18.51	16.90 ± 4.37
<i>H_o</i>	0.96	0.92	0.91	0.87	0.93 ± 0.06
<i>H_e</i>	0.92	0.88	0.94	0.92	0.91 ± 0.03
<i>F_{is}</i>	−0.057	−0.101	0.006	0.007	−0.02
HW	0.042	0.009	0.265	0.03	0.0146

amplification, repeated genotyping of some individuals was performed on the automated DNA sequencer (data not shown).

The assignment tests between the pairs of strains revealed that using the exclusion method with a *P*-value of 0.05, 100% correct assignment was obtained between CPP and KSB, followed by 98.7% between CPP and SKL, and 84.8% between KSB and SKL strains (Table 3). The assignment accuracy for each pair of strains varied slightly when using *P*-values of 0.01 and 0.001.

To optimize the trade-off between the cost of genotyping and the assignment power, simulations were performed for 127 sets of marker combinations. The assignment test results indicated that using a set of four loci (*Mbr-1*, *Mbr-2*, *Mbr-3*, and *Mbr-5*), the accuracy of the test was comparable to that using seven loci (Table 3). Therefore, this set of four loci was used for the genotyping prawn individuals in the communal rearing experiment. Of 1383 surviving juvenile prawns, 17 were unidentified due to low DNA concentrations, while 428, 446 and 492 individuals were assigned to the CPP, KSB and SKL strains, respectively. Each individual was assigned to the most likely strain of origin, with the highest values of the likelihood and score for that strain (data available upon request). For example, an unknown individual was assigned to the CPP strain with a likelihood value of −4.9 and a score of 95.9%, in comparison with the log-likelihoods of

Table 5

Mean body weight (BW), mean total length (TL), and mean carapace length (CL) of three prawn strains after 120 days of separate rearing, with ANOVA results showing *F*-values for differences among strains and tanks. Asterisk indicates significant difference ($P < 0.05$).

Strain	Mean BW ± SD (g)	Mean TL ± SD (mm)	Mean CL ± SD (mm)
CPP	6.75 ± 2.93 ^a	85.01 ± 11.05 ^a	42.12 ± 5.76 ^a
KSB	5.43 ± 3.91 ^b	80.23 ± 14.11 ^b	39.19 ± 7.73 ^b
SKL	4.13 ± 3.10 ^c	72.91 ± 14.44 ^c	35.07 ± 8.06 ^c
ANOVA			
<i>F</i> -value (strain)	26.41*	64.03*	63.07*
<i>P</i> -value	0.0011	<0.0001	<0.0001
<i>F</i> -value (tank)	2.08	0.99	1.13
<i>P</i> -value	0.05	0.43	0.34

Table 6

Mean body weight (BW), mean total length (TL) and mean carapace length (CL) of juveniles of three prawn strains after 120 days of communal rearing, with ANOVA results showing *F*-values among tanks, strains and tank–strain interaction. Asterisk indicates significant difference ($P < 0.05$).

Strain	Mean BW ± SD (g)	Mean TL ± SD (mm)	Mean CL ± SD (mm)
CPP	7.66 ± 5.16 ^a	86.66 ± 18.03 ^a	41.86 ± 9.71 ^a
KSB	5.27 ± 3.29 ^b	78.33 ± 26.28 ^b	37.71 ± 8.97 ^b
SKL	5.10 ± 3.58 ^b	76.77 ± 39.93 ^b	36.47 ± 9.53 ^b
ANOVA			
<i>F</i> -value (tank)	0.17	0.76	0.45
<i>P</i> -value	0.84	0.47	0.64
<i>F</i> -value (strain)	14.59*	9.25*	26.55*
<i>P</i> -value	<0.0001	0.0001	<0.0001
<i>F</i> -value (tank–strain)	1.78	0.7	1.88
<i>P</i> -value	0.13	0.59	0.11

−6.3 and −7.5 and scores of 3.8% and 0.3% for the assignment to the KSB and SKL strains, respectively.

The genetic variation at four loci of the three assigned strains from the communal rearing experiment is shown in Table 4. All three prawn stocks exhibited relatively high genetic variation, with average numbers of alleles per locus of 11.2, 15.2 and 18.5, and observed heterozygosities of 0.79, 0.92, and 0.93 for the CPP, KSB, and SKL strains, respectively.

3.3. Growth and survival of juveniles

In a separate testing, the average daily growth (ADG), body weight (BW), carapace length (CL) and total length (TL) of 4-month old juveniles differed significantly among strains ($P < 0.05$), with the CPP strain displaying the highest values for all characters (Table 5, Fig. 1). For example, body weights of CPP, KSB, and SKL individuals at 120 days were 6.75 ± 2.93 , 5.43 ± 3.19 , and 4.13 ± 3.10 g, respectively. Tank effects were not significant in the separate rearing experiment. Survival rates were considered low to moderate for the three strains, at 71, 50.6, and 76%, respectively, for the CPP, KSB, and SKL strains. However, testing for strain and tank effects on survival among strains was not possible in the nested design. In communal testing, a total of 1366 surviving juvenile prawns, including 428 CPP, 446 KSB and 492 SKL individuals, were measured. Similar to the results of the separate rearing experiment, the CPP stock exhibited the highest values for growth parameters (Table 6). For example, the mean body weights of CPP, KSB, and SKL individuals at 120 days were 7.66 ± 5.16 , 5.27 ± 3.29 , and 5.10 ± 3.58 g, respectively. Although differences in growth were observed within the strains of juvenile prawns between the two tests, the ranking of strains was the same for separate and communal rearing. Tank effects and strain–tank interaction were not significant in communal stocking. The survival rates of the CPP strain (71.3%) in the communal tanks did not differ from those in separate tanks, but the survival rates of the KSB (74.3%), and SKL (82%) strains in the communal tanks were higher than those in the separate rearing (Fig. 2).

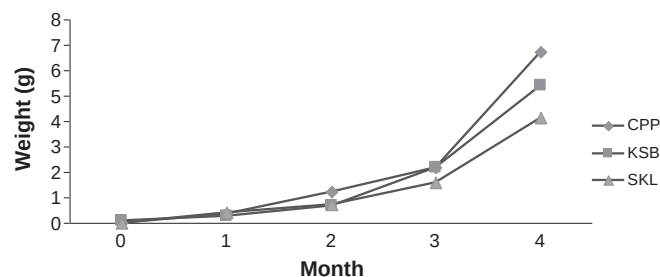


Fig. 2. Average daily growth rate among three prawn strains reared in separate tanks for 120 days.

4. Discussion

4.1. Genetic diversity of freshwater prawn

Assessing the genetic diversity of wild and cultured stocks and strain evaluation have become common practices in the selective breeding of aquaculture species. The genetic characterization is important because it reflects the genetic makeup and history of domestication of a particular strain. Although the issue of association between the genetic variation at neutral marker loci and the variation of quantitative traits remains controversial (Reed and Frankham, 2001), the analyzed data for 20 species – including plants, invertebrates and vertebrates – indicated positive correlation of the quantitative trait variation and the neutral marker divergence (Merila and Crnokrak, 2001). The genetic improvement of the prawn strains is still at an early stage compared to that for the domesticated fish species (Bart and Yen, 2003; Nhan et al., 2009; Kitcharoen et al., 2010; Thanh et al., 2010). Only a few genetically improved strains of prawn have been developed for commercial use (New, 2005). The prawn strains in this study – including CPP, KSB, and SKL – are widely used in the major farming areas in central Thailand. The original CPP broodstock was derived from the prawns of Indian origin and has undergone selective breeding for a number of generations (Nithid Patarakulchai, KasetSombon Farm, Supunburi province, pers. comm.). The other two strains were developed from wild populations native to Thailand. KSB originated from the ChaoPhraya River, but the record of domestication for this strain is not known. The SKL strain was brought recently from Songkla Lake in south Thailand. The CPP strain was believed to have more rapid growth rate than the other two strains. However, differences in other traits, such as survival rate and disease resistance among the three strains, were not known. The analysis of the population genetic data indicated that the three stocks exhibited relatively high genetic variation in terms of average numbers of alleles (8.3–14.7) and observed heterozygosities (0.76–0.79). Among them, the SKL strain displayed the highest number of alleles and percent heterozygosity, followed by KSB and CPP. Overall, the observed genetic diversity of the three strains was comparable to that of the hatchery and wild population samples of freshwater prawns in our previous study (Chareontawee et al., 2007). Significant departures from HWE in the CPP strain could have resulted from the presence of null alleles at *Mbr-1* and *Mbr-3* or from the inbreeding, while the heterozygote excess at *Mbr-8* may indicate the mixing of populations. The F_{ST} value of 0.076 showed high levels of genetic differentiation among the prawn strains and was in agreement with their different origins. The analysis of the genetic data at the four loci for the prawn strains in the communal tanks also exhibited relatively high genetic variation, with the average number of alleles, varying from 11.25 (CPP) to 18.5 (SKL) and observed heterozygosities varying from 0.79 (CPP) to 0.93 (SKL). The number of alleles detected at the four loci for prawn juveniles for the CPP and SKL strains were similar to those of their broodstock. However, for the KSB strain, the numbers of alleles at the three loci (*Mbr-1*, *Mbr-2*, and *Mbr-3*) were less than the number of alleles existing in their parental stock, suggesting that the KSB juveniles were produced from a small number of broodstock.

4.2. Assignment tests

Microsatellite DNA markers are an effective tool for the strain or population identification studies. A number of computer programs have been developed to perform genetic assignment tests based on different algorithms (Cornuet et al., 1999; Hansen et al., 2001; Piry et al., 2004; Manel et al., 2005). These assignment methods use the genotype data and statistical tests to assign individuals to their most likely stock of origin under different assumptions regarding the data. For instance, the assumptions of HWE and linkage equilibrium between loci are embodied in the original assignment test developed

by Paetkau et al. (1995). The test was shown to be effective in a study of the genetic population structure of polar bears *Ursus arcticus* and in other investigations (Paetkau et al., 1997). In the present study, however, the exclusion–simulation method implemented in the program GENECLASS2 was used specifically because it does not assume HWE and linkage equilibrium among the loci. The application of this method is more appropriate for the aquaculture stocks, where the departure of HWE is a common phenomenon. The performance of the exclusion–simulation approach is quantified as the proportion of the correctly assigned individuals at a threshold probability of belonging to a population (Cornuet et al., 1999; Piry et al., 2004). The exclusion method performed well in this study, showing high accuracy, with 90% correct assignment of individuals among the three strains at $P < 0.05$. Moreover, the assignment scores (88%) changed only slightly when the confidence level was decreased to $P < 0.01$ and $P < 0.001$. The utility of the exclusion–simulation method for individual assignment has been assessed in other studies, with varying results. For instance, in their study on the cattle breed assignment, Maudet et al. (2002) indicated that 67% correct assignment was obtained among seven breeds at a significance level of $P < 0.05$. The accuracy of the breed assignment, however, decreased to 54 and 33% at $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively. In other studies, the exclusion method failed to distinguish between the hybrids and wild individuals in admixed populations of the brown trout *Salmo trutta* (Hansen et al., 2006), but proved very effective in the discrimination among the three species of the Pacific abalone *Haliotis* spp. (Sekino and Hara, 2007).

There are several factors that determine the efficacy of the assignment methods, including the amount of genetic differentiation among stocks, the number and sample sizes of populations and the number of the loci studied (Cornuet et al., 1999; Hansen et al., 2001; Piry et al., 2004; Manel et al., 2005). The power of the exclusion method was estimated in a simulation study by Cornuet et al. (1999); for example, using 10 simulated populations, an assignment score of nearly 100% was obtained when ten loci and a sample size of 30 individuals were used with an F_{ST} of 0.1. The performance of the exclusion method was further evaluated using the empirical microsatellite data sets from 10 species, including bear, cattle, fish, bees, and *Drosophila* (Manel et al., 2002). Similarly, the analysis of the empirical data sets indicated that nearly all individuals were correctly assigned when populations were highly differentiated ($F_{ST} > 0.1$). The effect of genetic differentiation on power of the assignment test also was observed in this study, where a score of 100% correct assignment was obtained between the CPP and SKL strains with an F_{ST} of 0.12. In contrast, only 81–83% of individuals were correctly assigned between the least differentiated populations, KSB and SKL ($F_{ST} = 0.02$). Cornuet et al. (1999) suggested that if the degree of the genetic differentiation among populations is low, the power of the assignment test can be increased by using larger population samples and larger numbers of loci. It should be noted, however, that the accuracy of the test decreases with an increase in the number of populations due to the increased numbers of individuals wrongly assigned to each population (Hansen et al., 2001). For microsatellites, the genotyping errors caused by large allele dropout and scoring of the stuttering alleles on a sequencing gel may reduce the accuracy of the assignment. In such cases, the genotyping of individuals should be repeated by an automated DNA sequencer.

Although microsatellites are the most suitable genetic markers for the individual assignment, the genotyping at a large number of loci can be expensive and may reduce the benefit of the assignment tests. Therefore, it was our interest to determine the number of markers that optimizes the trade-off between assignment success and the cost of genotyping. The simulation results from the three baseline populations showed that high assignment scores were obtained with the use of several subsets of markers comprising four to seven loci. Of these, a subset of four loci (*Mbr-1*, *Mbr-2*, *Mbr-3*, and *Mbr-5*)

showing 89% of the correct assignment among the three strains at $P < 0.05$, 0.01 and 0.001 was chosen for the genotyping of the surviving prawn in the communal rearing experiment. The explanation for the high rate of assignment at the four chosen loci is that the removal of the three loci (*Mbr-7*, *Mbr-8*, and *Mbr-10*) which was less informative resulted in the increased population differentiation from $F_{ST} = 0.07$ (seven loci) to 0.08 (four loci). By using the subset of the four loci, the number of genotypes from the communal tanks was reduced considerably, from 9562 (1366 individuals $\times$ 7 loci) to 5464 (1366 individuals $\times$ 4 loci), with up to 43% reduction of the genotyping cost. However, the multiplexing of the microsatellite markers also can reduce the genotyping costs.

4.3. Comparison of growth performance

Communal rearing has proven an effective strategy for testing different genetic groups under the same environmental conditions. However, the presence of competition among different strains may invalidate the application of communal testing for certain species (Wohlfarth and Moav, 1985, 1991). Competitive advantage is indicated if the ranking of strains is different between the communal and separate testings. The results of the present study did not suggest the presence of competition among the prawn strains; i.e., the same ranking of strains for growth traits was observed between the separate and communal testings, with the CPP strain ranked first, followed by KSB and SKL. Without competition between different strains, the growth of juveniles in a communal rearing may be used as a predictor for their performance in a separate rearing (Wohlfarth and Moav, 1991). However, the application of communal stocking for comparison of survival for juvenile prawns may be restricted because the results varied between the separate and communal tests. While the survival of the CPP strain (71%) was consistent in the separate and communal cultures, the differences in survival were observed for the KSB and SKL strains. The variation in the survival rates at the end of the experiment were not unexpected and likely were due to the cannibalistic nature of the prawn larvae and juveniles.

The growth and survival of the juveniles are the important traits that determine prawn production. Prawn farmers practice two rearing strategies in Thailand. One strategy is to stock post-larvae (PLs) directly into the grow-out ponds. A second method is to stock post-larvae in nursing tanks or cages for 2–3 months and then to transfer juveniles to grow-out ponds. Several studies reported that the prawn production was relatively low for the first strategy due to the high mortality of PLs by cannibalism in the grow-out ponds. In contrast, the use of a nursery phase increases the survival of juveniles and subsequently increases farm production (Lin and Boonyaratpalin, 1988; Schwantes et al., 2007). According to our recent survey, most prawn farmers in the areas have adopted a new strategy by stocking 2–4 month old juveniles directly into the grow-out ponds. This practice shortens the culture period and reduces the production cost. As a result, the demand for juvenile prawns is increasing while the demand for the post-larvae is decreasing. It should be noticed, however, that significant differences in the performance of prawn strains may vary in the environments different from those utilized in this study.

5. Conclusion

Characterizing the genetic structure and assessing the performance of the freshwater prawn strains will assist in the selection of the best strains for increasing farm production and initiation of future breeding programs. This study demonstrated that individual prawns of different origins can be identified using four to seven microsatellite markers. The use of four markers optimized the power of assignment tests and the cost of genotyping. Communal rearing proved an effective technique for the comparison of the growth performances of

the different prawn strains because the inter-strain competition was not observed in this study. However, the communal rearing approach was not appropriate for comparing survival due to the different rankings of strains between separate and communal rearing.

Acknowledgments

This work was supported by a research grant # PHD/146/2547 from the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program to TK and SP. Partial support was obtained from the Kasetsart University Research and Development Institute (KURDI) and grant # RTA5080013 from the Thailand Research Fund to UN. We would like to thank all hatchery managers for the prawn samples. Comments from the three anonymous reviewers have greatly improved the manuscript.

References

- Arce, S.M., Argue, B.J., Thompson, B.A., Moss, S.M., 2003. Evaluation of a fluorescent, alphanumeric tagging system for penaeid shrimp and its application in selective breeding programs. *Aquaculture* 228, 267–278.
- Bart, A.N., Yen, P.T., 2003. Comparison of larval performance between Thai and Vietnamese giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man): a preliminary study. *Aquaculture Research* 34, 1453–1458.
- Chareontawee, K., Poompuang, S., Na-Nakorn, U., 2006. Isolation and characterization of microsatellites in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Molecular Ecology Notes* 6, 823–825.
- Chareontawee, K., Poompuang, S., Na-Nakorn, U., Kamonrat, W., 2007. Genetic diversity of hatchery stocks of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in Thailand. *Aquaculture* 271, 121–129.
- Cornuet, J.-M., Piry, S., Luikart, G., Estoup, A., Solignac, M., 1999. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics* 153, 1989–2000.
- Department of Fisheries, 2007. Fisheries Statistics of Thailand 2007. Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok, Thailand. <http://www.fisheries.go.th/it-stat/>.
- Falconer, D.S., Mackay, T.F.C., 1996. Introduction to Quantitative Genetics, fourth edition. Longman, Harlow, England. 464 pp.
- FAO, 2010. Fishstat Plus: Universal Software for Fishery Statistics. Time Series 1950–2008. Version 2.30. FAO Fisheries Department, Fishery Information, Data and Statistics Unit. <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstat/en>.
- Godin, D.M., Carr, W.H., Hagino, G., Segura, F., Sweeney, J.N., Blankenship, L., 1996. Evaluation of a fluorescent elastomer internal tag in juvenile and adult shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 139, 243–248.
- Guo, S.W., Thompson, E.A., 1992. Performing exact test of Hardy–Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48, 361–372.
- Hansen, M.M., Kenchington, E., Nielsen, E.E., 2001. Assigning individual fish to populations using microsatellite DNA markers. *Fish and Fisheries* 2, 93–112.
- Hansen, M.M., Bekkevold, D., Jensen, L.F., Mensberg, K.-L.D., Nielsen, E.E., 2006. Genetic restoration of a stocked brown trout *Salmo trutta* population using microsatellite DNA analysis of historical and contemporary samples. *Journal of Applied Ecology* 43, 669–679.
- Herbinger, C.M., Doyle, R.W., Pitman, E.R., Paquet, D., Mesa, K.A., Morris, D.B., Wright, J.M., Cook, D., 1995. DNA fingerprint based analysis of paternal and maternal effects on offspring growth and survival in communally reared rainbow trout. *Aquaculture* 137, 245–256.
- Herbinger, C.M., O'Reilly, P.T., Doyle, R.W., Wright, J.M., O'Flynn, F., 1999. Early growth performance of Atlantic salmon full-sib families reared in single family tanks versus in mixed family tanks. *Aquaculture* 173, 105–116.
- Jerry, D.R., Stewart, T., Purvis, I.W., Piper, L.R., 2001. Evaluation of visual implant elastomer and alphanumeric internal tags as a method to identify juveniles of the freshwater crayfish, *Cherax destructor*. *Aquaculture* 193, 149–154.
- Jerry, D.R., Preston, N.P., Crocos, P.J., Keys, S., Meadows, J.R.S., Li, Y., 2004. Parentage determination of Kuruma shrimp *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* using microsatellite markers (Bate). *Aquaculture* 235, 237–247.
- Jerry, D.R., Evans, B.S., Kenway, M., Wilson, K., 2006. Development of a microsatellite DNA parentage marker suite for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 255, 542–547.
- Jørstad, K.E., Prodohl, P.A., Kristiansen, T.S., Hughes, M., Farestveit, E., Taggart, J.B., Agnalt, A.-L., Ferguson, A., 2005. Communal larval rearing of European lobster (*Homarus gammarus*): family identification by microsatellite DNA profiling and offspring fitness comparisons. *Aquaculture* 247, 275–285.
- Kitcharoen, N., Koonawootrittiron, S., Na-Nakorn, U., 2010. Selection of brooders from early maturing freshwater prawns (*Macrobrachium rosenbergii*) results in faster growth rates of offspring than in those selected from late maturing prawns. *Aquaculture* 306, 362–364.
- Lin, C.K., Boonyaratpalin, M., 1988. An analysis of biological characteristics of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) in relation to pond production and marketing in Thailand. *Aquaculture* 74, 205–215.
- Linnane, A., Mercer, J.P., 1998. A comparison of methods for tagging juvenile lobsters (*Homarus gammarus* L.) reared for stock enhancement. *Aquaculture* 163, 195–202.

- Manel, S., Berthier, P., Luikart, G., 2002. Detecting wildlife poaching: identifying the origin of individuals with Bayesian assignment tests and multilocus genotypes. *Conservation Biology* 16, 650–659.
- Manel, S., Gaggiotti, O.E., Waples, R.S., 2005. Assignment methods: matching biological questions with appropriate techniques. *Trends in Ecology & Evolution* 20, 136–142.
- Maudet, C., Luikart, G., Taberlet, P., 2002. Genetic diversity and assignment tests among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis. *Journal of Animal Science* 80, 942–950.
- Menasveta, P., Sangpradub, S., Piyatiratitivorakul, S., Fast, A.W., 1994. Effect of broodstock size and source on ovarian maturation and spawning of *Penaeus monodon* Fabricius from the Gulf of Thailand. *Journal of the World Aquaculture Society* 25, 41–49.
- Merila, J., Crnokrak, P., 2001. Comparison of genetic differentiation at marker loci and quantitative traits. *Journal of Evolution Biology* 14, 892–903.
- Miller, M.P., 1997. Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3. A Windows program for the analysis of allozyme and population genetic data. <http://www.marksgeneticssoftware.net/tfpga.html>.
- New, M.B., 2005. Freshwater prawn farming: global status, recent research and a glance at the future. *Aquaculture Research* 36, 210–230.
- Nhan, D.T., Wille, M., Le Hung, L.T., Sorgeloos, P., 2009. Comparison of reproductive performance and offspring quality of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) broodstock from different regions. *Aquaculture* 298, 36–42.
- Norris, A.T., Bradley, D.G., Cunningham, E.P., 2000. Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers. *Aquaculture* 182, 73–83.
- Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I., Strobeck, C., 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4, 347–354.
- Paetkau, D., Waits, L.P., Clarkson, P.L., Craighead, L., Strobeck, C., 1997. An empirical evaluation of genetic distance statistics using microsatellite data from bear (Ursidae) populations. *Genetics* 147, 1943–1957.
- Piry, S., Alapetite, A., Cornuet, J.-M., Paetkau, D., Baudouin, L., Estoup, A., 2004. GENECLASS2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *The Journal of Heredity* 95, 536–539.
- Raymond, M., Rousset, F., 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49, 1280–1283.
- Reed, D.H., Frankham, R., 2001. How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis. *Evolution* 55, 1095–1103.
- SAS Institute, 2003. SAS/STAT User's Guide: Statistics, Release 9.1.3 Edition. SAS Institute Inc, Cary, NC, USA.
- Schwantes, V.S., Diana, J.D., Yi, Y., 2007. Social, economic, and production characteristics of giant river prawn *Macrobrachium rosenbergii* culture in Thailand. *Aquaculture* 287, 120–127.
- Sekino, M., Hara, M., 2007. Individual assignment tests proved genetic boundaries in a species complex of Pacific abalone (genus *Haliotis*). *Conservation Genetics* 8, 823–841.
- Taggart, J.B., Hynes, R.A., Prodohl, P.A., Ferguson, A., 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *Journal of Fish Biology* 40, 963–965.
- Tave, D., 2003. Genetics for Fish Hatchery Managers, second edition. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Thanh, N.M., Nguyen, N.H., Ponzoni, R.W., Vu, N.T., Barnes, A.C., Mather, P.B., 2010. Estimates of strain additive and non-additive genetic effects for growth traits in a diallel cross of three strains of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in Vietnam. *Aquaculture* 299, 30–36.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P., 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4, 535–538.
- Vandeputte, M., Kocour, M., Mauger, S., Dupont-Nivet, M., De Guerry, D., Rodina, M., Gela, D., Vallod, D., Chevassus, B., Linhart, O., 2004. Heritability estimates for growth-related traits using microsatellite parentage assignment in juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 235, 223–236.
- Wohlfarth, G.W., Moav, R., 1985. Communal testing, a method of testing the growth of different genetic groups of common carp in earthen ponds. *Aquaculture* 48, 143–157.
- Wohlfarth, G.W., Moav, R., 1991. Genetic testing of common carp in cages: 1. Communal versus separate testing. *Aquaculture* 95, 215–223.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aqua-online

Short communication

Species identification of four economically important *Pangasiid* catfishes and closely related species using SSCP markersKednapat Sriphairoj^{a,*}, Sirawut Klinbu-nga^b, Wongpathom Kamonrat^c, Uthairat Na-Nakorn^d^a Department of Fisheries, School of Agriculture and Natural Resource, Naresuan University, Phayao, Thailand^b National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Pathumthani, Thailand^c Inland Fisheries Resources Research and Development Institute, Department of Fisheries, Bangkok, Thailand^d Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 July 2009

Received in revised form 3 February 2010

Accepted 11 June 2010

Keywords:

Pangasiidae

Species-specific

SSCP

ABSTRACT

SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism) approaches were used to identify potential species-specific markers for species of Pangasiidae fish. Seven primers were obtained using the AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) approach. Only one of these (*PL8*) proved to have conserved variation within species and to be clearly distinguishable among species. *PL8* distinguished the five of nine Pangasiidae species, four of them are most economically important species (*Pangasianodon gigas*, *P. hypophthalmus*, *Pangasius bocourti* and *P. larnaudii*). The power of this marker for species identification was confirmed in samples of larvae although it failed to unambiguously differentiate hybrids of *Pangasianodon hypophthalmus* and *P. gigas* or *Pangasius bocourti* from their parents. *PL8* will be useful for species identification of Pangasiid catfishes, for larval identification and species authentication in food products.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The fishes of the Family Pangasiidae are important in South-east Asian countries as protein sources for local consumption. They form significant components of regional fisheries, especially in the Mekong River basin which is one of the most significant riverine fisheries in the world (Coates, 2002). Some species, particularly striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) are widely cultured and have become a major export commodity (e.g. export value of Vietnam exceeded one billion US\$ in 2007, FAO, 2009). Other species, for example, Pla mong, *Pangasius bocourti*, show high aquaculture potential due to their appreciable meat quality (e.g. white, tender meat). Some Pangasiids are important conservation targets due to their threatened status, e.g., a critically endangered *Pangasianodon gigas* (IUCN, 2005) and *Pangasius sanitwongsei* (Hogan et al., 2009).

The identification guideline for adult Pangasiid catfishes is well established based mainly on morphology (Roberts and Vidthayanon, 1991). However, the identification of larvae is still problematic due to their morphological similarity (Vidthayanon and Rungthongbaisuree, 1993). The expanding popularity of hybridization among Pangasiid species for aquaculture has led to necessity to identify hybrids [e.g. hybrid between *P. gigas* and *P. hypophthalmus* (Mongkonpanya et al.,

1996); *P. bocourti* and *P. hypophthalmus* (Annop Imsilp, per. com.)] for quality control of hybrid seeds and authentication of processed fish products.

Among various molecular markers applied to species identification of aquatic animals the AFLP approach is a relatively simple method without the need for prior sequence information for primer design (see review of Liu and Cordes, 2004). However, this approach comprised of several steps, and hence limiting the ability to screen a large number of specimens within a short period of time (Klinbunga et al., 2007). To overcome this obstacle, species-diagnostic SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) markers, which identify species based on the presence/absence of the amplification, may be developed from AFLP information.

In the present study, potential species-specific SCAR markers for Pangasiid catfishes were developed using AFLP approach and the SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism) technique was applied to differentiate cross-amplified fragments to determine a simple rapid marker for species identification.

2. Materials and methods

2.1. Sampling and DNA extraction

Samples of nine Pangasiid species (*P. gigas*, *P. hypophthalmus*, *P. bocourti*, *Pangasius conchophilus*, *Pangasius larnaudii*, *Pangasius macronema*, *P. sanitwongsei*, *Pseudolais pleurotaenia* and *Helicophagus leptorhynchus*) (31–62 fish/species) were collected from various locations including wild and captive populations.

* Corresponding author. Tel.: +66 54 466666x3137; fax: +66 54 466666x3155.
E-mail address: ssriphairoj@hotmail.com (K. Sriphairoj).

Twelve post-hatched larvae samples of each of the four most important species were collected according to the following details. Three full-sib families each of *P. gigas* and *P. hypophthalmus* were from Chiangmai Inland Fisheries Research and Development and the Department of Aquaculture, Kasetsart University, respectively; ten full-sib families of *P. bocourti* were from Sakonnakorn Inland Fisheries Research and Development; and four full-sib families of *P. larnaudii* were from Yasothon Inland Fisheries Research and Development. Hybrids of *P. hypophthalmus* × *P. bocourti* were collected from Sakonnakorn Inland Fisheries Research and Development (IFRD) ($n=20$; unknown numbers of parents) and Nakornpanom Fisheries Station ($n=10$; unknown numbers of parents). The samples of *P. gigas* × *P. hypophthalmus* hybrid ($n=10$; unknown numbers of parents) were collected from a private hatchery in Nakornsawan Province.

Fin clips of adults and hybrids, and the whole body of the larvae were preserved in absolute ethanol. Genomic DNA of all samples was extracted following the standard phenol–chloroform protocol (Taggart et al., 1992).

2.2. PCR-SSCP analysis

Seven primers were developed using the AFLP approach. All primers amplified clear PCR profiles in a majority of species (8–9 species) and generated small size PCR products (less than 400 bp) (Table 1).

All primers were initially used to amplify genomic DNA of a species representative sample. The PCR conditions comprised of predenaturation at 94 °C for 3 min followed by 30 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 50 s and extension at 72 °C for 1 min. The final extension was performed at 72 °C for 5 min. The PCR product from each of the seven primers was mixed with 4 vol. of the loading dye (95% formamide, 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol and 10 mM NaOH), denatured and electrophoresed using 12% nondenaturing polyacrylamide gel (37.5:1 crosslink). The electrophoresis was performed in 0.5× TBE on a 16×18 cm gel, at 140 V for 17 h and at 4 °C using a vertical system. SYBR Green II (Invitrogen) was employed to visualize DNA bands. The primers that differentiate a representative individual from each species were then examined in a larger sample size. The uniformity of electrophoretic profiles within each species was verified and then the electrophoretic phenotypes of nine species were compared.

3. Results

3.1. Species-specific SSCP patterns for Pangasiid catfishes

Four of the primers generated relatively homogenous SSCP profiles amongst species but had a variable quality of bands (clear bands for

primer *HL1*; faint bands for *PH1*, *PL6*, and *PL7*), and were eventually discarded.

Three of the seven markers (*PL8*, *PL5*, and *PM1*) gave clear SSCP patterns with sufficient differences amongst species in initial tests indicating that they could possibly be used as diagnostic markers. Of these, two (*PL5*, *PM1*) showed sufficiently high levels of band variation within and between species when a larger sample of individuals was screened. As such, they could not be used as simple species markers (data not shown). It is pertinent to note that *P. gigas* could be distinguished from all the other species using primer *PL5*.

PL8 gave clear SSCP banding patterns specific to each of six species (based on one sample/species), *P. hypophthalmus*, *P. conchophilus*, *P. sanitwongsei*, *P. pleurotaenia*, *P. gigas*, and *P. larnaudii* and one group comprising *H. leptorhynchus*, *P. macronema*, and *P. bocourti* a (data not shown). On screening the increased number of individuals ($n=31–62$), *PL8* showed some polymorphism within species of *P. sanitwongsei*, *P. conchophilus*, *P. macronema* and *P. pleurotaenia*, whereas twelve samples of *P. pleurotaenia* showed no amplification. *PL8* had a monomorphic SSCP pattern in all samples of *P. hypophthalmus* and *H. leptorhynchus* (Fig. 1A, B), in all but three samples (from Cambodia) of *P. gigas* (Fig. 1C), and in all but one sample each of *P. bocourti* and *P. larnaudii* (Fig. 1D, E).

All of the exceptional samples in the last three species had the DNA pattern of *P. hypophthalmus* samples. Analysis of PCR-RFLP of mtDNA 16S rRNA (K. Sriphairoj, unpublished data) from three *P. gigas* samples from Cambodia and one sample each of *P. bocourti* and *P. larnaudii* demonstrated that these samples were *P. hypophthalmus*.

3.2. Identification of larvae of *P. gigas*, *P. hypophthalmus*, *P. bocourti* and *P. larnaudii*

Using the DNA of larval samples ($n=12$ larvae/species) of four species (*P. gigas*, *P. hypophthalmus*, *P. bocourti* and *P. larnaudii*), *PL8* readily differentiated the four species with the monomorphic patterns within species and perfectly matched the patterns found in the adults. It should be noted that the un-availability of *H. leptorhynchus* larvae made us exclude this species in the analysis.

3.3. Identification of the hybrids of *P. gigas* × *P. hypophthalmus* and *P. bocourti* × *P. hypophthalmus*

Although the primer *PL8* gave unique SSCP patterns for parental species, the patterns obtained for the hybrids between *P. hypophthalmus* and *P. gigas* or *P. bocourti* could not unambiguously differentiate the hybrids from the parent. The two bands specific for *P. hypophthalmus* completely overlapped with the two of the three bands of *P. gigas* (Fig. 2) and the single band of *P. bocourti* (Fig. 3). Two of the ten samples of the *P. hypophthalmus* and *P. gigas* hybrids showed a SSCP pattern unique to *P. hypophthalmus* which may be owing to mislabeling.

3.4. Reproducibility of the markers

Primer *PL8* was tested for two–three times in five species (*P. gigas*, *P. hypophthalmus*, *P. bocourti*, *P. larnaudii* and *H. leptorhynchus*) using the same set of DNA samples of each species and identical running condition in every analysis. The *PL8* showed 100% reproducibility for four species including *P. hypophthalmus*, *P. bocourti*, *P. larnaudii* and *H. leptorhynchus*. In each case three consecutive tests involving 38–55 samples/species/test generated constant DNA banding pattern within species. In contrast, in *P. gigas*, one of the three tests showed a different *PL8* SSCP pattern. However, the three presumed *P. hypophthalmus* mislabeled as *P. gigas* were readily differentiated in every test.

Table 1

Loci, AFLP primer combinations, primer sequences and product size range of seven primers used for SSCP analysis.

Locus	AFLP primer combination	Primer sequence (5'–3')	Product size range (bp)
<i>PH1</i>	<i>Bam</i> -acg <i>Mse</i> -acg	F GTAGAAATGCGCACTACAGG R ACTGAGACCACCTCAAGTG	254
<i>PL5</i>	<i>Bam</i> -atc <i>Mse</i> -agc	F GCAGGCTGAAATATCCACA R ATGCCATAGGTTTGAGGGGT	334
<i>PL6</i>	<i>Bam</i> -cga <i>Mse</i> -aga1	F GTAGCTGTATTACACAGAGG R GAGATGTCAGCCTATGATGC	333
<i>PL7</i>	<i>Bam</i> -cga <i>Mse</i> -aga2	F GACATACTGGTGCATCATGC R CGACAGAAGTGAACATTAGC	165
<i>PL8</i>	<i>Bam</i> -cga <i>Mse</i> -agt	F GGGCTTGTTAAAGACCTTAG R ATCCAAGCCCTGGAGCACAG	204
<i>HW1</i>	<i>Eco</i> -aac <i>Mse</i> -ata	F ATGAGGTTTGGCCTATCTG R GAATACACCTGCACGGTACA	319
<i>PM1</i>	<i>Bam</i> -acg <i>Mse</i> -cac	F CTCCTGCAGTTTCCATCACA R CTAACCTAGCACCTAGCTAGC	359

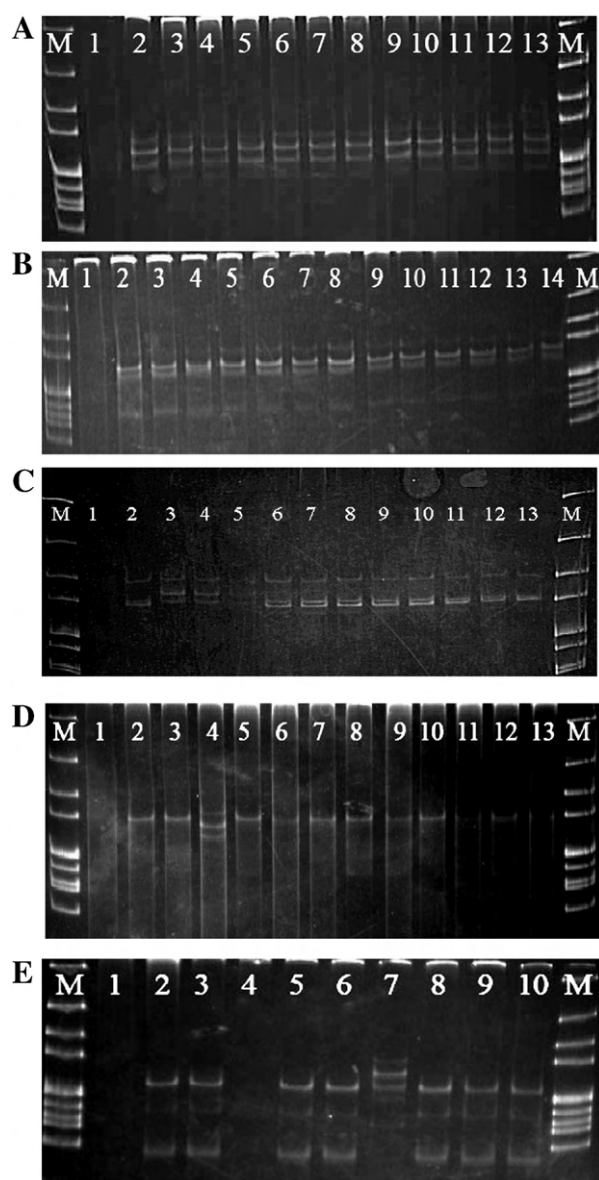


Fig. 1. The SSCP patterns of *P. hypophthalmus* (A), *H. leptorhynchus* (B), *P. gigas* (C), *P. bocourti* (D), and *P. larnaudii* (E). Note: lane M = 100 bp DNA markers; lane 1 = double stranded DNA of each species.

4. Discussion

This study provides the first report of a species-specific marker (PL8) in the Pangasiid catfishes that is capable of differentiating the five species (*P. hypophthalmus*, *P. gigas*, *P. bocourti*, *P. larnaudii* and *H. leptorhynchus*). The PL8 primer also differentiated the larvae of four most economically important Pangasiid species (*P. hypophthalmus*, *P. gigas*, *P. bocourti* and *P. larnaudii*). *P. gigas* could be also distinguished from the other species using primer PL5. The low success rate for developing species-specific markers (e.g. one out of seven primers being tested) may be because marker development was based on the AFLP fragments which would have included non-conserved DNA fragments. Most of the papers developing interspecies markers cited here relied on conserved DNA regions [e.g. the mitochondrial 12S rRNA in grouper, wreck fish and Nile perch, (Asensio et al., 2001); 16S rRNA in five Penaeid shrimps (Khamnamtong et al., 2005); and 18S rDNA in 11 bivalve species (Livi et al., 2006)]. However, species-diagnostic SSCP markers were also successfully developed using non-

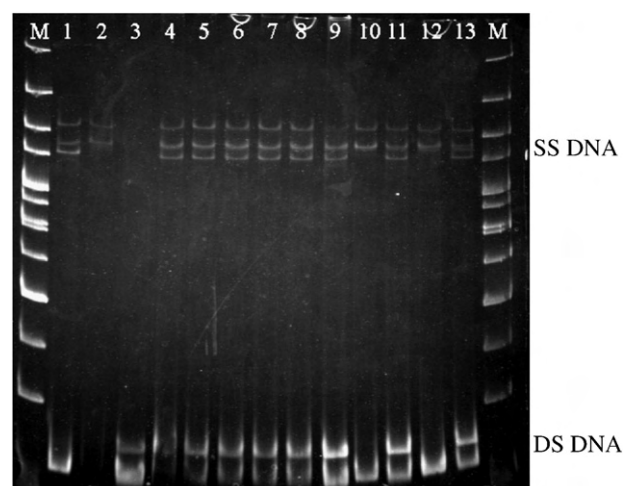


Fig. 2. The SSCP patterns of *P. gigas* (lane 1), *P. hypophthalmus* (lane 2) and hybrids of *P. gigas* × *P. hypophthalmus* (lanes 4–13). Note: The individuals representing each parental species are not the parent of the hybrids that appear in this figure. Lane 3 = non-denatured PCR product; lane M = 100 bp DNA markers; SS DNA = single stranded DNA; DS DNA = double stranded DNA.

conserved nuclear DNA as reported in blue swimming crab, *Portunus pelagicus*, (Klinbunga et al., 2007).

The advantage of PCR-SSCP analysis over other PCR base techniques is its ability to detect even a single base polymorphism in a given DNA fragment size (Oohara, 1997). In addition, analysis of degraded DNA is possible because SSCP analysis is suitable for short fragments (Rehbein et al., 1999). Furthermore, their short amplicons provide for, (i) reduced incidences of conformation change, and (ii) lower intraspecific variability of the DNA, relative to longer sequence fragments (Asensio et al., 2001). Therefore, this technique is expected to perform better than other PCR-base techniques for authentication of fishery products, especially processed products such as canned cold-smoked and caviar products (Rehbein et al., 1999; Rehbein, 2005). The PL8 primer should be useful for authentication of fishery products from Pangasiid catfishes widely distributed in local and export markets (Taychakomol, 2007). Moreover, the primer will enable rapid identification of Pangasiid larvae and hence facilitate various biological studies necessary for management and conservation of these invaluable Pangasiids.

An attempt to apply PL8 for identification of the hybrids of *P. gigas* × *P. hypophthalmus* and *P. bocourti* × *P. hypophthalmus* failed due to

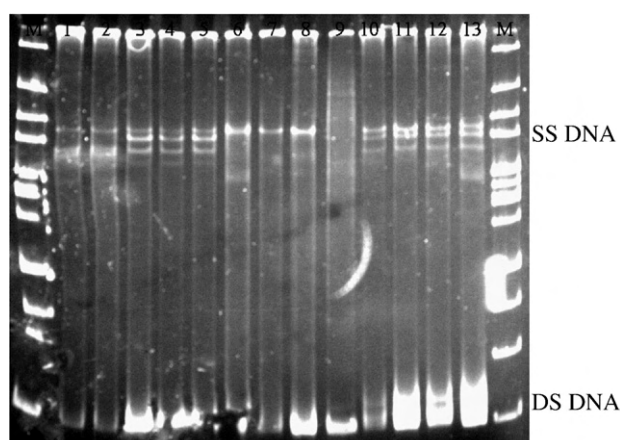


Fig. 3. The SSCP patterns of *P. gigas* (lanes 1, 2), *P. hypophthalmus* (lanes 3, 4, 5), *P. bocourti* (lanes 6, 7, 8) and hybrids of *P. hypophthalmus* × *P. bocourti* (lanes 10–13). Note: The individuals representing each parental species are not the parent of the hybrids that appear in this figure. Lane 9 = non-denatured PCR product; lane M = 100 bp DNA markers; SS DNA = single strand DNA; DS DNA = double stranded DNA.

overlapping of some key bands in the parent SSCP profiles, hence necessitating the development of more markers.

In general the SSCP technique possesses a limitation due to lack of reproducibility (Rehbein et al., 1999) resulting from sensitivity of the analysis to variation of running conditions, e.g. glycerol concentration, gel concentration, acrylamide/bis ratio, buffer concentration, and temperature (Hayashi, 1991; Fujita and Silver, 1994). However, in the present study the compromised reproducibility of *PL8* which was observed only in *P. gigas*, does not impair its potential use for species identification because the varying patterns were still species-specific. In addition, the reliability of PCR-SSCP for species identification could be ensured by using the known species as references, provided that the unknown samples and reference were amplified and denatured under identical conditions and run side-by-side on the same gel (Rehbein et al., 1999).

The present study has therefore developed a marker that can be used to reliably distinguish five of the nine species of Pangasiid catfishes, and the larvae of four species. This SSCP marker would enable rapid identification of Pangasiidae species and hence benefit both food product authentication and various biological studies. The development of more effective marker is needed to enable hybrid detection and identification of the remaining species of which *PL8* marker failed to do so.

Acknowledgements

This work was funded by the “Thailand Research Fund” through the project entitled “Application of Genetics and Biotechnology for Sustainable Development of Aquaculture” (Senior Research Scholar 2007) awarded to UN. We appreciate Professor Dr. Gary H. Thorgaard and Dr. Joseph P. Brunelli for their support in the initial AFLP analysis. We are grateful to all government hatcheries and private hatchery for providing samples of larvae and hybrids. We thank Ms. Warangkana Phrakun for her technical assistance.

References

- Asensio, L., González, I., Fernández, A., Rodríguez, M.A., Hernández, P.E., García, T., Martín, R., 2001. PCR-SSCP: A simple method for the authentication of grouper (*Epinephelus guaza*), wreck fish (*Polyprion americanus*), and Nile perch (*Lates niloticus*) fillets. J. Agric. Food Chem. 49, 1720–1723.
- Coates, D., 2002. Inland capture fishery statistics of Southeast Asia: current status and information needs, RAP publication no. 2002/1. Asia-Pacific Fishery Commission, Bangkok, Thailand.
- FAO, 2009. Fishstat Plus Version 2.30. Available at: <http://www.fao.org/fi/statist/FISOFI/FISHPLUS.asp>.
- Fujita, K., Silver, J., 1994. Single-strand conformational polymorphism. PCR Meth. Appl. 4, S137–S139.
- Hayashi, K., 1991. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. PCR Meth. Appl. 1, 34–38.
- Hogan, Z.S., Na-Nakorn, U., Kong, H., 2009. Threatened fishes of the world: *Pangasius sanitwongsei* Smith 1931 (Siluriformes: Pangasiidae). Environ. Biol. Fish. 84, 305–306.
- IUCN, 2005. 2005 IUCN Red list of threatened species. Available source: www.iucnredlist.org, January 5, 2006.
- Khamnamtong, B., Klinbunga, S., Menasveta, P., 2005. Species identification of five Penaeid shrimps using PCR-RFLP and SSCP analyses of 16 S ribosomal DNA. J. Biochem. Mol. Biol. 38, 491–499.
- Klinbunga, S., Khetpu, K., Khamnamtong, B., Menasveta, P., 2007. Development of a species-diagnostic SCAR marker of the blue swimming crab (*Portunus pelagicus*). Biochem. Genet. 45, 755–760.
- Liu, Z.J., Cordes, J.F., 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture 238, 1–37.
- Livi, S., Cordisco, C., Damiani, C., Romanelli, M., Crosetti, D., 2006. Identification of bivalve species at an early developmental stage through PCR-SSCP and sequence analysis of partial 18S rDNA. Mar. Biol. 149, 1149–1161.
- Mongkonpanya, K., Senawong, C., Pupipat, T., Tiersch, T., 1996. The Mekong giant catfish and ChaoPhraya catfish and their hybrid: morphology, carcass composition and press-out percentages. Thai. J. Agric. Sci. 29, 373–381.
- Oohara, I., 1997. Detection of single strand conformation polymorphisms (SSCPs) on mitochondrial DNA fragments between two domesticated strains of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Fisheries Sci. 63, 151–152.
- Rehbein, H., 2005. Identification of the fish species of raw or cold-smoked salmon and salmon caviar by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. Eur. Food Res. Technol. 220, 625–632.
- Rehbein, H., Mackie, I.M., Pryde, S., Gonzales-Sotelo, C., Medina, I., Perez-Martin, R., Quinteiro, J., Rey-Mendez, M., 1999. Fish species identification in canned tuna by PCR-SSCP: validation by a collaborative study and investigation of intra-species variability of the DNA-patterns. Food Chem. 64, 263–268.
- Roberts, T.R., Vidthayanon, C., 1991. Systematic revision of the Asian catfish family Pangasiidae, with biological observations and descriptions of three new species. Proc. Acad. Nat. Sci. Phila. 143, 97–144.
- Taggart, J.B., Hynes, R.A., Prodohl, P.A., Ferguson, A., 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. J. Fish Biol. 40, 963–965.
- Taychakomol, V., 2007. Economical freshwater fish. Aquat. Life Mag. 215, 145–154 (In Thai).
- Vidthayanon, C., Rungthongbaisuree, S., 1993. Taxonomy of Thai riverine catfishes family Schilbeidae and Pangasiidae. National Inland Fisheries Institute, Department of Fisheries, Thailand.



Heritability for growth traits in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Mann 1879) based on best linear unbiased prediction methodology

Nissara Kitcharoen¹, Wikrom Rungsin², Skorn Koonawootrittriron³ & Uthairat Na-Nakorn⁴

¹Department of Aquaculture, Graduate School, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

²Department of Zoology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

³Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

⁴Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

Correspondence: U Na-Nakorn, Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.
E-mail: ffishurn@ku.ac.th

Abstract

In this study, heritability was estimated for growth-related traits of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) before and after morphological sexual differentiation. Estimation was made on data from 16 full-sib and eight half-sib families. The variance estimation was performed using a univariate mixed linear animal model and variance components were analysed following an animal model using restricted maximum likelihood procedure using average information algorithm. Heritability estimates (h^2) varied considerably with ages. At 2 months old, h^2 for carapace length (CL; 0.35 ± 0.15) and body weight (BW; 0.26 ± 0.13) were higher than those estimated at 5 months old, based on mixed sex data. However, when data were sorted by sex, h^2 calculated from data of females were higher than those of males for CL (0.26 ± 0.16 vs. 0.10 ± 0.06), BW (0.28 ± 0.17 vs. 0.12 ± 0.08), body length (0.40 ± 0.17 vs. 0.11 ± 0.07), total length (0.47 ± 0.18 vs. 0.11 ± 0.07) and claw length (0.29 ± 0.16 vs. 0.03 ± 0.04). The same trend was observed for traits at 6 months old in both bulk and individual rearing.

Keywords: heritability, growth, *Macrobrachium rosenbergii*

Introduction

Aquaculture of giant freshwater prawn (GFP) (*Macrobrachium rosenbergii* de Mann 1879) is of eco-

nomically important (e.g. average annual production of > 200 000 tonnes as of 2007 (FAO 2009) with three major contributors, China, Thailand and India (New 2005). Despite a long culture history, only a few genetically improved strains have been established (e.g. Charoenpokphand strain, Anonymous 2001).

Heritability (h^2), which refers to the proportion of additive genetic variance to phenotypic variance of a trait, is important for the success of genetic improvement programme (Falconer & Mackay 1996). Previous publications have demonstrated sex-differentiated heritability estimates for growth of juvenile GFP, whereby h^2 of 11 months old prawn was higher for females ($h^2 = 0.35 \pm 0.15$) than for males of which h^2 was not different from zero ($P < 0.05$, Malecha, Masuno & Onizuka 1984); h^2_{SD} estimated in 5 months old prawn were -0.018 ± 0.014 and 0.122 ± 0.074 respective to length and weight of males, while it was 0.060 ± 0.054 and 0.030 ± 0.041 respective to length and weight of females (Uraivan, Sumanojitraporn & Ampolsak 2002). As such, efficiency of selection performed after sex differentiation may be compromised due to the confounding of male morphotypes. Therefore, selection to improve these traits should be performed before sexual differentiation and thus the estimation of h^2 at this stage is necessary. Moreover, the estimation of h^2 mentioned previously, used statistical models disregarding systematic errors (e.g. effects of age, sex, pond-cage, farm, feed, Gjedrem & Olesen 2005) which are difficult to avoid.

The present study used a mixed model equation (MME, Henderson 1975) for the estimation of h^2 for growth-related traits of GFP. To elucidate confounding effect of morphotypes, the estimations were made at three stages; before sex differentiation (2 months old), after sex differentiation but before morphotype differentiation (5 months old) and at commencement of morphotype differentiation (6 months old). The MME model is considered as best linear unbiased prediction (BLUP, Henderson 1975) capable of separating random and systematic errors and hence is expected to give a precise estimation of h^2 . Besides, we examined impacts of two rearing conditions (RC), pooled full-sib family and individual rearing, on h^2 values.

Materials and methods

Preparation of brooders and mating

The 200 GFP brooders were collected from Pasaak Chonlasidth Dam, Lop Buri Province. They probably originated from the domesticated stock released by the Department of Fisheries (Panuwat Kamutchart, pers. com.). They were checked for two virus strains, MrNV (*M. rosenbergii* nodavirus) and XSV (extra-small virus) using reverse transcriptase polymerase chain reaction and only the virus-free individuals were used. A total of eight males was successfully mated to 16 females at a ratio of one male to two females following a single pair mating scheme resulting in 16 full-sib families and eight half-sib families.

Larval rearing

Each family of larvae was separately reared in 250 L tanks, fed with brine shrimp (*Artemia* spp.) three times daily until reaching the post-larva (PL) stage. At 2 weeks after reaching the PL stage, they were transferred to two types of rearing (communal-within each family, and individual rearing). The pooled full-sib family rearing was performed in concrete tanks ($2 \times 1 \times 0.5 \text{ m}^3$) wherein each tank was randomly stocked with 200 prawns family⁻¹ with two replications. Two replications of individual rearing were performed at 5 months old when 20 individuals (10 males and 10 females) per replication were solitarily randomly stocked in a round plastic box (20 cm diameter) floating in $2 \times 1 \times 0.5 \text{ m}^3$ concrete ponds.

The individual rearing was continued until morphotypes were distinguishable (6–7 months old).

Measurements

Measurements were performed for the pooled full-sib rearing GFP at 2, 5 and 6 months of age when 40 prawns were randomly sampled from each replication and measured for carapace length (CL: from an ocular lobe to a carapace groove), body length (BL: from ocular lobe to telson), total length (TL: from an ocular lobe to a tail), claw length (CIL) and body weight (BW).

All individually reared GFP were measured at 6 months old.

Data analyses

The dataset composed of individual pedigree and growth traits measured from 1280 GFP at 2 and 5 months old, and 1824 GFP at 6 months old (progeny of 16 full-sib and eight half-sib families, pooled and individually reared). Descriptive statistics of the dataset (Table 1) were calculated using the program SAS (SAS 2003). Variance component estimation was performed using a univariate mixed linear animal model. The model is written in matrix notation as follows:

$$\mathbf{Y} = \mathbf{Xb} + \mathbf{Za} + \mathbf{Wc} + \mathbf{e}$$

where $\mathbf{y}$ is a vector of observations (at 2 months old: CL and BW; at 5 and 6 months old: CL, BW, BL and CIL); $\mathbf{b}$ is a vector of fixed effects [at 2 months old: hatching months (HM); at 5 months old: HM and sex; at 6 months old: HM, sex and RCs]; $\mathbf{c}$ is a vector of random effect of common environment effect including pond environments for each full-sib family; $\mathbf{a}$ is a vector of animal additive genetic effects; $\mathbf{e}$ is a vector of residual effects; $\mathbf{X}$, $\mathbf{Z}$ and $\mathbf{W}$ are incident matrices assigning the observations to levels of $\mathbf{b}$, $\mathbf{a}$ and $\mathbf{c}$ respectively. The assumption was as follows:

$$\begin{bmatrix} y \\ a \\ c \\ e \end{bmatrix} \sim \text{NID}, \left(\begin{bmatrix} \mathbf{X}\beta \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}, \begin{bmatrix} \mathbf{ZGZ}' + \mathbf{WCW}' + \mathbf{R} & \mathbf{ZG}' & \mathbf{WC}' & \mathbf{R} \\ \mathbf{GZ}' & \mathbf{G} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{CW}' & \mathbf{0} & \mathbf{C} & \mathbf{0} \\ \mathbf{R} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{R} \end{bmatrix} \right)$$

when $\mathbf{G} = \mathbf{A}\sigma_a^2$, $\mathbf{A}$ is a numerator relationship matrix (Henderson 1975), $\mathbf{C} (=I\sigma_c^2)$ is a common environmental matrix and $\mathbf{R} (=I\sigma_e^2)$ is a residual variance matrix.

Table 1 Mean [standard deviation (SD)], coefficient of variation [CV (%)] for carapace length (mm), body length (mm), total length (mm), claw length (mm) and body weight (g) of *Macrobrachium rosenbergii* at 2, 5 and 6 months after reaching the post-larva stage by sex and rearing condition

Age (months)	Sex	Rearing conditions	No. of records	Carapace length			Body length			Total length			Claw length			Body weight		
				Mean (SD)	CV		Mean (SD)	CV		Mean (SD)	CV		Mean (SD)	CV		Mean (SD)	CV	
2	Unsexed	–	1,280	7.47 (1.64)	21.98	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.36 (0.21)	–	58.45
5	Mixed sexes	–	1,280	18.68 (5.43)	29.10	–	39.15 (8.60)	21.97	–	79.08 (17.83)	22.55	–	16.70 (8.31)	49.79	–	5.71 (4.45)	–	77.94
	Male	–	640	19.10 (5.71)	29.89	–	39.67 (8.92)	22.48	–	80.45 (18.35)	22.81	–	17.72 (9.88)	55.79	–	6.32 (5.20)	–	82.30
	Female	–	640	18.25 (5.11)	28.02	–	38.62 (8.25)	21.36	–	77.71 (17.20)	22.14	–	15.63 (6.10)	39.02	–	5.11 (3.45)	–	67.53
6	Over all	–	1,824	20.63 (5.69)	27.60	–	42.24 (9.04)	21.40	–	84.65 (19.46)	22.99	–	19.23 (10.47)	54.43	–	7.85 (8.52)	–	108.56
	Mixed sexes	1	556	20.44 (5.15)	25.19	–	42.05 (8.16)	19.40	–	83.95 (17.27)	20.57	–	20.36 (9.27)	45.51	–	8.80 (12.08)	–	137.22
	Mixed sexes	2	1,268	20.71 (5.92)	28.56	–	42.32 (9.40)	22.21	–	84.96 (20.34)	23.95	–	18.65 (10.99)	58.94	–	7.44 (6.33)	–	85.13
	Male	1	263	21.17 (5.18)	24.47	–	42.78 (7.61)	17.79	–	85.60 (16.40)	19.15	–	22.72 (10.34)	45.51	–	9.19 (11.86)	–	129.12
	Female	1	293	19.78 (5.04)	25.46	–	41.40 (8.58)	20.73	–	82.47 (17.92)	21.73	–	18.16 (7.51)	41.36	–	8.46 (12.28)	–	145.20
	Male	2	632	21.42 (6.47)	30.22	–	42.87 (9.85)	22.98	–	86.44 (21.33)	24.67	–	21.35 (13.05)	61.12	–	8.27 (7.68)	–	92.88
	Female	2	636	20.00 (5.21)	26.06	–	41.78 (8.90)	21.31	–	83.48 (19.22)	23.02	–	15.93 (7.51)	47.12	–	6.60 (4.46)	–	67.53

1, individual rearing; 2, bulk rearing.

Variance components for each trait were estimated following the animal model using a restricted maximum likelihood procedure (REML) using average information algorithm. Then the variance component estimates were used for calculation of heritability following the formula $h^2 = \sigma_a^2 / \sigma_p^2$. Breeding value for each trait of the individual GFP was predicted using BLUP. The calculation was facilitated by a computer package ASREML (Gilmour, Gogel, Cullis, Welham & Thompson 2002).

Results

Overall, the length of incubation and larval development were very consistent among families. Descriptive statistics for CL, BL, TL, CIL and BW at different stages are shown in (Table 1). It was obvious that variance on growth traits increased with ages. Male prawns grew faster than female and the variance on growth traits was larger. In general, the pooled full-sibs prawn, which was directly stocked in tanks, grew faster than individually reared prawns. It was noteworthy that the latter group showed larger variation than the communally reared prawns except for BW.

Heritability and correlation

Heritability of growth-related traits varied considerably with ages. At 2 months after reaching the PL stage, h^2 of CL (0.35 ± 0.15) and BW (0.26 ± 0.13) was high. At 5 months, h^2 of CL and BW, based on mixed sex data, was lower than those estimated at 2 months old (Table 2). However, when data were sorted by sex, h^2 calculated from females data was as high as the estimation at 2 months (h^2 was 0.26 ± 0.16 for CL, 0.28 ± 0.17 for BW, 0.40 ± 0.17 for BL, 0.47 ± 0.18 for TL and 0.29 ± 0.16 for CIL) and was especially higher than those of males (h^2 was for 0.10 ± 0.06 for CL, 0.12 ± 0.08 for BW, 0.11 ± 0.07 for BL, 0.11 ± 0.07 for TL and 0.03 ± 0.04 for CIL). The same trend was observed at 6 months for both rearing methods (bulk and individual rearing), whereby, h^2 estimated from female data was higher than those of males. However, the estimation made from individual rearing showed high and unacceptable standard errors (SE). Notably, the proportion of c^2 to total variance for all estimation was small (ranged 0–0.08).

Most of the phenotypic correlations of all growth-related traits at 2, 5 and 6 months were high and statistically significant (0.54–0.97; Table 3).

Table 2 Heritability ($h^2 \pm \text{SE}$) and ratio of common environmental variance/total variance ($c_{\text{ratio}} \pm \text{SE}$) for carapace length, body length, total length, claw length and body weight of *Macrobrachium rosenbergii* at 2, 5 and 6 months after reaching the post-larva stage, by sex and rearing conditions

Age (months)	Sex	Rearing conditions	Carapace length	Body length	Total length	Claw length	Body weight
2	Unsexed	–	0.35 $\pm$ 0.15 (0.033 $\pm$ 0.019)	–	–	–	0.26 $\pm$ 0.13 (0.028 $\pm$ 0.018)
5	Mixed sexes		0.12 $\pm$ 0.75 (0.022 $\pm$ 0.017)	0.18 $\pm$ 0.12 (0.018 $\pm$ 0.016)	0.16 $\pm$ 0.08 (0.007 $\pm$ 0.012)	0.02 $\pm$ 0.05 (0.033 $\pm$ 0.022)	0.11 $\pm$ 0.08 (0.043 $\pm$ 0.024)
	Male	–	0.10 $\pm$ 0.06 (0.000 $\pm$ 0.000)	0.11 $\pm$ 0.07 (0.003 $\pm$ 0.017)	0.11 $\pm$ 0.07 (0.000 $\pm$ 0.000)	0.03 $\pm$ 0.04 (0.000 $\pm$ 0.000)	0.12 $\pm$ 0.08 (0.011 $\pm$ 0.022)
	Female	–	0.26 $\pm$ 0.16 (0.080 $\pm$ 0.050)	0.40 $\pm$ 0.17 (0.029 $\pm$ 0.035)	0.47 $\pm$ 0.18 (0.007 $\pm$ 0.029)	0.29 $\pm$ 0.16 (0.053 $\pm$ 0.041)	0.28 $\pm$ 0.17 (0.104 $\pm$ 0.058)
6	Mixed sexes	1	0.24 $\pm$ 0.13 (0.000 $\pm$ 0.000)	0.20 $\pm$ 0.11 (0.000 $\pm$ 0.000)	0.18 $\pm$ 0.10 (0.000 $\pm$ 0.000)	0.15 $\pm$ 0.10 (0.000 $\pm$ 0.000)	0.20 $\pm$ 0.71 (0.000 $\pm$ 0.000)
		2	0.15 $\pm$ 0.08 (0.006 $\pm$ 0.012)	0.16 $\pm$ 0.08 (0.001 $\pm$ 0.010)	0.15 $\pm$ 0.08 (0.003 $\pm$ 0.011)	0.01 $\pm$ 0.02 (0.015 $\pm$ 0.023)	0.07 $\pm$ 0.04 (0.003 $\pm$ 0.010)
	Male	1	0.10 $\pm$ 0.10 (0.000 $\pm$ 0.000)	0.03 $\pm$ 0.06 (0.000 $\pm$ 0.000)	0.01 $\pm$ 0.05 (0.000 $\pm$ 0.000)	0.05 $\pm$ 0.09 (0.000 $\pm$ 0.000)	0.20 $\pm$ 0.49 (0.000 $\pm$ 0.000)
	Female	1	0.42 $\pm$ 0.19 (0.000 $\pm$ 0.000)	0.46 $\pm$ 0.20 (0.000 $\pm$ 0.000)	0.47 $\pm$ 0.20 (0.000 $\pm$ 0.000)	0.27 $\pm$ 0.15 (0.000 $\pm$ 0.000)	0.26 $\pm$ 3.09 (0.000 $\pm$ 0.000)
	Male	2	0.05 $\pm$ 0.05 (0.008 $\pm$ 0.021)	0.05 $\pm$ 0.05 (0.014 $\pm$ 0.022)	0.06 $\pm$ 0.06 (0.015 $\pm$ 0.023)	0.00 $\pm$ 0.00 (0.011 $\pm$ 0.017)	0.03 $\pm$ 0.04 (0.002 $\pm$ 0.018)
	Female	2	0.54 $\pm$ 0.19 (0.000 $\pm$ 0.000)	0.52 $\pm$ 0.19 (0.000 $\pm$ 0.000)	0.51 $\pm$ 0.19 (0.000 $\pm$ 0.000)	0.10 $\pm$ 0.07 (0.0100 $\pm$ 0.071)	0.33 $\pm$ 0.14 (0.000 $\pm$ 0.000)

1, individual rearing; 2, bulk rearing; SE, standard error.

Discussion

Although the h^2 of growth-related traits of crustacean tremendously varied, but the majority indicated intermediate heritabilities in the range of 0.20–0.84 (e.g. in *Penaeus vannamei*, Perez-Rostro & Ibarra 2003; Argue, Arce, Lotz & Moss 2005; Gitterle, Rye, Salte, Cock, Johansen, Lozano, Suarez & Gjerde 2005; De Donato, Manrique, Ramerez, Mayer & Howell 2005; Castillo-Juarez, Casares, Campos-Montes, Villela, Ortega & Montaldo 2007; *Penaeus japonicus*, Hetzel, Crocos, Davis, Moore & Preston 2000; *Penaeus monodon*, Benzie, Kenway, Trott & 1997; Kenway, Macbeth, Salmon, McPhee, Benzie, Wilson & Knibb 2006). This was true for the estimations made at 2 months (mixed sex) and 5 and 6 months estimated from females GFP in the present study, despite of low h^2 estimates in males. The h^2 estimates of growth-related traits of GFP reported here together with those reported by Malecha *et al.* (1984) ($h^2 = 0.35 \pm 0.15$), Uraiwan *et al.* (2002) ($h^2 = 0.254 \pm 0.080$ and 0.272 ± 0.210) and a report on the high additive genetic variance of GFP based on a diallel crossing (Thanh, Ponzoni, Nguyen, Vu, Barnes & Mather 2010) may imply that the h^2 for growth of GFP is moderate to high in general.

Heritability of growth-related traits of mixed sex GFP declined with age (e.g. h^2_{F+M} for CL at 2 and 5 months of PL stage = 0.35 ± 0.15 and 0.12 ± 0.75 respectively), which was in accordance with those reported by Malecha *et al.* (1984); Meewan (1993) and Uraiwan *et al.* (2002). This may be partly explained by an aggressive behaviour of particularly male prawn, which differentiates into three morphotypes (Meewan 1993; Ranjeet & Kurup 2002; Karplus & Hulata 2005; Thanh, Ponzoni, Nguyen, Vu, Barnes & Mather 2009) at about 5 months after reaching the PL stage. The differentiation of morphotypes enhanced variation in growth capacity, especially of males.

Heritability of GFP was sexually dimorphic, high in females and low in males (e.g. h^2 of CL at 5 months of PL stage was 0.10 ± 0.06 for male and 0.26 ± 0.16 for female). Similar finding was also reported by Malecha *et al.* (1984). Likewise, Thanh *et al.* (2009) reported that growth variation, and relative frequencies among male morphotypes of GFP masked the among-strain growth difference for male while it was pronounced in females. Despite limited numbers of studies, sexual dimorphic heritabilities were also reported for other crustaceans, [e.g. h^2 for growth-related traits was higher for the immature male than

Table 3 Phenotypic correlation (r_p , below diagonal) for carapace length (CL), body length (BL), total length (TL), claw length (CIL) and body weight (BW) of *Macrobrachium rosenbergii* at 2, 5 and 6 months after reaching the post-larva stage

Age (months)	Sex group	Traits				
2	Unsexed	CL	–			
		BL	–	–		
		TL	–	–	–	
		CIL	–	–	–	–
		BW	0.91	–	–	–
5	Male	CL	–			
		BL	0.96	–		
		TL	0.92	0.95	–	
		CIL	0.83	0.84	0.84	–
		BW	0.87	0.88	0.87	0.81
						–
5	Female	CL	–			
		BL	0.95	–		
		TL	0.91	0.97	–	
		CIL	0.86	0.86	0.83	–
		BW	0.83	0.89	0.90	0.78
						–
6	Male	CL	–			
		BL	0.97	–		
		TL	0.96	0.96	–	
		CIL	0.86	0.84	0.83	–
		BW	0.73	0.72	0.71	0.67
						–
6	Female	CL	–			
		BL	0.97	–		
		TL	0.95	0.97	–	
		CIL	0.83	0.82	0.81	–
		BW	0.58	0.57	0.57	0.54
						–

female in Red Swamp crawfish, *Procambarus clarkii* (Girard), Lutz & Woltress 1989], and fish (El-Ibiary & Joyce 1978; Crandell & Gall 1993).

Despite the well-documented advantage of BLUP over the analysis of variance (ANOVA)-based analysis (Gjedrem & Olesen 2005), the application of BLUP to aquatic animals was well documented back to only the last decade [e.g. Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Winkelman & Peterson 1994a) Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Gall & Bakar 2002; Charo-Karisa, Komen, Rezk, Ponzoni, van Arendonk & Bovenhuis 2006), Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Gitterle *et al.* 2005; Castillo-Juárez *et al.* 2007), Coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Neira *et al.* 2006), common carp, *Cyprinus carpio* L. (Wang & Li 2007), Atlantic salmon, *Salmo salar* (Powell,

White, Guy & Brotherstone 2008)]. The present study was the first attempt to use BLUP for estimating h^2 in the GFP. According to the prior information obtained from ANOVA (data not shown), major factors affecting the present estimation of h^2 were HMs, tanks, effect of sex at 5 and 6 months and RCs (bulk and individual rearing). Therefore, these factors were incorporated into the model in order to separate the effects of these factors from genetic effect (Gjedrem & Olesen 2005) and thus enhanced precision of the estimation. It is noteworthy that, in our study, the variation of hatching time (months) was large (covering a period of 5 months), but with the BLUP approach, precision of the study was improved over the studies with less variation of spawning time [e.g. within a week (Malecha *et al.* 1984; Meewan 1993)].

It was our concern that the number of families (16 full-sib families) used in the present study was smaller than those used in a majority of the studies [e.g. 50 full- and half-sib families nested with 16 sires (Malecha *et al.* 1984); 430 full-sib families in Pacific white shrimp, *L. vannamei* (Gitterle *et al.* 2005)]. However, it meets the range of the recommended numbers [e.g. 20–30 families (Robertson 1959); $n = 2/h^2$ for full-sib families and $n = 4/h^2$ for half-sib families (Falconer & Mackay 1996)]. The weakness due to a consequence of small number of families could be partly compensated by relatively large family size (80 prawns family^{−1} for the pooled reared GFP + 40 prawns family^{−1} for the individually reared GFP). As a result, regarding SE, we obtained better precision of h^2 of female and male BW at 5 months ($h^2 = 0.28 \pm 0.17$ and 0.12 ± 0.08 respectively) than Malecha *et al.* (1984) based on 50 full-sib families ($h_s^2 = 0.34 \pm 0.24$ and -0.24 ± 0.11 for female and male respectively).

Based on our experimental design that each family was reared in duplicate, our animal model considered the random common environmental effect in addition to the random additive genetic effect and they were assumed to have no covariation. As such, the effect of common environment was theoretically removed and hence resulted in a more congruent estimation (Winkelman & Peterson 1994b). Thus, h^2 in this present study can be considered without any confounding effect of common environmental effect (c^2). However, it is of concern that the limited population size and the small genetic relationship available for the analyses may cause high SEs of the h^2 estimates in the present study.

Implications for selective breeding programmes

1. High heritability of the growth-related traits suggested that a simple mass selection, in which selection is up on individual's performance, may efficiently improve the growth-related traits of the GFP with a concern on high probability of inbreeding accumulation (Falconer & Mackay 1996). Nonetheless, this method has been efficiently used in marine shrimp (e.g. 17% and 14% increase respective to survival rate and weekly weight gain, FCR reduced by 19%, over 11 generations of the Pacific white shrimp, *L. vannamei*, De Donato *et al.* 2005). However, the empirical data showed that the Pacific white shrimp suffered from inbreeding accumulated over 22 years of family selection (Moss, Arce, Otoshi, Doyle & Moss 2007) which, theoretically, is a better selection method to control accumulation of inbreeding than mass selection (Falconer & Mackay 1996). Therefore, inbreeding depression should be concerned if a mass selection is used to improve GFP.
2. Selection may be performed on mixed sexes prawn at 2 months after reaching the PL stage because heritability is relatively high. However, it is of concern that the growth profile of the selected individuals may change as they grow up. According to our unpublished data, we observed high correlation between growth-related traits at 2 and 7 months after reaching the PL stage ($r = 0.70$ for CL, $P < 0.001$; $r = 0.60$ for BW, $P < 0.001$) of the 135 tagged individually reared prawns. Therefore, it is also recommended that a selection to improve growth of GFP may be performed at 2 months after reaching the PL stage.
3. Selection performed after sex differentiation should be exerted on females, by selecting on either CL, BL or TL. According to the present study, male BW is not a good target for selection due to relatively low h^2 . It is of concern that the correlation of CL and other traits was high. Therefore, selection for increasing BL or TL may increase the CL, which is undesirable.
4. High h^2 estimate for CL indicated a possibility of selection for smaller head. However, other growth-related traits may also decline as suggested by the high positive correlation between these traits and CL.

Acknowledgments

This research was supported by three funding sources, Thailand Research Fund (the Senior Research scholar Program 2007: project RTA 5080013 awarded to U. Na-Nakorn), the Royal Golden Jubilee PhD scholarship awarded to Nissara Kitcharoen and Kasetsart University. We would like to thank members of Laboratory of Aquatic Animal Genetics Kasetsart University and Mr Suwinai Pannkao for technical assistances. Finally, we thanked the anonymous referees whose comments significantly improved the manuscript.

References

- Anonymous CPF's meatier strain of *Macrobrachium rosenbergii*. *Asian Aquaculture Magazine*, September/October 2001, pp. 10–11.
- Argue B.J., Arce S.M., Lotz J.M. & Moss S.M. (2005) Selective breeding of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for growth and resistance to Taura Syndrome Virus. *Aquaculture* **204**, 447–460.
- Benzie J.A.H., Kenway M. & Trott L. (1997) Estimates for the heritability of size in juvenile *Penaeus monodon* prawns from half-sib matings. *Aquaculture* **152**, 49–53.
- Castillo-Juarez H., Casares J.C.Q., Campos-Montes G., Villela C.C., Ortega A.M. & Montaldo H.H. (2007) Heritability for body weight at harvest size in the Pacific white shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*, from a multi-environment experiment using univariate and multivariate animal models. *Aquaculture* **273**, 42–49.
- Charo-Karisa H., Komen H., Rezk M.A., Ponzoni R.W., van Arendonk J.A.M. & Bovenhuis H. (2006) Heritability estimates and response to selection for growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in low-input earthen ponds. *Aquaculture* **261**, 479–486.
- Crandell P.A. & Gall G.A.E. (1993) The effect of sex on heritability estimates of body weight determined from data on individually tagged rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **113**, 47–55.
- De Donato M., Manrique R., Ramirez L., Mayer C. & Howell C. (2005) Mass selection and inbreeding effect on cultivated strain of *Penaeus (Litopenaeus vannamei)* in Venezuela. *Aquaculture* **247**, 159–167.
- El-Ibiary H.M. & Joyce J.A. (1978) Heritability of body size traits, dressing weight and lipid content in channel catfish. *Journal of Animal Science* **48**, 82–88.
- Falconer D.S. & Mackay T.F.C. (1996) *Introduction to Quantitative Genetics*, 4th edn, pp. 160–183. Longman, Essex, UK.
- FAO (2009) *Fishstat Plus Version 2.30*. FAO Available at <http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS>. (accessed February 2009).

- Gall G.A.E. & Bakar Y. (2002) Application of mixed-model techniques to fish breed improvement: analysis of breeding-value selection to increase 98-day body weight in tilapia. *Aquaculture* **212**, 93–113.
- Gilmour A.R., Gogel B.J., Cullis B.R., Welham S.J. & Thompson R. (2002) *ASREML User Guide Release 1.0*. VSN International, Hemel Hempstead, UK.
- Gitterle T., Rye M., Salte R., Cock J., Johansen H., Lozano C., Suarez J.A. & Gjerde B. (2005) Genetic (co)variation in harvest body weight and survival in *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* under standard commercial conditions. *Aquaculture* **243**, 83–92.
- Gjedrem T. & Olesen I. (2005) Basic statistical parameters. In: *Selection and Breeding Programs in Aquaculture* (ed. by T. Gjedrem), pp. 45–47. Springer, Dordrecht, the Netherlands.
- Henderson C.R. (1975) Best linear unbiased estimation under selection model. *Biometrics* **31**, 423–437.
- Hetzel D.J.S., Crocos P.J., Davis G.P., Moore S.S. & Preston N.C. (2000) Response to selection and heritability for growth in the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* **181**, 215–223.
- Karplus I. & Hulata G. (2005) Social control of growth in *Macrobrachium rosenbergii* (de Man): a review and prospects for future research. *Aquaculture Research* **36**, 238–254.
- Kenway M., Macbeth M., Salmon M., McPhee C., Benzie J., Wilson K. & Knibb W. (2006) Heritability and genetic correlations of growth and survival in black tiger prawn *Penaeus monodon* reared in tanks. *Aquaculture* **259**, 138–145.
- Lutz G.C. & Woltress W. (1989) Estimation of heritability for growth, body size, and processing traits in Red Swamp crawfish. *Aquaculture* **78**, 21–33.
- Malecha S.R., Masuno S. & Onizuka D. (1984) The feasibility of measuring the heritability of growth pattern variation in juvenile freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture* **38**, 347–363.
- Meewan M. (1993) *Morphological inheritability and growth of giant freshwater prawn*. MSc thesis, Asian Institute of Technology, Pathomthane, Thailand, 77pp.
- Moss D.R., Arce S.M., Otoshi C.A., Doyle R.W. & Moss S.M. (2007) Effect of inbreeding on survival and growth of Pacific white shrimp, *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei*. *Aquaculture* **272**(Suppl. 1), S30–S37.
- Neira R., Diaz N.F., Gall G.A.E., Gallarado J.A., Lhorente J.P. & Manterola R. (2006) Genetic Improvement in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). I: Selection response and inbreeding depression on harvest weight. *Aquaculture* **257**, 9–17.
- New M.B. (2005) Freshwater prawn farming: global status, recent research and a glance at the future. *Aquaculture Research* **36**, 210–230.
- Perez-Rostro C.I. & Ibarra A.M. (2003) Heritabilities and genetic correlations of size traits at harvest size in sexually dimorphic Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) grown in two environments. *Aquaculture Research* **34**, 1079–1085.
- Powell J., White I., Guy D. & Brotherstone S. (2008) Genetic parameters of production traits in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* **274**, 225–231.
- Ranjeet K. & Kurup B.M. (2002) Heterogenous individual growth of *Macrobrachium rosenbergii* male morphotypes. *NAGA, The ICLARM Quarterly* **25**, 13–18.
- Robertson A. (1959) Experimental design in the evolution of genetic parameters. *Biometrics* **15**, 219–226.
- SAS (2003) *SAS OnlineDoc 9.1.3*. SAS Institute, Cary, NC, USA.
- Thanh N.M., Ponzoni R.W., Nguyen N.H., Vu N.T., Barnes A. & Mather P.B. (2009) Evaluation of growth performance in a diallel cross of three strains of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in Vietnam. *Aquaculture* **287**, 75–83.
- Thanh N.M., Nguyen N.H., Ponzoni R.W., Vu N.T., Barnes A.C. & Mather P.B. (2010) Estimates of strain additive and non-additive genetic effects for growth traits in a diallel cross of three strains of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in Vietnam. *Aquaculture* **299**, 30–36.
- Uraivan S., Sumanojitraporn S. & Ampolsak K. (2002) Genetic improvement for growth in giant freshwater prawn 1: estimating heritability and within family selection. In: *Proceedings of the 40th Kasetsart University Annual Conference (Animals and Fisheries Section)*, pp. 632–640. Kasetsart University, Bangkok, Thailand.
- Wang C. & Li S. (2007) Genetic effects and genotype x environment interactions for growth-related traits in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture* **272**, 267–272.
- Winkelman A.M. & Peterson R.G. (1994a) Genetic parameters (heritabilities, dominance ratios and genetic correlations) for body weight and length of chinook salmon after 9 and 22 months of saltwater rearing. *Aquaculture* **125**, 31–36.
- Winkelman A.M. & Peterson R.G. (1994b) Heritabilities, dominance variation, common environmental effects. *Aquaculture* **125**, 17–30.

Manuscript Number: AQUA-D-10-01451R2

Title: Loss of genetic variation of *Phalacrodon bleekeri* (Günther, 1864) in the hatchery stocks revealed by newly developed microsatellites

Article Type: Short Communication

Keywords: *Phalacrodon bleekeri*, hatchery stock, stock enhancement, multiplex PCRs, microsatellite

Corresponding Author: Professor Dr. Uthairat Na-Nakorn, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Kasetsart University

First Author: Anyalak Wachirachaikarn, M.S.

Order of Authors: Anyalak Wachirachaikarn, M.S.; Warangkana Prakoon, M.S.; Thuy T Nguyen, Ph.D.; Worawit Prompakdee, B.Sc.; Uthairat Na-Nakorn, Ph.D.

Abstract: Genetic variation of the two generations of hatchery stocks (the 1999 and 2006 yearclasses) and an original wild stock of *Phalacrodon bleekeri* was assessed using six novel microsatellite DNA loci developed from this species in two multiplex PCR reactions. Apparent decline of allele diversity was observed in the hatchery stocks relative to that of the wild ($A = 7.17 - 8.00$ and 13.00 for hatchery and wild stocks, respectively) despite of no changes in heterozygosity ($H_e = 0.84, 0.79$ and 0.70 for the wild, 1999 broodstock and 2006 broodstock, respectively, $P > 0.05$). The Bayesian assignment showed no genetic contributions from the hatchery stocks to genepool of the wild stock.

AQUA-D-10-01451R1

Loss of genetic variation of *Phalacrocorax bleekeri* (Günther, 1864) in the hatchery stocks revealed by newly developed microsatellites

Response to referee's comments

comments	Response
Firstly, I am sorry to say that the English of the paper is still of poor quality. The authors use too long sentences many times, incorrect tense for their verbs, and they mix up singular and plural forms in the same sentence. The authors have wisely chosen to delete sentences or paragraphs. That doesn't mean that they are finished. The MS needs to be more compact. Too many details can also be deleted e.g. there's far too many details as regards homozygosity and heterozygosity excess (table 2 could be deleted), or pairs of loci that are in linkage disequilibrium. This paper still needs short specified sentences and deletion of details to be accepted.	I found some mistake and corrected accordingly. I also tried my best to shorten the long sentences and also trimmed down the un-necessary things.
Genetic diversity between populations is not correct. Please correct throughout the MS with genetic differentiation between populations	It was corrected accordingly.
I would prefer if the authors delete standard deviation values from the number of alleles and give the heterozygosity values for each population separately.	It was revised accordingly.
Line 211. Change to Microsatellite development.	It was revised accordingly.
Lines 214-215. I do not understand the comparison to the microsatellites of other teleosts, the way it is written.	I deleted the comparison. My original idea was to give a benchmark.
Line 221. Admixture of different populations should produce heterozygote excess, no?	Admixture in this context referred to sampling of more than one population having different gene frequencies. It gives homozygote excess (the so-called "Wahlund effect").
Lines 232-239, 252-261, 268-273. These sentences still need better structure and English.	I split them into separated sentences except for lines 268-273. In my opinion the writing lines 268-273 is appropriate.
Table 1 Move PBL06 ahead of PBL10	It was revised.
Table 3 Correct 2007 Broodstock to 2006 Broodstock, and delete rxy	It was corrected and rxy was deleted.

AQUA-D-10-01451R1

Short Communication

Loss of genetic variation of *Phalacrodon bleekeri* (Günther, 1864) in the hatchery stocks revealed by newly developed microsatellites

Anyalak Wachirachaikarn^a, Warangkana Prakoon^b, Thuy T.T. Nguyen^{c,d}, Worawit Prompakdee^e, Uthairat Na-Nakorn^{f,g*}

^a Interdisciplinary Program in Genetic Engineering, Graduate School, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

^b Charoenpokphand Food Company Limited, Bangkok, Thailand

^c School of Life and Environmental Sciences, Deakin University, Geelong Campus at Waurn Ponds, Geelong, VIC 3217, Australia

^d Victorian AgriBioSciences Centre, Department of Primary Industries, Bundoora, VIC 3083, Australia

^e Chainat Fisheries Research and Development Institute, Chainat Province, Thailand

^f Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

^g Center for Advanced Studies in Agriculture and Food, National Research University Program, Kasetsart University, Bangkok, Thailand 10900

*Corresponding author

E mail: ffisurn@ku.ac.th; Tel/Fax: 66 2 5610990

ABSTRACT

Genetic variation of the two generations of hatchery stocks (the 1999 and 2006 yearclasses) and an original wild stock of *Phalacrocorax bleekeri* was assessed using six novel microsatellite DNA loci developed from this species in two multiplex PCR reactions. Apparent decline of allele diversity was observed in the hatchery stocks relative to that of the wild ($A = 7.17 - 8.00$ and 13.00 for hatchery and wild stocks, respectively) despite of no changes in heterozygosity ($H_e = 0.84, 0.79$ and 0.70 for the wild, 1999 broodstock and 2006 broodstock, respectively, $P > 0.05$). The Bayesian assignment showed no genetic contributions from the hatchery stocks to genepool of the wild stock.

KEYWORDS: *Phalacrocorax bleekeri*, hatchery stock, multiplex PCRs, microsatellite

1. INTRODUCTION

Southeast Asia, one of the world hotspots of freshwater fishes (Abell et al., 2008) is now facing threats on species extinction [see FishBase for examples (Froese and Pauly, 2010)] and decline of abundance of many native species (Baird and Flaherty, 2005). To mitigate the problem, restocking has been widely practiced for conservation and enhancing fishery production, with poor documentation and monitoring. Despite of recent concern on adverse impacts of this practice, there have been only limited studies in Thailand on this issue. For examples, Kamonrat (1996) based on microsatellite markers, found that the released of hatchery reared silver barb, *Barbodes gonionotus* has resulted in decline of genetic differentiation between populations but not the genetic variation within populations.

In this study the change of genetic variation of the captive stocks of *Phalacrodon bleekeri* (Günther, 1864) (synonym: *Kryptopterus bleekeri*) over 3 generations (from generation 2 towards generation 5) was evaluated using a set of newly developed microsatellite primers. *P. bleekeri* or Pla Daeng in Thai, inhabits rivers, streams, lakes and impoundment in Cambodia, Laos, Thailand and Vietnam (Froese and Pauly, 2010). It is of high value and the production is solely from artisanal fisheries. *P. bleekeri* is among the target species for restocking programs (Prompakdee, pers comm.) to mitigate the decline of abundance of many native fishes in the Chaophraya River in Thailand. At present two groups of broodstock (3 generations apart) have been maintaining in the Chainat Fisheries Research and Development Institute, Chainat Province. Therefore, it is of great interest to evaluate genetic alteration of the captive broodstocks relative to the wild populations over generations of captive breeding. The information obtained from this study is essential for recommendations on broodstock management to sustain the hatchery stocks.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Sample collection

In May 2009, samples of caudal fin clip (approximately 20 g) of *Phalacrocorax bleekeri* were collected from 39 samples of the second generation broodstock (spawned in 1999: 1999-broodstock) and 40 samples of the fifth generation broodstock (spawned in 2006: 2006-broodstock) of Chainat Fisheries Research and Development Institute. These stocks were originated from wild fish collected from Chaophraya River below the Chaophraya Dam at the location adjacent to the Chainat Fisheries Research and Development Institute. They were maintained without re-introduction of the wild fish. Finclip samples of 39 wild *P. bleekeri* individuals were collected from Chaophraya River at the location where the founders of the captive stocks have been collected. The fin clips were preserved in 90% ethanol until DNA extraction was performed.

2.2 DNA extraction

DNA extraction was performed according to the method described by Taggart et al. (1992) with slight modification. The DNA samples were used for development of microsatellite primers and subsequent scoring of microsatellite loci.

2.3 Development of microsatellite primers and multiplex PCR

The protocols employed here were as described in Na-Nakorn et al. (2010). In brief, genomic DNA derived from *P. bleekeri* were digested with *RsaI* then ligated to 21 bp and 25 bp *MluI* adapters. Next, it was purified using QIAquick PCR purification kit (Qiagen) and amplified. The PCR conditions and primer sequence were as reported in Edwards et al. (1996). For enrichment of microsatellites, 100 ng of ligated, denatured DNA was hybridised to repeated oligonucleotides {(GACA)₉, (GATA)₉, (AAAT)₉, (GATG)₉, (CAA)₁₄, (CA)₂₀, (GT)₅, (AAT)₁₄, (CT)₁₅, (AAG)₁₄} bound to the filter membranes. Following hybridisation the filters were washed, the bound DNA was eluted and amplified following Edwards et al.

(1996). The enriched DNA products were cloned using the pGEM[®]-T easy vector system I kit (Promega). Then the plasmids were transformed into *E. coli* JM109. The white colonies were selected in the presence of X-gal and IPTG in LB agar with ampicillin. Plasmids were then amplified using the illustra TempliPhi (GE Healthcare). DNA sequencing was performed using BIG DYE 3.1 terminator mix on an ABI 3730 automatic Sequencer (Applied Biosystems), conducted by MacroGen (Korea).

The PRIMER v.3 program (Rozen and Skaletsky, 2000), based upon the guideline for multiplex primer design (Multiplex PCR Handbook 09/2002, Qiagen), was used to design primers. Then a 5' end of forward primers were labeled with NED, PET, FAM, VIC fluorescent dyes (Applied Biosystems) based upon allelic size range. Each primer pair was individually applied to amplify each of five DNA samples. This step aimed to corroborate correct amplification, allele size range and microsatellite identification before multiplexing. All PCR reactions contained 10 ng of DNA, 0.5 units of DreamTaq DNA polymerase (Fermentas), 1.5 mM of MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP and 0.5 μM of each primer in the manufacturer's buffer. The reaction profile was 95 °C for 3 min, 35 cycles of 94 °C for 45 s, 57 °C for 45 s, and 72 °C for 60 s, followed by 10 min at 72 °C. PCR reactions were performed using PX2 Thermal cycler (ThermoScientific).

Subsequently two robust multiplex PCRs were developed based on allelic size range and fluorescent dye labeling. The individual DNA sample was amplified in the multiplex PCR using QIAGEN[®] Multiplex PCR kit (QIAGEN). The PCR conditions and reactions followed QIAGEN[®] Multiplex PCR handbook February 2008 (<http://www1.qiagen.com/literature/protocols/QIAGENMultiplexPCR.aspx>). The PCR products were detected by 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) by GeneSystems (Thailand), and demonstrated allelic size using Genemapper[®] software v.4.0 (Applied Biosystems).

2.4 Data analyses

Genepop version 4.0 (Rousset, 2008) was employed to test whether genotypic distributions of each population conform to Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). Exact P values were estimated using the Markov chain method (dememorization: 1000; batches: 100; iterations per batch: 1000) (Guo and Thompson, 1992). Inbreeding coefficient was calculated using FSTAT version 2.9.3.2 (Goudet, 2001). Parameters describing genetic variation within a population, allele frequencies, average number of alleles per locus, and observed and expected heterozygosities, were calculated using Popgene version 1.32 (Yeh and Boyle, 1999). The differences of genetic variation among populations were tested using the t-test (Archie, 1985). For all multiple tests, P values were corrected using a sequential Bonferroni correction (Hochberg, 1988; Rice, 1989).

To test the significant reduction of effective population size (a recent bottleneck), the program Bottleneck version 1.2.02 (Cornuet and Luikart, 1997) was used. The independent segregation of genotypes (linkage disequilibrium) was tested using the exact test (Markov chain: dememorization: 1000; batches: 100; iterations per batch: 1000) (Guo and Thompson, 1992) facilitated by Genepop version 4.0 (Rousset, 2008).

F -statistics (F_{ST} , F_{IT} and F_{IS}) were calculated using FSTAT version 2.9.3.2 (Goudet, 2001). The values of F -statistics were tested against zero by a bootstrapping method to determine the existence of population differentiation. Differences in distributions of allele frequencies between populations were tested using Fisher's exact test in Genepop version 4.0 (Rousset, 2008). Cavalli-Sforza and Edwards' (1967) genetic distances between population pairs were calculated using the program PHYLIP version 3.63 (Felsenstein, 1993).

To elucidate the contributions of the hatchery populations to the genepool of the wild population, the multilocus genotypes of individuals in the wild population were assigned to the two hatchery populations and the wild population itself using GeneClass2 (assignment

threshold: 0.05; Criteria for computation: Bayesian method of Rannala and Mountain, 1997; resampling algorithm: Paetkau et al., 2004; minimum number of simulated individuals: 1,000) (Piry et al., 2004).

3. RESULTS

3.1 Microsatellites of *Phalacrocorax bleekeri*

Among 30 sequenced positive clones, 10 clones contained microsatellites all of which allowed successful primer design. Two multiplex PCR panels were developed, i.e. a hexaplex (*PBL06*, *PBL10*, *PBL16*, *PBL21*, *PBL28*, *PBL33*) and a tetraplex (*PBL14*, *PBL17*, *PBL24*, *PBL26*). However, when a large number of samples (> 50) were screened, only seven primers produced unambiguous and reproducible microsatellite profiles (Table 1). These microsatellites possessed high polymorphisms (number of alleles per locus = 14 – 24; expected heterozygosity H_e = 0.848 – 0.927), except for *PBL17* which has relatively lower number of alleles per locus (5) and H_e (0.588).

3.2 Hardy-Weinberg equilibrium, genetic equilibrium and bottleneck

All loci conformed to Hardy-Weinberg equilibrium in the wild population ($n = 39$), whereas homozygote excess was observed in the 1999 broodstock at two loci, in the 2006 broodstock at one locus. Heterozygote excess was observed only in the 2006 broodstock at three loci. Genotype distribution of the wild population conformed to Hardy-Weinberg equilibrium at all loci while the departure from HWE towards homozygote excess was observed in the 1999-broodstock at two loci. Heterozygote excess was significant in the 2006-broodstock at three loci and homozygote excess at one locus. Overall, exact tests showed that only the wild population conformed to HWE and the captive stocks showed homozygote excess (after sequential Bonferroni correction).

Linkage disequilibrium was observed at two, three and eight pairs of loci in the wild population, the 1999-broodstock and the 2006-broodstock, respectively. Notably, the linkage between *PBL06* - *PBL21* was significant in all three populations. Therefore one of them (*PBL21*) was removed from the analysis.

Based on six remaining microsatellite loci, non random association was observed at one pair of loci in each of the wild and the 1999-broodstock populations. While in the 2006-broodstock, four loci pairs showed significant genotype disequilibrium.

Bottleneck test revealed no recent bottleneck occurred in all populations (the allele frequency distribution was approximately L-shaped).

3.3 Genetic variation within populations

Allele diversity (mean number of alleles per locus - A and average effective number of alleles per locus - A_e) of the wild population is almost 1.5 times higher than both yearclasses of broodstock ($P < 0.01$) (Table 3). We did not calculate allelic richness because the sample sizes were almost equal (39 – 40 individuals/population). Thirty-five alleles observed in the wild population were missing in the hatchery populations (supplement table). On the other hand, seven alleles found in the hatchery populations were not observed in the wild population.

Heterozygosities were not different among the brooders and the wild population although the trend was towards reduction of heterozygosities in the broodstock relative to the wild population.

3.4 Genetic differentiation between populations and genetic distance

Global F_{ST} was 0.086 ($CI_{95} = 0.130 - 0.052$), indicating significant genetic differentiation among populations. Every population pair was significantly different as revealed by differences in distributions of allele frequencies between populations and the

pairwise F_{ST} . Both pairwise F_{ST} and genetic distance showed the highest significant differentiation between wild and the 2006 broodstock ($D = 0.103$; $F_{ST} = 0.152$), followed by wild and 1999 broodstock ($D = 0.083$; $F_{ST} = 0.083$). The most similar populations were between the two broodstock yearclasses ($D = 0.026$; $F_{ST} = 0.052$).

3.5 Contributions of the hatchery populations as revealed by the Bayesian assignment

The Bayesian assignment assigned all of the wild individuals to its own population at a score of 100. None were assigned to the hatchery populations, implying no contributions of the hatchery populations to the wild populations.

4. DISCUSSION

4.1 Microsatellite development

We developed the first primer sets for microsatellites of *P. bleekeri*, which could be run in the multiplex PCRs. All but one locus (*PBL17*) contained dinucleotide motifs and thus, showed high polymorphisms (O'Connell and Wright, 1997). These primer sets, due to the capability of multiplex PCRs, would allow for saving of time and cost relative to single PCR (e.g., Neff et al., 2000; Navarro et al., 2008), with improved precision (Navarro et al., 2008).

4.2 Departure from HWE and genetic variation of the broodstocks

The homozygote excess observed for both hatchery populations may be an artifact of small sample sizes rather than the admixture of different population (as shown by the population history) and inbreeding (as shown by no recent bottleneck, heterozygote excess at some loci; see Na-Nakorn and Moeikum, 2009). Most of the microsatellites used (5 of 6 loci) were highly polymorphic. As such, they required large sample sizes to cover all possible genotypes.

It was obvious that both broodstock yearclasses of which levels of genetic variation within populations was not different, lost allele diversity relative to the wild stock, while decline in heterozygosities are not significant. This clearly demonstrated the effect of genetic drift caused by founder effect (using small number of individuals as founders). The founder effect is characterized by loss of alleles with minimal effect to heterozygosities (Allendorf and Phelps, 1980; e.g. Kohlmann et al., 2005; Horreo et al., 2008). Although the initial number of founders were relatively large (approximately 200 fish, Sonthipan Phasukdee, pers.comm.), the limited success of hatchery operations (e.g. broodstock maturation, induced breeding, nursing of fry, etc.) could have reduced the number of contributed broodstock. . Notably, decline of effective population size was not only a matter of broodstock number, but also mating scheme (Falconer and Mackay, 1996; see also Fiumera et al., 2004), increase variance of family size (Falconer and Mackay, 1996) which partly due to limited success of induced breeding commonly found in early domesticated fish, e.g. *Cromileptes altivelis* (Na-Nakorn et al., 2010).

The 2006 broodstock showed a trend of declining genetic variation (allele diversity reduced by 10.37% and expected heterozygosity reduced by 11.39%) relative to the 1999 broodstock, although not statistically significant. This is in accordance with the previous studies in many fish species [e.g. Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), Sekino et al. (2002); channel catfish (*Ictalurus punctatus*), Simmons et al., 2006; Atlantic salmon (*Salmo salar*), Skaala et al., 2005; Machado-Schiaffino et al., 2007; Horreo et al., 2008). Reduced genetic variation at molecular markers correlated well with reduced variation in quantitative traits (e.g. in *Drosophilla melanogaster*, Gilligan et al., 2005). Thus, this implied that the two broodstock yearclasses may lose their adaptability (see also Allendorf and Phelps, 1980 and Allendorf and Luikart, 2007). Therefore, we surmised that, without genetic restoration, this hatchery stocks may not persist in the long term.

4.3 Genetic impacts of the restocking

Previous release of *P. bleekeri* fingerlings into the Chaophraya River did not contribute to the genepool of the wild population as revealed by the Bayesian assignment. Failure of the stock enhancement program of *P. bleekeri* may result from too small numbers of released fingerlings ($\approx 10,000$ fingerlings/year, Worawit Prompakdi, pers. comm.) and low survival rate. In general, released fingerlings of finfish have low survival rates [e.g. 1.5 and 13.8% in white sea bass, *Atractoscion nobilis*, Hervas et al. (2010); Araki et al., 2007]. Therefore, the successful restocking programs needed large numbers of released fingerlings. For examples, the most successful stock enhancement reported for scallops and shrimp involved releasing of hundreds of millions to billions of juveniles each year (Uki, 2006; Wang et al., 2006).

4.4 Recommendations for broodstock management

The present results suggested that the hatchery stocks are not suitable for the restocking program due to the genetic alteration and decline of genetic variation. However, they may be useful for aquaculture. Due to the high market demand of this species and to reduce exploitation pressure on natural populations, aquaculture of *P. bleekeri* should be developed. Nevertheless, the genetic variation of the stocks which may relate to variation of the quantitative traits (Gilligan et al., 2005) should be enhanced. The most possible way is to introduce wild broodstock and incorporate into the hatchery stocks. The practice draws back the domestication process but efficiently increase genetic variation and effective population size of the hatchery stocks (Schonhuth et al., 2003; Na-Nakorn and Moeikum, 2009). Then, using a population with sufficient genetic variation, domestication selection may eventually yield good aquaculture stock.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors appreciate funding support from the Thailand Research Fund-TRF (Agriculture Program) through the project entitled “The Present Status of Local Freshwater Fish Production in Chainat Province” (project RDG5120040). A partial support was from TRF (Academic Program) through the Senior Research Scholar Program 2007: project RTA 5080013 awarded to U. Na-Nakorn. Finally, the authors would like to express sincere appreciation to anonymous referees whose comments significantly improved the manuscript.

6. REFERENCES

- Abell, R., Thieme, M.L., Revenga, C., Bryer, M., Kottelat, M., Bogutskaya, N., Coad, B., Mandrak, N., Balderas S.C., Bussing, W., Stiassny, M. L.J., Skelton, P., Allen, G. R., Unmack, P., Naseka, A., Ng, R., Sindorf, N., Robertson, J., Armijo, E., Higgins, J.V., Heibel, T.J., Wikramanayake, E., Olson, D., López, H., Reis, R. E., Lundberg, J.G., Pérez, M.H.S., Petry, P., 2008. Freshwater ecoregions of the world: a new map of biogeographic units for freshwater biodiversity conservation. *BioScience* 58(5), 403 - 414.
- Allendorf, F.W., Luikart, G., 2007. *Conservation and the Genetics of Populations*. Blackwell Publishing, MA, USA.
- Allendorf, F.W., Phelps, S.R., 1980. Loss of genetic variation in a hatchery stock of cutthroat trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* 109, 537-543.
- Araki, H., Cooper, B., Blouin, M.S., 2007. Genetic effects of captive breeding cause a rapid, cumulative fitness decline in the wild. *Science* 318, 100 -103.
- Archie, J.W., 1985. Statistical analysis of heterozygosity data: independent sample comparisons. *Evolution* 39, 623-637.

294 Baird, I.G., Flaherty, M.S., 2005. Environmental Assessment Mekong River fish conservation
 295 zones in southern Laos: Assessing effectiveness using local ecological Knowledge. J.
 296 Environ. Manage. 36 (3), 439–454.

297 Cavalli-Sforza, L.L., Edwards, A.W.F., 1967. Phylogenetic analysis: model and estimate
 298 procedures. Evolution 21, 550-570.

299 Cornuet, J.M., Luikart, G., 1997. Description and power analysis of two tests for detecting
 300 recent population bottlenecks from allele frequency data. Genetics 144, 2001-2014.

301 Edwards, K.J., Barker, J.H.A., Daly, A., Jones, C., Karp, A., 1996. Microsatellite libraries
 302 enriched for several microsatellite sequences in plants. Biotechniques 20, 758–760.

303 Falconer, D.S., Mackay, T.F.C., 1996. Introduction to Quantitative Genetics, Fourth edition.
 304 Longman, Essex.

305 Felsenstein, J., 1993. PHYLIP (Phylogeny Interference Package) version 3.5c. Distributed by
 306 the author. Department of Genetic, University of Washington, Seattle, USA.

307 Fiumera, A.C., Porter, B.A., Looney, G., Asmussen, M.A., Avise, J.C., 2004. How to keep
 308 numbers up and inbreeding down in supplemented stocks: Maximizing offspring
 309 production while maintaining genetic diversity in supplemental breeding programs of
 310 highly fecund managed species. Conserv. Biol. 18, 94-101.

311 Froese, R., Pauly, D. Editors., 2010. FishBase. World Wide Web electronic publication.
 312 www.fishbase.org, version (07/2010).

313 Gilligan, D.M., Briscoe, D., Frankham, R., 2005. Comparative losses of quantitative and
 314 molecular genetic variation in finite populations of *Drosophila melanogaster*. Genet.
 315 Res., Camb. 85, 47 - 55.

316 Goudet, J., 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices
 317 (version 2.9.3) 2003. Available at <http://www2.unil.ch/izea/software>.

318 Guo, S.W., Thompson, E.A., 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions
 319 for multiple alleles. *Biometrics* 48, 361 - 372.

320 Hervas, S., Lorenzen, K., Shane, M.A., Drawbridge, M.A., 2010. Quantitative assessment of a
 321 white sea bass (*Atractoscion nobilis*) stock enhancement program in California: Post-
 322 release dispersal, growth and survival. *Fish. Res.* 105, 237 - 243.

323 Hochberg, Y., 1988. A sharper Bonferroni procedure for multiple tests of significance.
 324 *Biometrika* 75, 800 - 802.

325 Horreo, J.L., Machado-Schiaffino, G., Griffiths, A., Bright, D., Stevens, J., Garcia-Vazquez,
 326 E., 2008. Identification of differential broodstock contribution affecting genetic
 327 variability in hatchery stocks of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 280, 89
 328 - 93.

329 Kamonrat, W. 1996. Spatial genetic structure of Thai silver barb *Puntius gonionotus*
 330 (Bleeker) populations in Thailand. Ph.D. Thesis, Dalhousie University, Canada.

331 Kohlmann, K., Kersten, P., Flajshans, M., 2005. Microsatellite-based genetic variability and
 332 differentiation of domesticated, wild and feral common carp (*Cyprinus carpio* L.)
 333 populations. *Aquaculture* 247, 253 - 266.

334 Na-Nakorn, U., Moeikum, T., 2009. Genetic diversity of domesticated stocks of striped
 335 catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage 1878), in Thailand: Relevance to
 336 broodstock management regimes. *Aquaculture* 297, 70 - 77.

337 Na-Nakorn, U., Yashiro, R., Wachirachaikarn, A., Pansaen, N., 2010. Novel microsatellites
 338 for multiplex PCRs of the Humpback grouper, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes,
 339 1828), and application for broodstock management. *Aquaculture* 306, 57 - 62.

340 Navarro, A., Badilla, R., Zamorana, M.J., Pasamontes, V., Hildebrandt, S., Sánchez, J.J.,
 341 Afonso, J.M., 2008. Development of two new microsatellite multiplex PCRs for
 342 three sparid species: Gilthead seabream (*Sparus auratus* L.), red porgy (*Pagrus*
 343 *pagrus* L.) and redbanded seabream (*P. auriga*, Valenciennes, 1843) and their
 344 application to paternity studies. *Aquaculture* 285, 30 - 37.

345 Neff, B.D., Fu, P., Gross, M.R., 2000. Microsatellite multiplexing in fish. *Trans. Amer. Fish.*
 346 *Soc.* 129, 584 - 593.

347 O'Connell, M., Wright, J.M., 1997. Microsatellite DNA in fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.* 7, 331
 348 - 363.

349 Paetkau, D., Slade, R., Burden, M., Estoup, A., 2004. Genetic assignment methods for the
 350 direct, real-time estimation of migration rate a simulation-based exploration of
 351 accuracy and power. *Mol. Ecol.* 13, 55 - 65.

352 Piry, S., Alapetite, A., Cornuet, J.-M., Paetkau, D., Baudouin, L., Estoup, A., 2004.
 353 GeneClass2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant
 354 Detection. *J. Hered.* 95, 536 - 539.

355 Ramírez, M.A., Patricia-Acevedo, J., Planas, S., Carlin, J.L., Funk, S.M., McMillan, W.O.,
 356 2006. New microsatellite resources for groupers (Serranidae). *Mol. Ecol. Notes* 6,
 357 813 - 817.

358 Rannala, B., Mountain, J.L., 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes.
 359 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9197 - 9221.

360 Rice, W.R., 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43, 223 - 225.

361 Rousset, F., 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for
362 Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.* 8, 103 - 106.

363 Rozen, S., Skaletsky, H.J., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist
364 programmers. In: Krawetz, S., Misener, S. (Eds.), *Bioinformatics Methods and*
365 *Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 365 - 386.

366 Schonhuth, S., Luikart, G., Doadrio, I., 2003. Effects of a founding event and supplementary
367 introductions on genetic variation in a captive breeding population of the endangered
368 Spanish killifish. *J. Fish Biol.* 63, 1538 - 1551.

369 Sekino, M., Hara, M., Taniguchi, N., 2002. Loss of microsatellite and mitochondrial DNA
370 variabilities in hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*.
371 *Aquaculture* 213, 101 - 122.

372 Simmons, M., Mickett, K., Kucuktas, H., Li, P., Dunham, R., Liu, Z., 2006. Comparison of
373 domestic and wild channel catfish (*Ictalurus punctatus*) populations provides no
374 evidence for genetic impact. *Aquaculture* 252, 133 - 146.

375 Skaala, Ø., Taggart, J.B., Gunnes, K., 2005. Genetic differences between five major
376 domesticated strains of Atlantic salmon and wild salmon. *J. Fish Biol.* 67, 118 - 128.

377 Taggart, J.B., Hynes, R.A., Prodöhl, P.A., Ferguson, A., 1992. A simplified protocol for
378 routine total DNA isolation from salmonid fishes. *J. Fish Biol.* 40, 963 - 965.

379 Uki, N. 2006. Stock enhancement of the Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* in
380 Hokkaido. *Fish. Res.* 80, 62 - 66.

381 Wang, Q., Zhuang, Z., Deng, J., Ye, Y., 2006. Stock enhancement and translocation of the
382 shrimp *Penaeus chinensis* in China. *Fish. Res.* 80, 67 - 79.

383 Yeh, F.C., Boyle, T., 1999. POPGENE, version 1.32. The user friendly software for
384 population analysis. Edmonton: University of Alberta and CIFOR.
385
386
387
388

Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Chatujak, Bangkok, 10900

15 July, 2011

Dear Professor Gideon Hulata,

On behalf of the authors, I would like to resubmit a manuscript entitled “Loss of genetic variation of *Phalacrotonotus bleekeri* (Günther, 1864) in the hatchery stocks revealed by newly developed microsatellites” by Anyalak Wachirachaikarn, Warangkana Prakoon, Thuy T.T. Nguyen, Worawit Prompakdee, Uthairat Na-Nakorn (AQUA-D-10-01451R1).

I have made revisions according to the comments as described in a respond to reviewer file.

Your kind consideration is appreciated.

Best Regards

Uthairat Na-Nakorn

Table 1 Characteristics of seven microsatellite primers developed from DNA of *Phalacronotus bleekeri*. Data were recorded from genotypes of 78 individuals

Primer name	Accession number	Repeat sequence	Primer details	Predicted product size	Observed product range	Allele number	Expected heterozygosity
<i>PBL06</i>	GU306058	(GA) ₉ N(GA) ₉	F 5′CCATCTAGTAGGGGTCCGGTA3′ R 5′TAGCTTGTGCGGTTTTCTGA3′	150	133-171	14	0.906
<i>PBL10</i>	GU306057	(GT) ₂₅	F 5′GGCTCAGTTATAAACCCGACA3′ R 5′AGGATGACCCTCATCACTCTG3′	203	181-223	17	0.902
<i>PBL17</i>	GU306059	(GAA) ₈	F 5′TGTAAGCAAAGCTGTGAGCAA3′ R 5′GGCGGGCAACAAAGTTTAAT3′	231	220-235	5	0.588
<i>PBL21</i>	GU306060	(GT) ₉	F 5′TCTGAAGCCGCCTTTTAGTT3′ R 5′GAAGGATCCACTGCCTGGTA3′	183	204-250	24	0.927

<i>PBL24</i>	GU306061	(GA) ₁₅	F 5'TGTGTGTTCTGACATGGGAAA3'	249	242-276	15	0.893
			R 5'CCCAATGGAAAAATAGGAACAA3'				
<i>PBL26</i>	GU306062	(GA) ₆₃	F 5'CCAGTCCAGGTATAACAAGCAG3'	227	235-279	18	0.848
			R 5'AGGAACATGTTTGGGTCTCG3'				
<i>PBL33</i>	GU306063	(CT) ₂₄	F 5'CTCAGAGGCCTCACAGCATT3'	178	156-194	16	0.889
			R 5'AATCGCGTTTCTTTGCATTC3'				

Table 2 Genetic variation and F_{IS} of broodstocks and wild populations of *Phalacrocorax bleekeri*; Note: n = sample sizes; A = mean number of alleles per locus; A_e = mean effective number of alleles per locus; H_o = observed heterozygosity; H_e = expected heterozygosity; r_{xy} = average genetic relatedness among individuals within population; means in the same column superscripted with different letters are statistically different ($P < 0.01$).

Population	n	A	A_e	H_o	H_e
Wild	39	13.00 ± 4.65^a	7.29 ± 2.67^a	0.84 ± 0.14^a	0.84 ± 0.12^a
1999 Broodstock	39	8.00 ± 2.00^b	4.83 ± 1.61^b	0.75 ± 0.11^a	0.79 ± 0.07^a
2006 Broodstock	40	7.17 ± 1.84^b	3.80 ± 1.39^b	0.70 ± 0.23^a	0.70 ± 0.15^a
Overall	118	9.39 ± 3.16	5.31 ± 1.79	0.76 ± 0.07	0.78 ± 0.07

ลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจของปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*)

ปลาโมง (*Pangasius bocourti*) และลูกผสม (*P. hypophthalmus* X *P. bocourti*)

Performance of Striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*), Pla mong (*Pangasius bocourti*) and their hybrid (*P. hypophthalmus* X *P. bocourti*)

สิทธิชัย หะทะโชติ¹ เกตุณภัต ศรีไพโรจน์² และ อุทัยรัตน์ ณ นคร³

Sittichai Hatachote¹ Kednapat Sriphairoj¹ and Uthairat Na-Nakorn²

บทคัดย่อ

การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจระหว่างปลาสวาย ปลาโมง และปลาสวายโมง ทำการทดลองโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) เลี้ยงปลาในกระชัง(3x3x1.5เมตร) อัตราปล่อย 45 ตัวต่อลูกบาศก์เมตร ให้อาหาร 30% โปรตีน วันละ 2 ครั้ง ปลาทดลองมีน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 13.61-23.32 กรัม เลี้ยงเป็นเวลา 93 วัน พบว่าน้ำหนักสุดท้ายของปลาสวายมีค่ามากที่สุดและแตกต่างจากปลาโมงและสวายโมงอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าเท่ากับ 267.31 ± 21.43 , 90.50 ± 2.12 และ 68.05 ± 2.58 กรัม ตามลำดับ น้ำหนักเพิ่มเฉลี่ยต่อวัน อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตราการรอดของปลาทั้ง 3 ชนิด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยปลาสวายมีน้ำหนักเพิ่มเฉลี่ยต่อวันและอัตราการเติบโตจำเพาะมากที่สุด (2.62 ± 0.22 g, $2.63 \pm 0.05\%$) ปลาโมงมีอัตราการรอดมากที่สุด (98%) ส่วนอัตราแลกเนื้อพบว่าปลาสวายและปลาโมงมีค่าแตกต่างจากปลาสวายโมงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 1.44 ± 0.20 , 1.10 ± 0.00 และ 2.43 ± 0.34 ตามลำดับ

ABSTRACT

Performance of economically important trait among Striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*; Ph), Pla mong (*Pangasius bocourti*; Pb) and their hybrid (*P. hypophthalmus* X *P. bocourti*) was conducted using Complete Randomization design. Fish (average initial weight range from 13.61 to 23.32) were cultured in cage (13.5 m^3) density in each cage was 45 fish/ m^3 . Fish were fed twice a day using 30% protein feeds. The preliminary data from July-October 2009 (93 days) showed that the average final weight of Stripped catfish was highest ($p < 0.05$) among three species (267.31 ± 21.43 , 90.50 ± 2.12 and 68.05 ± 2.58 g for Ph, Pb and PhxPb, respectively). ADG, SGR and SR of all three species were significantly different ($p < 0.05$). ADG and SGR of Ph (2.62 ± 0.22 g and $2.63 \pm 0.05\%$) SR of Pb (98%) was highest followed by Ph (85%) and PhxPb (48%), respectively. FCR of Pb (1.10 ± 0.00) and Ph (1.44 ± 0.20) were higher than those of PhxPb (2.43 ± 0.34).

Key Words: growth performance, *Pangasianodon hypophthalmus*, *Pangasius bocourti*, Pangasiids hybrid

S hatachote: hatachote@hotmail.com

¹ คณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร

Faculty of Natural Resources and Agro-industry, Kasetsart University, Chalermphrakiat Sakonnakorn Campus

² สำนักวิชาเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยนเรศวร พะเยา

School of Agriculture and Natural Resources Naresuan University Phayao

³ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University

คำนำ

ปลาในครอบครัว Pangasiidae จัดเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจกลุ่มหนึ่งในประเทศไทย และภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ปลาหลายชนิดในกลุ่มเป็นปลาที่มีความสำคัญในแง่การอนุรักษ์ เช่น ปลาบึก (*Pangasianodon gigas*) ปลาเทพา (*Pangasius sanitwongsei*) (IUCN, 2005; TISTR, 1995) และหลายชนิดมีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยง เช่น ปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*) และปลาโงหรือปลาเผาะ (*Pangasius bocourti*) ปลาสวายเป็นปลาพื้นเมืองของไทย มีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย ผลผลิตประจำปี 2548 ของปลาสวายมีปริมาณสูงถึง 16,473 ตัน คิดเป็นมูลค่า 329,927,500 บาท (FAO, 2005) สำหรับปลาโงหรือปลาเผาะนั้นได้รับการส่งเสริมให้เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจตัวใหม่ ในโครงการพัฒนาสัตว์น้ำเศรษฐกิจชนิดใหม่ของไทยเพื่อการส่งออก เนื่องจากคุณสมบัติของเนื้อปลาที่มีสีขาว จึงเป็นที่ต้องการของประเทศแถบยุโรปโดยจะส่งออกกันมากในรูปแบบของเนื้อแล่ (fillet) ทำให้มีการส่งเสริมการเลี้ยงปลาชนิดนี้กันมากโดยเฉพาะในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (อรรถนพ และณรงค์ศักดิ์, 2550)

โดยธรรมชาติแล้วปลาโงเป็นปลาที่มีความดกไข่น้อยคือแม่ปลา 1 กิโลกรัมมีความดกไข่เฉลี่ย 7,236 ฟอง (วรัญญู และคณะ, 2549) ทำให้เกิดปัญหาไม่สามารถผลิตลูกพันธุ์ปลาโงได้เพียงพอกับความต้องการซึ่งเป็นข้อจำกัดของการผลิตปลาชนิดนี้ในเชิงพาณิชย์ ด้วยเหตุนี้จึงมีการผลิตลูกปลาสวายโงซึ่งได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างปลาสวายซึ่งมีความดกไข่น้อยกว่าสูง (อำพล และอารีย์, 2532) และปลาโง แม้ว่าการแก้ไขปัญหาดังกล่าวจะสามารถผลิตลูกปลาเนื้อขาวได้ทันกับความต้องการของตลาดและปัจจุบันมีการผลิตลูกปลาสวายโงในเชิงพาณิชย์กันอย่างกว้างขวางในแถบภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แต่ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับลักษณะที่สำคัญที่มีผลต่อศักยภาพการผลิต เช่น อัตราการเจริญเติบโต การเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ความต้านทานโรค อัตรารอดของปลาสวายโง และคุณภาพของเนื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับชนิดพ่อแม่ (ปลาสวายและปลาโง) นั้นยังไม่พบรายงานเกี่ยวกับข้อมูลเหล่านี้ ซึ่งหากในอนาคตจะมีการส่งเสริมการเลี้ยงปลาสวายโงให้เป็นปลาเศรษฐกิจที่สำคัญ จำเป็นต้องอาศัยข้อมูลดังกล่าวข้างต้นในการพัฒนาการเลี้ยงปลาชนิดนี้ ผลจากการศึกษาในครั้งนี้จะทำให้ทราบข้อมูลเบื้องต้นที่เป็นประโยชน์ต่อการเลี้ยง และการผลิตปลาเนื้อขาวกลุ่ม Pangasiids ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design ; CRD) โดยแบ่งเป็น 3 ชุดการทดลอง (treatment) ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ (replication) ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 : ปลาสร้อย

ชุดการทดลองที่ 2 : ปลาหมอ

ชุดการทดลองที่ 3 : ปลาสร้อยหมอ

สถานที่และระยะเวลาการทดลอง

ทำการทดลอง ณ อุทยานหนองหารเฉลิมพระเกียรติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร เป็นระยะเวลา 93 วัน ตั้งแต่เดือน กรกฎาคม ถึง เดือนตุลาคม 2552

วิธีการทดลอง

การเตรียมกระชังทดลอง

เตรียมกระชังอวนแบบมีพุนลอยน้ำขนาด 3x3x1.5 เมตร ปริมาตร 13.5 ลูกบาศก์เมตร จำนวน 9 กระชัง กั้นกระชังลอยอยู่สูงกว่าพื้นท้องน้ำประมาณ 1 เมตร

การเตรียมปลาทดลอง

นำลูกปลาสร้อย ปลาหมอ ปลาสร้อยหมอ ที่ได้จากการเพาะพันธุ์ของสถานีประมงน้ำจืดนครพนม ในช่วงฤดูการเพาะพันธุ์ลูกปลาทั้งหมด 3 ชนิด โดยลูกปลาทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในการทดลองมีอายุเริ่มต้นอยู่ในช่วง 30 – 50 วัน เลี้ยงปลาทั้ง 3 ชนิดในกระชังก่อนทำการสุ่มลงกระชังทดลองเป็นระยะเวลา 1 เดือน เพื่อให้ปลาที่ใช้ในการทดลองได้ทำการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม หลังจากนั้นทำการสุ่มปลาทั้ง 3 ชนิดลงในแต่ละชุดการทดลองในอัตราการปล่อย 45 ตัวต่อลูกบาศก์เมตรหรือกระชังละประมาณ 600 ตัว อาหารที่ให้คืออาหารปลาดุกสำเร็จรูปลอยน้ำขนาดเล็ก ให้อาหารวันละ 2 มื้อ

การจัดการการทดลอง

การให้อาหารทดลอง

ให้อาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ดลอยน้ำ เป็นอาหารปลาดุกเล็กระดับโปรตีนร้อยละ 30 โดยให้กินจนอิ่มวันละ 2 ครั้ง เวลา 09.00 และ 16.00 น. บันทึกปริมาณอาหารที่ปลากิน

การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ดำเนินการเก็บข้อมูลคุณภาพน้ำของพื้นที่การเลี้ยง 2 สัปดาห์/ครั้ง โดยทำการวิเคราะห์หาปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (dissolved oxygen ;DO) ความเป็นกรดเป็นด่าง(pH)

แอมโมเนียทั้งหมด(total ammonia) และวัดอุณหภูมิ น้ำ ทุกพารามิเตอร์วัดโดยใช้เครื่อง YSI Professional Plus

การเก็บข้อมูลการเจริญเติบโต

สุ่มซึ่งวัดขนาด น้ำหนัก ปริมาณอาหารที่กิน จำนวนปลาทดลองทั้งหมดที่เหลือ โดยสุ่มซึ่งวัดปลาจำนวน 10 % ของจำนวนปลาในแต่ละชุดการทดลองทุกๆ 1 เดือน จนถึงสิ้นสุดการทดลอง

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลทั้งหมดมาหาค่าน้ำหนักเพิ่มเฉลี่ยต่อวัน (average daily weigh gain, ADG) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, SGR) อัตราการรอดตาย (survival rate) และ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion ratio, FCR) ตามวิธีที่กล่าวอ้างใน Hephher (1988) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนแบบ one way analysis of variance แปลงข้อมูลอัตราการรอดด้วย arcsine transformation ก่อนการวิเคราะห์เพื่อให้ข้อมูลมีการกระจายเป็นแบบปกติ (normal distribution) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองโดยวิธี Duncan's new multiple range test กำหนดค่าความเชื่อมั่นที่ 95%

ผลการทดลองและวิจารณ์

การเจริญเติบโต

การทดลองเลี้ยงปลาปลาสวาย ปลาโม่ง ปลาสวายโม่งในกระชังในแหล่งน้ำนิ่งที่ความหนาแน่น 45 ตัวต่อลูกบาศก์เมตร เป็นระยะเวลา 93 วัน ปรากฏผลการทดลองดังนี้

น้ำหนักสุดท้ายและความยาวสุดท้าย

ปลาสวาย ปลาโม่ง ปลาสวายโม่งที่เลี้ยงในกระชังมีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ยเท่ากับ 23.32 ± 0.93 , 13.61 ± 0.93 และ 21.39 ± 1.86 กรัม ตามลำดับ และมีความยาวเริ่มต้นเฉลี่ยเท่ากับ 14.07 ± 0.25 , 11.01 ± 0.19 และ 13.36 ± 0.09 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อนำมาเลี้ยงในกระชังเป็นระยะเวลา 93 วัน พบว่ามีน้ำหนักสุดท้ายเฉลี่ยเท่ากับ 267.31 ± 21.43 , 90.50 ± 2.12 และ 68.05 ± 2.58 กรัม ตามลำดับ ซึ่งน้ำหนักสุดท้ายเฉลี่ยของปลาสวายมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับปลาโม่ง และปลาสวายโม่ง ส่วนความยาวสุดท้ายเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 30.56 ± 0.56 , 21.47 ± 0.38 และ 20.05 ± 0.65 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งความยาวสุดท้ายเฉลี่ยของปลาทั้ง 3 ชนิดมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 1)

น้ำหนักที่เพิ่มและน้ำหนักเพิ่มเฉลี่ยต่อวัน

ปลาสวาย ปลาโม่ง ปลาสวายโม่งที่เลี้ยงในกระชังมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเท่ากับ 243.99 ± 20.5 , 76.88 ± 2.69 และ 46.67 ± 1.47 กรัม ตามลำดับ ซึ่งน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลาทั้ง 3 ชนิดมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนค่าน้ำหนักเพิ่มเฉลี่ยต่อวันมีค่าเท่ากับ 2.62 ± 0.22 , 0.83 ± 0.03 และ 0.50 ± 0.02 กรัม/วัน ตามลำดับ ซึ่งน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยต่อวันของปลาทั้ง 3 ชนิดมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยปลาสวายมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยต่อวันสูงที่สุด (ตารางที่ 1)

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ

เมื่อสิ้นสุดการทดลองการเลี้ยงปลาทราย ปลาโม่ง ปลาทรายโม่ง ในกระชังเป็นระยะเวลา 93 วัน พบว่า อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเฉลี่ยเท่ากับ 2.63 ± 0.05 , 2.04 ± 0.09 และ 1.24 ± 0.07 %/วัน ตามลำดับ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเฉลี่ยของปลาทั้ง 3 ชนิดมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยปลาทรายมีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเฉลี่ยสูงที่สุด (ตารางที่ 1)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าปลาทรายมีน้ำหนักสุดท้ายเฉลี่ย ความยาวสุดท้ายเฉลี่ย น้ำหนักที่เพิ่ม น้ำหนักเพิ่มเฉลี่ยต่อวัน และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุด แสดงให้เห็นว่าปลาทรายมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในการเลี้ยงในกระชังในแหล่งน้ำนิ่ง เนื่องจากปลาทรายสามารถทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้ดี กินอาหารเก่ง และอาศัยในแหล่งน้ำนิ่งได้ดีกว่าปลาโม่ง และปลาทรายโม่ง ที่ชอบอาศัยในแหล่งน้ำไหล

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ

เมื่อสิ้นสุดการทดลองการเลี้ยงปลาทราย ปลาโม่ง ปลาทรายโม่ง ในกระชังเป็นระยะเวลา 93 วัน โดยใช้อาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ดลอยน้ำโปรตีน 30% พบว่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของปลาทั้ง 3 ชนิดมีค่าเท่ากับ 1.44 ± 0.20 , 1.10 ± 0.01 และ 2.43 ± 0.34 ตามลำดับ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของปลาทรายและปลาโม่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่มีความแตกต่างกับปลาทรายโม่งชนิดมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยพบว่าปลาโม่งมีค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีที่สุด รองลงมาคือปลาทราย และปลาทรายโม่ง ตามลำดับ (ตารางที่ 1) สอดคล้องกับรายงานของ วิศนุพร และ โสภิต (2547) รายงานว่า ปลาทรายโม่งมีนิสัยการกินอาหารรวมกันเป็นฝูง ตื่นตกใจง่ายขณะกินอาหาร หากเกิดเสียงดังหรือถูกรบกวนจะผละหนีนินที่ซึ่งคล้ายคลึงกับพฤติกรรมของปลากดแก้ว ปลาทรายโม่งอาจไม่ขึ้นมากินอาหารอีกเลย ทำให้อาหารบางส่วนสูญเสียไประหว่างการให้อาหารมีผลให้อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อสูงเมื่อเทียบกับปลาทรายและปลาโม่ง

อัตราการรอด

เมื่อสิ้นสุดการทดลองการเลี้ยงปลาทราย ปลาโม่ง ปลาทรายโม่ง ในกระชังเป็นระยะเวลา 93 วัน พบว่าอัตราการรอดของปลาทั้ง 3 ชนิดมีค่าเท่ากับ 85.06 ± 3.95 , 98.05 ± 1.49 และ 48.11 ± 7.59 ตามลำดับ อัตราการรอดของปลาทั้ง 3 ชนิดมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยพบว่าปลาโม่งมีค่าอัตราการรอดสูงที่สุดรองลงมาคือปลาทราย และปลาทรายโม่ง ตามลำดับ (ตารางที่ 1) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าปลาทรายโม่งมีอัตราการรอดที่ต่ำที่สุดอาจเนื่องมาจากในช่วงระหว่างการเลี้ยงแหล่งน้ำนิ่งที่เลี้ยงมีการแพร่ระบาดของพาราสิตภายนอก เช่น ปลิงใส เห็บระฆัง หมัดปลา พบว่าปลาทรายโม่งไม่สามารถทนทานต่อการเข้าจู่โจมของพาราสิตดังกล่าว ก่อให้เกิดการบอบช้ำและมีการตายเกิดขึ้นเป็นจำนวนมากเมื่อเทียบกับปลาทราย และปลาโม่ง

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยของการเจริญเติบโตของปลาปลาสวาย ปลาโม่ง ปลาสวายโม่งที่เลี้ยงในกระชังในแหล่งน้ำนิ่งเป็นระยะเวลา 93 วัน

ค่าเฉลี่ยของการเจริญเติบโต	ชุดการทดลอง		
	ปลาสวาย	ปลาโม่ง	ปลาสวายโม่ง
น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)	23.32± 0.93 ^a	13.61± 0.93 ^b	21.39±1.86 ^a
ความยาวเริ่มต้น (เซนติเมตร)	14.07±0.25 ^a	11.01±0.19 ^c	13.36±0.09 ^b
น้ำหนักสุดท้าย (กรัม)	267.31±21.43 ^a	90.50±2.12 ^b	68.05±2.58 ^b
ความยาวสุดท้าย (เซนติเมตร)	30.56±0.56 ^a	21.47±0.38 ^b	20.05±0.65 ^c
น้ำหนักที่เพิ่ม(กรัม)	243.99± 20.5 ^a	76.88 ±2.69 ^b	46.67±1.47 ^c
น้ำหนักเพิ่มเฉลี่ยต่อวัน (กรัม/วัน)	2.62±0.22 ^a	0.83 ±0.03 ^b	0.50 ±0.02 ^c
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (%/วัน)	2.63±0.05 ^a	2.04±0.09 ^b	1.24±0.07 ^c
อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ(FCR)	1.44 ±0.20 ^b	1.10±0.01 ^b	2.43 ±0.34 ^a
อัตราการรอด (%)	85.06±3.95 ^b	98.05± 1.49 ^a	48.11 ±7.59 ^c

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($\alpha = 0.05$)

คุณภาพน้ำ

คุณภาพน้ำจากการทดลอง พบว่าบริเวณกระชังปลาที่มีค่าอุณหภูมิของน้ำอยู่ในช่วง 28.9 – 32.5 องศาเซลเซียส ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำมีค่าอยู่ระหว่าง 2.03 – 4.58 มิลลิกรัม/ลิตร ความเป็นกรดเป็นด่างมีค่าอยู่ระหว่าง 6.84 – 7.93 มิลลิกรัม/ลิตรเป็นคุณภาพน้ำที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ(ไมตรี้ และจารุวรรณ,2528 ; ธรรมรักษ์, 2541) ปริมาณแอมโมเนียมีค่าเท่ากับ 0.00 มิลลิกรัม/ลิตร ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงซึ่งไม่เป็นอันตรายต่อการเลี้ยงปลา(ไมตรี้,2530)

สรุป

การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจระหว่างปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*) ปลาโม่ง (*Pangasius bocourti*) และปลาสวายโม่ง (*P. hypophthalmus* X *P. bocourti*) ทำการทดลองโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomization design) เลี้ยงปลาในกระชัง (3x3x1.5 เมตร) แขนงลอยในแหล่งน้ำนิ่ง อัตราปล่อยกระชังละ 45 ตัวต่อลูกบาศก์เมตร ให้อาหาร 30% โปรตีน วันละ 2 ครั้ง ปลาทดลองมีน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นระหว่าง 13.61-23.32 กรัม

ข้อมูลเบื้องต้นจากการเลี้ยงเป็นเวลา 93 วัน (กรกฎาคม-ตุลาคม 2552) พบว่าน้ำหนักสุดท้ายของปลาสวยมีค่ามากที่สุดและแตกต่างจากปลาโง่งและสวยโง่งอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 267.31 ± 21.43 , 90.50 ± 2.12 และ 68.05 ± 2.58 กรัม ตามลำดับ น้ำหนักเพิ่มเฉลี่ยต่อวัน (Average daily weight gain) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate) และอัตราการรอด (Survival rate) ของปลาทั้ง 3 ชนิด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยปลาสวยมีน้ำหนักเพิ่มเฉลี่ยต่อวันและอัตราการเติบโตจำเพาะมากที่สุด ($2.62 \pm 0.22\%$, $2.63 \pm 0.05\%$) รองมาคือปลาโง่ง (0.83 ± 0.03 , $2.04 \pm 0.09\%$) และปลาสวยโง่ง (0.50 ± 0.02 , $1.24 \pm 0.07\%$) ปลาโง่งมีอัตราการรอดมากที่สุด (98%) รองมาคือปลาสวย (85%) และปลาสวยโง่ง (48%) ส่วนอัตราแลกเนื้อ (Feed conversion ratio) พบว่าปลาสวยและปลาโง่งมีค่าแตกต่างจากปลาสวยโง่งอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 1.44 ± 0.20 , 1.10 ± 0.00 และ 2.43 ± 0.34 ตามลำดับ ผลการทดลองเบื้องต้นที่ได้บอกแนวโน้มว่าปลาสวยและปลาโง่งมีลักษณะอัตราการเจริญเติบโต อัตรารอด และการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีกว่าลูกผสม ในสภาวะการทดลองในแหล่งน้ำนิ่ง อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ยังไม่สิ้นสุดเหลือระยะเวลาการทดลองอีกประมาณ 5 เดือน ซึ่งจะมีการเก็บข้อมูลด้านความต้านทานโรค และลักษณะต่างๆที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพของเนื้อปลามาวิเคราะห์ด้วย ซึ่งเมื่อได้ข้อมูลครบถ้วนจึงจะสามารถสรุปถึงความเป็นไปได้ในการส่งเสริมการเลี้ยงปลาเนื้อขาวกลุ่ม Pangasiids ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากโครงการ "การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน-2" (เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ศ.ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร-2550) ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการทำการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- ธรรมรักษ์ ละอองนวล. 2541. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. คณะเกษตรและอุตสาหกรรม. สถาบันราชภัฏอุบลราชธานี, อุบลราชธานี. 212 หน้า.
- ไมตรี ดวงสวัสดิ์. 2530. เกณฑ์คุณภาพน้ำเพื่อการคุ้มครองทรัพยากรสัตว์น้ำจืด. เอกสารวิชาการฉบับที่ 75. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ, กรมประมง. 38 หน้า.
- ไมตรี ดวงสวัสดิ์ และ จารุวรรณ สมศิริ. 2528. คุณสมบัติของน้ำและวิธีวิเคราะห์สำหรับงานวิจัยทางการประมง. ฝ่ายวิจัยสิ่งแวดล้อมสัตว์น้ำ. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ, กรมประมง. 115 หน้า.
- วรัญญู ขุนเจริญ, โสภิต ไชยยาว และ สุพัตร ศรีพัฒน์. 2549. การเพาะพันธุ์ปลาโง่งรุ่น F1. เอกสารวิชาการฉบับที่ 69/2549. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง. 27 หน้า.
- วิศณุพร รัตนตรัยวงศ์ และ โสภิต ไชยยาว. 2547. ความหนาแน่นที่เหมาะสมในการอนุบาลลูกปลากดแก้วในบ่อซีเมนต์. เอกสารเผยแพร่ฉบับที่ 2/2547. สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ, กรมประมง. 9 หน้า.

อรรถนพ อิมศิริปี่ และ ณรงค์ศักดิ์ ศิริชัยพันธุ์. 2550. การเลี้ยงปลาโพงในกระชังที่ความหนาแน่นต่างกัน 4 ระดับ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 16/2550. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง. 21 หน้า.

อำพล พงศ์สุวรรณ และ อารีย์ สิทธิมงคล. 2532. คู่มือการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. โครงการพัฒนาประมงภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, กรมประมง. หน้า 26-247.

FAO. 2005. Fishstat Plus Version 2.30. Available source:

<http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS.asp>, September 5, 2007.

IUCN. 2005. 2005 IUCN Red List of Threatened Species. Available source:

www.iucnredlist.org, January 5, 2006.

Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR). 1995. The endangered species of animal and plant in Thailand. The Teachers' Council of Thailand Press, Bangkok.

Editorial Manager(tm) for Fisheries Science
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Genetic diversity of feral populations of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Thailand and evidences of genetic introgression

Article Type: Original Article

Corresponding Author: Uthairat Na-Nakorn, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Kasetsart University

First Author: Srijanya Sukmanomon, M.S. (Fisheries)

Order of Authors: Srijanya Sukmanomon, M.S. (Fisheries); Wansuk Senanan, Ph.D.; Anne Kapuscinski, Ph.D.; Uthairat Na-Nakorn, Ph.D.

Abstract: This study aimed to understand genetic diversity of Thai feral populations of Nile tilapia which have significant contribution to fisheries production of freshwater fish of the country. The possible introgression from other tilapia populations/species was also investigated. We used 14 microsatellite primers to study three feral *O. niloticus* populations collected from reservoirs representing three parts of the country, Sam Roi Yot reservoir in southern Thailand (ON-SY), Bang Phra reservoir in central Thailand (ON-BP) and Bueng Boraphet in northern Thailand (ON-BB). We imported genetic data of two reference populations of *O. niloticus* [one population each from the Chitralada Villa Royal Residence, Thailand (ON-CD) and the genetically improved GIFT strain] and one *O. mossambicus* population from South Africa. We found that ON-CD contributed to significant portions of the genepool of the feral populations. Genetic differentiation among the feral populations was significant. Introgression at the intraspecific level (from ON-GIFT to ON-BP and ON-BB) was observed while interspecific introgression between *O. niloticus* and *O. mossambicus* was apparent in ON-SY. Genetic variation was high in ON-BP ($Ar = 7.99$, $He = 0.75$) relatively low in ON-BB ($Ar = 5.71$, $He = 0.62$) and ON-SY ($Ar = 5.78$, $He = 0.71$).

Suggested Reviewers: Prof. Nobuhiko Taniguchi

Fukushima U.

nobuhiko@ma.fuma.fukuyama-u.ac.jp

He is among the top scientist in this field and has published many papers.

Prof. Gideon Hulata

Institute of Animal Science

vlaqua@volcani.agri.gov.il

Prof. Hulata has long experience as the editor of *Aquaculture*. Thus he has very good experience in reviewing the paper in the field of genetic diversity.

Devin Bartley

FAO

devin.bartley@fao.org

He has long time experience in the field of population genetics.

Genetic diversity of feral populations of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Thailand and evidences of genetic introgression

Srijanya Sukmanomon¹ Wansuk Senanan² Anne R. Kapuscinski³ Uthairat Na-Nakorn^{4*}

¹Program in Aquaculture, Graduate School, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

²Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University, Chon Buri 20131, Thailand

³Environmental Studies Program, Dartmouth College, Hanover, NH 03755, USA

⁴Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

* corresponding author

E mail: ffisurn@ku.ac.th; Tel/Fax: 66 2 5610990

ABSTRACT

This study aimed to understand genetic diversity of Thai feral populations of Nile tilapia which have significant contribution to fisheries production of freshwater fish of the country. The possible introgression from other tilapia populations/species was also investigated. We used 14 microsatellite primers to study three feral *O. niloticus* populations collected from reservoirs representing three parts of the country, Sam Roi Yot reservoir in southern Thailand (ON-SY), Bang Phra reservoir in central Thailand (ON-BP) and Bueng Boraphet in northern Thailand (ON-BB). We imported genetic data of two reference populations of *O. niloticus* [one population each from the Chitralada Villa Royal Residence, Thailand (ON-CD) and the genetically improved GIFT strain] and one *O. mossambicus* population from South Africa. We found that ON-CD contributed to significant portions of the genepool of the feral populations. Genetic differentiation among the feral populations was significant. Introgression at the intraspecific level (from ON-GIFT to ON-BP and ON-BB) was observed while interspecific introgression between *O. niloticus* and *O. mossambicus* was apparent in ON-SY. Genetic variation was high in ON-BP ($A_r = 7.99$, $H_e = 0.75$) relatively low in ON-BB ($A_r = 5.71$, $H_e = 0.62$) and ON-SY ($A_r = 5.78$, $H_e = 0.71$).

Keywords: feral populations; *Oreochromis niloticus*; genetic difference; introgression, Thailand

INTRODUCTION

Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* has been transferred beyond its native range in Africa to natural and manmade waterbodies world wide [1]. Consequently, non-native feral populations are now established in at least 74 countries (Fishbase: <http://www.fishbase.org/Country/CountryList.php?ID=2&GenusName=Oreochromis&SpeciesName=niloticus+niloticus> “Accessed 6 May 2011”).) such as Bangladesh, the Philippines, Thailand [2], Indonesia [3], Hong Kong, Malaysia [4], Viet Nam [5], Sri Lanka [6], USA [7-8], Madagascar [9], Nicaragua [10] and Mexico [11]. Feral populations have significantly contributed to freshwater fisheries of many countries, exemplified by Thailand, Indonesia and El Salvador [12]. However, the production of feral Nile tilapia in some countries was likely on decline, e.g. in Sri Lanka [13], El Salvador, Ecuador, Fiji and Thailand [12]. In fact, the reasons for the decline production are complicated and include habitat destruction and/or over exploitation. However, genetic factors were believed to account for such reduction, for examples genetic introgression by *O. mossambicus* [13]. Furthermore, the feral populations were likely originated from small founders, hence may pose low genetic variation. Thus, they could not adapt to fluctuated environments. Due to the importance of the feral tilapia production to low income, rural communities, it is urgent to evaluate genetic variation of the feral Nile tilapia populations in Thailand.

Background on Thai populations of *O. niloticus*: *O. niloticus* in Thailand originated from 50 individuals brought to Thailand by the Crown Prince Akihito of Japan as a present for King Bhumipol Aduljadej in 1965 [14]. The stock was told to originate from 200 fish being transferred from Egypt [15]. Eventually, only 38 introduced individuals survived and have been reared in the Chitralada Villa Royal Residence. The successive generations of these founders were given to the Department of Fisheries, Thailand and were used for aquaculture and stock enhancement [16]. Consequently, *O. niloticus* has established populations in natural

waters around Thailand through escapes from aquaculture and regular intentional stocking [2].

The objectives of this study were to (1) assess genetic diversity of feral populations of Nile tilapia in Thailand; (2) elucidate contribution of the newly introduced strain of Nile tilapia to the feral populations; and (3) detect interspecific introgression from *Oreochromis mossambicus* of which feral populations were established in Thailand [17]. The results of this study would benefit management and utilization of these feral populations.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection: Geographical origins and sample sizes of all examined populations are given in Figure 1 and Table 1. Samples of feral populations of *O. niloticus* were collected from three reservoirs representing different geographic regions, Sam Roi Yot reservoir in Prachuap Khiri Khan province, southern Thailand, Bang Phra reservoir in Chon Buri province, central Thailand and Bueng Boraphet in Nakhon Sawan province, northern Thailand.

Origins of the feral tilapia populations were as follows. Sam Roi Yot reservoir: *O. niloticus* (Chitralada strain) and *O. mossambicus* have been cultured around this area with at least an evidence of escapees due to flooding [18]. Additionally, feral tilapias could originate from fish stocked in the adjacent Pranburi Dam [19] which connects to this reservoir. Bang Phra reservoir: this reservoir has been stocked with tilapia fingerlings (Chitralada strain) in the early period of introduction [20] and recently stocked with fingerlings of the GIFT strain (Sangduen N, pers. Comm., 2010). Bueng Boraphet reservoir: the feral tilapia population established here could have been aquaculture escapees into the Nan River which runs into this reservoir [21].

A piece of caudal fin (about 50 mg) was collected from each individual, kept in 95% Ethyl alcohol and delivered to Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok. DNA extraction protocol of Taggart et al. [22] was performed with slight modification, and DNA stored at -20°C until used.

For the model-based clustering analyses, we included the genetic data, based on the same sets of microsatellite primers, of two *O. niloticus* populations (Sukmanomon et al, in prep.) comprising Chitralada strain and 9th generation of GIFT strain (Table 1). One population of *O. mossambicus* from South Africa was also included to detect possible interspecific introgression.

Microsatellite primers and PCR conditions: Fourteen microsatellite primers developed from DNA of *Oreochromis niloticus* by Lee and Kocher [23] were used as detailed in Sukmanomon et al (in prep.). Each of the six primer pairs (*UNH172*, *UNH211*, *UNH216*, *UNH222*, *UNH212* and *UNH 160*) were run in a single locus PCR performed in a 10 µl reaction volume contain 2.5 ng of template DNA, 1X PCR buffer, 1.5mM MgCl₂, 100 µM of each dNTPs, 0.25 µM of each primer and 0.2 units of *Taq* DNA polymerase (Fermentas). PCR were carried out in a PX2 Thermal Cycler (Thermoscientific, USA) under the following conditions: 3 min at 94°C followed by 30 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at T_a°C (see Sukmanomon et al, in prep.), 1 min at 72°C, with final extension of 5 min at 72°C. Separation of the PCR products were done on the 4.5% polyacrylamide gel and visualized by silver staining [24]. Allele sizes were designated relatively to the M13 DNA ladder.

In addition, two multiplex PCR each comprised four microsatellite primers (Multiplex 1: *UNH213*, *UNH153*, *UNH132*, *UNH138*; Multiplex 2: *UNH192*, *UNH1004*, *UNH982*, *UNH173*) were scored against all DNA samples. A 10 µl total reaction volume consisted of 5 ng of template DNA, 1 µl of 10X PCR reaction buffer with 20 mM MgCl₂, 0.3-0.4 µl of each primer (10 µM) depending on relative fluorescence in relationship to other primers in the

multiplex, 1 μ l dNTPs (20 μ M) and 0.12 μ l FastStrat *Taq* DNA polymerase (Roche, Germany). Forward primers were fluorescently end labeled with 6-FAM, VIC, NED or PET (Applied Biosystems, USA) for visualization. A two-step PCR program was used for the multiplex amplification with GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) involving: 5 min at 94°C followed by 28 cycles of 30 s at 94°C, 45 s at a first T_a °C (detailed in Sukmanomon et al, in prep.), 1 min at 72°C; 10 cycles of 30 s at 94°C, 45 s at a second T_a °C (detailed in Sukmanomon et al, in prep.), 45 s at 72°C and a final extension of 10 min at 72°C. One microliter of diluted multiplex PCR product was run on an ABI 3130xl Genetic Analyzer with a LIZ600 size standard (Applied Biosystems, USA). Then the electropherograms and allelic sizes were analyzed using GeneMapper[®] Software Version 4.0 (Applied Biosystems, USA). The facilities for multiplex PCR were provided by the Genomic Variation Laboratory, University of California, Davis, CA, USA.

Data analyses: The following analyses were performed on multilocus genotypes. Test for conformation to Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) by a Markov chain approximation of exact test [25] was facilitated by the program GENEPOP version 4.0 [26-27]. The analyses also provided the locus-wise F_{IS} for each population. The test for linkage disequilibrium based on the Chi-square test was performed using the program GENETIX Version 4.05.2 [28], wherein the disequilibrium coefficient (D) was provided.

The evidences of “null-allele” were tested when departure from HWE towards homozygote excess was observed using the program Micro-Checker version 2.2.3 [29]. Then the genotypes of populations showing evidences of null alleles were adjusted accordingly, wherever appropriate. The populations were once again tested for the departure from HWE.

Genetic variation within populations (average number of alleles/locus- A , effective number of alleles/locus- A_e , observed and expected heterozygosity- H_o and H_e respectively) was estimated using the program POPGENE version 1.32 [30]. Calculation of allelic richness

(A_r), the A estimated from the smallest sample size was performed using the program FSTAT version 2.9.3.2 [31].

To assess the overall population differentiation, the F -statistics (F_{ST} , F_{IS} and F_{IT}) were calculated using the program FSTAT version 2.9.3.2 [31]. The genetic differentiation between populations based on the allele frequency distribution was tested using GENEPOP version 4.0 [32, 27]. Then the pairwise F_{ST} between population pair with significant probability was calculated using ARLEQUIN version 3.11 [33].

To detect population admixture, we employed a model-based clustering method for inferring population structure using the program STRUCTURE version 2.3.3 [34-35]. Analysis was run using the admixture ancestry model with twenty runs of a burn-in time of 100,000 followed by 100,000 iterations. The best number of clusters, K , was decided according to the *ad hoc* statistic ΔK based on the rate of change in the log probability of data between the successive K values [36], that calculated using STRUCTURE HARVESTER version 0.6.7 (Structure Harvester: http://users.soe.ucsc.edu/~dearl/software/struct_harvest/ "Accessed 17 July 2011"). Then the averaged proportion of membership of each cluster was calculated for each predefined population/species using a Bayesian clustering algorithm in STRUCTURE. The clustering is meaningful when a proportion of membership is apparently highest in a single cluster and the non-contaminated population would have a proportion of membership equaling 1 in one cluster and 0 in the other clusters. The population of origin would be a referenced population that showed the highest proportion of membership in the same cluster with the feral population(s).

In addition, the individual bar plot which showed probabilities of assigning an individual to each cluster (admixture proportion, q_i) gave better detailed results. An admixed individual assigned to two genetic groups at $q_i = 0.5$ is first generation hybrid, while the

introgression was characterized by q_i higher or less than 0.5; only the assignments with $q_i > 0.1$ are taken into account.

RESULTS

Hardy-Weinberg Equilibrium and Linkage disequilibrium

The Fisher exact test showed that ON-BB conformed to HWE while significant homozygote excess was observed in ON-BP and ON-SY ($P < 0.0036$; Bonferroni correction). However the null allele test suggested adjustment of genotypes due to presence of null alleles of six loci in ON-BP (*UNH211*, *UNH222*, *UNH212*, *UNH153*, *UNH192* and *UNH1004*); four loci for ON-SY (*UNH172*, *UNH222*, *UNH160* and *UNH1004*); and one locus for ON-BB (*UNH172*). The re-analyses based on the adjusted genotypes showed the same results of the Fisher exact test. Whereas the locus-wise HWE tests showed that every locus conformed to HWE in ON-SY and homozygote excess at 3 loci in ON-BP.

The linkage disequilibrium (LD) was observed in all populations. The most intensive LD, shown at 45 loci pairs was observed in ON-BP following by 10 loci pairs in ON-BB and 8 loci pairs in ON-SY. Disequilibrium coefficient (D) indicated that linkage disequilibrium was more recent in ON-SY as indicated by high value of mean D ($D = 0.0668 \pm 0.0199$) comparing with ON-BB ($D = 0.0305 \pm 0.0033$) and ON-BP ($D = 0.0237 \pm 0.0017$).

Genetic variation within populations of the feral populations

Among the three feral populations, ON-BP had significantly higher allele diversity (A and A_r) than ON-BB and ON-SY ($A_r = 7.99 \pm 1.82$, 5.71 ± 2.05 and 5.78 ± 1.48 for ON-BP, BB and ON-SY, respectively). Expected heterozygosity of ON-BP ($H_e = 0.75 \pm 0.11$) was higher than ON-BB (0.62 ± 0.17) ($P < 0.05$) while it was not different with ON-SY (0.71 ± 0.08). Likewise, H_e of ON-SY was not different with that of ON-BB (Table 2).

Genetic diversity among populations

The overall F_{ST} showed significant population differentiation at least for a pair of populations among the three feral populations ($F_{ST} = 0.0917$; $CI_{99\%} = 0.068 - 0.115$). Further test based on the allele frequency distribution (Fisher's exact test, $P < 0.017$, Bonferroni corrected) and pairwise F_{ST} ($P < 0.017$, Bonferroni corrected) showed significant differences between all pairs of populations. The pairwise F_{ST} among the three feral populations were 0.0501 - 0.1437).

Population clustering and population origin

To identify the genetic composition of the feral populations, the multilocus data of two populations of Nile tilapia including Chitralada strain and GIFT strain (Sukmanomon et al, in prep.) and one *O. mossambicus* population were incorporated in the model-based clustering analyses. The results showed, base on the highest ΔK value (208.42), that the best fitted number of populations (K) was 3. The proportion of membership, averaged across individuals in a population (Table 3), clearly assigned the reference populations/species into separate cluster with high proportion of membership (0.974 - 0.996) (Table 3). ON-BP, as expected shared highest proportion of membership (0.724) with ON-CD following by 0.268 sharing with ON-GIFT. Relative higher proportion of ON-BB genepool (proportion of membership = 0.914) was assigned to cluster 1 with ON-CD, while the assignment of ON-BB to other cluster was considered as *nil* (proportion of membership < 0.100). Notably, 0.121 of ON-SY was assigned to a cluster of *O. mossambicus* with a majority of genepool (0.868) was assigned to cluster 1 with ON-CD.

Figure 2 showed that ON-BP mainly comprised of pure ON-CD (23 individuals; $q_1 = 0.888 - 0.996$). Seven pure GIFT ($q_2 = 0.964 - 0.993$) and seven admixed individuals between ON-CD and ON-GIFT ($q_1 = 0.172 - 0.880$; $q_2 = 0.116 - 0.826$) were observed in ON-BP. Less degree of admixture was reported for ON-BB which comprised of 21 pure ON-CD ($q_1 = 0.961 - 0.997$); none of pure GIFT; three admixed individual between ON-CD and ON-GIFT

($q_1 = 0.118 - 0.620$; $q_2 = 0.379 - 0.881$). ON-SY comprised of 26 pure ON-CD ($q_1 = 0.898 - 0.995$); 18 admixed individuals between ON-CD and OM-S ($q_1 = 0.515 - 0.896$; $q_3 = 0.102 - 0.483$).

DISCUSSION

We found evidence that ON-CD (Chitralada strain) was a major contributor to genepools of the three feral populations of *O. niloticus* in Thailand. Genetic differentiation was apparent among the feral populations. The feral population from Bang Phra (ON-BP) has relatively high genetic variation while those of Bueng Boraphet (ON-BB) and Sam Roi Yot (ON-SY) were low. Intraspecific genetic introgression (from ON-GIFT to ON-BP and ON-BB) was obvious, while the interspecific (from *O. mossambicus* to *O. niloticus*) introgression was observed only in Sam Roi Yot (ON-SY) population.

An evidence of having ON-CD as a population of origin and intra- and inter-specific introgression

All of the feral tilapia populations shared substantial proportion of membership with a reference population from Chitralada Villa Royal Residence (ON-CD) as revealed by the model-based clustering. This finding agreed with prior information, which indicated extensive release of the ON-CD into many reservoirs in Thailand [16-17, 20]. In addition, ON-CD was introduced into Sam Roi Yot reservoir through the aquaculture escapees [18].

Genetic introgression was detected at intra- and inter-specific levels. The introgressions likely play significant role in shaping genetic constitution of the feral populations. The introgression is an important mechanism to increase genetic variation [37-39]. Whereas adverse impacts are also concern due to the so-called “out-breeding depression” which refers to breaking of linkage group favoring local adaptation [40-42]. The model-based clustering showed remarkable contribution of ON-GIFT to ON-BP (a proportion of

membership of 0.268 sharing with ON-GIFT). This was in line with the significant homozygote excess and intensive linkage disequilibrium (45 loci pairs) observed for ON-BP which indicated population admixture (Wahlund effect) [43-44]. Moreover the individual bar plots clearly supported the population admixture by revealing 18.9% each of relatively pure ON-GIFT and admixed individuals (ON-GIFT and ON-BP) in ON-BP. The LD coefficient suggested that introgression in ON-BP was not recent [40]. The impact of introgression on genetic variation within populations will be discussed in the later part of this manuscript.

Introgression from ON-GIFT was also observed in ON-BB, but at a lower magnitude (un-detected in the model-based clustering; 12.5% admixed individuals revealed by the individual bar plot). Actually, there was no report on release of ON-GIFT into Bueng Boraphet reservoir. Thus the introgression may come from the escapees from cage culture nearby [21].

No intra-specific introgression was observed in ON-SY but introgression from *O. mossambicus* was detected. This was not surprising because GIFT has never been released into this reservoir while there was no report on aquaculture of GIFT in this area. Whereas, *O. mossambicus* has been widely cultured around the area of Sam Roi Yot reservoir since it was first introduced into Thailand [17]. This species survives well in the low salinity habitats like the areas surrounding Sam Roi Yot reservoir. As such, when *O. niloticus* was released into this reservoir, introgression definitely occurred. The introgression between these species is common and has been previously reported in Thailand [17] and worldwide [6, 45-46]. The impact of interspecific introgression is discussed in the later part of this manuscript.

Genetic diversity of feral populations of Nile tilapia in Thailand

Genetic differentiation between populations

Despite of the common origin, the three feral populations were genetically divergent. This may be mainly explained by genetic drift after the initial founding event [39, 47]. In

addition, the cumulative effect of natural selection across at least 30 generations (1 year/generation) and limited gene-flow among the feral populations may have substantially contributed to this genetic divergence. In addition, the gene-flow from other genepools (e.g. ON-GIFT and OM-S), may have increased the magnitude of the genetic differentiation among these populations.

Genetic variation within populations

Genetic variation within populations, especially allele diversity, depends on genetic constitution of the founding stock and effective population size since the founding event and in successive generations. There is a tendency that a population under exploitation reduces its effective population size over time (e.g. New Zealand snapper, *Pagrus auratus* in Tasman Bay during 1950 and 1998 [48]; plaice, *Pleuronectes platessa* in North Sea and Iceland during 1924-2002 [49]) which resulted in decline of genetic variation. Therefore, it is relatively unexpected that the population from Bang Phra had higher allele diversity than the population of origin (Chitralada) ($A = 5.4 - 6.8$, and $H_e = 0.624 - 0.82$ [50-52]; $A = 6.00 \pm 1.88$; $H_e = 0.65 \pm 0.15$; Sukmanomon et al, in prep.). This is most likely explained by gene-flow from GIFT as discussed in the above section.

Generally, genetic introgression can increase genetic variation of the recipient populations (e.g. Sušnik et al. [53]; Sukmanomon et al, in prep.). Genetic variation of ON-SY was not increased as compared to its presumed ancestor, ON-CD, despite of introgression from *O. mossambicus*. This implied that the genetic variation of this population might be reduced due to other factors, e.g. habitat destruction, over-exploitation [54], which resulted in small effective population size. Despite of high A_r in ON-BP, the low effective number of alleles per locus observed in all of the feral tilapia populations revealed high proportion of alleles with low frequencies. These alleles are easily to be left out in the later generations. Given the problems on global warming which may result in rising of water temperature,

intrusion of saline water into rivers, etc. [55-56] ON-BB and ON-SY will face more serious problems than ON-BP.

One of the feral populations (ON-BP) showed comparable genetic variation ($A = 9.07 \pm 2.34$; $H_e = 0.75 \pm 0.11$) relative to the wild populations of Nile tilapia ($A = 7.22 - 9.42$; $H_e = 0.493 - 0.900$ [57]). Whereas, the others (ON-BB and ON-SY) had genetic variation apparently lower than the wild populations. Despite of the inconclusive empirical data on relationship of genetic variation and performance traits (e.g. Shikano and Taniguchi [58]; Heath et al [59]; Overturf et al [60]; Borrell et al [61]), high genetic variation (especially allele diversity) theoretically promotes better adaptability of the populations [62]. As such, it is likely that ON-BP would be able to adapt well and may benefit the yield of artisanal fisheries in this reservoir. However, it is unfortunate that the annual production of the feral populations was available only for Bueng Boraphet reservoir, hence un-enabling us to make intensive discussion on a relationship of genetic variation with the production. In the case of Bueng Boraphet reservoir, decline of production (e.g. 46 mt in 1998 reduced to 12 mt in 2009 [63]), in addition to impacts of other factors, might relate with low genetic variation of ON-BB. Notably, heterozygosities of the feral populations of Nile tilapia in Thailand were in the same range with the values reported for feral Nile tilapia elsewhere, e.g. in southern California ($H = 0.35 - 0.72$ [7]).

Implications on management and utilization of the feral populations

The feral tilapia in Bang Phra reservoir (ON-BP) has high genetic variation. This implied that it would adapt well with the changing environment. However, sustainability of this population depends on effective population size in successive generations. Therefore, the management should be performed to retain its effective population size. Firstly, monitoring of captive fisheries activities and production should be performed. Then measures to prevent

over-exploitation, improper fishing (e.g. poisoning), etc. should be established. In addition the measures to avoid polluting and habitat destruction were also required.

The other two feral populations had low genetic variation and thus may not well adapt to the changing environment. The mitigation may be done by introduction of other gene-pools, probably GIFT strain. Generally fishery management is always towards retaining genetic integrity of a population, thus translocation is always avoided. In this context, it is likely that the feral populations of Nile tilapia in Thailand are not useful as gene-pools for genetic improvement. This was because their gene-pools are represented by their ancestor, ON-CD. ON-CD which is pure *O. niloticus* has been evaluated for its performance and widely used for genetic improvement program. More importantly the management measures recommended to apply for Bang Phra are also recommended for Sam Roi Yot and Bueng Boraphet reservoir.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded in part from a research contract with the Biodiversity and Biotechnology Interface program of the United States Agency for International Development (GDG-G-00-01-0010-00 awarded to the University of Minnesota, ARK and WS co-PIs), the Department of Fisheries, Wildlife and Conservation Biology, University of Minnesota (ARK support); Thailand Research Fund (the Senior Research scholar Program 2007: project RTA 5080013 awarded to U. Na-Nakorn) and the Royal Golden Jubilee-Ph.D. scholarship (Grant No. PHD/0198/2547) awarded to Srijanya Sukmanomon. The authors appreciated the support from Professor Bernie May, Genetic Variation Laboratory, Department of Animal Science, University of California Davis, CA, USA where a part of the DNA analyses was performed.

REFERENCES

1. Trewavas E (1983) Tilapiine fishes of the genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*. Brit. Mus. (Nat. Hist.), London
2. Asian Development Bank (2005) An impact evaluation of the development of genetically improved farmed tilapia and their dissemination in selected countries. The Asian Development Bank, Philippines
3. Abery NW, Sukadi F, Budhimam AA, Kartamihardja ES, Koeshendrajana S, Buddhiman, De Silva SS (2005) Fisheries and cage culture of three reserviors in west Java, Indonesia; a case study of ambitious development and resulting interactions. Fish Manag Ecol 12:315-330
4. De Silva SS, Subasinghe RP, Bartley DM, Lowther A (2004) Tilapia as alien aquatics in Asia and the Pacific: a review. FAO Fisheries Technical Paper. No. 453, FAOUN, Rome
5. Phan PD, De Silva SS (2000) The fishery of Ea-Kao reservior, southern Viet Nam; a fishery based on a combination of stock and recapture and self-recruiting populations. Fish. Manag. Ecol 7:251-264
6. De Silva CD (1997) Genetic variation in tilapia populations in man-made reserviors in Sri Lanka. Aquacult Int 5:339-349
7. Costa-Pierce BA (2003) Rapid evolution of an established feral tilapia (*Oreochromis* spp.): the need to incorporate invasion science into regulatory structures. Biol Invasions 5:71-84
8. Zambrano L, Martínez-Myer E, Menezes N, Peterson AT (2006) Invasive potential of common carp (*Cyprinus capio*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in American freshwater system. Can J Fish Aquat Sci 63:1903-1910
9. Benstead JP, De Rham PH, Gattolliat JL, Gibon FM, Loiselle PV, Sartori M, Sparks JS, Stiassny MLJ (2003) Conserving Madagascar's freshwater biodiversity. Bioscience 53:1101-1111

10. McCrary JK, Van der Berghe EP, McKaye KR, Lopez Perez LJ (2001) Tilapia cultivation:
a threat to native fish species in Nicaragua. *Encuentro* 58:3-19
11. Zambrano L, Marcias-Garcia C (1999) Impact of introduced fish for aquaculture in
Mexican freshwater systems. In: Claudi R, Leach JH (eds). *Nonindigenous freshwater
organisms: vectors, biology and impacts*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 113-123
12. FAO (2010) FAO Fisheries Department, Fishery Information, Data and Statistic Unit.
FISHSTAT Plus (Universal software for fishery statistic time series) version 2.32. Rome.
(<http://www.fao.org/fi/statist/fisoft/fishplus.asp>).
13. Amarasinghe US, De Silva SS (1996) Impact of *Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus*
(Pisces: Cichidae) hybridization on population reproductive potential and long-term
influence on a reservoir fishery. *Fish Manag Ecol* 3:239-249
14. Damrongratana S, Kessanchai P (1966) *Tilapia niloticus* Linnaeus presented to the King
on March 17, 1966 (in Thai). Department of Fisheries, Bangkok
15. Pullin RSV, Capili JB (1988) Genetic improvement of tilapias: problems and prospects.
In: Pullin RSV et al (eds) *The second international symposium on tilapia in aquaculture*.
ICLARM Conference Proceedings 15. Department of Fisheries, Thailand and ICLARM,
Manila, Philippines, pp 259-266
16. Tangtrongpiros M, Tewaratmaneeekul P, Jarimopas P, Nhookwan S, Lawanyawut K,
Watcharakornyothin W, Chantarakorothai W (1993) Development of the Nile tilapia
culturing (in Thai). Extension paper No. 23, National Inland Fisheries Institute,
Department of Fisheries, Bangkok
17. Karnasuta J, Kamonrat W, Ngamsiri T (1999) Specific identification of tilapia found in high
salinity sea water in artemia culture area of Phetburi coastal aquaculture station using enzyme
electrophoresis (in Thai with English abstract). *Thai Fish Gaz* 52:533-542

18. Rajitparinya C, Yeneang S, Imjaisuk W (1973) Survey on pond fish culture in and about the province of Prachuap Khiri Khan (in Thai). Annual report, Prachuap Khiri Khan Fisheries Station, Department of Fisheries, Bangkok
19. Chittapalapong T, Kaewjaroon P, Tienthong P, Somchan W (1997) Study on fisheries resource in Pran Buri reservoir, Prachuap Khiri Khan Province (in Thai with English abstract). Technical paper No. 190, National Inland Fisheries Institute, Department of Fisheries, Bangkok
20. Chookajorn T, Chansavang B, Tharnsuthus S, Kaewjaroon P (1991) Fishery resource survey in Bang Phra reservoir, Chon Buri Province (in Thai with English abstract). Technical paper No. 120, National Inland Fisheries Institute, Department of Fisheries, Bangkok
21. Srichareondham B, Kittivorachte R, Leenanond Y (1993) Fisheries survey and fish catch in the Nan River, Nakhon Sawan Province (in Thai with English abstract). In: Proceedings of the 31st Kasetsart University Conference, Fisheries Section, 3-6 February 1993. Kasetsart University, Bangkok, pp 533-542
22. Taggart JB, Hynes RA, Prodöhl PA, Ferguson A (1992) A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. J Fish Biol 40:963-965
23. Lee W-J, Kocher TD (1996) Microsatellite DNA markers for genetic mapping in *Oreochromis niloticus*. J Fish Biol 49:169-171
24. Bassam BJ, Anollés GC, Gresshoff PM (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal Biochem 196:80-83
25. Guo SW, Thompson EA (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. Biometrics 48:361-372
26. Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (ver 3.4): a population genetics software for exact test and ecumenicism. J Hered 86:248-249

- 411 27. Rousset F (2008) Genepop'007: a complex re-implementation of the genepop software
412 for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour* 8:103-106
- 413 28. Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2004) GENETIX 4.05.2,
414 logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations (in French). Laboratoire
415 Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II,
416 Montpellier
- 417 29. Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER:
418 software for indentifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol*
419 *Ecol Notes* 4:535-538
- 420 30. Yeh FC, Boyle T (1999) POPGENE, version 1.32. The user friendly software for
421 population analysis. University of Alberta and CIFOR, Edmonton, Canada
- 422 31. Goudet J (1995) FSTAT version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. *J Hered*
423 86:485-486
- 424 32. Raymond M, Rousset F (1995) An exact test for population differentiation. *Evolution*
425 49:1280-1283
- 426 33. Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software
427 package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-
428 50
- 429 34. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using
430 multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959
- 431 35. Hubisz M, Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2009) Inferring weak population
432 structure with the assistance of sample group information. *Mol Ecol Resour* 9:1322-1332
- 433 36. Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals
434 using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14:2611-2620

- 435 37. Grant PR, Grant BR (2002) Unpredictable evolution in a 30-year study of Darwin's
436 finches. *Science* 296:707–711
- 437 38. Almodóvar A, Nicola GG, Elvira B, García-Marín JL (2006) Introgression variability
438 among Iberian brown trout evolutionary significant units: the influence of local
439 management and environmental features. *Freshwater Biol* 51:1175-1187
- 440 39. Allendorf FW, Luikart G (2007) Conservation and the genetics of populations. Blackwell
441 Publishing, MA
- 442 40. Allendorf FW, Leary RF, Spruell P, Wenburg JK 2001 The problems with hybrids: setting
443 conservation guidelines. *Trends Ecol Evol* 16:613-622
- 444 41. Goldberg TL, Grant EC, Inendino KR, Kassler TW, Claussen JE, Philipp DP (2005)
445 Increased infectious disease susceptibility resulting from outbreeding depression.
446 *Conserv Biol* 19:455-462
- 447 42. Tymchuk WE, Biagi C, Withler R, Devlin RH (2006) Growth and behavioral
448 consequences of introgression of a domesticated aquaculture genotype into a native strain
449 of coho salmon. *Trans Am Fish Soc* 135:442-455
- 450 43. Harlt DL, Clark AG (1997) Principles of Population Genetics. 3rd edn. Sinauer,
451 Sunderland, MA
- 452 44. Falconer DS, Mackay TFC (1996) Introduction to Quantitative Genetics. 4th edn.
453 Longman, Essex
- 454 45. Macaranas JM, Taniguchi N, Pante MJR, Capili J, Pullin RSV (1986) Electrophoretic
455 evidence for extensive hybrid gene introgression into commercial *Oreochromis niloticus*
456 (L.) stocks in the Philippines. *Aquacult Fish Manag* 17:249-258
- 457 46. De Silva CD, Ranasinghe J (1989) Biochemical evidence of hybrid gene introgression in
458 some reservoir population tilapia in southern Sri Lanka. *Aquacult Fish Manag* 20:269-
459 277

47. Ramstad KM, Woody CA, Sage GK, Allendorf FW (2004) Founding events influence genetic population structure of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) in Lake Clark, Alaska. Mol Ecol 13:277-290
48. Hauser L, Adcock GJ, Smith PJ, Bernal Ramirez JH, Carvalho GR (2002) Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). Proc Natl Acad Sci USA 99:11742-11747
49. Hoarau G, Boon E, Jongma DN, Ferber S, Palsson J, Van der Veer HW, Rijnsdorp AD, Stam WT, Olsen JL (2004) Low effective population size and evidence for inbreeding in an over exploited flatfish, plaice (*Pleuronectes platessa* L.). Proc Royal Soc B 272:497-503
50. Ambali AJD, Doyle RW, Cook DI (2000) Development of polymorphic microsatellite DNA loci for characterizing *Oreochromis shiranus* subspecies in Malawi. J Appl Ichthyol 16:121-125
51. Romana-Eguia MRR, Ikeda M, Basiao ZU, Taniguchi N (2004) Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA analysis. Aquaculture 236:131-150
52. Rutten MJM, Bovenhuis H, Komen H (2004) Modeling fillet traits based on body measurements in three Nile tilapia strains (*Oreochromis niloticus* L.). Aquaculture 231:113-122
53. Sušnik S, Berrebi P, Dovč P, Hansen MM, Snoj A (2004) Genetic introgression between wild and stocked salmonids and the prospects for using molecular markers in population rehabilitation: the case of the Adriatic grayling (*Thymallus thymallus* L. 1785). Heredity 93:273-282
54. Boonthongchuay J (2008) Structure and Distribution of Fish Community in Thung Sam Roi Yot Swamp, Prachuap Khiri Khan Province (in Thai with English abstract). Technical

- Paper No. 26/2008, Inland Fisheries Research and Development Bureau, Department of Fisheries, Bangkok
55. Schindler DW (2001) The cumulative effects of climate warming and other human stresses on Canadian freshwaters in the new millennium. *Can J Fish Aquat Sci* 58:18-29
 56. Ficke AD, Myrick CA, Hansen LJ (2007) Potential impacts of global climate change on freshwater fisheries. *Rev Fish Biol Fish* 17:581-613
 57. Hassanien HA, Gilbey J (2005) Genetic diversity and differentiation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) revealed by DNA microsatellites. *Aquacult Res* 36:1450-1457
 58. Shikano T, Taniguchi N (2002) Relationships between genetic variation measured by microsatellite DNA markers and a fitness-related trait in guppy (*Poecilia reticulata*). *Aquaculture* 209:77-90
 59. Heath DD, Bryden CA, Shrimpton JM, Iwama GK, Kelly J, Heath JW (2002) Relationship between heterozygosity, allelic distance (dz), and reproduction traits in Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Can J Fish Aquat Sci* 59:77-84
 60. Overturf K, Casten MT, LaPatra SL, Rexroad III C, Hardy RW (2003) Comparison of growth performance, immunological response and genetic diversity of five strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 217:93-106
 61. Borrell YJ, Pineda H, McCarthy I, Vázquez E, Sánchez Lizana GB (2004) Correlations between fitness and heterozygosity at allozyme and microsatellite loci in the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Heredity* 92:585-593
 62. Allendorf, FW, Phelps SR (1980) Loss of genetic variation in a hatchery stock of cutthroat trout. *Trans Am Fish Soc* 109:537-543
 63. Fisheries Economics Division (2011) Statistical Survey of the Freshwater Landing Places, 2009. Technical paper No. 6/2011, Department of Fisheries, Bangkok

Figure

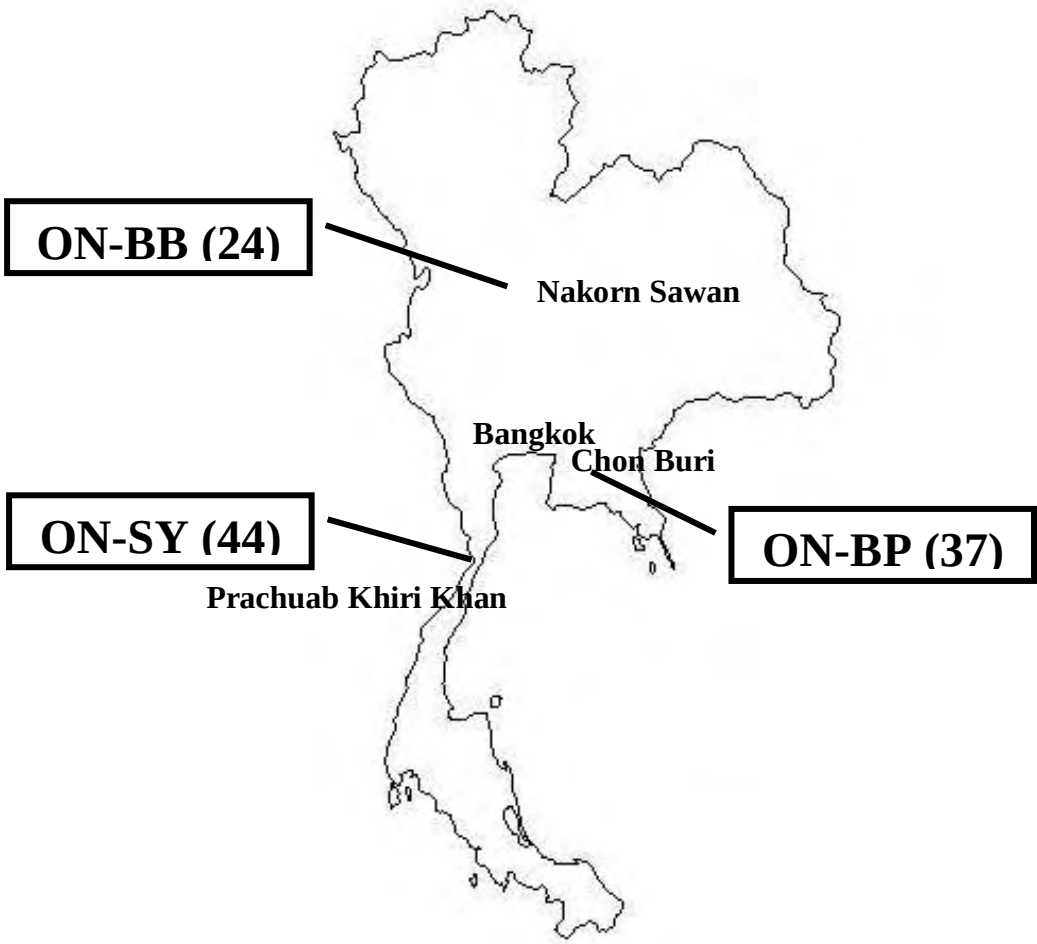


Figure 1

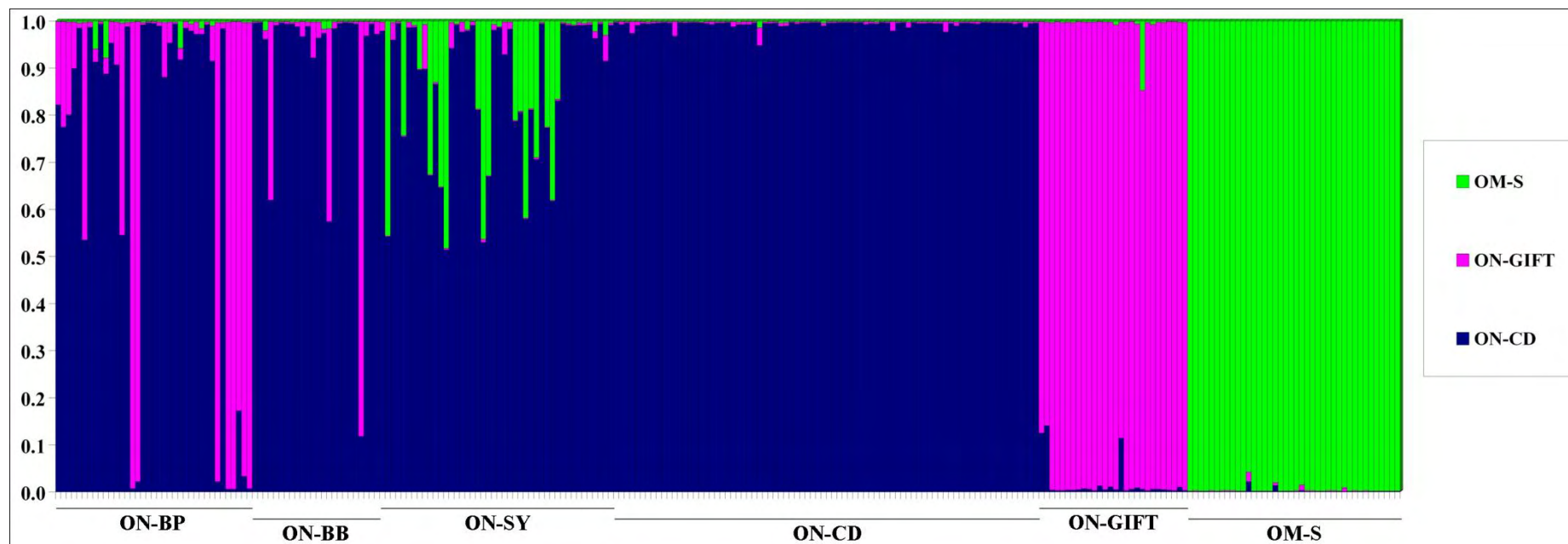


Figure 2

Table 1 Sources of three feral populations of *Oreochromis niloticus* in Thailand. N = sample size.

Population Names	N	Locations	Coordinates
Bang Phra (ON-BP)	37	Bang Phra Reservoir, Si Racha, Chon Buri	13°11'60"N 100°58'60"E
Bueng Boraphet (ON-BB)	24	Bueng Boraphet Reservoir, Nakorn Sawan	15°41'00"N 100°15'00"E
Sam Roi Yot (ON-SY)	44	Sam Roi Yot Reservoir, Kui Buri, Prachuap Khiri Khan	12°11'00"N 99°57'00"E

Table 2 Genetic variation within three feral *O. niloticus* populations in Thailand: N = sample size, P = number of polymorphic loci, A = number of alleles per locus, A_e = effective number of alleles per locus, A_r = allelic richness, H_o , H_e = observed and expected heterozygosity respectively. Values in parentheses denote SD. Mean values in the same column with different superscripts are statistically significant ($\alpha = 0.05$).

Population	N	Genetic variation					
		P	A	A_e	A_r	H_o	H_e
Bang Phra (ON-BP)	37	14	9.07 ^a	4.29 ^a	7.99 ^a	0.66 ^a	0.75 ^a
			(2.34)	(1.42)	(1.82)	(0.15)	(0.11)
Bueng Boraphet (ON-BB)	24	14	5.71 ^b	2.92 ^b	5.71 ^b	0.60 ^a	0.62 ^b
			(2.05)	(1.07)	(2.05)	(0.17)	(0.17)
Sam Roi Yot (ON-SY)	44	14	6.29 ^b	3.55 ^{ab}	5.78 ^b	0.66 ^a	0.71 ^{ab}
			(1.73)	(0.94)	(1.48)	(0.11)	(0.08)

Table 3 Proportion of membership of each pre-defined population in each of the three clusters ($K=3$). (STRUCTURE: 100,000 Burn-in period; 100,000 Reps)

Given Pop.	Inferred Clusters			Number of Individuals
	1	2	3	
ON-BP	0.724	0.268	0.008	37
ON-BB	0.914	0.082	0.003	24
ON-SY	0.868	0.012	0.121	44
ON-CD	0.993	0.005	0.002	80
ON-GIFT	0.018	0.974	0.008	28
OM-S	0.002	0.002	0.996	40

Figure Legends

Figure 1 A map showing sampling localities of three feral populations of *Oreochromis niloticus* in Thailand. Values in parentheses represent sample sizes.

Figure 2 The probability of assignment of individuals to each of the three genetic groups ($K = 3$) defined in the present study. Each vertical bar represents an individual and each color represents a probability that the individual is assigned to each genepool (admixture proportion, q_i). The values of q_i were provided in the output sheet generated by the program.

Manuscript Number:

Title: GENETIC CHANGES, INTRA- AND INTERSPECIFIC INTROGRESSION IN FARMED NILE TILAPIA IN THAILAND

Article Type: Research Paper

Keywords: genetic change; GIFT; Chitralada; introgression; genetic variation

Corresponding Author: Professor Dr. Uthairat Na-Nakorn, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Kasetsart University

First Author: Srijanya Sukmanomon, M.S.

Order of Authors: Srijanya Sukmanomon, M.S.; Wongpathom Kamonrat, Ph.D.; Supawadee Poompuang, Ph.D.; Thuy T Nguyen, Ph.D.; Devin M Bartley, Ph.D.; Bernie May, Ph.D.; Uthairat Na-Nakorn, Ph.D.

Abstract: Fourteen microsatellite loci were used to examine genetic changes of four strains of Nile tilapia derived from genetically improved farmed tilapia (GIFT) and two strains of Nile tilapia derived from a local Chitralada strain of Nile tilapia in Thailand. Reference populations including the ninth generation of GIFT strain, the original Chitralada strain, two conspecific reference populations from Ivory Coast and Uganda, one population each of *O. mossambicus* and *O. aureus* were also examined. Despite minor genetic changes, three of the four GIFT derived populations retained their purity as GIFT while genetic variation did not decline. One of the GIFT derived population showed high levels of introgression from the Chitralada strain. Likewise, introgression from GIFT to the Chitralada derived populations was seen. Interspecific introgression from *O. mossambicus* was observed in the GIFT reference population which may have passed to one of the Chitralada derived strains. Introgression from *O. aureus* was detected in one of the GIFT derived population with a history of intensive inter-strain crossing. However, the introgression resulted in elevated genetic variation relative to Chitralada original strains.

Suggested Reviewers: Raul Ponzoni
r.ponzoni@cgair.org

He is knowledgeable in the field of genetic improvement and population genetics and well experienced with GIFT.

M.R.R. Romana-Eguia
mreguia@seafdec.org.ph

She published good papers regarding genetic variation and broodstock management of GIFT.

Randall Brummett
r.brummett@cgiar.org

He is well experienced in population genetics especially in *O. niloticus*.

Opposed Reviewers:

Department of aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Chatujak, Bangkok 10900, Thailand

18 June, 2011

Dear Prof. Gideon Hulata

First of all may I congratulate the rising of impact factor of AQUACULTURE and thank for the excellent services. On behalf of the authors I would like to submit a manuscript entitled “GENETIC CHANGES, INTRA- AND INTERSPECIFIC INTROGRESSION IN FARMED NILE TILAPIA IN THAILAND” by Srijanya Sukmanomon, Wongpathom Kamonrat, Supawadee Poompuang, Thuy T.T. Nguyen, Devin M. Bartley, Bernie May, Uthairat Na-Nakorn to be considered for publication in AQUACULTURE.

The manuscript describes original research aiming to study genetic changes of the GIFT strains of Nile tilapia after dissemination into Thailand and also the impacts of GIFT to Thai local strains. We used 14 microsatellite loci to study 4 GIFT derived strains, 2 Chitralada derived strains; 4 conspecific reference populations including GIFT, Chitralada, a wild population from Uganda, a hatchery population from Ivory Coast; a population each of reference *O. mossambicus* and *O. aureus*. This study is submitted only to AQUACULTURE.

Your kind consideration on this manuscript is appreciated.

Best Regards

Uthairat Na-Nakorn

Corresponding author

GENETIC CHANGES, INTRA- AND INTERSPECIFIC INTROGRESSION IN FARMED
NILE TILAPIA IN THAILAND

Srijanya Sukmanomon^a, Wongpathom Kamonrat^b, Supawadee Poompuang^c, Thuy T.T.
Nguyen^{d,e}, Devin M. Bartley^f, Bernie May^g, Uthairat Na-Nakorn^{c*}

^a Program in Aquaculture, Graduate School, Kasetsart University, Chatujak, Bangkok 10900,
Thailand

^b Inland Fisheries Research and Development Bureau, Department of Fisheries, Bangkok
10900 Thailand

^c Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Chatujak, Bangkok
10900, Thailand

^d School of Life and Environmental Sciences, Deakin University, Geelong Campus at Waurn
Ponds, Geelong, VIC 3217, Australia

^e Victorian AgriBioSciences Centre, Department of Primary Industries, Bundoora, VIC 3083,
Australia

^f Fisheries and Aquaculture Department, Food and Agriculture Organization of the United
Nations, Rome, Italy

^g Department of Animal Science, Genomic Variation Laboratory, University of California
Davis, CA 95616 USA

*Corresponding author, Tel./Fax 66 2 5794956; E-mail, ffisurn@ku.ac.th,
uthairatn@yahoo.com

ABSTRACT

Fourteen microsatellite loci were used to examine genetic changes of four strains of Nile tilapia derived from genetically improved farmed tilapia (GIFT) and two strains of Nile tilapia derived from a local Chitralada strain of Nile tilapia in Thailand. Reference populations including the ninth generation of GIFT strain, the original Chitralada strain, two conspecific reference populations from Ivory Coast and Uganda, one population each of *O. mossambicus* and *O. aureus* were also examined. Despite minor genetic changes, three of the four GIFT derived populations retained their purity as GIFT while genetic variation did not decline. One of the GIFT derived population showed high levels of introgression from the Chitralada strain. Likewise, introgression from GIFT to the Chitralada derived populations was seen. Interspecific introgression from *O. mossambicus* was observed in the GIFT reference population which may have passed to one of the Chitralada derived strains. Introgression from *O. aureus* was detected in one of the GIFT derived population with a history of intensive inter-strain crossing. However, the introgression resulted in elevated genetic variation relative to Chitralada original strains.

Key words: genetic change, GIFT, Chitralada, introgression, genetic variation

INTRODUCTION

World Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) production has been dramatically increasing recently (e.g. from 970,756 metric tonnes in 2000 to 2,334,432 metric tonnes in 2008; FAO, 2010). Before 1998 cultured stocks of Nile tilapia were facing problems of genetic deterioration due to small number of founders and successive bottleneck effects (reviewed by Pullin and Capili, 1988; reviewed by Eknath and Hulata, 2009). Introgression from the congeneric *O. mossambicus* (Macaranas et al., 1986; 1995) also presumably accounted for the decline in culture performance in some stocks (Amarasinghe and De Silva, 1996). Since 1997, the GIFT (Genetically Improved Farmed Tilapia) strain has been disseminated and has shown remarkable impacts in enhancing production of Nile tilapia (ADB, 2005; Ponzoni et al., 2010). The GIFT and GIFT derived strains have made significant contributions to major producer countries of Nile tilapia, e.g. they have accounted for 80% of the total tilapia seed production in China, 75% in Thailand, and 40% in the Philippines (Ponzoni et al., 2010).

Thailand is among the world's top five producers of Nile tilapia (FAO, 2011) with annual production averaging 155,000 metric tonnes from 2000 - 2009 (FAO, 2011). Amongst freshwater commodities, Nile tilapia contributed more than 40% to total aquaculture production of the country (Department of Fisheries, 2010) and it is a major export commodity contributing 12,956 mt, valued at more than US\$ 22.3 million in 2010 (Customs Department, 2011). Before 1998, aquaculture of Nile tilapia in Thailand relied on the Chitralada strain which originated from an Egyptian stock that reached Thailand in 1965 *via* Japan (Chotiyarnwong, 1971). As in other countries, the Chitralada derived stocks were believed to suffered genetic deterioration probably caused by inbreeding and introgression with *O. mossambicus* (Gupta and Acosta, 2004) and poor culture performance. Therefore, when the

GIFT strain was introduced to Thailand in 1998 (ADB, 2005) it was well accepted by major hatcheries across the country.

It is of concern that genetic change may have occurred in the GIFT derived strains in Thailand. Generally, genetic change in hatcheries is common and is usually accompanied by loss of alleles due to genetic drift, especially when effective population size (N_e) is small (Allendorf and Phelps, 1980; Coughlan et al., 1998; Romana-Eguia et al., 2005; Aho et al., 2006; McKinna et al., 2010). Subsequently, if N_e is continually low, inbreeding will accumulate (Falconer and Mackay, 1996; Romana-Eguia et al., 2005). Moreover, reduction of genetic variation may be triggered by selection (e.g. Appleyard and Ward, 2006) which has been widely practiced in tilapia hatcheries (Li et al., 2006; Romana-Eguia et al., 2005). Despite an inconclusive relationship between genetic variation based on molecular markers and performance (e.g. Shikano and Taniguchi, 2002; Heath et al., 2002; Overtuf et al., 2003; Borrell et al., 2004), loss of genetic variation was assumed to cause the decline of Nile tilapia production in Fiji (McKinna et al., 2010) and introgression of genes from other species may occur and may have adverse impacts on production (Amarasinghe and De Silva, 1996).

The critical questions of the present study are, 1) whether genetic change, especially loss of genetic diversity, has occurred in the GIFT derived strains in Thailand; 2) does introgression occur from the local Chitralada strain and/or *O. mossambicus* into the GIFT derived strains and *vice versa*.

This study provided a scenario which is useful for broodstock management of other tilapia broodstocks, that 1) broodstock management of the GIFT derived strains in Thailand followed good broodstock management regimes, mainly by using large number of brooders and equal contribution of family; 2) intraspecific introgression resulted in increasing genetic variation of populations with low genetic variation; 3) genetic differentiation among the

GIFT derived strains occurred after a few generations and may eventually result in valuable genetic resources for further genetic improvement; 4) interspecific introgression was frequently observed and the impact was still inconclusive.

MATERIALS AND METHODS

Fish samples: origins, collection and DNA extraction

Four GIFT derived strains, i.e. strains that were intentionally founded with the GIFT strain and/or incorporated the GIFT strain as a founder, were collected from two private and two government hatcheries during February to September 2006; two Chitralada derived strains were collected from a private and a government hatchery (Table 1). The sampling was limited to hatcheries that maintain their own broodstock and have been producing more than 10 million tilapia fingerlings per year for at least 10 years.

Six categories of reference populations were included to serve as standards (Table 1): a standard GIFT population, a standard Chitralada population, pure cultured and wild *O. niloticus* from Africa and a standard population for *O. mossambicus* and *O. aureus*. *O. aureus* was included in this study because it has been introduced to Thailand in 1980 for production of all-male tilapia (Tangtrongpiros, 1980) through interspecific hybridization with *O. niloticus*.

A piece of caudal fin (about 50 mg) was collected from each individual broodfish, stored in 95% Ethyl alcohol and delivered to Fish Genetics Laboratory, Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok. DNA extraction was performed using the standard protocol of Taggart et al. (1992) with a slight modification: DNA pellet was resuspended in TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5; 1 mM EDTA pH 8.0) and stored at -20°C until use. The quantity and quality of the extracted DNA was determined by spectrophotometry and agarose gel electrophoresis.

Microsatellite primers and PCR conditions

Fourteen microsatellite primers developed from DNA of *O. niloticus* by Lee and Kocher (1996) were used (Table 2). A single locus PCR each of six microsatellite primers (*UNH172*, *UNH211*, *UNH216*, *UNH222*, *UNH212* and *UNH 160*) was performed in a 10 µl reaction volume contain 2.5 ng of template DNA, 1X PCR buffer, 1.5mM MgCl₂, 100 µM of each dNTPs, 0.25 µM of each primer and 0.2 units of *Taq* DNA polymerase (Fermentas). PCR were carried out in a PX2 Thermal Cycler (Thermoscientific, USA) under the following conditions: 3 min at 94°C followed by 30 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at T_a°C (Table 2), 1 min at 72°C, with final extension of 5 min at 72°C. Then the PCR products were separated on the 4.5% polyacrylamide gel. Visualization of the microsatellite profiles was accomplished by silver staining (Bassam et al., 1991). Allele sizes were designated relatively to the M13 DNA ladder.

In addition, eight microsatellite primers consolidated into two multiplex PCR (Multiplex 1: *UNH213*, *UNH153*, *UNH132*, *UNH138*; Multiplex 2: *UNH192*, *UNH1004*, *UNH982*, *UNH173*) were scored against all DNA samples. PCR was performed in a 10 µl total reaction volume consisting of 5 ng of template DNA, 1 µl of 10X PCR reaction buffer with 20 mM MgCl₂, 0.3-0.4 µl of each primer (10 µM) depending on relative fluorescence in relationship to other primers in the multiplex, 1 µl dNTPs (20 µM) and 0.12 µl FastStrat *Taq* DNA polymerase (Roche, Germany). Forward primers were fluorescently end labeled with 6-FAM, VIC, NED or PET (Applied Biosystems, USA) for visualization. A two-step PCR program was used for the multiplex amplification with GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) involving: 5 min at 94°C followed by 28 cycles of 30 sec at 94°C, 45 sec at a first T_a°C (Table 2), 1 min at 72°C; 10 cycles of 30 sec at 94°C, 45 sec at a second T_a°C (Table 2), 45 sec at 72°C and a final extension of 10 min at 72°C. One microliter of diluted multiplex PCR product was run on an ABI 3130xl Genetic Analyzer with a LIZ600

size standard (Applied Biosystems, USA). GeneMapper[®] Software Version 4.0 (Applied Biosystems, USA) was used to analyze the electropherograms and allelic sizes. The facilities for multiplex PCR were provided by the Genomic Variation Laboratory, University of California, Davis, CA, USA.

Data analyses

Conformation to Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was tested using a Markov chain approximation of exact test (dememorisation = 10,000; batches = 1,000; iteration per batch = 10,000) (Guo and Thomson, 1992) facilitated by the program GENEPOP version 4.0 (Raymond and Rousset, 1995a; Rousset, 2008). The analyses also provided the locus-wise F_{IS} for each population (Guo and Thomson, 1992). The test for linkage disequilibrium based on the Chi-square test facilitated by the program GENETIX Version 4.05.2 (Belkhir et al., 2004) was also performed, wherein the disequilibrium coefficient (D) was estimated as $D = P_{AB} - p_A p_B$; where P_{AB} is the observed frequency of the AB gamete and p_A and p_B are the allele frequencies at loci A and B , respectively.

Due to the departure from HWE towards homozygote excess in some populations, the program Micro-Checker version 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004) was used to explore the evidence of “null-allele” and then the genotypes of the populations showing evidence of null alleles were adjusted accordingly, wherever appropriate. The populations were once again tested for the departure from HWE.

Genetic variation within populations (average number of alleles/locus- A , effective number of alleles/locus- A_e , observed and expected heterozygosity- H_o and H_e , respectively) was estimated using the program POPGENE version 1.32 (Yeh and Boyle, 1999). Calculation of allelic richness (A_r), the A_r estimated from the smallest sample size was performed using the program FSTAT version 2.9.3.2 (Goudet, 1995). The differences between populations were tested for each parameter (A , A_e , A_r , H_o and H_e) using the

independent t-test comparison in the SPSS statistical package (version 11.5.0) (SPSS Inc, Chicago) followed by a post-hoc multiple comparisons. CONVERT version 1.31 (Glaubitz, 2004) was used to calculate allele frequencies and identifying private alleles.

The population structuring was evaluated based on the F -statistics (F_{ST} , F_{IS} and F_{IT}) which were calculated using the program Fstat version 2.9.3.2 (Goudet, 1995). GENEPOP version 4.0 (Raymond and Rousset, 1995b; Rousset, 2008) was used to test the genetic differentiation between populations based on the allele frequency distribution. The pairwise F_{ST} and significance tests were calculated using ARLEQUIN 3.11 (Excoffier et al., 2005). Then the program PHYLIP version 3.67 was used to calculate the Cavalli-Sforza and Edwards (1967) chord distance (genetic distance) between populations using the adjusted data set with corrected genotypes for null alleles. The same program was used for a reconstruction of the phylogenetic tree (Neighbor-joining tree, Felsenstein, 1993) among populations and for estimation of bootstrap-values.

To examine possible genetic introgression, a model-based clustering method for inferring population structure using the program STRUCTURE version 2.3.3 (Pritchard et al., 2000; Hubisz, 2009) was employed. Analysis was run using the admixture ancestry model with twenty runs of a burn-in time of 100,000 followed by 100,000 iterations. The best number of clusters, K , was decided according to the *ad hoc* statistic ΔK based on the rate of change in the log probability of data between the successive K values (Evanno et al., 2005), that calculated using STRUCTURE HARVESTER version 0.6.5 (Earl, 2011). Averaged proportion of membership of each cluster was calculated for each predefined population/species using a Bayesian clustering algorithm in STRUCTURE. The clustering is meaningful when a proportion of membership is apparently highest in a single cluster and the non-contaminated population would have a proportion of membership equaling 1 in one cluster and 0 in the other clusters. The population of origin would be the reference population

210 that showed the highest proportion of membership in the same cluster with the examined
211 population(s).

212

213

214

215

216

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

227

228

229

230

231

232

233

234

RESULTS

Despite the typically high polymorphism of microsatellites, the locus *UNH222* was monomorphic in the Ivory Coast samples of *O. niloticus*. Two loci (*UNH172* and *UNH138*) were monomorphic in the *O. mossambicus* samples (fixed for the alleles *UNH172*246* and *UNH138*164*). These alleles were also observed in *O. niloticus* populations; both alleles were found in ON-AY ($p = 0.030$ for *UNH172*246*; 0.070 for *UNH138*164*), and ON-AIT ($p = 0.020$ for *UNH172*246*; 0.070 for *UNH138*164*). The allele *UNH138*164* was observed in ON-CP ($p = 0.060$), ON-CD ($p = 0.013$) and ON-GIFT ($p = 0.143$).

Hardy-Weinberg Equilibrium and Linkage disequilibrium

The Fisher exact test revealed that ON-CP, ON-AY, ON-CD and ON-I, did not conform to Hardy-Weinberg expectation with an excess of homozygotes while those of ON-PT and OM-S had an excess of heterozygotes ($P < 0.0036$; Bonferroni correction). However, after the allele frequencies were adjusted for the presence of null alleles [three loci in ON-CP (*UNH172*, *UNH1004* and *UNH982*) and ON-AY (*UNH216*, *UNH212*, and *UNH982*); two loci for ON-I (*UNH172*, and *UNH211*); and one locus each for ON-PT (*UNH222*), ON-UT (*UNH1004*), ON-PB (*UNH172*), ON-AIT (*UNH982*), ON-CD (*UNH222*), ON-U (*UNH172*), ON-GIFT (*UNH211*), OM-S (*UNH173*) and OA-E (*UNH211*)], the re-analyses showed the same results of the Fisher exact test but the locus-wise F_{IS} was significant at only 1 - 3 loci of 14 loci in each population. It is likely that the significant Fisher's exact test may have been biased due to extreme F_{IS} at a few loci. Therefore, we concluded that all populations conformed to HWE (Table 3).

Linkage disequilibrium (LD) was discovered wherein all populations showed LD at least at two loci pair (ranged from 2 - 25 loci pairs in a population). Among the Nile tilapia populations the most pronounced LD, shown at 25 loci pairs, was observed in ON-AY, followed by 14 loci pairs in ON-AIT, 13 loci pairs in ON-CP, 9 loci pairs in ON-PT, 4 loci

pairs in ON-UT, 2 loci pairs in ON-PB. The reference *O. niloticus* populations showed LD at 4 loci pairs in ON-CD; 3 loci pairs in ON-GIFT; 2 and 12 loci pairs in ON-U and ON-I, respectively. However, the LD coefficient was relatively low across the Nile tilapia hatchery populations (0.0122 ± 0.0013 to 0.0197 ± 0.0023). The reference Nile tilapia populations showed much lower D [$D = 0.0103 \pm 0.0028$ (ON-CD), 0.0129 ± 0.0084 (ON-I)] except for ON-GIFT which showed the highest value of mean D ($D = 0.0457 \pm 0.0075$) (Table 4).

Population structure and genetic diversity between populations

The overall F_{ST} calculated across all populations/species was 0.209 and significantly greater than zero ($CI_{99\%} = 0.185 - 0.240$). When *O. aureus* and *O. mossambicus* samples were removed from the analyses, the F_{ST} was reduced to 0.121 ($CI_{99\%} = 0.097 - 0.153$). This indicated the existence of population differentiation among the populations of *O. niloticus*. The F_{ST} among GIFT and GIFT derived populations (0.0316; $CI_{99\%} = 0.021 - 0.044$); among GIFT and GIFT derived populations except ON-CP (0.0262; $CI_{99\%} = 0.012 - 0.044$), and Chitralada and Chitralada derived strains (0.0676; $CI_{99\%} = 0.039 - 0.115$) were relatively low but statistically significant, hence implied an existence of population differentiation among populations within each group.

Pairwise F_{ST} estimates (Table 5) revealed significant differentiation between the GIFT derived strains and GIFT (pairwise $F_{ST} = 0.0156 - 0.0475$; $P < 0.0008$, Bonferroni correction) and genetic distance- d was 0.0228 - 0.0395. Notably, the Chitralada derived strains were different from the original Chitralada (pairwise $F_{ST} = 0.0600 - 0.0862$; $P < 0.0008$, Bonferroni correction; $d = 0.0430 - 0.0497$). Likewise, relatively high pairwise F_{ST} (0.1753) and genetic distance (0.0908) revealed remarkable genetic differences between the GIFT and Chitralada strain. Genetic differentiation between ON-CD and ON-GIFT with the reference Nile tilapia from Uganda ($F_{ST} = 0.1525 - 0.1801$) was lower than that between ON-CD, ON-GIFT and ON-I from Ivory Coast ($F_{ST} = 0.3125 - 0.3248$). In addition the allele frequency

distribution showed significant differences between all pairs of populations (Fisher's exact test, $P < 0.0008$, Bonferroni correction).

A phylogenetic dendrogram

The neighbor-joining tree (bootstrap = 61.8 - 100%) (Fig. 1) gave a clear picture of genetic relationship among the major Nile tilapia broodstocks in Thailand. A majority of the GIFT derived populations (ON-PB, ON-PT, ON-UT) clustered with ON-GIFT from which they presumably originated. The Chitralada (ON-CD) clustered with one (ON-AIT) of the two descendant populations. The admixture between Chitralada and GIFT was clearly shown for ON-CP and ON-AY which were placed between the two reference populations of origin. It is noteworthy that the *O. niloticus* populations from Uganda (ON-U) and Ivory Coast (ON-I) formed a cluster distinct from the clusters of the GIFT and Chitralada reference populations and their derivative populations. The tree also showed a clear separation of *O. aureus* and *O. mossambicus* from *O. niloticus*, whereby *O. mossambicus* was more divergent from *O. niloticus* than *O. aureus*.

Population clustering and population origin

The clustering based on the highest ΔK value (140.08), showed that the best fitted number of populations (K) was 6 (Fig. 2). Cluster 1 comprised Chitralada (ON-CD) (an average admixture proportion, $q_1 = 0.978$) and ON-AIT ($q_1 = 0.936$). Cluster 2 comprised of ON-GIFT (an average admixture proportion, $q_2 = 0.936$), ON-PT ($q_2 = 0.972$), ON-UT ($q_2 = 0.981$), and ON-PB ($q_2 = 0.980$). Cluster 3, 4, 5 and 6 comprised each population of ON-U ($q_3 = 0.976$), ON-I ($q_4 = 0.968$), OM-S ($q_5 = 0.991$) and OA-E ($q_6 = 0.977$), respectively. Population admixture comprising ON-CD and ON-GIFT was revealed for ON-CP ($q_1 = 0.403$, $q_2 = 0.559$) and ON-AY ($q_1 = 0.566$, $q_2 = 0.394$). Notably, the reference populations of *O. niloticus* from Ivory Coast and Uganda shared the least proportion of genepool with *O.*

niloticus in Thailand, and so did the *O. mossambicus* (OM-S) and *O. aureus* (OA-E) populations (Table 6).

Figure 3 shows the probability of assignment of individuals to six genetic groups ($K = 6$). Each vertical bar represents an individual and each colour represents a probability that the individual is assigned to each genepool (admixture proportion, q_i), for examples, an individual assigned to two genetic groups at $q_i = 0.5$ is first generation hybrid. Only the assignments with $q_i > 0.1$ are taken into account.

Admixed individuals determined by $q_{2-6} > 0.1$ were not found in the reference ON-CD. While in ON-GIFT, four admixed individuals were observed comprising three individuals with q_1 (ON-CD) = 0.167 - 0.455 and an individual with q_5 (OM-S) = 0.162. Among the GIFT derived strains, only ON-PT contain admixed individuals from ON-CD ($q_1 = 0.112 - 0.134$) (2 individuals). On the contrary, ON-CP contained 20% pure Chitralada ($q_1 = 0.874 - 0.984$) and 40% pure GIFT ($q_2 = 0.899 - 0.990$); 36% ON-CD and ON-GIFT ($q_1 = 0.105 - 0.883$, $q_2 = 0.107 - 0.857$) and 4% interspecific admixture between ON-CD and OA-E ($q_1 = 0.744 - 0.842$, $q_6 = 0.106 - 0.136$). Among the Chitralada derived populations, the majority of ON-AIT individuals were pure Chitralada ($q_1 = 0.876 - 0.992$) whereas seven individuals were admixture of ON-CD and ON-GIFT ($q_2 = 0.114 - 0.451$). ON-AY comprised of 42% pure ON-CD ($q_1 > 0.907$), 22% pure GIFT ($q_2 > 0.809$) and 34% admixed individuals (ON-CD and ON-GIFT; $q_1 = 0.104 - 0.826$; $q_2 = 0.157 - 0.779$); 2% ON-CD and OM-S ($q_1 = 0.826$; $q_5 = 0.141$).

Genetic variation within populations of the Nile tilapia hatchery populations

Genetic variation within populations was calculated based on the original data before being adjusted for null alleles (Table 7). The GIFT derived populations showed relatively high genetic variation ($A_r = 6.61 \pm 2.31$ of ON-PB to 8.35 ± 2.69 of ON-CP; $H_e = 0.73 \pm 0.10$ of ON-PB to 0.79 ± 0.09 of ON-CP) while that of the population of origin (ON-GIFT) was

also relatively high ($A_r = 7.14 \pm 2.09$; $H_e = 0.74 \pm 0.13$). On the contrary, the Chitralada (ON-CD) showed relative low genetic variation ($A_r = 4.86 \pm 1.55$; $H_e = 0.65 \pm 0.15$) while the descendant populations had relatively high genetic variation ($A_r = 7.06 \pm 1.76$ of ON-AIT to 8.03 ± 2.74 of ON-AY; $H_e = 0.71 \pm 0.13$ of ON-AIT to 0.75 ± 0.12 of ON-AY). It is obvious that genetic variation of the genetically improved GIFT strain was significantly higher than that of the Chitralada strain (ON-CD) (Table 7).

The reference Nile tilapia hatchery population from Ivory Coast showed remarkably low A_r and H_e while those of the wild reference population from Uganda were moderate. Genetic variation of the *O. mossambicus* population from South Africa (OM-S) was very low both for the parameters representing allele diversity and heterozygosity while *O. aureus* population (OA-E) had moderate genetic variation (Table 7).

DISCUSSION

Genetic change of the GIFT derived hatchery populations comparing to the original GIFT population

The small, but statistically significant, genetic differences observed among the GIFT derived Nile tilapia populations and between each population and the GIFT strain implies that genetic changes have occurred since the dissemination of the GIFT strain to Thailand. Generally, genetic change in hatcheries is common and caused by the following factors: genetic drift due to using small number of broodstock during founding event and in later generations, selection (natural and artificial; intentional and un-intentional), introduction of genetically different populations, and non-random mating (Norris et al., 1999; Fiumera et al., 2000; Taniguchi, 2003; Aho et al., 2006; Qin et al., 2007). Due to the relative high genetic variation especially allelic richness of the GIFT derived populations, it is assumed that genetic drift which has pronounced effect on allele loss (Allendorf and Phelps, 1980) may only partly responsible for the genetic differentiation observed in this study. This is supported by the large N_e assumed from the following information: 1) breeding of Nile tilapia required large number of females to meet demand for fingerlings due to low fecundity (approximately 96.9 and 127.5 eggs/g for GIFT and Chitralada strain, respectively, ADB, 2005 cited Hans Komen, personal communication), and 2) short generation time and high survival partly contribute to large N_e (Allendorf and Luikart, 2007). As such, even though the sex ratio of the mating was not always 1:1 (Fessehaye et al., 2006), N_e was not adversely affected (Falconer and Mackay, 1996). Selection, although unlikely, causes genetic change based on neutral markers, may have considerable contribution to genetic change of the GIFT derived strains as was reported in Atlantic Salmon, *Salmo salar* (Norris et al., 1999), Nile tilapia (Romana-Equia et al., 2005) and Pacific oyster (Appleyard and Ward, 2006), probably through linkages between the markers and the traits under selection. In this study the farm records showed that

artificial selection was applied to all hatchery populations (e.g. within family selection for ON-PT, ON-UT, ON-PB and ON-CP). Non-random mating, which is a part of the selection program, probably enhanced the genetic change that occurred in the GIFT derived strains while gene flow from other strains did not occur according to the model-base clustering.

Interspecific introgression

We found interspecific introgression, as indicated by the model-based clustering, from *O. mossambicus* to ON-GIFT and ON-AY, and from *O. aureus* to ON-CP. In the case of ON-GIFT, despite of low proportion of membership sharing with OM-S (0.8%), the bar plot (model-based clustering) showed an individual with admixture probability of 0.162 from OM-S that implied introgression. Introgression of *O. mossambicus* was allowed during the foundation of the GIFT strain, probably through introgressed founding stocks from the Philippines (Macaranas et al., 1995). The presence of *O. mossambicus* haplotypes in the sixth generation of GIFT from World Fish Centre, Malaysia (McKinna et al., 2010) confirmed this information. However, in the present study the relatively high LD coefficient of ON-GIFT (0.0457 compared to less than 0.02 in other populations) suggests that the introgression recently occurred (Allendorf et al., 2001). In fact, the GIFT project prevented any further introgression with *O. mossambicus* because of various assumed negative impacts (Macaranas et al., 1995; Amarasinge and De Silva, 1996; McKinna et al., 2010). Therefore, the reason for the recent introgression of *O. mossambicus* into the GIFT strain is unknown.

Notably, in the present study we observed the allele *UNH138*164* which was fixed in OM-S, in *O. niloticus* populations (ON-CD, ON-GIFT, ON-AY, ON-AIT). However, this was not solid evidence of genetic introgression from OM-S because the fixation of a locus of highly polymorphic microsatellite, although not frequently reported is not impossible (Antoro et al., 2006). Additionally, the results from the model-based clustering did not support an assumption of introgression from *O. mossambicus*. It is possible that this allele

(UNH138*164) is naturally shared among *O. niloticus* and *O. mossambicus* and the fixation in OM-S may be a result of small population of OM-S as supported by very low A_r and heterozygosity.

The presence of *O. aureus* alleles in ON-CP was unexpected. In fact, *O. aureus* was introduced to Thailand as a male parent for production of all-male tilapia by interspecific hybridization with *O. niloticus* (Tangtrongpiros, 1980). It is possible that the record on the introgression was covered by the owner of ON-CP while the reason of the introgression was unknown.

Possible impacts of interspecific introgression

Introgression in fishes is believed to be detrimental. For examples, in Nile tilapia, introgression from *O. mossambicus* was assumed to result in: reduced growth rate (Macaranas et al., 1995; Micha et al., 1996); decline in fecundity and early maturation (Amarasinge and De Silva, 1996; McKinna et al., 2010). Introgression from African catfish, *Clarias gariepinus*, was assumed to be responsible for decline of abundance of wild Günther's walking catfish, *C. macrocephalus* (Na-Nakorn et al., 2004; Senanan et al., 2004). Theoretically, interspecific introgression can be beneficial as an important source of genetic variation in recovery projects for rare species (Allendorf and Luikart, 2007; e.g. the rare Galápagos finch, Grant and Grant, 1998). To date, empirical data for impact of interspecific introgression is limited and seems to vary among species groups. For example there was reduced fitness of introgressed individuals between Bighead, *Hypophthalmichthys nobilis* and Silver carp, *H. molitrix* (Lamer et al., 2010), while performance of hybrid and introgressed *Mytilus* relative to parental species varied considerably according to environments (Shields et al., 2008). In aquaculture, it is likely that uncontrolled introgression may have adverse impacts, for example introgression from *O. mossambicus* has led to undesired traits in feral Nile tilapia (Amarasinghe and De Silva, 1996). On the contrary, the

same introgression occurred in GIFT strain did not result in unwanted traits (e.g. Department of Fisheries, 2006) which may be a consequence of selection which targeted on improving growth and appearances (Bentsen et al., 1998; Eknath and Acosta, 1998).

Intraspecific genetic introgression and possible impacts

High levels of introgression occurred in ON-CP and ON-AY which are GIFT derived and Chitralada derived strains, respectively. In general, intraspecific introgression occurring between genetically distinct populations or between domesticated and wild populations had adverse impacts due to out-breeding depression (e.g. increased infectious disease susceptibility of introgressed individuals between geographic populations of large mouth bass, Goldberg et al., 2005; coho salmon, *Oncorhynchus kisuth*, Tymchuk et al., 2006). In the case of GIFT and Chitralada strains, such adverse impacts may not exist because the donor and recipient strains are related (ON-CD was one of the grandparents of the founding stock of GIFT, Eknath et al., 2007).

However, cross-breeding of genetically diverse populations was expected to increase genetic variation (e.g. in Adriatic grayling, *Thymallus thymallus* L. 1785; Sušnik et al., 2004). The underlying reason for cross breeding occurring in Chitralada derived, ON-AY, was to restore genetic variation with concern on maintaining Chitralada integrity. Nevertheless, due to the confused naming of the advanced generations of GIFT as Chitralada III, the interstrain crossing occurred (Rom Sai Farm, pers. comm.). Whereas, ON-CP was crossed with GIFT and probably *O. aureus* in order to broaden the genetic background probably to enhance selection response. The present results showed that the introgression did not increase genetic variation of the GIFT derived strains but it did for the Chitralada derived strains. Detailed discussion on genetic variation is in the later section.

Impacts of introgression on morphology and/or economically important traits may exist. The Chitralada and GIFT strains are different in growth performance, e.g. growth rate

and fillet yield of GIFT were higher than Chitralada (Dey et al., 2000; Dan and Little, 2000; Hussain et al., 2000; Rutten et al., 2004). Hence, despite an advantage from heterosis in the early generations, crossing of these two strains may result in decline of growth performances in the later generations (Allendorf and Luikart, 2007). Moreover, the introgression may compromise the superiority of GIFT appearances over the Chitralada strain. For example, GIFT strain has smaller proportion of head and broader trunk than the Chitralada (Department of Fisheries, 2006). To date, the information on this issue is not available, hence worth closely monitoring.

Introgression observed in ON-PT may be a remnant of the Chitralada strain that was a grandparent of the based population of GIFT rather than recent introgression (model-based clustering). On the contrary, the presence of GIFT alleles in the Chitralada derived ON-AIT may be due to un-intentional crossing of ON-AIT with GIFT derived fish brought in for other purposes (ADB, 2005). Slight introgression may not change the appearances of a strain, possibly causes confusion when the strain is used as founder stock or for genetic improvement programs. For example, when pure *O. niloticus* is required to produce all-male tilapia through the YY-male technology (Wohlfarth, 1994), the un-noticed introgression of *O. mossambicus* genes into the ON-AIT will eventually result in failure of the project.

Genetic variation of the hatchery stocks of Nile tilapia in major hatcheries in Thailand

High levels of genetic variation in aquaculture stock are important to prevent possible negative impacts of inbreeding and can facilitate rapid gains in genetic improvement programs (Dudash and Fenster, 2000; Miller and Kapuscinski, 2003). Due to the fact that genetic variation influences fitness and adaptability of the populations, management of genetic diversity of broodstock is important in the production of high quality seed for aquaculture (Taniguchi, 2003). Genetic variation, especially allelic richness, of the hatchery populations included in this study was lower than that of wild populations from the Nile

River (5 populations, 50 fish/population, based on 6 microsatellite loci; $A = 7.22 - 9.42$; $H_e = 0.493 - 0.900$) (Hassanien and Gilbey, 2005). Lower genetic variation in hatchery stocks was mainly a consequence of small effective population size (N_e) which led to allele loss due to genetic drift (Allendorf and Phelps, 1980; e.g. in turbot, *Scophthalmus maximus*, Coughlan et al., 1998; Atlantic salmon, Whitler et al., 2005; *Litopenaeus vannamei*, Perez-Enriquez et al., 2009). Small N_e , which theoretically reduced heterozygosity in later generations (Crow, 1986), did not show pronounced effect on reduction of H_e (e.g. Shikano et al., 2001). In addition, empirical data also indicated that selection decreased genetic variation in Atlantic salmon (Norris et al., 1999), and Nile tilapia (Romana-Eguia et al., 2005), despite of neutrality of genetic markers used for the studies.

The genetic variation of GIFT strain in the present study ($A_r = 7.36 \pm 2.19$, $H_e = 0.75 \pm 0.13$) was slightly lower than that reported by Romana-Eguia et al. (2004) ($A = 10.0$, $H_e = 0.81$) on the same specimens using 5 microsatellite loci. This may be an artifact of using small number of loci in the earlier study. Whereas the study by Rutten et al. (2004) which was based on 14 loci supported our result ($A = 7.5$, $H_e = 0.70$) as did the study of McKinna et al. (2010). The Chitralada strain was characterized with low allele diversity ($A = 5.4 - 6.8$, Ambali et al., 2000; Romana-Eguia et al. 2004; Rutten et al., 2004) compared to the average for freshwater fishes ($A = 7.5$, DeWoody and Avise, 2000) while heterozygosity which was relatively high relative to freshwater fishes (0.46, DeWoody and Avise, 2000), varied considerably ($H_e = 0.624 - 0.82$, Ambali et al., 2000; Romana-Eguia et al., 2004; Rutten et al., 2004).

Among the two major origins of Nile tilapia hatchery populations in Thailand, ON-GIFT has slightly higher genetic variation than that of the Chitralada population. This may be a result of using genetically diverse founder stock (e.g. the founder population originated from a combination of eight different Nile tilapia strains) and relatively high number of

brooders (an average of 92 sires and 163 dams/generation during the first five generations) (Eknath et al., 1993; Bentsen et al., 1998; Eknath and Acosta, 1998). In addition, despite the selection pressure exerted during ten years of the selection program, good broodstock management, e.g. using large number of brooders, equal family contribution, and 1:1 mating ratio, may have contributed to retaining genetic diversity of the stock. The small genetic variation of Chitralada strain was not surprising because the strain was founded by a single stock comprising 120 fish from Egypt to Japan (Pullin and Capili, 1988) and the number of brooders was suddenly reduced to 38 fish (Damrongratana and Kessanchai, 1966) when it was introduced from Japan to Thailand. Moreover, it was likely that genetic broodstock management was not systematically applied to this stock.

The introgression from Chitralada to GIFT did not elevate genetic variation as has been reported for other species (Sušnik et al., 2004). This may be because Chitralada was among the founders of GIFT, thus introgression from Chitralada did not bring in novel alleles to GIFT while heterozygosity may have been elevated in the early generations but declined as random mating proceeded (Falconer and Mackay, 1996). On the contrary, introgression from GIFT increased allelic richness of Chitralada derived strains while the result was not pronounced for heterozygosity.

Studies on the relationship between genetic variation and performance have given inconclusive results. For example, heterozygosity was positively related with average tolerance to salinity of guppy (*Poecilia reticulata*) populations (Shikano and Taniguchi, 2002); and fecundity and gonado-somatic index (percentage of gonad weight to body weight), but not with a majority of reproductive traits of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Heath et al., 2002). Immune response to IHNV and mortality rates did not correlate with genetic variation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) while a positive correlation between heterozygosity and feed conversion ratio was observed (Overturf et al.,

2003). Allozyme variation of Atlantic salmon (*Salmo salar*) correlated with body weight, length and fluctuation asymmetry, while microsatellite based genetic variation did not show such relationship (Borrell et al., 2004). Despite a complicated relationship between genetic variation and performance, relatively large genetic variation of a majority of hatchery stocks included in the present study suggested that they should be able to retain/or improve the performance relative to their original populations. The GIFT strain cultured in Fiji lost approximately 20% of its genetic variation relative to the reference GIFT population. This loss was thought to be responsible in part for the decline of tilapia production in Fiji (McKinna et al., 2010). Production could probably be increased through addition of new genetic resources.

Genetic variation, broodstock management and implications

If the broodstock for maintaining the commercial strains were not separated from the broodstock used for commercial seed production, undesirable change may occur in the broodstock populations. This may be due to high demand for fingerlings that could push the population towards selection of early maturing fish (McKinna et al., 2010). It is fortunate that the broodstocks included in this study were separately managed with the brooders for seed production.

According to broodstock management regimes, the hatchery populations used in this study may be divided into four categories; 1) closed population with within family selection (comprising ON-PT, ON-UT, ON-PB); 2) closed population with mass selection (ON-AIT); 3) open population (with introduction from other sources) with within family selection (ON-CP); and 4) open population with mass selection (ON-AY). Although genetic variation of these hatchery populations was not statistically different, a trend was apparent that the open populations had relatively high allele diversity (e.g. $A_r = 8.03 \pm 2.74 - 8.35 \pm 2.69$) comparing to the “closed” populations ($6.61 \pm 2.31 - 7.66 \pm 2.76$). However, the relatively low A_e

(effective number of alleles per locus) of ON-AY ($A_e = 4.71 \pm 2.02$) indicated that it is prone to allele loss if N_e is not high enough (recommended $N_e = 50$, FAO, 1980; Tave, 1993). Mass selection which is currently performed on ON-AY can reduce N_e because of high variance of family sizes (Falconer and Mackays, 1996). On the contrary, within family selection could ensure equal family contributions in effort to increase or optimize N_e .

Low value of A_e in ON-AIT put this population at risk of losing alleles. In addition, mass selection currently applied to this population may result in overall decline of genetic variation due to genetic drift and inbreeding (Falconer and Mackay, 1996). Among the closed populations with within family selection, ON-PB has relatively small genetic variation ($A_r = 6.61 \pm 2.31$; $H_e = 0.73 \pm 0.10$), which suggested that it is prone to inbreeding. Therefore, close monitoring is required (e.g. monitoring of selection response, sign of inbreeding depression, etc.); eventually, introduction of genetically different stocks may be required to mitigate genetic erosion. Likewise, it is well known that after a certain number of generations inbreeding will start to accumulate in a closed population (Falconer and Mackay, 1996). For example, inbreeding coefficient increased by 64.2% in a control line of Nile tilapia after 4 generations, Romana-Eguia et al., 2005). All of the closed populations may eventually require addition of new genetic material from other sources.

It is recommended that the purity of Chitralada should be maintained while good broodstock management should be endorsed to prevent loss of genetic variation. In the future the Chitralada strain may be a valuable source of genes for mitigation of genetic deterioration in other stocks. Similarly the GIFT derived strains including ON-PT, ON-UT and ON-PB, should be managed so that in the future they maintain their genetic differentiation and hence can be used as a source of genetic resources for other populations.

Conclusions

The present study provided evidence that 1) genetic change in GIFT derived populations has occurred and could eventually result in genetically differentiated strains; 2) the GIFT derived strains retained high genetic variation probably through using large number of parents and equal contribution of families; 3) introduction of new genetic materials into a population increased genetic variation of populations with low genetic variation while change of performance should be concern; 4) closed populations tended to have low genetic variation; 5) un-intentional introgression both at intra- and interspecific levels easily occurred in Nile tilapia.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors appreciate the funding support from Thailand Research Fund through two projects comprising the project “Application of Genetics and Biotechnology for Sustainable Development of Aquaculture - II”, Senior Research Scholar 2007 awarded to Uthairat Nanakorn; and the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (Grant No. PHD/0198/2547) awarded to Srijanya Sukmanomon was appreciated. We thank the following colleagues who provided fin clip of fish samples from referenced populations of *O. niloticus* and other species: Drs. G. Hulata (Agricultural Research Organization, Israel), W. Mwanja (Department of Fisheries Resources, Uganda), M. Rezk (WorldFish Center, Egypt), N. Taniguchi (Tohoku University, Japan) and K. Veverica (Auburn University). Moreover, special thanks are to the hatchery managers who allow us to collect fin-clip samples of their valuable broodstock and also shared information on their broodstock management practices. S. Sukmanomon would like to thank the member of the Genetic Variation Laboratory, Department of Animal Science, University of California Davis, CA, USA for their help as well as a friendly working environment during her six months stay.

REFERENCES

- ADB, 2005. An impact evaluation of the development of genetically improved farmed tilapia and their dissemination in selected countries. The Asian Development Bank, Philippines.
- Aho, T., Ronn, J., Piironen, J., Bjorklund, M., 2006. Impacts of effective population size on genetic diversity in hatchery reared Brown trout (*Salmo trutta* L.) populations. *Aquaculture* 253, 244-248.
- Allendorf, F.W., Leary, R.F., Spruell, P., Wenburg, J.K., 2001. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends Ecol. Evol.* 16, 613-622.
- Allendorf, F.W., Luikart, G., 2007. *Conservation and the Genetics of Populations*. Blackwell Publishing, MA, USA. 642 pp.
- Allendorf, F.W., Phelps, S.R., 1980. Loss of genetic variation in a hatchery stock of cutthroat trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* 109, 537-543.
- Amarasinghe U.S., De Silva, S.S., 1996. Impact of *Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus* (Pisces: Cichidae) hybridization on population reproductive potential and long-term influence on a reservoir fishery. *Fisheries Management and Ecology* 3, 239-249.
- Ambali, A.J.D., Doyle, R.W., Cook, D.I., 2000. Development of polymorphic microsatellite DNA loci for characterizing *Oreochormis shiranus* subspecies in Malawi. *J. Appl. Ichthyol.* 16, 121-125.
- Antoro, S., Na-Nakorn, U., Koedprang, W., 2006. Study of genetic diversity of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* from Thailand and Indonesia using microsatellite markers. *Mar. Biotechnol.* 8, 17-26.
- Appleyard, S.A., Ward, R.D., 2006. Genetic diversity and effective population size in mass selection lines of Pacific oyster. *Aquaculture* 254, 148-159.

631 Bassam, B.J., Anollés, G.C., Gresshoff, P.M., 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA
 632 in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 196, 80-83.

633 Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi L., Raufaste, N., Bonhomme, F., 2004. GENETIX 4.05.2,
 634 logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome,
 635 Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II,
 636 Montpellier.

637 Bentsen, H.B., Eknath, A.E., Palada de Vera, M.S., Danting, J.C., Bolivar, H.L., Reyes, R.A.,
 638 Dionisio, E.E., Longalong, F.L., Circa, A.V., Tayamen, M.M., Gjerde, B., 1998.
 639 Genetic improvement of farmed tilapias: growth performance in a complete diallel
 640 cross experiment with eight strains of *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 160, 145-
 641 173.

642 Borrell, Y.J., Pineda, H., McCarthy, I., Vázquez, E., Sánchez, Lizana, G.B., 2004.
 643 Correlations between fitness and heterozygosity at allozyme and microsatellite loci in
 644 the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Heredity* 92, 585-593.

645 Cavalli-Sforza, L.L., Edwards, A.W.F., 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation
 646 procedures. *Evolution* 21, 550-570.

647 Chotiyarnwong, A. 1971. Studies on *Tilapia niloticus* Linnaeus, *Tilapia mossambicus* Peter
 648 and their hybrid. M.S. Thesis, Kasetsart University.

649 Coughlan, J.P., Imsland, A.K., Galvin, P.T., Fitzgerald, R.D., Naevdal, G., Cross, T.F., 1998.
 650 Microsatellite DNA variation in wild populations and farmed strains of turbot from
 651 Ireland and Norway: a preliminary study. *J. Fish Biol.* 52, 916-922.

652 Crow, J.F., 1986. Basic Concepts in Population Genetics. Freeman, New York.

653 Customs Department, 2011. Export of freshwater fishes in 2002-2010. Available at
 654 <http://www.fisheries.go.th/foreign/INDEX2.htm>. Accessed 1 May 2011.

655 Damrongratana, S., Kessanchai, P, 1966. *Tilapia niloticus* Linnaeus Presented to the King on
656 March 17, 1966. Department of Fisheries, Bangkok. (in Thai)

657 Dan, N.C., Little, D.C., 2000. The culture performance of monosex and mixed-sex new-
658 season and overwintered fry in three strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in
659 northern Vietnam. Aquaculture 184, 221-231.

660 Department of Fisheries, 2006. Nile Tilapia: The Fish Given by His Majesty the King for
661 Thai People. Department of Fisheries, Bangkok. 125 pp. (in Thai)

662 Department of Fisheries, 2010. Fisheries Statistics of Thailand. 2008. Technical paper
663 No.12/2010, Information Technology Center, Department of Fisheries, Ministry of
664 Agriculture and Cooperative, Bangkok.

665 DeWoody, J.A., Avise, J.C., 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and
666 anadromous fishes compared with other animals. J. Fish Biol. 56, 461-473.

667 Dey, M.M., Eknath, A.E., Sifa, L., Hussain, M.G., Thien, T.M., Hao, N.V., Aypa, S.,
668 Pongthana, N., 2000. Performance and nature of genetically improved farmed tilapia:
669 a bieconomic analysis. Aquacult. Econ. Manag. 4, 83-106.

670 Dudash, M.R., Fenster, C.B., 2000. Inbreeding and outbreeding depression in fragment
671 populations. In: A. Young, Clarke, G. (Eds.), Genetics, Demography, and Viability of
672 Fragmented Populations. Cambridge University Press, UK, pp. 55-74.
673 [http://books.google.com/books?id=5TTcPEEJol8C&pg=PA35&lpg=PA35&dq=Michelle+R+Dudash+and+Charles+B+Fenster&source=web&ots=TZr0Qbzf5_&sig=x4kH](http://books.google.com/books?id=5TTcPEEJol8C&pg=PA35&lpg=PA35&dq=Michelle+R+Dudash+and+Charles+B+Fenster&source=web&ots=TZr0Qbzf5_&sig=x4kHMrsIJwYgqzXTd4Cr5KU19nk&hl=en&sa=X&oi=book_result&resnum=4&ct=result)
674 [MrsIJwYgqzXTd4Cr5KU19nk&hl=en&sa=X&oi=book_result&resnum=4&ct=result](http://books.google.com/books?id=5TTcPEEJol8C&pg=PA35&lpg=PA35&dq=Michelle+R+Dudash+and+Charles+B+Fenster&source=web&ots=TZr0Qbzf5_&sig=x4kHMrsIJwYgqzXTd4Cr5KU19nk&hl=en&sa=X&oi=book_result&resnum=4&ct=result)
675 http://books.google.com/books?id=5TTcPEEJol8C&pg=PA35&lpg=PA35&dq=Michelle+R+Dudash+and+Charles+B+Fenster&source=web&ots=TZr0Qbzf5_&sig=x4kHMrsIJwYgqzXTd4Cr5KU19nk&hl=en&sa=X&oi=book_result&resnum=4&ct=result

676 Earl, D.A., 2011. Structure Harvester v0.6.5. Available at
677 http://users.soe.ucsc.edu/~dearl/software/struct_harvest/ Accessed 22 April 2011.

678 Eknath, A.E., Acosta, B.O., 1998. Genetic Improvement of Farmed Tilapias (GIFT) Project
679 Final Report, March 1998 to December 1997. ICLARM, Makati City, Philippines.

680 Eknath, A.E., Hulata, G., 2009. Use and exchange of genetic resources of Nile tilapia
681 (*Oreochromis niloticus*). Reviews in Aquaculture 1, 197-213.

682 Eknath, A.E., Tayamen, M.M., Palada-de Vera, M.S., Danting, J.C., Reyes, R.A., Dionisio,
 683 E.E., Capili, J.B., Bolivar, H.L., Abella, T.A., Circa, A.V., Bentsen, H.B., Gjerde, B.,
 684 Gjeder, T., Pullin, R.S.V., 1993. Genetic improvement of farmed tilapias: the
 685 growth performance of eight strains of *Oreochromis niloticus* tested in different farm
 686 environments. *Aquaculture* 111, 171-188.

687 Eknath, A.E., Bentsen, H.B., Ponzoni, R.W., Rye, M., Nguyen, N.H., Thodesen, J., Gjerde,
 688 B., 2007. Genetic improvement of farmed tilapias: Composition and genetic
 689 parameters of a synthetic base population of *Oreochromis niloticus* for selective
 690 breeding. *Aquaculture* 273, 1-14.

691 Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals
 692 using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14, 2611-2620.

693 Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software
 694 package for population genetics data analysis: *Evolutionary Bioinformatics Online*
 695 1, 47-50.

696 Falconer, D.S., Mackay, T.F.C., 1996. *Introduction to quantitative genetics*, 4th edn.
 697 Longman, Essex.

698 FAO, 1980. *Conservation of the genetic resources of fish: problems and recommendations.*
 699 *Report of the expert consultation on the genetic resources of fish. Rome, 9–13 June*
 700 *1980. FAO Fisheries Technical Paper No. 217.*

701 FAO, 2011. Fisheries Department, Fishery Information, Data and Statistic Unit. FISHSTAT
 702 Plus (Universal software for fishery statistic time series) version 2.32.
 703 <http://www.fao.org/fi/statist/fisoft/fishplus.asp>

704 Felsenstein, J., 1993., PHYLIP (Phylogenetic Inference Package) Version 3.67. Department
 705 of Genetics, University of Washington, Seattle.

706 Fessehaye, Y., El-bialy, Z., Rezk, M.A., Crooijmans, R., Bovenhuis, H., Komen, H., 2006.
707 Mating systems and male reproductive success in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)
708 in breeding hapas: A microsatellite analysis. *Aquaculture* 256, 148-158.

709 Fiumera, A.C., Parker, P.G., Fuerst, P.A., 2000. Effective population size and maintenance of
710 genetic diversity in captive-bred populations of a Lake Victoria cichlid. *Conserv.*
711 *Biol.* 14, 886-892.

712 Glaubitz, J.C., 2004. CONVERT: a user friendly program to reformat diploid genotypic data
713 for commonly used population genetic software package. *Mol. Ecol. Notes* 4, 309-
714 310.

715 Goldberg, T.L., Grant, E.C., Inendino, K.R., Kassler, T.W., Claussen, J.E., Philipp, D.P.,
716 2005. Increased infectious disease susceptibility resulting from outbreeding
717 depression. *Conserv. Biol.* 19, 455-462.

718 Goudet, J. 1995. FSTAT version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.*
719 86, 485-486.

720 Grant, B.R., Grant, P.R. 1998. Hybridization and speciation in Darwin's finches- the role of
721 sexual imprinting on a culturally transmitted trait. Pp. 404-422 in Howard, D.J., H.H.
722 Berlocher, eds, eds. *Endless Forms*, Oxford University Press, New York.

723 Guo, S.W., Thompson, E.A. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions
724 for multiple alleles. *Biometrics* 48, 361-372.

725 Gupta, M.V., Acosta, B.O., 2004. From drawing board to dining table: the success story of
726 the GIFT project. *NAGA, WorldFish Center Quarterly* 27(3-4), 4-14.

727 Hassanien, H.A., Gilbey, J., 2005. Genetic diversity and differentiation of Nile tilapia
728 (*Oreochromis niloticus*) revealed by DNA microsatellites. *Aquacult. Res.* 36, 1450-
729 1457.

730 Heath, D.D., Bryden, C.A., Shrimpton, J.M., Iwama, G.K., Kelly, J., Heath, J.W., 2002.
731 Relationship between heterozygosity, allelic distance (dz), and reproduction traits in
732 Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 59, 77-84.

733 Hubisz, M., Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J.K., 2009. Inferring weak population
734 structure with the assistance of sample group information. Mol. Ecol. Resour. 9, 1322-
735 1332.

736 Hussain, M.G., Kohinoor, A.H.M., Islam, M.S., Mahata, S.C., Ali, M.Z., Tanu, M.B.,
737 Hossain, M.A., Mazid, M.A., 2000. Genetic evaluation of GIFT and existing strains of
738 Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., under on-station and on-farm conditions in
739 Bangladesh. Asian Fish. Sci. 13, 117-126.

740 Lamer, J.T., Dolan, C.R., 2010. Introgressive hybridization between bighead carp and silver
741 carp in the Mississippi and Illinois rivers. North American Journal of Fisheries
742 Management 30, 1452–1461.

743 Lee, B-Y, Lee, W-J., Streelman, J.T., Carleton, K.L., Howe, A.E., Hulata, G., Slettan, A., Stern,
744 J.E., Terai, Y., Kocher, T.D., 2005. A second-generation genetic linkage map of tilapia
745 (*Oreochromis* spp.). Genetics 170: 237-244.

746 Lee, W-J, Kocher, T.D., 1996. Microsatellite DNA markers for genetic mapping in
747 *Oreochromis niloticus*. J. Fish Biol. 49, 169-171.

748 Li, S-F., He, X-J., Hu, G-C., Cai, W-Q., Deng, X-W., Zhou, P-Y., 2006. Improving growth
749 performance and caudal fin stripe pattern in selected F₆–F₈ generations of GIFT
750 Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) using mass selection. Aquaculture Research
751 37, 1165-1171.

752 Macaranas, J.M., Taniguchi, N., Pante, M.J.R., Capili, J., Pullin, R.S.V., 1986.
753 Electrophoretic evidence for extensive hybrid gene introgression into commercial
754 *Oreochromis niloticus* (L.) stocks in the Philippines. Aquacult. Fish. Manag. 17, 249-
755 258.

756 Macaranas, J.M., Agustin, L.Q., Ablan, M.C.A., Pante, M.J.R., Eknath, A.A., Pullin, R.S.V.,
 757 1995. Genetic improvement of farmed tilapias: biochemical characterization of strain
 758 differences in Nile tilapia. *Aquacult. Inter.* 3, 43-54.

759 McKinna, E.M., Nandlal, S., Mather, P.B., Hurwood, D.A., 2010. An investigation of the
 760 possible causes for the loss of productivity in genetically improved farmed tilapia
 761 strain in Fiji: inbreeding versus wild stock introgression. *Aquacult. Res.* 41, 730-742.

762 Micha, J.C., Cuvelier, R., Tilquin, C., Muraille, B., Bourgois, M., Galter, U., 1996.
 763 Comparative growth of hybrids (F_1 , F_2 & F_3) of *Oreochromis niloticus* and *O.*
 764 *marcrochir*. In: Pullin, R.S.V., Lazard, J., Legendre, M., Amon-Kothias, J.B., Pauly,
 765 D. (Eds.), The Third International Symposium on Tilapia in Aquaculture ICLARM
 766 Conference Proceeding 41. WorldFish Center, Penang, Malaysia, pp. 354-360.

767 Miller, L.M., Kapuscinski, A.R., 2003. Genetic guidelines for hatchery supplementation
 768 programs. In: Hallerman, E.M. (Ed.), *Population Genetics: Principles and*
 769 *Applications for Fisheries Scientists*. American Fisheries Society, Bethesda, MD,
 770 USA, pp. 329-355.

771 Norris, A.T., Bradley, D.G., Cunningham, E.P., 1999. Microsatellite genetic variation
 772 between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations.
 773 *Aquaculture* 180, 247-264.

774 Overturf, K., Casten, M.T., LaPatra, S.L., Rexroad III, C., Hardy, R.W., 2003. Comparison of
 775 growth performance, immunological response and genetic diversity of five strains of
 776 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 217, 93-106.

777 Perez-Enriquez, R., Hernández-Martínez, F., Cruz, P., 2009. Genetic diversity status of White
 778 shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* broodstock in Mexico. *Aquaculture* 297,
 779 44-50.

780 Ponzoni, R.W., Khaw, H.L., Yee, H.Y., 2010. GIFT: the Story Since Leaving ICLARM (now
781 known as The WorldFish Center. Socioeconomic, Access and Benefit Sharing and
782 Dissemination Aspects. FNI Report 14/2010. The WorldFish Center, Penang,
783 Malaysia.

784 Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using
785 multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.

786 Pullin, R.S.V., Capili, J.B., 1988. Genetic improvement of tilapias: problems and prospects.
787 In: Pullin, R.S.V., Bhukaswan, T., Tonguthai, K., Maclean, J.L. (Eds). The second
788 International Symposium on Tilapia in Aquaculture. ICLARM Conference
789 Proceedings 15, Department of Fisheries, Thailand and ICLARM, Manila,
790 Philippines, pp. 259-266.

791 Qin, Y., Liu, X. Zhang, H., Zhang, G., 2007. Effect of parental stock size on F₁ genetic
792 structure in the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck, 1819). *Aquacult. Res.*
793 38, 174-181.

794 Raymond, M., Rousset, F., 1995a. GENEPOP (ver 3.4): a population genetics software for
795 exact test and ecumenicism. *J. Hered.* 86, 248-249.

796 Raymond, M., Rousset, F., 1995b. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49,
797 1280-1283.

798 Romana-Eguia, M.R.R., Ikeda, M., Basiao, Z.U., Taniguchi, N., 2004. Genetic diversity in
799 farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and
800 mitochondrial DNA analysis. *Aquaculture* 236, 131-150.

801 Romana-Eguia, M.R.R., Ikeda, M., Basiao, Z.U., Taniguchi, N., 2005. Genetic changes
802 during mass selection for growth in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.), assessed
803 by microsatellites. *Aquacult. Res.* 36, 69-78.

804 Rousset, F., 2008. Genepop'007: a complex re-implementation of the genepop software for
 805 Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.* 8, 103-106.

806 Rutten, M.J.M., Bovenhuis, H., Komen, H., 2004. Modeling fillet traits based on body
 807 measurements in three Nile tilapia strains (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture*
 808 231, 113-122.

809 Shields, J.L., Barnes, P., Heath, D.D., 2008. Growth and survival differences among native,
 810 introduced and hybrid blue mussels (*Mytilus* spp.): genotype, environment and
 811 interaction effects. *Mar. Biol.* 154, 919–928.

812 Shikano, T., Taniguchi, N., 2002. Relationships between genetic variation measured by
 813 microsatellite DNA markers and a fitness-related trait in guppy (*Poecilia reticulata*).
 814 *Aquaculture* 209, 77-90.

815 Shikano, T., Chiyokubo, T., Taniguchi, N., 2001. Temporal changes in allele frequency,
 816 genetic variation and inbreeding depression in small populations of the guppy,
 817 *Poecilia reticulata*. *Heredity* 86, 153-160.

818 Sušnik, S., Berrebi, P., Dovč, P., Hansen, M.M., Snoj, A., 2004. Genetic introgression
 819 between wild and stocked salmonids and the prospects for using molecular markers in
 820 population rehabilitation: the case of the Adriatic grayling (*Thymallus thymallus* L.
 821 1785). *Heredity* 93, 273-282.

822 Taggart, J.B., Hynes, R.A., Prodöhl, P.A., Ferguson, A., 1992. A simplified protocol for
 823 routine total DNA isolation from salmonid fishes. *J. Fish Biol.* 40, 963-965.

824 Tangtrongpiros, M., 1980. Culture of blue tilapia (*Oreochormis aureus*). Technical paper no.
 825 6/2523. Department of Fisheries, Bangkok. (in Thai).

826 Taniguchi, N., 2003. Genetic factors in broodstock management for seed production. *Rev.*
 827 *Fish Biol. Fish.* 13, 177-185.

828 Tave, D., 1993. *Genetics for Fish Hatchery Managers*. 2nd edition. Kluwer Academic
 829 Publishers, Boston. 299 pp.

830 Tymchuk, W.E., Biagi, C., Withler, R., Devlin, R.H., 2006. Growth and behavioral
831 consequences of introgression of a domesticated aquaculture genotype into a native
832 strain of coho salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.* 135, 442-455.

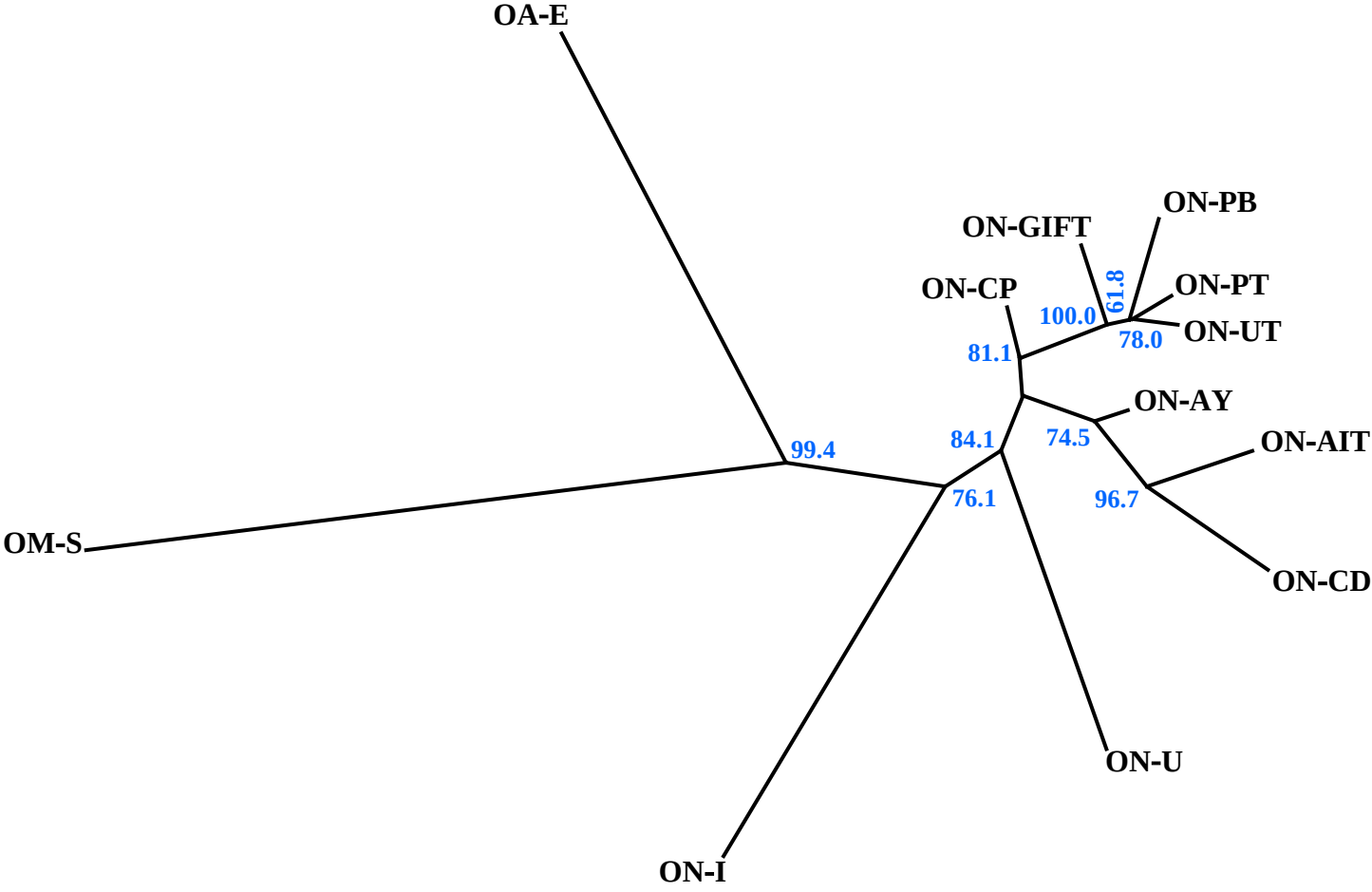
833 Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P., 2004. MICRO-
834 CHECKER: software for indentifying and correcting genotyping errors in
835 microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4, 535-538.

836 Withler, R. E., Supernault, K. J., Miller, K. M., 2005. Genetic variation within and among
837 domesticated Atlantic salmon broodstocks in British Columbia, Canada. *Animal*
838 *Genetics* 36, 43-50.

839 Wohlfarth, G.W., 1994. The unexploited potential of tilapia hybrids in aquaculture. *Aquacult.*
840 *Fish. Manag.* 25, 781-788.

841 Yeh, F.C., Boyle, T., 1999. POPGENE, version 1.32. The user friendly software for
842 population analysis. University of Alberta and CIFOR, Edmonton, Canada
843

Figure(s)



0.1

Figure 1

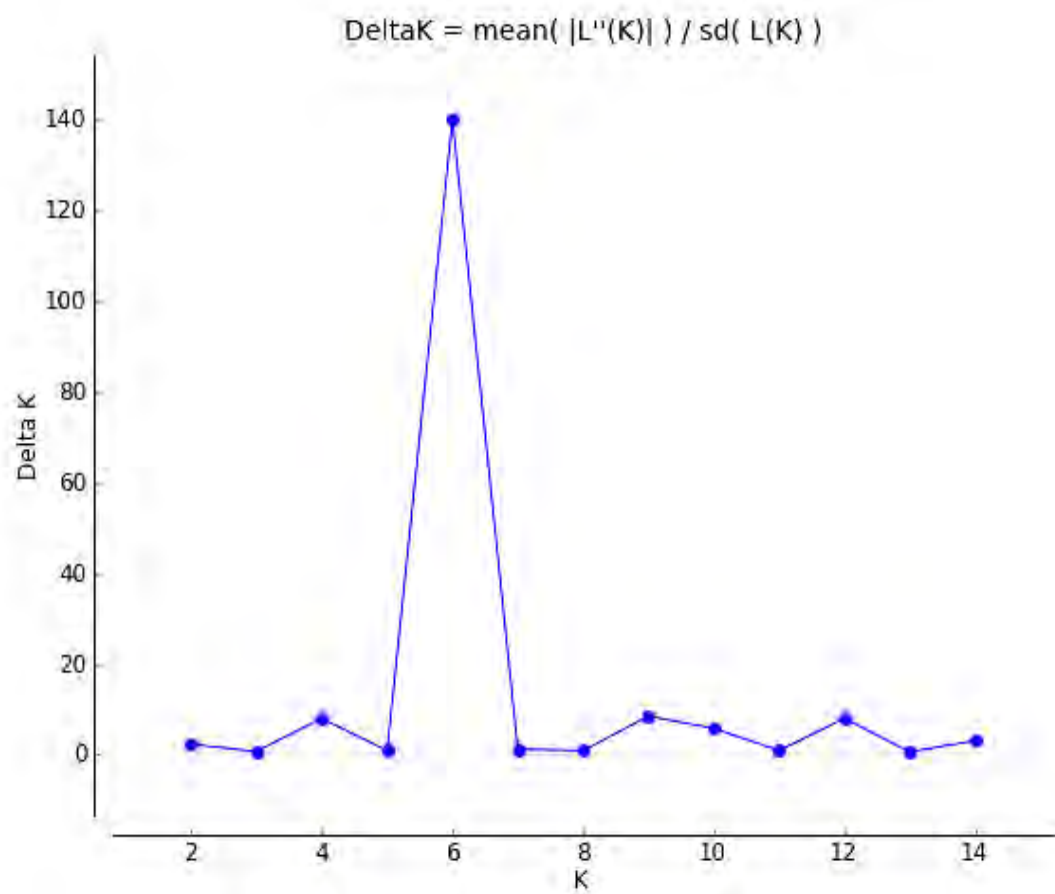


Figure 2

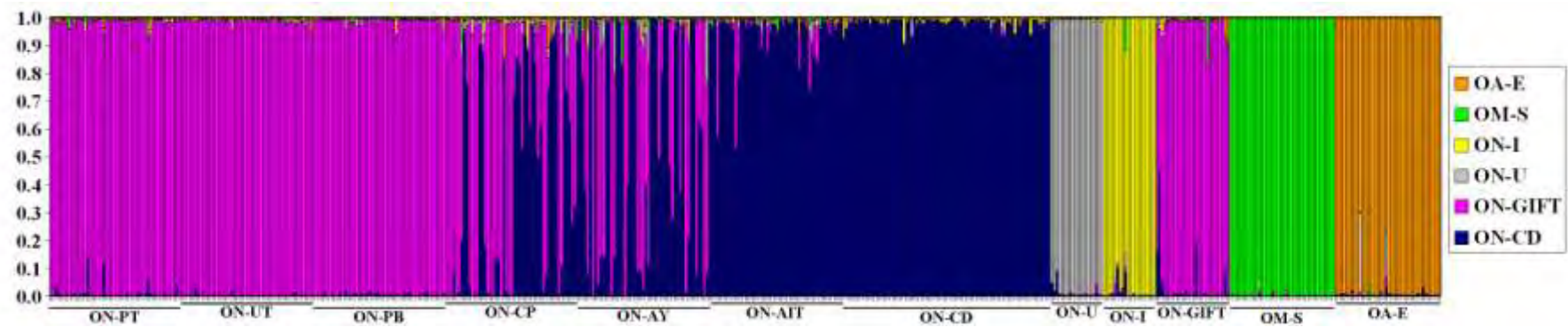


Figure 3

Table 1 Sources of six Nile tilapia hatchery populations and three feral populations of *O. niloticus* in Thailand; four conspecific referenced populations from Chitralada Villa Royal Residence Thailand (ON-CD), Uganda (ON-U), Ivory Coast (ON-I) and genetically improved GIFT strain (ON-GIFT); A population each of *O. mossambicus* (from South Africa, OM-S) and *O. aureus* (from Egypt, OA-E); N = sample size.

Stock abbreviation	Names of hatchery/locations	Origin of the stock	Sample size
<i>GIFT derived populations</i>			
ON-PT	Pathum Thani Fisheries Test and Research Center (Pathum Thani FTRC)	Founders comprised fifty families of the 9 th generation GIFT from the WorldFish Center, Malaysia in 2000, undergone within family selection for growth for 5 generations	50
ON-UT	Uttaradit Fisheries Test and Research Center (Uttaradit FTRC)	Founders comprised 33 out of 50 families of the 9 th generation of GIFT from Pathum Thani FTRC, undergone 3 generations of within family selection for growth	50
ON-PB	Nam Sai Farm, Prachin Buri province	Founders comprised the 5 th and 9 th generation GIFT from the National Aquaculture Genetics research Institute (NAGRI), Thailand in 1997 and 2000, respectively; no records on number of families, the stocks were merged and subjected to 2 generations of selection for growth	50

ON-CP	Charoen Pokphand Hatchery, Ayutthaya province.	Founders comprised 250 fullsib families using females from 2 sources, GIFT from Pathum FTRC and GIFT originated in Philippines, and males from Chitralada and other tilapia strain/species from Africa, undergone 5 generations of within family selection for growth	50
<i>Chitralada derived populations</i>			
ON-AIT	Asian Institute of Technology (AIT), Pathum Thani province	Founders comprised members of Chitralada strain reared in Chitralada Villa Royal Resident, Bangkok, no information on number of founders, undergone at least 10 generations of mass selection for growth	50
ON-AY	Rom Sai Farm, Ayutthaya province.	Founders comprised a combination of Chitralada strain and GIFT (GIFT was un-intentionally introduced due to the confused naming of the GIFT strain as Chitralada III (ADB, 2005; Chinabut <i>et al.</i> , 2007), undergone 2 generations of mass selection for growth	50
<i>Reference populations</i>			
ON-CD	Chitralada population,	collected from Chitralada Villa Royal Residence, Bangkok	80
ON-GIFT	GIFT population	the ninth generation GIFT originally	28

		collected from the Philippines (obtained from N. Taniguchi, Tohoku University, Japan)	
ON-I	Ivory Coast population	a cultured population from Ivory Coast, obtained from K. Veverica, Auburn Univeristy, USA)	20
ON-U	Uganda population	Wild, collected from Lake Albert in Uganda (obtained from W. Mwanja, Uganda)	20
OM-S	Reference population for <i>O. mossambicus</i>	A cultured population from South Africa (obtained from G. Hulata, Agricultural Research Organization, Israel)	20
OA-E	Reference population for <i>O. aureus</i>	A cultured population from Egypt, (obtained from Mahmoud Rezk, WorldFish Center)	40

Table 2 Primer details for microsatellite loci used in this study

Locus	GenBank	LG	Primer Sequence	Dye ^b	Ta	Repeat type	Size range
ID	Accession no.	no. ^a	(5'-3')		(°C)		(bp)
UNH172	G12324	4	AATGCCTTTAAATGCCTTCA CTTTTATAGTCGCCCTTTGTTA	-	60	(CA) ₁₇	176-246
UNH211	G12362	19	GGGAGGTGCTAGTCATA CAAGGAAAACAATGGTGATA	-	60	(CA) ₁₇	106-212
UNH216	G12367	23	GGGAAACTAAAGCTGAAATA TGCAAGGAATATCAGCA	-	55	(CA) ₁₁	120-186
UNH222	G12373	2	CTCTAGCACACGTGCAT TAACAGGTGGGAACTCA	-	58	(CA) ₁₇	162-196
UNH212	G12363	Not mapped	ACTGTATTCTATAAATGCATTTT GGAATGTGACATTTTGA	-	50	(CA) ₁₃	178-228
UNH160	G12312	6	CCATTGGCTCTTACATC GATAGCATTTCTGTAGTTATGG	-	60	(CA) ₃₅	132-210

UNH213	G12364	1	ACTGCTCCTCTTGTTTT TGTGATAAGGTTAATTAAAGTTAGG	6-FAM	59, 56	(CA) ₁₇	182-218
UNH153	G12305	18	TCTGCTTTGCTTTTTCTCATTCT TACGGCACACTCCCTCCAT	VIC	59, 56	(CA) ₉	197-243
UNH132	G12285	9	ATATAAGAACTGAGTCGGTGAG TGGAAATAGAGGGTGGGTGAG	NED	59, 56	(GA) ₆ GC (GA) ₇	125-149
UNH138	G12290	16	TTCAGCTTCATCTCTTG CCATTTTAACCTCTCCATCT	PET	59, 56	(CA) ₂₆	164-228
UNH192	G12344	11	GGAAATCCATAAGATCAGTTA CTTTTTCAGGATTTACTGCTAAG	6-FAM	56, 53	(CA) ₁₀	144-190
UNH1004	G68281	22	CATCTGAGTCACGCAGGTTC GCTGAGGTGAGTGTGATGGA	VIC	56, 53	(GT) ₂₉	180-256
UNH982	G68265	3	TCAATACTGTGGTCCCCTCTTT TCTCAGAGCGCTATCTTCCTG	NED	56, 53	(GT) ₂₁ GC (GT) ₉	120-168
UNH173	G12325	13	CGTGAGAAAACAATGGT	PET	56, 53	(CA) ₈	123-207

TATTGATTTTATAGCTGTCTGG

^asee a genetic linkage map of tilapia (*Oreochromis* spp.) (Lee *et al.*, 2005)

^bfluorescently labeled forward primer for multiplex PCR

Table 3 Test for conformation to Hardy-Weinberg equilibrium (after the adjustment of allele frequencies due to null allele) showing the locus-wise F_{IS} , the probability for overall Fisher's exact test ($\alpha = 0.0036$ after Bonferroni correction for multiple tests); * denotes statistical significant ($P < 0.0036$)

Population	Locus														F_{IS}	Prob.
	UNH	UNH	UNH	UNH	UNH	UNH	UNH	UNH	UNH	UNH	UNH	UNH	UNH	UNH		exact
	172	211	216	222	212	160	213	153	132	138	192	1004	982	173		test
<i>O. niloticus</i>																
Pathum Thani (ON-PT)	0.0725*	-0.0570	-0.3275	0.1273	-0.0177	0.0623	-0.0324	-0.0390	-0.0138	0.0182	-0.0852	0.1215	-0.0513	-0.0574	-0.0094	0.0005
Uttaradit (ON-UT)	0.0514	0.0921	-0.2273	0.0252	0.0880	-0.0002	-0.1741	-0.0071	0.0913	0.1013	-0.0862	0.0886	0.0381	-0.0064	0.0145	0.1591
Prachin Buri (ON-PB)	0.1323	0.0247	0.0895	-0.0998	-0.0379	0.0283	0.0622	-0.1533	0.0383	-0.0228	0.0473	-0.0515	0.0878	-0.0205	0.0106	0.0184
CP (ON-CP)	0.0785*	0.0211	0.0565	0.0972	0.1160	0.0082	0.0357	-0.1062	0.1238	0.1061*	0.0683	0.1002	0.1485*	0.0647	0.0835	0.0000
Ayutthaya (ON-AY)	0.1098	-0.0397	0.1227	0.0493*	0.0810	0.1128	0.1115*	0.0943	0.1075	0.0162	0.0523	0.0152	0.1772*	0.0683	0.0998	0.0000
AIT (ON-AIT)	0.1332	0.0275	-0.0842	-0.0180	0.0007	0.0033	0.0106	-0.0449	-0.1003	0.0003	-0.1553	0.0020	0.0934	0.0392	0.0100	0.1470
Chitralada (ON-CD)	0.0866	0.1105	0.0678	0.0520	-0.0882	0.0975	0.0007	-0.1112	0.0255	0.0815	0.0936	-0.0033*	-0.0542	-0.0321	0.0479	0.0001
Uganda (ON-U)	0.1795	-0.0314	0.1264	-0.0076	-0.1271	0.0563	-0.1934	0.3968	-0.3412	0.1853	-0.0156	0.1419	0.1584	0.1762	0.0455	0.2330
Ivory Coast (ON-I)	0.1595	0.2623	-0.0270	-	-0.0556	0.0270	-0.4975*	1.0000	-0.3790*	0.3968	0.3596	-0.3194	-0.1875	-0.0629	0.0207	0.0001

GIFT strain (ON-GIFT)	0.1550	0.1637	-0.1670	-0.2990	-0.0970	-0.0239	-0.0904	-0.2213	0.1274	0.1353	0.1196	0.0935	-0.1232	-0.0532	-0.0024	0.5957
<i>O. mossambicus</i>																
South Afirca (OM-S)	-	-0.0428	-0.2039*	-0.2145	-0.5584*	-0.1380	0.2166	0.0557	-0.1692	-	0.0140*	-0.3929	-0.2381	-0.2000*	-0.0952	0.0000
<i>O. aureus</i>																
Egypt (OA-E)	0.0545	0.1418	0.0862	0.2320	0.0714	-0.0864	-0.0630	0.1491	-0.2412	0.0640	0.0746	-0.0056	0.0561	-0.0428	0.0573	0.0904

Table 4 Results of linkage disequilibrium (LD) tests based on the Chi-square tests;Population abbreviations are as in Table 1; D = disequilibrium coefficient

Population	No. of loci pairs for LD	D (mean $\pm$ SE)
ON-PT	9	0.0194 $\pm$ 0.0025
ON-UT	4	0.0122 $\pm$ 0.0013
ON-PB	2	0.0190 $\pm$ 0.0002
ON-CP	13	0.0171 $\pm$ 0.0024
ON-AY	25	0.0197 $\pm$ 0.0023
ON-AIT	14	0.0142 $\pm$ 0.0012
ON-CD	4	0.0103 $\pm$ 0.0028
ON-U	2	0.0125 $\pm$ 0.0125
ON-I	12	0.0129 $\pm$ 0.0084
ON-GIFT	3	0.0457 $\pm$ 0.0075
OM-S	2	-0.0066 $\pm$ 0.0010
OA-E	17	0.0121 $\pm$ 0.0025

Table 5 A matrix of pairwise F_{ST} value (below diagonal) and Carvalli-Sforza and Edwards chord distance (above diagonal) among the populations of Nile tilapia and the referenced populations/species; Every test for pairwise F_{ST} was significant different ($P < 0.0008$ after Bonferroni correction for multiple tests).

	ON-PT	ON-UT	ON-PB	ON-CP	ON-AY	ON-AIT	ON-CD	ON-U	ON-I	ON-GIFT	OM-S	OA-E
ON-PT	**	0.0151	0.0249	0.0340	0.0513	0.0874	0.0963	0.1054	0.1286	0.0258	0.1946	0.1531
ON-UT	0.0118	**	0.0253	0.0341	0.0534	0.0885	0.1030	0.0991	0.1306	0.0228	0.1973	0.1585
ON-PB	0.0323	0.0330	**	0.0390	0.0506	0.0875	0.0975	0.1067	0.1399	0.0395	0.1964	0.1627
ON-CP	0.0363	0.0338	0.0476	**	0.0268	0.0519	0.0579	0.0899	0.1256	0.0378	0.1935	0.1485
ON-AY	0.0732	0.0712	0.0869	0.0349	**	0.0318	0.0497	0.0909	0.1308	0.0512	0.1920	0.1714
ON-AIT	0.1403	0.1391	0.1596	0.0753	0.0526	**	0.0430	0.1035	0.1379	0.0861	0.1923	0.1804
ON-CD	0.1750	0.1776	0.1942	0.1031	0.0862	0.0600	**	0.1022	0.1170	0.0908	0.2205	0.1769
ON-U	0.1490	0.1410	0.1700	0.1214	0.1196	0.1451	0.1801	**	0.1362	0.1016	0.2039	0.1926
ON-I	0.2782	0.2856	0.3115	0.2803	0.2965	0.3161	0.3248	0.3359	**	0.1310	0.2121	0.1922
ON-GIFT	0.0156	0.0186	0.0475	0.0369	0.0713	0.1423	0.1753	0.1525	0.3125	**	0.1914	0.1651
OM-S	0.3658	0.3709	0.3830	0.3579	0.3803	0.3991	0.4425	0.4422	0.5857	0.3908	**	0.1978
OA-E	0.3157	0.3217	0.3325	0.3012	0.3365	0.3622	0.3946	0.4113	0.5263	0.3483	0.4986	**

Table 6 Average admixture proportion (q_i) of each pre-defined population in each of the six clusters ($K=6$). (STRUCTURE: 100,000 Burn-in period; 100,000 Reps)

Population	Inferred Clusters						Number of Individuals
	1	2	3	4	5	6	
ON-PT	0.011	0.972	0.005	0.004	0.003	0.004	50
ON-UT	0.005	0.981	0.005	0.004	0.002	0.004	50
ON-PB	0.006	0.980	0.005	0.004	0.002	0.003	50
ON-CP	0.403	0.559	0.016	0.008	0.003	0.011	50
ON-AY	0.566	0.394	0.022	0.006	0.007	0.004	50
ON-AIT	0.936	0.042	0.009	0.004	0.005	0.004	50
ON-CD	0.978	0.004	0.005	0.009	0.001	0.004	80
ON-U	0.011	0.005	0.976	0.004	0.002	0.002	20
ON-I	0.012	0.006	0.006	0.968	0.007	0.001	20
ON-GIFT	0.038	0.936	0.005	0.005	0.008	0.007	28
OM-S	0.002	0.002	0.002	0.002	0.991	0.002	40
OA-E	0.003	0.003	0.013	0.002	0.002	0.977	40

Table 7 Genetic variation of Nile tilapia hatchery populations in Thailand and six referenced populations; N = sample size, P = number of polymorphic loci, A = number of alleles per locus, A_e = effective number of alleles per locus, A_r = allelic richness, H_o , H_e = observed and expected heterozygosity respectively; Values in parentheses denote SD; Mean values in the same column with different superscripts are statistically significant ($\alpha = 0.05$).

Species	Population	N	Genetic variation					
			P	A	A _e	A _r	H _o	H _e
<i>O. niloticus</i>								
	Pathum Thani (ON-PT)	50	14	8.86 ^{ab} (3.11)	5.03 ^a (2.46)	7.66 ^a (2.76)	0.76 ^a (0.13)	0.76 ^a (0.13)
	Uttaradit (ON-UT)	50	14	8.86 ^{ab} (3.18)	4.70 ^{ab} (1.99)	7.41 ^a (2.50)	0.74 ^a (0.11)	0.75 ^a (0.12)
	Prachin Buri (ON-PB)	50	14	7.50 ^{bc} (2.53)	4.15 ^{abc} (1.85)	6.61 ^{ab} (2.31)	0.72 ^a (0.11)	0.73 ^a (0.10)
	CP (ON-CP)	50	14	10.36 ^a (3.71)	5.24 ^a (2.01)	8.35 ^a (2.69)	0.72 ^a (0.08)	0.79 ^a (0.09)
	Ayutthaya (ON-AY)	50	14	9.93 ^{ab} (3.75)	4.71 ^{ab} (2.02)	8.03 ^a (2.74)	0.68 ^a (0.13)	0.75 ^a (0.12)
	AIT (ON-AIT)	50	14	8.57 ^{ab} (2.47)	4.10 ^{abc} (1.71)	7.06 ^a (1.76)	0.71 ^a (0.13)	0.72 ^a (0.13)
	Chitralada (ON-CD)	80	14	6.00 ^c (1.88)	3.24 ^{bcd} (1.25)	4.86 ^{bc} (1.55)	0.62 ^a (0.14)	0.65 ^a (0.15)
	Uganda (ON-U)	20	14	7.43 ^{bc}	3.91 ^{abc}	7.43 ^a	0.66 ^a	0.69 ^a

Strain	Age (years)	Sex	CFU/g	CFU/g	CFU/g	CFU/g	CFU/g
Ivory Coast (ON-I)	20	13	3.29 ^d	1.90 ^d	3.29 ^{cd}	0.34 ^b	0.35 ^b
			(2.02)	(1.10)	(2.02)	(0.31)	(0.27)
GIFT strain (ON-GIFT)	28	14	7.64 ^{bc}	4.37 ^{abc}	7.14 ^a	0.74 ^a	0.74 ^a
			(2.24)	(1.87)	(2.09)	(0.10)	(0.13)
<i>O. mossambicus</i>							
South Africa (OM-S)	40	12	3.07 ^d	1.97 ^d	2.86 ^d	0.46 ^b	0.42 ^b
			(1.21)	(0.72)	(1.04)	(0.31)	(0.24)
<i>O. aureus</i>							
Egypt (OA-E)	40	14	5.79 ^c	2.85 ^{cd}	4.97 ^{bc}	0.46 ^b	0.48 ^b
			(4.30)	(2.37)	(3.52)	(0.24)	(0.26)

Figure legends

Figure 1 A phylogenetic dendrogram reconstructed from Carvalli-Sforza chord distance between six Nile tilapia hatchery populations in Thailand; four conspecific referenced populations from Chitralada Villa Royal Residence Thailand (ON-CD), Uganda (ON-U), Ivory Coast (ON-I) and genetically improved GIFT strain (ON-GIFT); A population each of *O. mossambicus* (from South Africa, OM-S) and *O. aureus* (from Egypt, OA-E).

Figure 2 DeltaK (ΔK) value calculated for assuming $K = 1-15$ clusters of six Nile tilapia hatchery populations in Thailand; four reference populations of *O. niloticus* and one population each of *O. mossambicus* and *O. aureus*

Figure 3 The probability of assignment of individuals to each of the six genetic groups ($K = 6$) defined in the present study. Each vertical bar represents an individual and each colour represents a probability that the individual is assigned to each genepool (admixture proportion, q_i). The values of q_i were provided in the output sheet generated by the program.

Manuscript Number:

Title: Development stages of androgenic glands in Giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* De Mann, 1879 in relation to size and success rate of andrectomization in small and large size prawn

Article Type: Research Paper

Keywords: *Macrobrachium rosenbergii*, androgenic glands, development stage, neofemale

Corresponding Author: Professor Dr. Uthairat Na-Nakorn, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Kasetsart University

First Author: Uthairat Na-Nakorn, Ph.D.

Order of Authors: Uthairat Na-Nakorn, Ph.D.; Wikrom Rungsin, M.S.

Abstract: To produce all male Giant freshwater prawn-GFP (*Macrobrachium rosenbergii* De Mann, 1879) neofemales are produced by removing androgenic glands of young post larvae. The key success of the sex change depends on selection of suitable stage of post larvae (PL) which was formerly recommended according to carapace length (CL). The present study aimed at understanding the relationship between developmental stages of androgenic glands and size of the GFP and success rate of sex change after removal of androgenic glands in different size groups of PL. We provided the first report on developmental stages of androgenic glands of GFP based on histology of 30 PL/age-class (a total of 240 individuals) during 10-80 days after reaching the PL stage. The development stages were separated into 4 stages: Stage I denoted the initiation of the development along with the development of vas deferens; Stage II denoted the first function of androgenic glands which coincided with the first appearance of gonopore complexes; Stage III was characterized by non functioning of the androgenic glands while development of vas deferens proceeded and Stage IV marked the fully developed and functioned androgenic glands which coincided with differentiation of testes. The regression analysis showed that the development of androgenic glands related with size (CL) ($r^2 = 0.584$; $F = 370.13$; $P = 3.127 \times 10^{-56}$). The removal of androgenic glands in small ($CL \leq 0.6$ cm) and large PL ($CL > 0.6$ cm) at each PL stage showed the overall results (investigation made on 700 andrectomized PL) that using small PL yielded higher success rate of sex change to female.

Suggested Reviewers: Amir Sagi

sagia@bga.ac.il

He is well experienced and currently working in this field.

I. S. Racotta

iracotta@cibnor.mx

He published a paper on reproductive histology of shrimp.

Opposed Reviewers:

Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

6th December, 2010

Dear the editor

I on behalf of the authors would like to submit a manuscript entitled “Development stages of androgenic glands in Giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* De Mann, 1879 in relation to size and success rate of andrectomization in small and large size prawn” by Wikrom Rungsin, Akarapong Swatdipong and Uthairat Na-Nakorn to be considered for publication in the journal “Aquaculture”. This manuscript is an original article which has not been submitted elsewhere. This study is a continueing study aiming at improving the neofemale technology. The present study aimed at understanding the relationship between developmental stages of androgenic glands and size of the GFP and success rate of sex change after removal of androgenic glands in different size groups of PL. We found that the development of androgenic glands related with size (CL) (investigation made on 240 PL of 8 age-classes) and using small PL ($CL \leq 0.6$ cm) for andrectomization yielded higher success rate of sex change to female.

Your kind consideration on this matter would be greatly appreciated.

Best Regards

Uthairat Na-Nakorn, Ph.D.

Professor

Development stages of androgenic glands in Giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* De Mann, 1879 in relation to size and success rate of andrectomization in small and large size prawn

Wikrom Rungsin^{a,b} Akarapong Swatdipong^c Uthairat Na-Nakorn^{b,d*}

^a Ph.D. Program in Aquaculture, The Graduate School, Kasetsart University, Chatujak, Bangkok 10900, Thailand

^b Center of Advanced Studies for Agriculture and Food, KU Institute for Advanced Studies, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand (CASAF, NRU-KU, Thailand)

^c Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, Thailand 10900

^d Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Chatujak, Bangkok 10900, Thailand

*corresponding author

Tel./Fax. 66 2 5794956; e-mail ffisurn@ku.ac.th

ABSTRACT

To produce all male Giant freshwater prawn-GFP (*Macrobrachium rosenbergii* De Mann, 1879) neofemales are produced by removing androgenic glands of young post larvae. The key success of the sex change depends on selection of suitable stage of post larvae (PL) which was formerly recommended according to carapace length (CL). The present study aimed at understanding the relationship between developmental stages of androgenic glands and size of the GFP and success rate of sex change after removal of androgenic glands in different size groups of PL. We provided the first report on developmental stages of androgenic glands of GFP based on histology of 30 PL/age-class (a total of 240 individuals) during 10-80 days after reaching the PL stage. The development stages were separated into 4 stages: Stage I denoted the initiation of the development along with the development of vas deferens; Stage II denoted the first function of androgenic glands which coincided with the first appearance of gonopore complexes; Stage III was characterized by non functioning of the androgenic glands while development of vas deferens proceeded and Stage IV marked the fully developed and functioned androgenic glands which coincided with differentiation of testes. The regression analysis showed that the development of androgenic glands related with size (CL) ($r^2 = 0.584$; $F = 370.13$; $P = 3.127E-56$). The removal of androgenic glands in small ($CL \leq 0.6$ cm) and large PL ($CL > 0.6$ cm) at each PL stage showed the overall results (investigation made on 700 andrectomized PL) that using small PL yielded higher success rate of sex change to female.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*, androgenic glands, development stage, neofemale

1. INTRODUCTION

Sexual dimorphism of growth is pronounced in Giant freshwater prawn-GFP (*Macrobrachium rosenbergii* De Mann, 1879) of which males are larger than females (Sandifer and Smith, 1985). Culture of all male stocks resulted in significant elevated yield (Nair et al., 2006). Recently, a neofemale technology, where sex change is triggered in male postlarvae by removing androgenic glands (andrectomization), has been developed and all male post larvae were successfully produced (Sagi and Cohen, 1990; Aflalo et al., 2006; Rungsin et al., 2006). However, the success rates of the andrectomization was low and varied [e.g. 40 percents (Sagi and Cohen, 1990); 17.62 percents (Aflalo et al., 2006); 27.14 percents (Rungsin et al., 2006)], hence hampered the mass production of the neofemales and the commercial production of all-male PL.

A key success of the andrectomization is a stage of the PL used for the operation. The optimal stage was described as size (e.g. body weight of about 0.96 g, Sagi and Cohen, 1990), age (e.g. 20-30 days after reaching the post larvae stage, Aflalo et al., 2006) and morphology (e.g. presence of gonopore complex, before development of appendix masculina, Rungsin et al., 2006). All of these descriptions reflected a smallest size of the post larvae that can accommodate an operation while testes were not yet developed. However, it is obvious that growth rate of aquatic animals partly depends on stocking density (Cohen et al., 1981). As such, those descriptions may not applicable if stocking density of the PL changes especially towards high density. This necessitates a study on development of androgenic glands and gonadal development in GFP relative to age and size.

The present study aims at elucidating the development stages of androgenic glands and studying the relationship of the development stages with sizes or ages of PL. The information obtained would enable improving success rates of andrectomization and hence fulfill the demand for neofemales for commercial production of all male GFP post larvae.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Development of androgenic glands and relationship with carapace length

2.1.1 Preparation of all male GFP post larvae

The presumed all male GFP larvae were produced by mating a neofemale and a normal male GFP. Then the larvae were reared in a 250 l plastic tank fed with artemia nauplii. At 21 days of rearing all larvae reached the postlarva stage and were stocked in a tank at a density of 2500 PL/1500 l. They were fed with commercially available prawn feed (40% crude protein). Water quality has been maintained by daily siphoning of waste and filling with fresh water. The nursing tank was supplied with pieces of 90 x 15 cm² plastic net as shelters to reduce cannibalism.

2.1.2 Sample collection for histological study

A total of 240 PL, of which appendix masculinae were not yet formed, were taken during 10 - 80 days (30 PL/day) after reaching the PL stage at a 10 days interval. The samples were preserved in Davidson's fixative for 48 hours before transferring to 70% alcohol until used.

Prior to embedding, carapace length was measured and secondary sex characters were observed. Histological study followed Humason (1979). In brief, the embedded sample was sagittally sectioned; tissues were mounted on to a slide, dried, and stained with Hematoxylin and Eosin before they were investigated under a compound microscope.

2.1.3 Data collection and analyses

Developmental stages of the androgenic gland and frequency of samples in each stage within an age class (10 – 80 days after reaching the PL stage) were investigated along with the development of gonads (testes) and vas deferens.

The relationship between carapace length and development stages of the androgenic glands (designated as 1 – 4) was analyzed using linear regression. In addition, resampling was

done on both traits. Then the means were plotted against each other and confident limits (95%) were estimated over 1,000 resampling using the program PopTools 2.7.5 (Hood, 2006).

2.2 A comparison of success (feminization) rates in relation to carapace length

2.2.1 Preparation of all male GFP post larvae and rearing of the experimental PL

The presumed all-male larvae were produced as described in 2.1.1. Then the postlarvae were stocked in two tanks (1500 l) at a density of 2500 PL and 5000 PL per tank. Feeding and water quality management were the same as described in 2.1.1.

2.2.2 Removal of androgenic glands (andrectomization)

The maleness of the experimental prawns was confirmed by selecting only PL with gonopore complexes. As such, the operation started at PL37 when sufficient amount of prawns with gonopore complexes were observed. Samples of the experimental prawns of a particular age and stocking density were separated into two size-groups, small ($CL \leq 0.60$ mm) and large ($CL > 0.60$ cm). Then 70 PL/group were subjected to andrectomization following Rungsin et al. (2006). Three days after the operation 50 survivors/group were collected and reared for further investigation. The operation was repeated on a weekly basis and continued until PL79 when the appendix masculinae were observed in a majority of the PL. This resulted in 7 age classes of prawn with a total of 980 andrectomized PL and 700 PL reared for sex investigation. The andrectomized PL were stocked in cages of $80 \times 80 \times 80$ cm³ fixed in a 1.5×2 m² concrete tank. They were fed with 40% protein commercially available pellet at satiation.

2.2.3 Evaluation of sex change

Successful feminization was evaluated at 30 days after the removal of androgenic glands (Aflalo et al., 2006) indicating by the absence of appendix masculina at the inner rims of second pleopods. The success rates were indicated by percentage of neofemales.

2.2.4 Data analyses

The percentages of the neofemales were compared between small and large size-groups within a PL stage of each stocking density using t-test. Then success rates of small and large size groups pooled across ages were compared within a stocking density using the Chi square test facilitated by the program PopTools 2.7.5 (Hood, 2006).

3. RESULTS

3.1 Development of the androgenic gland

Development of the androgenic gland of the GFP samples in this study could be divided into 4 stages following those of *Pandalopsis japonica* report by Kim et al. (2006) as followed.

Stage 0: “no development stage” An androgenic gland did not show sign of development. It comprised of a small undifferentiated cluster of cells. Morphologically, the GFP samples did not show primary sex characteristics.

Stage I: “Initiation stage” An androgenic gland comprised a small cluster of cells which stained with blue colour; appeared in front of the distal end of the vas deferens (Figure 1A). An undifferentiated gonad appeared as a single layer of primordial germ cells lining between a heart and hepatopancreas (Figure 1B).

Stage II: “Early development stage” The androgenic gland appeared as a single cord of cells, comprising of multiplying enlarged cells (Figure 2A) in which nucleoli were observed in cell nuclei. At the base of the fifth walking leg, a gonopore complex was observed. In this stage the gonads enlarged and comprised of increasing numbers of primordial germ cells (Figure 2B). A lumen was first observed in vas deferens lining with a single layer of cells.

Stage III “Intermediate development stage” An androgenic gland appeared as multiple cords of cells (Figure 3A) comprising of multiple shapes and sizes of cells. Notably,

nucleoli were not found. The vas deferens remarkably enlarged with an operculum like structure at the end. The wall of the vas deferens comprised of two muscle layers, circular and longitudinal muscles (Figure 3B).

Stage IV “Fully development stage” An androgenic gland remarkably increased in cell number, in which nucleoli were distinct (Figure 4A). A vas deferens was surrounded with well developed muscular layers, the inner longitudinal muscle and a surrounding circular muscle. At this stage, a gonad was in an early stage of differentiation into a testis in which only spermatogonia were observed in spermatogenic lobules (Figure 4B).

Although the stage IV was the last development stage of androgenic glands, the histology of the androgenic glands differed as the testes developed into a relatively advanced stage when the postlarvae developed appendix maculinae (data not shown). In this stage the androgenic gland cells enlarged with cytoplasm which homogeneous but less dense and basophilic than other stages.

3.2 Carapace length and development of the androgenic gland

At each PL stage (20 – 80 days), multiple stages of androgenic gland development were observed (e.g. stage 0 to stage II at 20 days; stage I to stage IV at 80 days). However, the proportion of the advanced androgenic gland stages was increased with time (Table 1). The carapace length of the samples sharing the same androgenic gland stage showed only slight differences across the PL stages (e.g. at stage III, carapace length was different only between PL20 and the others; no significant difference among carapace length of PL40 – PL70 with androgenic gland in stage II). Across androgenic gland stages within each PL stage, a trend was shown towards increasing carapace length with advanced androgenic gland development. The overall results were shown in Table 1.

When data were pooled according to androgenic gland stages, the resampling method revealed significant differences of carapace length among androgenic gland stages (Figure 5).

Moreover, the regression of carapace length on the androgenic gland developmental stages was significant ($r^2 = 0.584$; $F = 370.13$; $P = 3.127\text{E-}56$; Figure 6), hence implied that development of androgenic glands depends on size of the PL. Figure 6 also demonstrated high overlapping of size ranges across ages.

3.3 A comparison of success (feminization) rates in relation to carapace length

It should be noted that only the PL without appendix masculina were used in this experiments. In the GFP reared in a moderate stocking density (2500 PL/1500 l), the removal of androgenic glands in PL44 – PL58 gave similar results for both the small and large size groups. But when reaching PL65 and PL79 the success rates were higher in the small size group (60% vs 36% for PL65; 57.14% vs 36.0% for PL79; $P < 0.05$) except for the PL72 where both size groups gave indifferent success rates. At high stocking density, small and large groups did not give different success rates except for the PL58 where small group gave higher success rate than the large group (Table 1). The pooled data of success rates within a stocking density showed that the operation applied to the small PL group gave significant higher success rate than the large group in both stocking density (Table 3).

4. DISCUSSION

4.1 Development stages of GFP androgenic glands

This is the first report on development of androgenic glands of GFP. We found that the development of androgenic glands occurred at the same time as the appearance of vas deferens in the so-called “Initiation stage” (Stage II) as was reported in other crustacean, e.g. youngest crayfish (*Orconectes nais*) (Carpenter and deRoos, 1970). Notably, it was likely that the androgenic gland may somehow function at this stage as indicated by presence of nucleoli in the androgenic gland cells (Thampy and John, 1974). Histologically, the nucleoli which involed in RNA synthesis, were undetectable during the inactive stage while they were dark

199 stained during the active stage [e.g., the studies in a fish parasite (*Irona fa*) (Thampy and John,
200 1974) and a shrimp, *Pandalopsis japonica* (Kim et al., 2006)]. We presumed that the
201 androgenic gland might trigger the development of the gonopore complexes which appeared
202 in stage II “early development stage”, probably through synthesis of an inducing factor. This
203 may elaborate the so-called “genetic factor” that had been previously proposed by our group
204 to regulate the development of the gonopore complexes (Rungsin et al., 2006). In addition a
205 remarkable increase in size of the gonads in this stage (stage II) may also be responsible by a
206 function of the androgenic glands. However, the function of the androgenic gland in
207 triggering morphological sex differentiation (appearance of the gonopore complex) has not
208 been reported before. Rather, the studies in crayfish (*Pontastacus leptodactylus*) (Payen,
209 1973), Kuruma prawn (*Penaeus japonicus*) (Nakamura et al., 1992) and Pacific white shrimp
210 [*Penaeus (Litopenaeus) vannamei*] (Garza-Torres et al., 2009) showed that the appearance of
211 morphological sex characters occurred when the androgenic glands were still in a very early
212 developmental stage (appeared as primordial cells).

213 The disappearance of nucleoli in nuclei of the androgenic gland cells in stage II may
214 reflect the active cell division (Villem and Dethier, 1976) which was well supported by the
215 increment of cell number in the stage III androgenic gland. Later at stage IV “fully
216 development stage”, the androgenic gland resumed its function as indicated by presence of
217 nucleoli which might responsible for differentiation of testes. This implied that function of the
218 androgenic glands was not constant over time, rather it switched on and off, generally during
219 the reproductive cycles (see Carpenter and deRoos, 1970 for examples in crayfish
220 (*Orconectes nais*) and mud crab (*Scylla paramamosian*) (Liu et al., 2008).

221 Overall, the present results suggested the role of androgenic glands in controlling
222 development of primary and secondary sex characteristics (testes and gonopore complexes,
223 respectively) as indicated by the presence of nucleoli in those developmental stages. Our

finding was in line with the report in talitrid amphipods where primary and secondary sexual differentiation was controlled by androgenic glands through the secretion of an androgenic hormone (Charniaux-Cotton and Payen, 1985).

4.2 Size of PL (CL) vs development stages of androgenic glands

The present study showed that the development of androgenic glands depended largely on sizes rather than ages. Ra'anan and Cohen (1984) and Karplus et al. (1987) reported strong hierarchy in GFP that led to the development of 25% fast growing prawns (a so-called "jumper") and the remaining with suppressed growth (laggard), of which the reproductive system was also retarded (the present study-data not shown).

Androgenic glands at stage IV coincided with relative well developed testis, therefore the prawn at this stage may not response to andrectomy (Rungsin et al., 2006). In addition, due to the relationship between CL and development of androgenic glands, it is likely that we should avoid using PL with $CL \geq 0.67$ cm (see table 1) to ensure high success rate of sex change.

4.3 Success rate of feminization by removal of androgenic glands

We confirmed the possibility of using small prawn regardless of ages for the removal of androgenic glands and found that as far as they did not develop appendix masculina (Rungsin et al., 2006) small prawn ($CL \leq 0.6$ cm) gave better success rate than the larger group. The discrepancy of the results (i.e. the non-significant difference between success rates of the small and large groups at some ages) may be due to the wide range of size categories. Some PL in the large group, although have not developed appendix masculina yet, may have androgenic glands in the advanced stages. The present study revealed that some PL without appendix masculina developed the testes, hence, will not change sex after the operation. Therefore selection of PL should stick on size ($CL \leq 6$ mm.) rather than age.

Notably, the present study showed that successful sex change could be achieved using advanced stage of PL (as late as PL79) relative to the stages previously recommended (PL20-30, Aflalo et al., 2006; PL45-65, Rungsin et al., 2006) as long as appendix masculina did not develop (Rungsin et al., 2006) and $CL \leq 0.67$ cm (present study).

4.4 Conclusion and implication to a production of neofemales:

4.4.1 Development of androgenic glands was divided into 4 stages. Stage I denoted the initiation of the development along with the development of vas deferens. Stage II denoted the first function of androgenic glands which coincided with the first appearance of gonopore complexes. Stage III was characterized by non functioning of the androgenic glands while development of vas deferens proceeds. Stage IV marked the fully developed and functioned androgenic glands which coincided with a differentiation of testes.

4.4.2 Development of androgenic glands related with size (CL) rather than age.

4.4.3 Using small PL ($CL \leq 0.6$ cm) for andrectomization yielded higher success rate of sex change to female.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to express sincere gratitude to Thailand Research Fund (Academic Program) for the funding support through the Senior Research Scholar Program 2007: project RTA 5080013 awarded to U. Na-Nakorn. We thank a scholarship for Ph.D. program awarded to Wikrom Rungsin from Center for Advanced Studies in Agriculture and Food, National Research University Program, Kasetsart University.

6. REFERENCES

Aflalo, E.D., Hoang, T.T.T., Nguyen, V.H., Lam, Q., Nguyen, D.M., Trinh, Q.S., Raviv, S., Sagi, A., 2006. A novel two-step procedure for mass production of all-male populations of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture 256, 468-478.

273 Carpenter, M.B., deRoos, R., 1970. Seasonal morphology and histology of androgenic gland
 274 of crayfish, *Orconectes nais*. Gen. Comp. Endocrinol. 15, 143-157.

275 Charniaux-Cotton, H., Payen, G., 1985. Sexual differentiation, in: Bliss, D.E., Mantle, L.H.
 276 (Eds.), Integuments, Pigments, and Hormonal processes. The Biology of Crustacea,
 277 vol. 9. Academic Press., New York, pp. 217-299.

278 Cohen, D., Ra'anan, Z., Brody, T., 1981. Population profile development and morphotypic
 279 differentiation in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). J.
 280 World Maric. Soc. 12, 231-243.

281 Garza-Torres, R., Campos-Ramos, R., Maeda-Martinez, A.M., 2009. Organogenesis and
 282 subsequent development of genital organs in female and male Pacific white shrimp
 283 *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. Aquaculture 296, 136-142.

284 Humason, G.L., 1979. Animal Tissue Techniques. W.H. Freeman and Company, San
 285 Francisco. 661 pp.

286 Hood, G.M., 2006. PopTools 2.7.5, Albany, Western Australia.

287 Kim, D.H., Choi, J.H., Kim, J.N., Cha, H.K., Oh, T.Y., Kim, D.S., Han, C.H., 2006. Gonad
 288 and androgenic gland development in relation to sexual morphology in *Pandalopsis*
 289 *japonica* Balss, 1914 (Decapoda, Pandalidae). Crustaceana 79(5), 541-554.

290 Karplus, I., Hulata, G., Wolhlfarth, G.W., Halevy, A., 1987. The Effect of size grading
 291 juvenile *Macrobrachium rosenbergii* prior to stocking on their population structure
 292 and production in polyculture. II. Dividing the population into three fractions.
 293 Aquaculture 62, 85-95.

294 Liu, H., Cheung, K.C., Chu, K.H., 2008. Cell structure and seasonal change of the androgenic
 295 gland of the Mud crab *Scylla paramamosian* (Decapoda: Portunidae). Zool. Stud.
 296 47(6), 720-732.

297 Nakamura, K., N. Matsuzaki and K. Yonekura.1992.Organogenesis of genital organs and
 298 androgenic gland in Kuruma prawn. Nip. Sui. Gak. 58(12), 2261-2267.
 299 Nair, M.C., Salin, K.R., Raju, M.S., Sebastian, M., 2006. Economic analysis of monosex
 300 culture of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* DeMan): a case study.
 301 Aquacult. Res. 37, 949-954.
 302 Payen, G., 1973. Étude descriptive des principales étapes de la morphogénèse sexuelle chez
 303 un crustacé décapode à développement condensé, l'écrevisse *Pontastacus*
 304 *leptodactylus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823). Ann. Embryol. Morpho. 6, 179-206.
 305 Ra'anan, Z., Cohen, D., 1984. The effect of group interaction on the development of size
 306 distribution in *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) juvenile populations,
 307 Biol.Bull. 166, 22–31.
 308 Rungsin, W., Paankhao, N., Na-Nakorn, U., 2006. Production of all-male stock by neofemale
 309 technology of Thai strain of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*.
 310 Aquaculture 259, 88-94.
 311 Sagi, A., Cohen, D., 1990. Growth, maturation and progeny of sex-reversed
 312 *Macrobrachium rosenbergii* males. World Aquac. 21, 87-90.
 313 Sandifer, P.A., Smith, T.I.J., 1985. Freshwater prawns. In: Huner, J.V., Brown, E.E (Eds.),
 314 Crustacean and Mollusk Aquaculture in the United States. AVI Publishing, Westport,
 315 CT. pp. 63-125.
 316 Thampy, D.M., John, P.A., 1974. Sex-reverse and androgenic gland in the fish parasite
 317 *Irona far* (Cymothoidae: Isopoda: Crustacea). Int. J. Parasitol. 4, 575-583.
 318 Villee, C.A., Dethier, V.G., 1976. Biological principles and progresses, second edition. W.B.
 319 Saunders Company, Philadelphia.

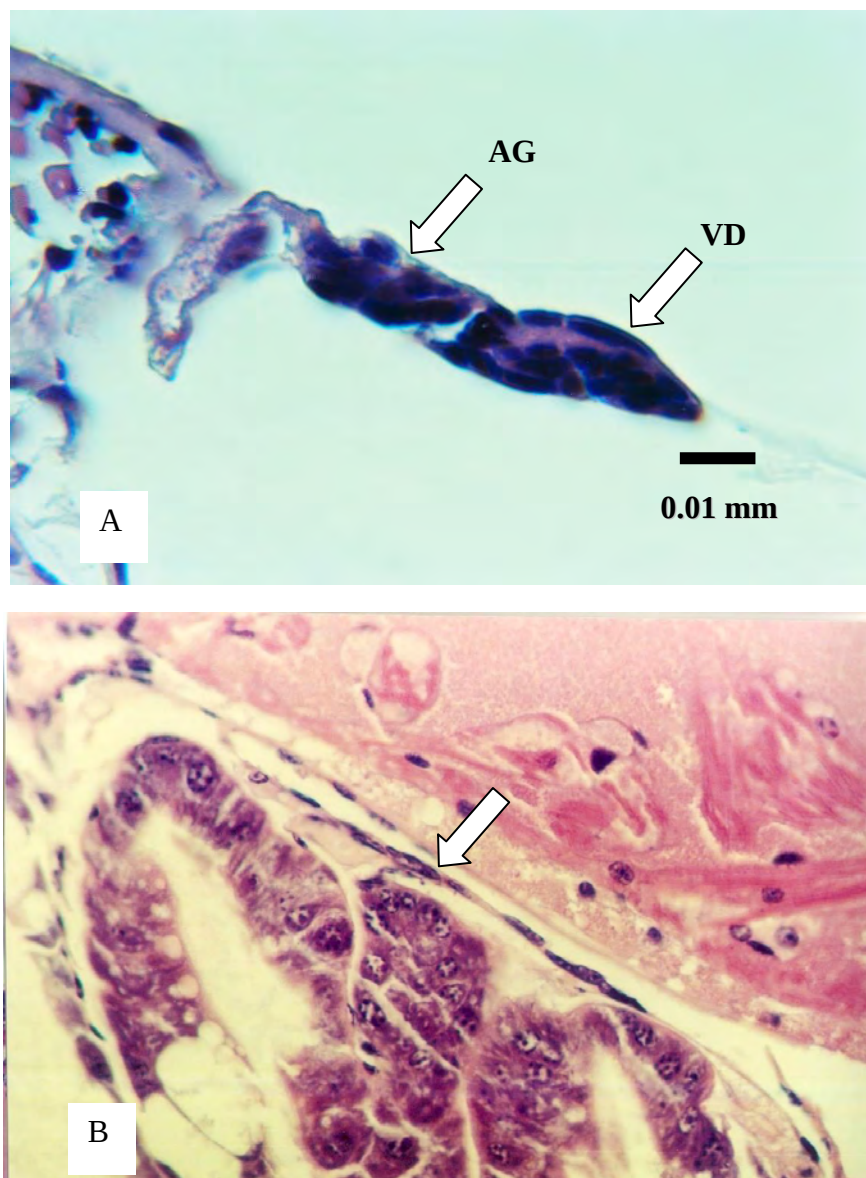


Figure 1

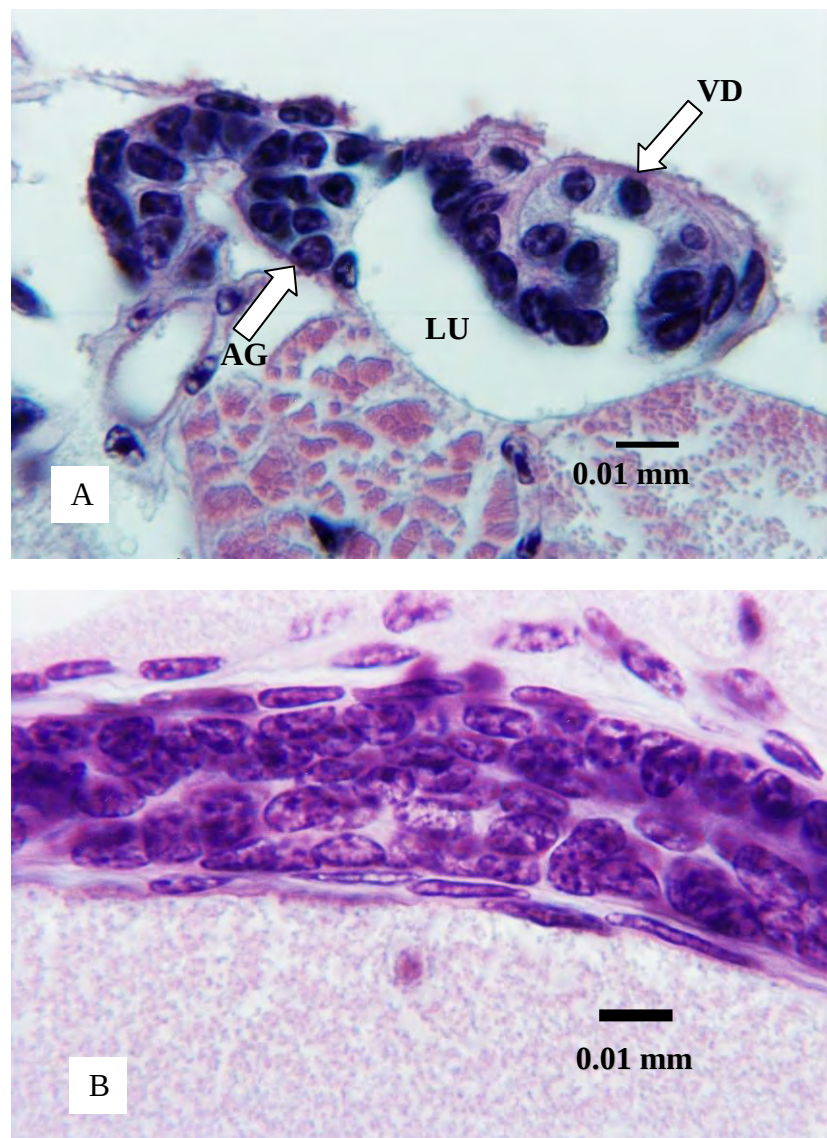


Figure 2

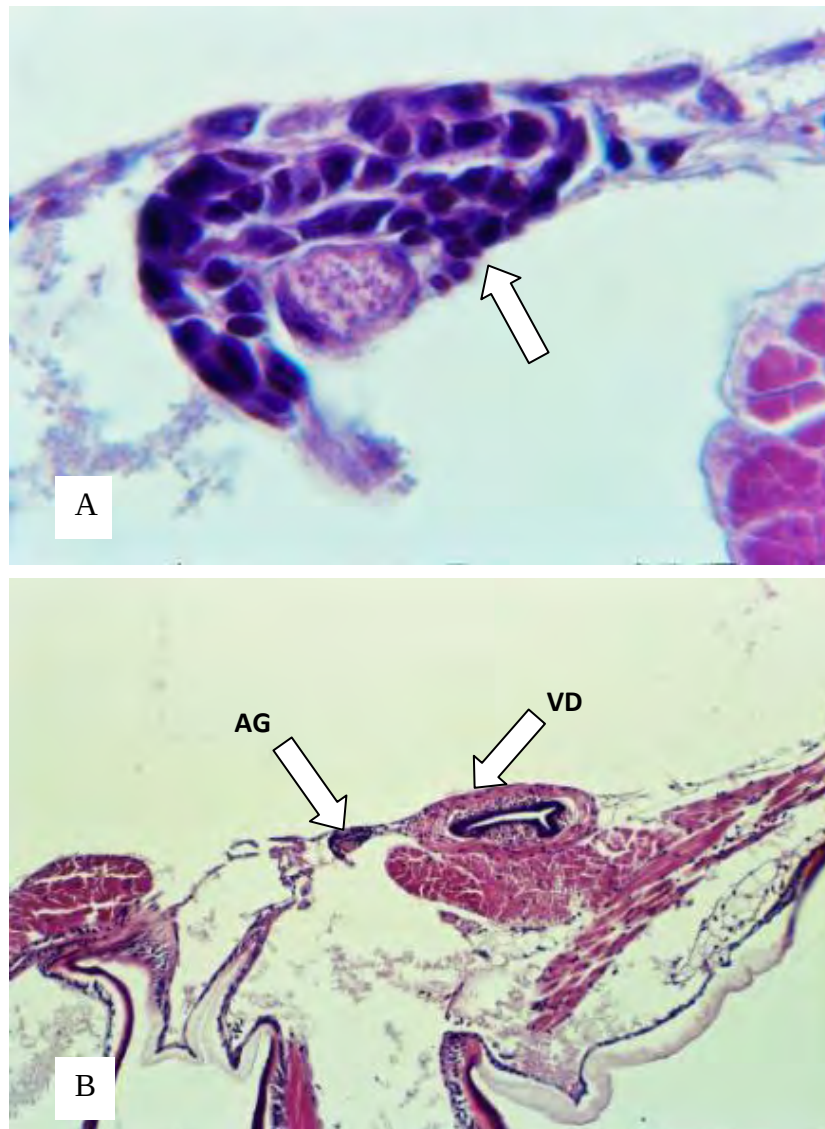


Figure 3

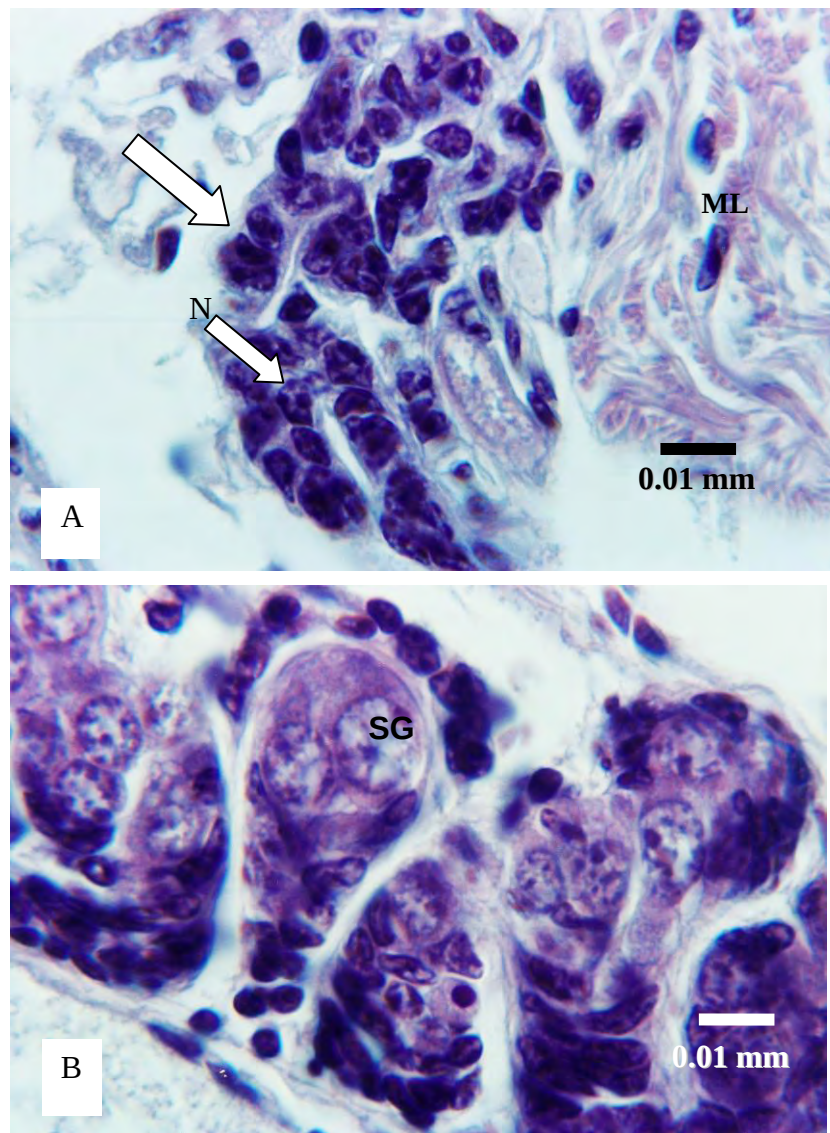


Figure 4

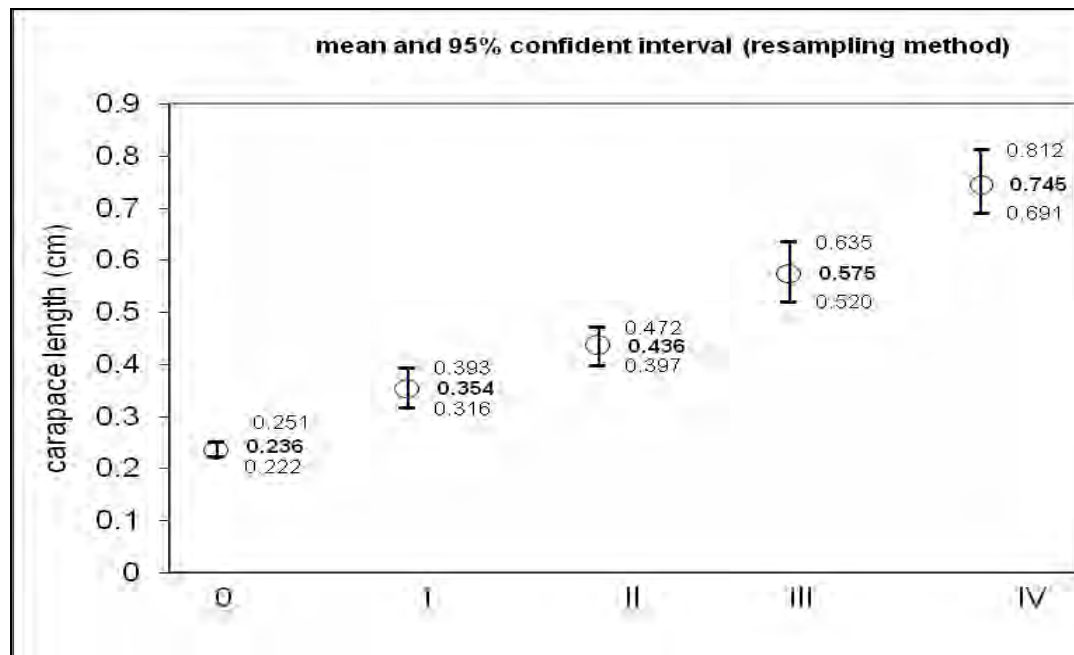


Figure 5

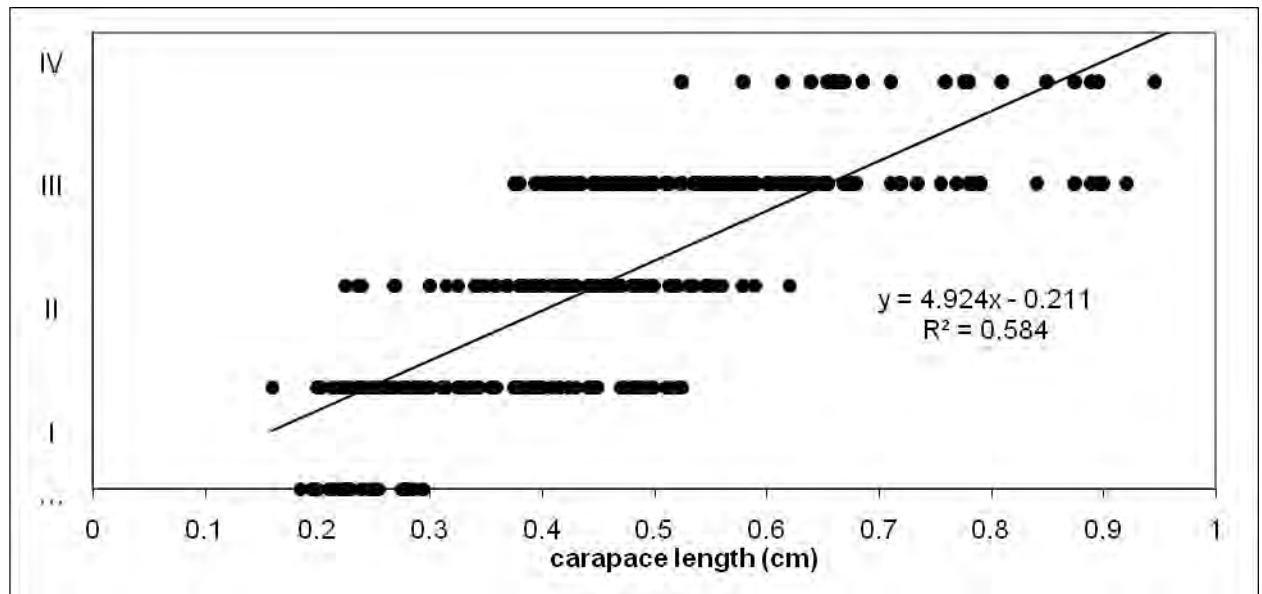


Figure 6

Table 1 Carapace length ± S.D. of Giant freshwater prawn at 20 – 80 days after reaching post larva stages having androgenic gland development in stage 0 to stage IV; n = number of samples subjected to histological study; percentages in brackets denotes proportion of samples; different superscripted letters in the same row and different superscripted number in the same column indicated significant difference (P<0.01)

Development	Days after reaching PL stage						
stage	20	30	40	50	60	70	80
	(n = 34)	(n = 52)	(n = 79)	(n = 61)	(n = 49)	(n = 46)	(n = 36)
Stage 0	0.24 ± 0.03 ^{a1}	0.25 ± 0.00 ^{a1}	-	-	-	-	-
	(5.88%)	(3.85%)					
Stage I	0.25 ± 0.04 ^{a1}	0.37 ± 0.05 ^{b2}	0.39 ± 0.08 ^{b1}	0.39 ± 0.07 ^{b1}	0.44 ± 0.07 ^{b1}	0.41 ± 0.12 ^{b1}	0.43 ± 0.05 ^{b1}
	(64.71%)	(44.23%)	(43.04%)	(24.59%)	(8.16%)	(4.35%)	(5.56%)
Stage II	0.29 ± 0.05 ^{a2}	0.42 ± 0.04 ^{b3}	0.46 ± 0.05 ^{c2}	0.48 ± 0.07 ^{cd2}	0.46 ± 0.07 ^{bcd1}	0.47 ± 0.08 ^{cd2}	0.51 ± 0.00 ^{d1}
	(29.41%)	(32.69%)	(21.52%)	(27.87%)	(18.37%)	(36.96%)	(2.78%)

Stage III	-	0.45 ± 0.07^{a3} (19.23%)	0.53 ± 0.06^{b3} (32.91%)	0.58 ± 0.10^{b3} (39.34%)	0.57 ± 0.10^{b2} (59.18%)	0.59 ± 0.14^{b3} (34.78%)	0.63 ± 0.14^{b2} (86.11%)
Stage IV	-	-	0.67 ± 0.02^{a3} (2.53%)	0.73 ± 0.14^{b3} (8.20%)	0.76 ± 0.11^{b3} (14.28%)	0.70 ± 0.10^{b4} (23.91%)	0.78 ± 0.07^{b2} (5.56%)

Table 2 Percentage of successful feminization (n = 50 PL, all without appendix masculinae) by removal of androgenic glands in small post-larvae (PL) (carapace length ≤ 0.6 cm) and large PL (carapace length > 0.6 cm) at different stages (days after reaching PL stage); PL were reared at two different density. *, ** denoted significant difference and highly significant difference respectively

PL stage	2500 /1500 l.			5000 /1500 l.		
	≤ 0.6	> 0.6	<i>P</i> - value	≤ 0.6	> 0.6	<i>P</i> - value
37 days*	39.05	-		49.46	-	
44 days	38.83	25.93	0.2838	41.67	21.62	0.0537
51 days	34.00	28.00	0.6654	44.00	24.00	0.0574
58 days	38.00	38.00	1.0000	66.00	36.00	0.0051**
65 days	60.00	36.00	0.0276*	50.00	42.00	0.5472
72 days	37.84	52.00	0.2278	38.00	50.00	0.3138
79 days	57.14	36.00	0.0451*	48.00	44.00	0.8410

Note: there was no prawn larger than 0.6 cm at PL 37

Table 3 Number of neofemales and males which failed to change sex after androgenic gland removal performed on small post-larvae (PL) (carapace length ≤ 0.6 cm), large PL (carapace length > 0.6 cm) at different stages (days after reaching PL stage). PL was reared at two different density. (n = 300 PL/group)

Sizes of PL	no sex change	sex changed	χ^2	<i>P</i> -value
2500 PL/1500 l.				
Small (≤ 0.6 cm)	167	133	3.994	0.045
Large (> 0.6 cm)	192	108		
5000 PL/1500 l.				
Small (≤ 0.6 cm)	156	144	7.900	0.005
Large (> 0.6 cm)	191	109		

Figure legends

Figure 1. A) The androgenic gland (AG) attached to anterior of vas deferens (VD) which comprised of a cluster of cells without a lumen. B) An undifferentiated gonad appeared (arrow) as a single layer of primordial germ cells lining between a heart (H) and hepatopancreas (HP). Magnification: x1000

Figure 2 A) A sagittal section of an androgenic gland (AG) and vas deferens (VD) of giant freshwater prawn postlarva in Stage II (Early development stage). A lumen (LU) of the vas deferens was observed. B) A sagittal section of a gonad; Magnification: x1000

Figure 3 A) A sagittal section of an androgenic gland (arrow) of giant freshwater prawn postlarva in Stage III: Intermediate development stage; Magnification: x1000. B) showing a position of an androgenic gland (AG) which attached to anterior of vas deferens (VD). Magnification: x100

Figure 4 A) A sagittal section of an androgenic gland (arrow) of GFP postlarva in Stage IV: Fully development stage (A), notice the well developed nucleoli (N); B) A sagittal section of a testis with distinguishable spermatogonia (SG). Magnification: x1000; ML= muscular layer

Figure 5 Carapace length of giant freshwater prawn postlarva plotted against development stages of the androgenic glands, confidence intervals were estimated using the resampling method.

Figure 6 A regression profile of carapace length of giant freshwater prawn on androgenic gland developmental stages.

Table 1. A list and description of samples examined in this study

Sampling location (sample code)	Type of population	Breeder sources	Sample size
Upper Gulf of Thailand (UGOT), eastern Thailand			
Chon Buri (CHN)	Private hatchery	Local cage aquaculture	56
Rayong Coastal Fisheries Research and Development Center, Rayong province (RACF)	Government hatchery	Local cage aquaculture, local wild fish, and government hatcheries in southern Thailand	31
Selected progeny of RACF (RACF-F1)		Selected large progeny of RACF.	36
Chantaburi (CHT)	Wild		65
Trat (TRT)	Wild		54
Lower Gulf of Thailand (LGOT), southern Thailand			
National Institute for Coastal Aquaculture, Songkhla province (NICA)	Government hatchery	Local cage aquaculture (mainly farmers who bought seeds from the institute).	34
Songkhla Coastal Fisheries Research and Development Center, Songkhla province (SKCF)	Government hatchery	NICA, NSCF, offspring from breeders of SKCF, local cage aquaculture.	48
Nakorn Si Thammarat Coastal Fisheries Research and Development Center, Nakorn Si Thammarat province (NSCF)	Government hatchery	Local cage aquaculture (sometimes used seeds sold in UGOT)	39
Nakorn Si Thammarat (NST)	Wild		57
Andaman Sea, southern Thailand			
Satun Coastal Fisheries Research and Development Center, Satun province (STCF)	Government hatchery	Wild fish from the Andaman Sea	43

Table 2. Microsatellite primer information and polymerase chain reaction conditions

Locus	Reference	Annealing temperature (°C)	Allele size (bp)	5' modification
Lca20	Yue <i>et al.</i> (2002)	55	124-160	NED
Lca27	Yue <i>et al.</i> (2002)	55	206-335	VIC
Lca32	Yue <i>et al.</i> (2002)	50	136-194	PET
Lca50	Zhu <i>et al.</i> (2006)	57	340-345	FAM
Lca58	Zhu <i>et al.</i> (2006)	55	393-493	NED
Lca70	Zhu <i>et al.</i> (2006)	57	297-327	PET
Lca98	Wang <i>et al.</i> (2007)	57	193-238	FAM
Lca184	Wang <i>et al.</i> (2007)	55	125-189	FAM
Lca185	Wang <i>et al.</i> (2007)	55	167-215	NED
Lca260	Wang <i>et al.</i> (2007)	57	115-145	PET
Lca284	Wang <i>et al.</i> (2007)	57	133-207	VIC

Table 3. Microsatellite DNA variation at 11 loci of Asian seabass (*Lates calcarifer*) populations in Thailand. Within population genetic variation indices include the number of alleles per locus (A), allelic richness (Ar), observed and expected heterozygosity (Ho and He respectively), and F_{IS} values (a negative value indicates heterozygote excess). Underlined p values indicate the deviation of genotypic proportion from those expected under the Hardy-Weinberg equilibrium (p values were adjusted for multiple comparisons using the Bonferroni corrections, $0.05/110 = 0.0004$). Superscript over the genetic diversity values averaged across all loci indicates statistically significance at 0.05.

		Microsatellite loci											Average across all loci
Pop		Lca184	Lca185	Lca260	Lca284	Lca50	Lca58	Lca70	Lca98	LcaM20	LcaM27	LcaM32	
CHN	N	56	55	56	56	56	55	55	56	55	56	56	55.64
	A	9	10	10	17	2	14	6	9	8	16	12	10.27 ^a
	Ar	8.45	8.88	9.51	13.86	2	13.33	5.33	8.42	7.48	13.53	10.21	9.18 ^{a,b}
	Ho	0.714	0.855	0.839	0.804	0.518	0.909	0.709	0.768	0.945	0.804	0.911	0.80
	He	0.751	0.806	0.869	0.832	0.473	0.893	0.707	0.775	0.771	0.883	0.866	0.78 ^a
	F_{IS}	0.048	-0.061	0.034	0.034	-0.095	-0.018	-0.004	0.009	-0.226	0.090	-0.052	
	P-value	0.5799	0.8077	0.2646	0.2757	0.5798	0.7468	0.6236	0.4055	<u>0.0004</u>	0.0491	0.6906	0.257
RACF	N	31	30	31	31	31	31	30	30	30	30	31	30.55
	A	9	10	11	16	2	14	6	9	8	17	11	10.27 ^a
	Ar	9	10	11	16	2	14	6	9	8	17	11	10.27 ^a
	Ho	0.839	0.800	0.839	0.903	0.387	0.935	0.767	0.833	0.700	0.867	0.935	0.80
	He	0.843	0.828	0.856	0.895	0.412	0.873	0.742	0.749	0.696	0.913	0.860	0.79
	F_{IS}	0.006	0.034	0.021	-0.009	0.061	-0.072	-0.033	-0.113	-0.006	0.051	-0.088	
	P-value	0.185	0.588	0.572	0.054	0.680	0.232	0.449	0.703	0.867	0.063	0.946	0.385
RACF-F1	N	36	36	36	36	35	36	36	36	36	36	36	35.91
	A	8	7	5	11	2	8	4	8	6	12	9	7.27 ^b
	Ar	7.82	6.66	4.86	10.41	2.00	7.70	3.83	7.66	5.81	11.42	8.70	6.99 ^b
	Ho	0.889	0.861	0.417	0.917	0.086	0.972	0.639	0.917	0.694	0.972	0.972	0.76
	He	0.710	0.773	0.568	0.779	0.082	0.785	0.556	0.760	0.628	0.834	0.830	0.66 ^b
	F_{IS}	-0.251	-0.114	0.266	-0.177	-0.045	-0.239	-0.149	-0.207	-0.106	-0.165	-0.172	
	P-value	0.0027	0.0507	0.0018	0.0382	1	0.005	0.1573	<u>0.0002</u>	0.0066	<u>0.0003</u>	0.0073	0.0000.

Table 1 (cont.)

		Microsatellite loci											Average across all loci
Pop		Lca184	Lca185	Lca260	Lca284	Lca50	Lca58	Lca70	Lca98	LcaM20	LcaM27	LcaM32	
NSCF (Hatchery)	N	38	38	39	39	39	38	39	39	39	38	38	38.55
	A	9	10	8	14	2	13	7	10	7	18	10	9.82 ^a
	Ar	8.95	9.56	7.76	13.10	2	12.28	6.53	9.25	6.85	16.05	9.99	9.30 ^a
	Ho	0.895	0.816	0.769	0.923	0.487	0.868	0.769	0.667	0.692	0.868	0.816	0.78
	He	0.826	0.786	0.822	0.872	0.453	0.865	0.726	0.696	0.754	0.895	0.880	0.78 ^a
	F _{IS}	-0.083	-0.037	0.064	-0.059	-0.076	-0.004	-0.060	0.042	0.082	0.030	0.072	
	P-value	0.6772	0.3644	0.3593	0.0299	0.7373	0.0244	0.5832	0.7462	0.0693	0.3768	0.0114	0.0192
NICA (Hatchery)	N	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38.00
	A	7	11	9	12	2	13	6	12	8	18	14	10.18 ^a
	Ar	6.94	10.87	8.75	11.28	2	12.44	5.99	11.60	7.75	17.21	12.86	9.79 ^{a,b}
	Ho	0.711	0.868	0.816	0.921	0.500	0.895	0.789	0.500	0.789	0.895	0.974	0.79
	He	0.715	0.879	0.842	0.820	0.491	0.856	0.702	0.709	0.821	0.916	0.865	0.78 ^a
	F _{IS}	0.012	0.006	0.038	-0.117	-0.011	-0.039	-0.118	0.300	0.0454	0.0293	-0.1192	
	P-value	0.090	0.209	0.001	0.000	1.000	0.073	0.096	0.000	0.0336	0.2064	0.004	Highly sig.
SKCF (Hatchery)	N	48	48	47	48	48	47	48	48	48	46	48	47.64
	A	11	11	8	20	2	16	6	12	11	23	11	11.91 ^a
	Ar	10.30	10.06	7.83	17.09	2	13.19	5.81	10.35	9.67	20.52	10.43	10.66 ^a
	Ho	0.833	0.833	0.787	0.938	0.521	0.766	0.792	0.792	0.833	0.870	0.958	0.81
	He	0.833	0.778	0.833	0.893	0.500	0.793	0.699	0.824	0.809	0.932	0.876	0.80 ^a
	F _{IS}	0.000	-0.071	0.054	-0.050	-0.042	0.034	-0.133	0.039	-0.029	0.067	-0.094	
	P-value	0.8855	0.9743	0.0056	0.1844	1	0.3297	0.6612	0.3337	0.0555	0.0327	0.0607	0.0207
STCF (Hatchery)	N	57	57	56	57	57	57	57	57	57	57	57	56.91
	A	9	8	7	11	2	12	5	8	6	18	12	8.91 ^{a,b}
	Ar	8.37	7.20	6.32	9.51	2	11.39	4.53	7.18	5.95	14.98	11.54	8.09 ^{a,b}
	Ho	0.860	0.772	0.607	0.912	0.561	0.860	0.789	0.684	0.877	0.930	0.912	0.80
	He	0.813	0.713	0.741	0.842	0.456	0.841	0.724	0.689	0.770	0.898	0.879	0.76 ^a
	F _{IS}	-0.057	-0.082	0.181	-0.083	-0.232	-0.022	-0.090	0.007	-0.140	-0.035	-0.038	
	P-value	0.1856	0.298	0.1408	0.4479	0.1431	0.1512	0.3105	0.9163	0.194	0.5625	0.3116	0.1672

Table 1 (cont.)

		Microsatellite loci											Average across all loci
Pop		Lca184	Lca185	Lca260	Lca284	Lca50	Lca58	Lca70	Lca98	LcaM20	LcaM27	LcaM32	
CHT (Wild)	N	65	65	65	65	65	59	65	65	65	65	64	64.36
	A	13	12	10	18	2	13	6	12	7	21	12	11.45 ^a
	Ar	10.45	10.04	9.62	14.39	2	11.89	5.64	10.39	6.75	15.83	10.26	9.75 ^{a,b}
	Ho	0.846	0.754	0.862	0.831	0.585	0.780	0.708	0.846	0.708	0.815	0.969	0.79
	He	0.813	0.844	0.865	0.840	0.494	0.877	0.669	0.793	0.776	0.902	0.868	0.79 ^a
	F _{IS}	-0.041	0.107	0.004	0.011	-0.183	0.111	-0.058	-0.067	0.088	0.096	-0.116	
	P-value	0.3411	0.1664	0.1259	0.1247	0.2094	0.000	0.6259	0.3835	0.7794	0.0295	0.9112	0.1323
TRT (Wild)	N	43	43	39	43	42	36	43	43	43	42	42	41.73
	A	10	14	10	13	5	14	6	11	8	23	11	11.36 ^a
	Ar	9.49	12.01	9.53	12.53	4.14	13.31	5.88	9.97	7.60	20.92	11.14	10.59 ^a
	Ho	0.860	0.814	0.718	0.884	0.619	0.750	0.698	0.767	0.837	0.905	0.762	0.78
	He	0.828	0.848	0.837	0.851	0.490	0.887	0.649	0.738	0.771	0.921	0.860	0.79 ^a
	F _{IS}	-0.040	0.040	0.142	-0.038	-0.262	0.154	-0.075	-0.040	-0.085	0.018	0.114	
	P-value	0.7047	0.0741	0.0005	0.5618	0.0158	0.0067	0.5967	0.526	0.2758	0.5899	0.0056	0.0004
NST (Wild)	N	57	52	56	57	56	49	56	56	56	53	54	54.73
	A	10	15	12	22	3	14	8	13	10	21	15	13.00 ^a
	Ar	9.52	12.89	10.93	18.32	2.51	12.93	6.19	10.80	8.65	18.68	12.58	11.27 ^a
	Ho	0.684	0.923	0.821	0.982	0.304	0.755	0.661	0.786	0.839	0.981	0.907	0.79
	He	0.713	0.853	0.862	0.915	0.330	0.838	0.661	0.775	0.767	0.909	0.856	0.77 ^a
	F _{IS}	0.041	-0.082	0.047	-0.074	0.080	0.099	0.000	-0.014	-0.095	-0.080	-0.059	
	P-value	0.7353	0.0520	0.2650	0.3770	0.5402	0.1646	0.3255	0.0319	0.5139	0.4858	0.1529	0.0086
Across all pop.	A (total)	14	19	14	31	6	19	11	16	15	37	21	203
	A (ave.)	9.50	10.80	9.10	15.60	2.40	13.10	6.10	16.40	8.00	18.90	11.90	10.53
	Ar (ave.)	9.00	9.86	8.69	14.08	2.27	12.56	5.67	9.59	7.56	16.87	10.98	9.70
	Ho	0.81	0.83	0.75	0.90	0.46	0.85	0.73	0.75	0.79	0.89	0.91	0.79
	He	0.79	0.81	0.81	0.85	0.42	0.85	0.68	0.75	0.76	0.90	0.86	0.77
	F _{IS}	-0.035	-0.026	0.086	-0.054	-0.084	-0.003	-0.073	-0.003	-0.047	0.013	-0.054	-0.026

Table 3. Genetic relatedness among individuals within each sample using six estimators, presented as a mean value and a variance in a parenthesis. In each column, different superscript letters reflected the statistical difference at 0.05 (excluded the fullsib families).

Sample	Moment estimators				Maximum likelihood estimators	
	Wang (2002)	Lynch (1988) and Li (1993)	Lynch-Ritland (1999)	Queller-Goodnight (1989)	Milligan (2003)	Wang (2007)
Fullsib 1	0.525	0.543	0.493	0.522	0.511	0.471
CHN10xCHN4	(0.030)	(0.023)	(0.034)	(0.026)	(0.029)	(0.029)
Fullsib 2	0.502	0.530	0.489	0.504	0.535	0.499
CHN8xCHN7	(0.016)	(0.016)	(0.052)	(0.014)	(0.017)	(0.016)
Hatchery						
CHN	0.015 ^a (0.021)	0.023 ^a (0.025)	-0.001 ^a (0.009)	0.019 ^a (0.020)	0.058 ^a (0.009)	0.042 ^a (0.005)
RACF	-0.048 ^a (0.020)	-0.041 ^a (0.022)	-0.048 ^a (0.008)	-0.040 ^a (0.028)	0.067 ^a (0.008)	0.057 ^a (0.007)
RACF-F1	0.204 ^b (0.063)	0.193 ^b (0.066)	0.075 ^b (0.042)	0.151 ^b (0.055)	0.177 ^b (0.048)	0.164 ^b (0.047)
NSCF	-0.024 ^a (0.028)	-0.031 ^a (0.025)	-0.030 ^a (0.019)	-0.017 ^a (0.027)	0.046 ^a (0.008)	0.035 ^a (0.005)
NICA	0.039 ^a (0.070)	0.044 ^a (0.068)	-0.001 ^a (0.035)	0.061 ^a (0.065)	0.137 ^a (0.050)	0.126 ^a (0.042)
SKCF	0.014 ^a (0.026)	0.013 ^a (0.029)	-0.016 ^a (0.008)	0.014 ^a (0.026)	0.052 ^a (0.010)	0.041 ^a (0.007)
STCF	0.008 (0.021)	0.010 ^a (0.023)	-0.003 ^a (0.020)	-0.004 ^a (0.022)	0.066 ^a (0.011)	0.051 ^a (0.007)
Wild						
CHT	-0.040 ^a (0.019)	-0.026 ^a (0.025)	-0.024 ^a (0.008)	-0.022 ^a (0.020)	0.045 ^a (0.009)	0.037 ^a (0.006)
TRT	0.029 ^a (0.047)	0.042 ^a (0.047)	0.036 ^a (0.033)	0.048 ^a (0.042)	0.082 ^a (0.031)	0.076 ^a (0.030)
NST	0.029 ^a (0.047)	0.042 ^a (0.047)	0.036 ^a (0.033)	0.048 ^a (0.042)	0.082 ^a (0.031)	0.076 ^a (0.030)

Table 4. Estimates and 95% confidence interval of effective population size (N_e) based on linkage disequilibrium among unlinked loci within each sample. The analysis included alleles with frequency greater than 0.01.

Sample	Ne estimates	95% confidence interval	
		Lower bound	Upper bound
Hatchery			
CHN	102	76.2	148.1
RACF	88.7	59.9	159
RACF-F1	7.8	6.4	9.3
NSCF	82.9	60	127.6
NICA	17.4	15.3	19.8
SKCF	88.5	70	117.6
STCF	34.7	29.5	41.2
Wild			
CHT	132	98.2	194
TRT	83.6	66.4	110.1
NST	46.8	40.5	54.8

Table 5. Pairwise Φ_{PT} values (obtained from the AMOVA framework) inferred from 11 microsatellite loci. Values underlined and superscripted with asterisk indicate statistical significance ($p \leq 0.001$, after Bonferroni correction for 45 tests) for pairwise Φ_{PT} values and exact tests for genetic differentiation among samples, respectively.

	CHN	RACF	RACF-F1	NSCF	NICA	SKCF	STCF	CHT	TRT
CHN	-								
RACF	0.019*	-							
RACF-F1	<u>0.180*</u>	<u>0.096*</u>	-						
NSCF	0.018*	0.004	<u>0.120*</u>	-					
NICA	<u>0.050*</u>	<u>0.053*</u>	<u>0.194*</u>	<u>0.059*</u>	-				
SKCF	<u>0.038*</u>	0.024*	<u>0.135*</u>	0.018*	<u>0.058*</u>	-			
STCF	<u>0.061*</u>	<u>0.061*</u>	<u>0.179*</u>	<u>0.049*</u>	<u>0.098*</u>	<u>0.052*</u>	-		
CHT	0.010	0.010	<u>0.142*</u>	0.013*	<u>0.034*</u>	<u>0.014*</u>	<u>0.062*</u>	-	
TRT	<u>0.022*</u>	0.012*	<u>0.125*</u>	0.004*	<u>0.041*</u>	<u>0.028*</u>	<u>0.053*</u>	0.007*	-
NST	<u>0.056*</u>	<u>0.048*</u>	<u>0.155*</u>	<u>0.045*</u>	<u>0.108*</u>	<u>0.059*</u>	<u>0.062*</u>	<u>0.067*</u>	<u>0.060*</u>



Current status & prospects of farming the Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Mann 1879) in Thailand

Journal:	<i>Aquaculture Research</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Review Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Na-Nakorn, U.; Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand, Department of Aquaculture Jintasathaporn, Orapin; Kasetsart University, Aquaculture
Keywords:	Giant Freshwater Prawn , <i>Macrobrachium rosenbergii</i> , culture, Thailand

SCHOLARONE™
Manuscripts

Only

Current status & prospects of farming the Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Mann 1879) in Thailand

Na-Nakorn, U.^{1,*} & Jintasathaporn, O.¹

¹ Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

* Corresponding author

Tel: 66 2 5794956, e-mail: ffisurn@ku.ac.th

For Review Only

ABSTRACT

□ Thailand was second only to P.R.China in annual production of Giant Freshwater Prawn. This article briefly describes the seed production of Giant Freshwater Prawn technology in Thailand and notes that broodstock management has paid scant attention to genetic issues. There are, however, ongoing selective breeding programs on Giant Freshwater Prawn aimed to improve growth and disease resistance. In the conventional culture technology post-larvae are stocked at a high density and prawns are harvested partially. The cropping period is long and the practice has led to disease outbreaks and deteriorated pond bottoms that result in frequent detection of antibiotic residue. The improved culture technology involves manual sexing of the prawns at three months and restocking only the males into new ponds at low density. The technique gives higher yield and reduces incidence of disease and thus the need for prophylactics. The constraints to Giant Freshwater Prawn culture business in Thailand include low yield and a limited export market. The article describes three ways to expand and sustain the business of Giant Freshwater Prawn farming in the country: development of more genetically improved strains; culture of all-male stock, and new culture techniques.

□

Keywords: Giant Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, culture, Thailand

Running title: Giant Freshwater Prawn culture in Thailand

51 **Importance of Giant Freshwater Prawn to Thailand**

52 The production of Giant Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii* de Mann
53 1879, from culture contributed only 6.6% of the aquaculture output in 2008 (Department of
54 Fisheries 2010). It is much smaller than for instance farmed marine shrimp or tilapia.
55 Nonetheless it has the potential of playing a more significant role in the livelihood of Thai
56 rural households. Among freshwater commodities Giant Freshwater Prawn commands the
57 highest price, which is comparable to marine shrimp. A kilogram of Giant Freshwater Prawn
58 was US\$ 4.0-9.3 in 2010 compared to US\$ 3.3-6.0 for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus*
59 *vannamei* (<http://www.ryt9.com/s/fmo/1106044>). Giant Freshwater Prawn provides an
60 opportunity for inland farmers to produce a high value commodity. Just as important for
61 small farmers is the fact that Giant Freshwater Prawn culture requires a lower operating cost,
62 which is estimated at US\$ 7,600-10,400/ha/year on average for a 2.44-ha farm (Urironk
63 2006) compared to US\$ 20,000/ha/four months for Pacific white shrimp (Mangkala 2005) for
64 a 2.19-ha farm (Department of Fisheries 2008). Giant Freshwater Prawn culture thus
65 provides low-income farming households the opportunity to farm a commodity that can give
66 a high return. Furthermore, Giant Freshwater Prawn culture is not limited to areas with easy
67 access to sea water, which enhances the utilization of irrigated areas for the production of a
68 high value commodity. Finally, the major portion of the Giant Freshwater Prawn production
69 is consumed locally (only 10% is exported). Usually sold live, it is an important ingredient
70 of some of the famous Thai dishes such as “Tom Yum Kung”, a piquant and sour soup,
71 “Kung Pao Sadao Luak” or grilled prawn with half-boiled Siamese neem leaves, and other
72 treats.

73 Thailand is among the top five producers of Giant Freshwater Prawn, second only to
74 P.R.China in annual production in 2008 (Food and Agriculture Organization 2010). The

growth in volume has been sluggish but the value has rapidly risen over the past ten years (Figure 1).

Culture history of Giant Freshwater Prawn in Thailand

In the past, wild Giant Freshwater Prawn was caught from rivers by artisanal fishers. Economic development particularly urbanization and expansion of agricultural areas, which altered or destroyed its habitats and degraded the water quality of river systems, caused a rapid decline in the population of wild Giant Freshwater Prawn. This necessitated research and development in artificial breeding and culture. Giant Freshwater Prawn has been cultured in Thailand since 1977 when its breeding technology was developed (New 2010; Kongkeo & Davy 2010). Since then the country's annual production has increased from about 400 mt in 1980 to more than 30,000 mt in 2008 (Department of Fisheries 2010). In the early years Giant Freshwater Prawn farms were concentrated in the western part of the country (in the provinces of Chachoengsao, Suphan Buri, Nakorn Pathom, etc.) because of the easier access to seed (post larvae-PL) and a sufficient water supply. Farmers in these provinces have a long tradition of fish culture and thus possess skills in good fish farming and some have played a vital role in developing and refining the culture technology of Giant Freshwater Prawn. Eventually, prawn farming expanded to other regions because of the efficient logistics for seed supply and the availability of good water supply. A province in the northeast region, Kalasin, which is distant from any saltwater body, has become one of the major production areas of Giant Freshwater Prawn (Department of Fisheries 2010).

Breeding of Giant Freshwater Prawn in Thailand, technology and present status

Breeding of wild Giant Freshwater Prawn occurs in brackishwater, when gravid females carrying fertilized eggs attached to their abdomens migrate to river mouths which connect to the sea. Spawning takes place in this brackish section of the river and the larvae

metamorphose until they assume the adult morphology, in other words, post-larval stage. They then migrate to the freshwater stretch of the river and spend the rest of their lives upstream (Brown, New & Ismael 2010).

The breeding practice of hatchery is simple. The farmers collect the berried females, females with fertilized eggs attached to their abdomens, from grow-out farms and stock these in the spawning tanks at a density of 100 females/100 m² (Na-Nakorn 2004). The tank is filled with 12-13 ppt brackishwater. After hatching, which takes place the next morning, the larvae are fed with young *Artemia* nauplii supplemented with artificial feed consisting of steamed eggs mixed with minced fish meat. The larvae undergo 11 metamorphosis stages over a period of 21 to 30 days (at water temperature of 28-30 Celsius) until they reach the post-larval stage. At this stage the nursing tank is supplied with freshwater.

A rough estimation indicates that the annual production of post-larvae is more than 7,700 million (calculated from a culture area of 20,500 ha and a stocking density of 375,000 PL/ha). This estimate excludes the PL produced for restocking by the Department of Fisheries. Nowadays most of the Giant Freshwater Prawn hatcheries are located around the lower central part of the country (e.g. the provinces of Suphan Buri, Chachoengsao, Ratcha Buri and Nakorn Pathom) where sea water is available and farmers are skilled in breeding techniques.

Hatchery production of Giant Freshwater Prawn is facing many technical obstacles that include low survival of PL, diseases, and lack of genetically improved strains. Survival rate until the PL stage is low at an average of 30%. This increases the cost of producing the PL (Poonddee & Choochote 1987), which was estimated at about US\$ 1.9-2.2/1,000 PL by Jantakanon and Worasayan (2001) even as the price is relatively low at US\$ 1-1.6/1,000 PL (Na-Nakorn 2004). The outbreak in 2005 of Nodavirus and Extra small virus, which causes

“the white tail disease”, caused mass mortality of larvae (Yoganandhan, Leartvibhas, Sriwongpuk & Limsuwan 2006), plunging Giant Freshwater Prawn production in 2006 by more than 20% of the output in 2004 (Food and Agriculture Organization 2010). White tail disease (WTD) or whitish muscle disease (Qian, Shi, Zhang, Cao, Liu, Li, Xie, Cambournac & Bonami 2003) is the most virulent pathogen in cultured Giant Freshwater Prawn and has been reported since 1999 in France (Arcier, Herman, Lightner, Redman, Mari & Bonami 1999), mainland China (Qian et al., 2003), India (Sri Widada, Durand, Cambournac, Qian, Shi, Dejonghe, Richard & Bonami 2003) and Thailand (Yoganandhan et al. 2006). In order to solve the problem the Department of Fisheries of Thailand has permitted the introduction of virus-free post-larvae and/or broodstock from neighboring countries (Kongratanakosol, Pimolboot, Chinaboot, Leelapatra, Uraiwan, Tantawanich, Kittisuwan, Somsiri, Vidchavudth & Wanapat 2011). The Department also established in 2006 a biosecure system to produce virus-free (*Macrobrachium rosenbergii* nodavirus-MrNV and extra small virus-XSV) larvae of the local strains of giant freshwater prawn, which are supplied to farmers.

Genetic aspects of PL production

Little attention has been paid to genetic considerations in the seed production of the Giant Freshwater Prawn. Fortunately female broodstock had been randomly taken from grow-out farms and pooled regardless of their origin. This practice may have broadened the genetic base of the brooder stocks. As such, the local populations, which were believed to face genetic deterioration, have been able to retain a certain level of genetic variation, e.g., allelic richness or the average number of alleles/locus based on equal sample size. It was found to be $A_r = 8.82 - 9.37$ with an expected heterozygosity of $H_e = 0.69 - 0.70$, which is comparable to that of a wild population, $A_r = 8.99$; $H_e = 0.68$ (Charoentawee, Poompuang, Na-Nakorn & Kamonrat 2007). In contrast, a stock that was introduced from Myanmar for the purpose of mitigating genetic deterioration showed the lowest genetic variation ($A_r =$

6.34; $H_e = 0.64$). It probably was due to the small population size of the founder stock (Charoentawee et al. 2007). This case is a good example of the adverse impacts of broodstock management that is performed with little regard for genetic consideration.

The unintentional negative selection on the broodstock of Giant Freshwater Prawn was noted by Doyle, Singholka & New (1983). They observed that Thai Giant Freshwater Prawn farmers collected berried females from the late maturing batch because of their relatively large size at maturation. But because of the likelihood that the fast growing females would mature earlier, Doyle et al. (1983) estimated a -2.6 g/generation selection differential resulting from such practice. Recently, Kitcharoen, Rungsin, Koonawootrittiron & Nakorn (2010) provided evidence to support Doyle et al. (1983). They showed that a selection based on body length exerted on the first batch of maturing females yielded larger offspring than the selection on the later maturing batches.

Nevertheless, high genetic variation does not necessarily relate with good performance (e.g. Heath, Bryden, Shrimpton, Iwama, Kelly & Heath 2002; Overturf, Casten, LaPatra, Rexroad III & Hardy 2003; Borrell, Pineda, McCarthy, Vázquez, Sánchez & Lizana 2004). Rather it only implies that organisms with high genetic variation may adapt well to changing environments (e.g. Shikano & Taniguchi 2002). Particularly, high genetic variation of hatchery populations is essential to avoid genetic degradation (Falconer & Mackay 1996).

Genetic improvement of Giant Freshwater Prawn in Thailand

Genetic improvement enhances yield of plants and animals. Genetic improvement of aquatic animals, although at an early stage, has led to the improvement of traits in many fish and shrimp species. Examples of this are the GIFT (Genetic Improved Farmed Tilapia) strain of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Dey & Gupta 2000) and the specific pathogen free (SPF) and disease tolerant, fast growing Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Argue, Arce, Lotz & Moss 2002). However, work on genetic improvement of Giant

Freshwater Prawn in Thailand is still in infancy. At present only one commercial genetically improved strain Giant Freshwater Prawn, the CPF or Charoen Phokphand Food strain, is available in the seed market. Despite the lack of information on growth performance until market size, juveniles of this strain were 45 and 24 percent heavier than the local strains in communal and separate rearing, respectively (Karaket, Poompuang, Na-Nakorn, Kamonrat & Hallerman 2011). In addition, a genetic improvement program conducted by the Department of Fisheries has shown improvement of growth of intraspecific hybrid between a domesticated strain reared in a DoF hatchery and a wild stock from Chantaburi (Kongratanakosol et al. 2011). Therefore, mass selection can be applied to each parental stock to improve the performance of the hybrid. Resistance to MrNV and XSV is included as an additional target trait.

The success of the GIFT project partially owed to the design of the breeding program, which avoided genotype by environment effects; the best families were selected based on the records from many commercial farms. Recently, the concept of selection based on farm-reared performances has been applied to the improvement of Giant Freshwater Prawn in Thailand by the Department of Aquaculture of the Faculty of Fisheries, Kasetsart University. Established in 2010, the program aims to improve growth of Giant Freshwater Prawn by family selection using wild founders caught from the southern part of the country, in particular Nakorn Sri Thammarat Province.

Genetic improvement of Giant Freshwater Prawn by means of selection is relatively complicated because of the differences in the growth rates between sexes and among male morphotypes (blue-claw, orange-claw and small male) (Kitcharoen, Rungsin, Koonawootrittiron & Na-Nakorn 2011). Heritability estimates on growth-related traits of matured Giant Freshwater Prawn is high only in females while those of males was not different from zero (Kitcharoen et al. 2011). Therefore, selection on growth should be exerted

199 on females. Alternatively, selection may be applied in juvenile prawn (two months after
200 reaching post-larval stage) prior to sex differentiation.

201 **Culture techniques for Giant Freshwater Prawn**

202 The conventional practice of Giant Freshwater Prawn culture is as follows: Most
203 farms culture Giant Freshwater Prawn in earthen ponds of 0.8 - 1.6 ha in area and 1m deep.
204 Prior to stocking pests are eradicated, lime is applied and manure is loaded to produce natural
205 food. Then PL are released into the pond at stocking densities between 250,000 – 75,000 /ha.
206 Some farms stock as high as 650,000 /ha. Stocks are given artificial feed of 30% crude
207 protein. After 6-7 months of rearing the prawns are partially harvested by seining and those
208 that are of market size (30 g/prawn, all male) are sold. Seining is repeated every month until
209 all the prawns are harvested. The yield is approximately 2,000 – 3,000 kg/ha over 12 months.
210 The disadvantage of this practice is a long production period, different-sized animals which
211 affect the price of the harvest, and the intensive application of drugs especially antibiotics to
212 prevent infection that may result from the partial harvesting operations.

213 An improved or modern culture practice has been described by Limsuwan &
214 Chantaratchakool (2004). The practice considers the growth difference between sexes. In the
215 initial period, the mixed sexes PL are stocked for about three months after which they are
216 manually sexed; the females are sold and the males are restocked at a relatively low density.
217 The two variations of this practice are (a) the stocking of mixed sexes PL in high density
218 followed by thinning and (b) stocking of PL at low density from the start.

219 The details of these practices are as follows: The farmers who prefer high density
220 stocking followed by thinning stock mixed-sexed PL at about 310,000 /ha and nurse them for
221 a period of 2-2.5 months. The prawns are then transferred to new ponds at a lower density
222 (75,000 /ha). After two months they are harvested and sexed and the female prawns are sold.
223 Only male prawns are restocked in the pond at about 44,000 /ha. They are reared for three

more months and then harvested completely. At harvest the male prawn would weigh an average of about 70 g.

Alternatively, most farmers stock the PL at a relatively low stocking density of about 62,500/ha from the start. After three months of rearing the prawns are harvested and sexed. Only males are restocked at 30,000 /ha and reared for another three months. At harvest the average weight of the prawn would be about 50 g.

□ The advantages of the modern rearing techniques over the conventional include the following: the incidence of diseases and pollution of pond bottoms are reduced because the prawns are transferred to new ponds during the culture period, size variation of the harvest is reduced, and yield is increased (Limsuwan & Chantaratchakool 2004).

□ The average yield of Giant Freshwater Prawn in Thailand varies considerably e.g. 1,900 – 3,100 kg/ha/year in Suphan Buri province (Uraironk 2006), due to variation of culture practices, strains, feed, and other factors. The average investment cost is US\$ 8,000/ha, comprising a 51.91% feed cost and a 16.47% seed cost (Uraironk 2006).

Major limitations of the Giant Freshwater Prawn culture business in Thailand

□ A number of limiting factors constrain the expansion of Giant Freshwater Prawn culture. The differential growth rate between male and female necessitates partial harvesting, which lengthens the culture period to 8 to 12 months (Limsuwan & Jantharattakul 2004). Hierarchical size differences among male morphotypes accompanied by an aggressive behavior of dominant males significantly limits the number that can be stocked (35 prawns/square meter). In comparison, marine shrimp are stocked at approximately 50 shrimps/square meter (Limsuwan & Jantharattakul 2004). Moreover, the differential sizes of male morphotypes result in a skewed distribution of body sizes towards smaller size. A harvest usually comprises 50% small and 10% large prawns (Malecha 1983; Ranjeet & Kurup 2002).

In Thailand, despite the slight increase in Giant Freshwater Prawn production (Figure 1a) during the past decade the culture area has decreased (Figure 1c). This is partly explained by the low yield of Giant Freshwater Prawn and a lower rate of return than marine shrimp culture. Although yield of Giant Freshwater Prawn in Thailand is higher than in some countries (reviewed by Valenti, New, Salin & Ye 2010), it is much lower than that of the marine shrimps (e.g. 1,900 – 3,100 kg/ha/year for Giant Freshwater Prawn vs a minimum estimate of 12,500 kg/ha/year of Pacific white shrimp (based on a yield of 6,250 kg/ha over four months and two crops/year, Limsuwan & Chantaratchakool 2004). As such, the farmers often convert Giant Freshwater Prawn farms to other agricultural activities that give higher returns. For example, before its culture in inland freshwater areas was banned by the government Pacific white shrimp, which grows well in low salinity, replaced Giant Freshwater Prawn in some areas.

The limited export market of Giant Freshwater Prawn is also a major limiting factor in Thailand. With a small export demand, the domestic market is easily saturated resulting in lower prices. Export of Giant Freshwater Prawn is hard to enhance due to many reasons. Foreign consumers are not familiar with Giant Freshwater Prawn products as the species is not suitable for the same processing methods done on marine shrimps (New et al. 2010), e.g. percentage of meat after it is headed and peeled is 37- 42% for Giant Freshwater Prawn vs 63-67% for other marine shrimps, Na-Nakorn 2004). A private investor sees the potential of enhancing the popularity of Giant Freshwater Prawn among foreign consumers, but the unpredictable production, in terms of quantity and quality (size and chemical residues) makes it risky for government or private sector to invest more in the export of Giant Freshwater Prawn (Panitsuan Chamnanvej, pers. comm.). Furthermore, chemical residues, e.g. sulfadiazine and nitrofurantoin, in Giant Freshwater Prawn products, are serious problems that hamper expansion of the market (Ruangphand 2002). Antibiotics are used throughout its

production cycle. Very high stocking density in hatcheries has caused disease outbreaks and the conventional culture practice has led to deterioration of pond bottoms, which also triggers pathogenic infections. Therefore, farmers intensively apply antibiotics for prevention and treatment (Jarimopas, Pasookdee & Thawilwan 2004). However, since the application of the GAP for Giant Freshwater Prawn culture, the practice has gradually diminished and the residue problem is now less.

The prospects of Giant Freshwater Prawn culture in Thailand

There are three ways to expand and sustain the business of Giant Freshwater Prawn farming in the country: development of more genetically improved strains; culture of all-male stock, and new culture techniques. These are described below:

More genetically improved strains of Giant Freshwater Prawn. Besides improving farm management and assuring a good environment for growth, genetically improved strain of Giant Freshwater Prawn is a key factor to higher yield. At present two genetic improvement programs are on-going at the Department of Fisheries and at the Kasetsart University. The programs are expected to develop fast growing and/or disease resistant strains in the near future.

Culture of all- male Giant Freshwater Prawn: Culture of all-male stock significantly enhances yield (Sagi, Ra'anan, Cohen & Wax 1986; Cohen, Sagi, Ra'anan & Zohar 1988). Instead of the labor-intensive manual culling of females as currently practiced, the neofemale (a ZZ female from sex reversal by androgenic gland removal at post larva Giant Freshwater Prawn) technology first reported by Sagi & Cohen (1990) has been modified and shown to result in a more efficient production of neofemales (Rungsin, Paankao & Na-Nakorn 2006). The technology has been transferred to a private company "Power Prawn Company, Ltd", which has established a network of contract farmers who will receive the all-male PL for grow-out under the company's supervision (Nattaporn Santhanawit, pers. comm.). More

recently, a molecular genetic technique has been applied to clone and express the gene controlling production of androgenic gland hormone (Srisapoome, Paankao, Rungsin, Areechon & Na-Nakorn 2009). Large scale production of the androgenic gland hormone has been achieved and its efficiency on sex reversal to maleness is being tested (Prapansak Srisapoom, pers. comm.).

New culture systems. The advantage of Giant Freshwater Prawn over marine shrimp is its hardiness, which enables a good survival rate after long transportation. There is a growing demand for large size, live Giant Freshwater Prawn in neighboring countries, e.g. Singapore and Korea (Panitsuan Chamnanvej, pers. comm). To cater to this market, a novel culture system has been devised whereby male Giant Freshwater Prawns of about 80 g each are reared solitarily in a closed recirculation system for about three months. The harvest size is between 250 – 400 g/prawn (Suwannatot & Pasukdee 2003). Prawns of this size are not only required by export markets but also desired by local consumers.

In conclusion, the competitiveness of the Giant Freshwater Prawn culture business in Thailand depends largely on the availability of genetically improved strains and the all-male PL, good culture technology and expansion of the export market. To facilitate the attainment of these objectives, an efficient logistics throughout the supply chain is essential. In this regard, the contract farming system may play an important role. The system provides technical and management guidance on culture practices and enhances the farmers' access to good inputs particularly seed and feed. More importantly, it enables the numerous farmers to synchronize the timing of their production with the requirements of the exporters. The export market demands a reliable and regular supply of products so that it is essential for farmers to adhere to an agreed schedule. Contract farming makes this possible, but with a cautionary note: A well-managed contract system that provides attractive incentives to farmers mitigates the risk of growers ignoring the contract provisions as soon as another buyer offers them a

higher price than the pre-agreed contract price. This business model can be strengthened by organizing the farmers into associations to facilitate the adoption of new technology and better farm management practices and increase the economy of scale of the small farmers.

Acknowledgements

This review article is prepared under the support of Thailand Research Fund (the Senior Research Scholar Program 2007: project RTA 5080013 awarded to U. Na-Nakorn). The assistance of student members of the Fish Genetics Laboratory, Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University is appreciated. We thank Mr. Pedro Bueno for his assistance in editing the manuscript for grammar and style.

References

- Arcier J.M., Herman F., Lightner D.V., Redman R.M., Mari J. & Bonami J.R. (1999) A viral disease associated with mortalities in hatchery-reared postlarvae of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Diseases of Aquatic Organisms* **38**, 177-181.
- 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.
- Borrell Y.J., Pineda H., McCarthy I., Vázquez E., Sánchez J.A., Lizana, G.B. (2004) Correlations between fitness and heterozygosity at allozyme and microsatellite loci in the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Heredity* **92**, 585-593.
- Brown J.H., New M.B. & Ismael D. (2010) Biology. In: *Freshwater Prawns Biology and Farming*. (ed. by M.B. New, W.C. Valenti, J.H. Tidwell, L.R. D'Abramo & M.N. Kutty), pp. 18-34. Wiley-Blackwell, West Sussex.

- 347 Charoentawee K., Poompuang S., Na-Nakorn U. & Kamonrat W. (2007) Genetic diversity of
348 hatchery stocks of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in Thailand.
349 *Aquaculture* **271**, 121-129.
- 350 Cohen D., Sagi A., Ra'anan Z. & Zohar G. (1988) The productions of *Macrobrachium*
351 *rosenbergii* in monosex populations: III. Yield characteristics under intensive
352 monoculture conditions in earthen ponds. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*
353 **40**, 57-63.
- 354 Department of Fisheries (2010) *Fisheries Statistics of Thailand 2008*. Document No.
355 12/2010. Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Thailand.
356 91 p.
- 357 Dey M.M. & Gupta M.V. (2000) Socioeconomics of disseminating genetically improved Nile
358 tilapia in Asia: an introduction. *Aquaculture Economics and Management* **4(1/2)**, 5-11.
- 359 Doyle R.W., Singholka S. & New M.B. (1983) Indirect selection for genetic change: A
360 quantitative analysis illustrated with *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* **30**,
361 237-247.
- 362 Falconer D.S. & Mackay T.F.C. (1996) *Introduction to Quantitative Genetics*, 4th edn,
363 Longman, Essex, UK. 464 p.
- 364 Food and Agriculture Organization (2010) *Fishstat Plus Version 2.30*. FAO Available at:
365 <http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS>. (accessed March, 2010)
- 366 Heath D.D., Bryden C.A., Shrimpton J.M., Iwama G.K., Kelly J. & Heath J.W. (2002)
367 Relationship between heterozygosity, allelic distance (dz), and reproduction traits in
368 Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Canadian Journal of Fisheries and*
369 *Aquatic Sciences* **59**, 77-84.
- 370 Jantakanon, B. & Worasayan, P. (2001) An experiment on nursing of giant freshwater prawn
371 larvae at three stocking densities. *Puen Chao Kung* **November 2001**, 31-40. (in Thai)

- 372 Jarimopas P., Pasookdee S. & Thawilwan W. (2005) *Replacement of Oxytetracycline by*
373 *Microorganism in Larvae Nursing of Giant Freshwater Prawn (Macrobrachium*
374 *rosenbergii* de Man). A Full Report Submitted to National Research Council of
375 Thailand. NRCT, Bangkok. 57 pp.
- 376 Karaked T., Poompuang S., Na-Nakorn U., Kamonrat W. & Hallerman E.M. (2011) DNA
377 microsatellite-based evaluation of early growth performance among strains of
378 freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* de Man. *Aquaculture* **311**, 115-122.
- 379 Kitcharoen N., Rungsin W., Koonawootrittiron S. & Na-Nakorn U. (2010) Selection of
380 brooders from the early maturing freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de
381 Mann 1879) resulted in better growth rate of offspring than those selected from the late
382 maturing. *Aquaculture* **306**, 362 – 364.
- 383 Kitcharoen N., Rungsin W., Koonawootrittiron S. & Na-Nakorn U. (2011) Heritability for
384 growth traits in Giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Mann 1879)
385 based on BLUP method. *Aquaculture Research* **2011**, 1-7.
- 386 Kongeo H. & Davy F.B. (2010) Backyard hatcheries and small scale shrimp and prawn
387 farming in Thailand. In: Success Stories in Asian Aquaculture. (ed. by S.S. De Silva &
388 F.B. Davy), pp 67-84. Springer, Ottawa.
- 389 Kongratanakosol W., Pimolboot S., Chinaboot S., Leelapatra W., Uraiwan S., Tantawanich
390 S., Kittisuwan P., Somsiri T., Vidchavudth M. & Wanapat S. (2011) *Production of The*
391 *Virus-free (Macrobrachium rosenbergii nodavirus-MrNV and extra small virus-XSV)*
392 *Giant Freshwater Prawn*. A full report submitted to The Agricultural Research
393 Development Agency, Bangkok. (in Thai)
- 394 Limsuwan C. & Chantaratchakool P. (2004) *Shrimp Culture Business in Thailand*. National
395 Research Council of Thailand, Bangkok. 206 pp. (in Thai)

- 396 Malecha S.R. (1983) Crustacean genetics and breeding: overview. *Aquaculture* **33**, 395-
397 413.
- 398 Mangkala K. (2005) *Investment Cost and Return of Pacific White Shrimp Culture in Tambol*
399 *Satingmo, Amphur Singhanakorn, Songkhla province*. MS Thesis. Prince of Songkhla
400 University.
- 401 Na-Nakorn U. (2004) *A Guideline for Promoting Giant Freshwater Prawn As An Important*
402 *Exported Commodity*. An Individual Research Report. National Defence College 2003-
403 2004, Bangkok.
- 404 New M.B. (2010) History and global status of freshwater prawn farming. In: *Freshwater*
405 *Prawns Biology and Farming*. (ed. by M.B. New, W.C. Valenti, J.H. Tidwell, L.R.
406 D'Abramo & M.N. Kutty), pp. 1-11. Wiley-Blackwell, West Sussex.
- 407 Overturf K., Casten M.T., LaPatra S.L., Rexroad III C. & Hardy R.W. (2003) Comparison of
408 growth performance, immunological response and genetic diversity of five strains of
409 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **217**, 93-106.
- 410 Poondee T. & Choochote S. (1987) Survival and growth rate of giant freshwater prawn larvae
411 reared in different stocking density. *Kaenkaset* **15(2)**, 69-75. (in Thai)
- 412 Qian D., Shi Z., Zhang S., Cao Z., Liu W., Li L., Xie Y., Cambournac I. & Bonami J.R.
413 (2003) Extra small virus-like particles (XSV) and nodavirus associated with whitish
414 muscle disease in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of*
415 *Fish Diseases* **26**, 521-527.
- 416 Ranjeet K. & Kurup B.M. (2002) Heterogenous individual growth of *Macrobrachium*
417 *rosenbergii* male morphotypes. *NAGA, The ICLARM Quarterly* **25**, 13-18.
- 418 Ruangphand L. (2002) A problem on antibiotic residues and shrimp culture. *Thai Fisheries*
419 *Gazette* **55 (3)** available online at

- 420 http://www.nicaonline.com/articles2/site/view_article.asp?idarticle=157. Download on
421 28 May 2011. (in Thai)
- 422 Rungsin W., Paankhao N. & Na-Nakorn U. (2006) Production of all-male stock by neofemale
423 technology of the Thai strain of Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*.
424 *Aquaculture* **259**, 88-94.
- 425 Sagi A. & Cohen D. (1990) Growth, maturation and progeny of sex reversed *Macrobrachium*
426 *rosenbergii* males. *World Aquaculture* **21**, 87–90.
- 427 Sagi A., Ra'anan Z., Cohen D. & Wax Y. (1986) Production of *Macrobrachium rosenbergii*
428 in monosex population: yield characteristic under intensive monoculture condition in
429 cages. *Aquaculture* **51**, 265–275.
- 430 Shikano T. & Taniguchi N. (2002) Relationships between genetic variation measured by
431 microsatellite DNA markers and a fitness-related trait in guppy (*Poecilia reticulata*).
432 *Aquaculture* **209**, 77-90.
- 433 Sri Widada J., Durand S., Cambournac I., Qian D., Shi Z., Dejonghe E., Richard V. &
434 Bonami J.R. (2003) Genome based detection methods of *Macrobrachium rosenbergii*
435 nodavirus, a pathogen of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: dot-
436 blot, in situ hybridization and RT-PCR. *Journal of Fish Diseases* **26**, 583-590.
- 437 Srisapoome P., Paankao N., Rungsin W., Areechon N. & Na-Nakorn, U. (2009)
438 Transcriptome analysis in androgenic gland of giant freshwater prawn (*Macrobrachium*
439 *rosenbergii*, de Man) for development of all-male production. In: ISAGA X Abstract
440 book, pp. 67. ISGAX Secretariat, Bangkok.
- 441 Suwannatot S. & Pasukdee S. (2003) *Feasibility of Commercial Rearing of Giant Freshwater*
442 *Prawn to Large Size Using Diets with Different Protein Content*. Technical Paper No.
443 4/2546. Department of Fisheries, Bangkok. (in Thai)

Uraironk P. (2006) *Economic Analysis of Giant Freshwater Prawn: Case Study of Pond Culture in Suphanburi Province*. Technical paper No. 1/2006. Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok. (in Thai)

Valenti W.C., New M.B., Salin K.R. & Ye J. (2010) Grow-out systems-monoculture. In: *Freshwater Prawns Biology and Farming*. (ed. by M.B. New, W.C. Valenti, J.H. Tidwell, L.R. D'Abramo & M.N. Kutty), pp. 154-179. Wiley-Blackwell, West Sussex.

Yoganandhan K., Leartvibhas M., Sriwongpuk S. & Limsuwan C. (2006) White tail disease of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* in Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms* **69**, 255-258.

Figure legend

Figure 1 Annual production of Giant freshwater prawn in Thailand during 1999 – 2009 (Department of Fisheries 2010); Quantity in metric tonnes (a); Value in thousand US\$ (b) and area in hectare (c)

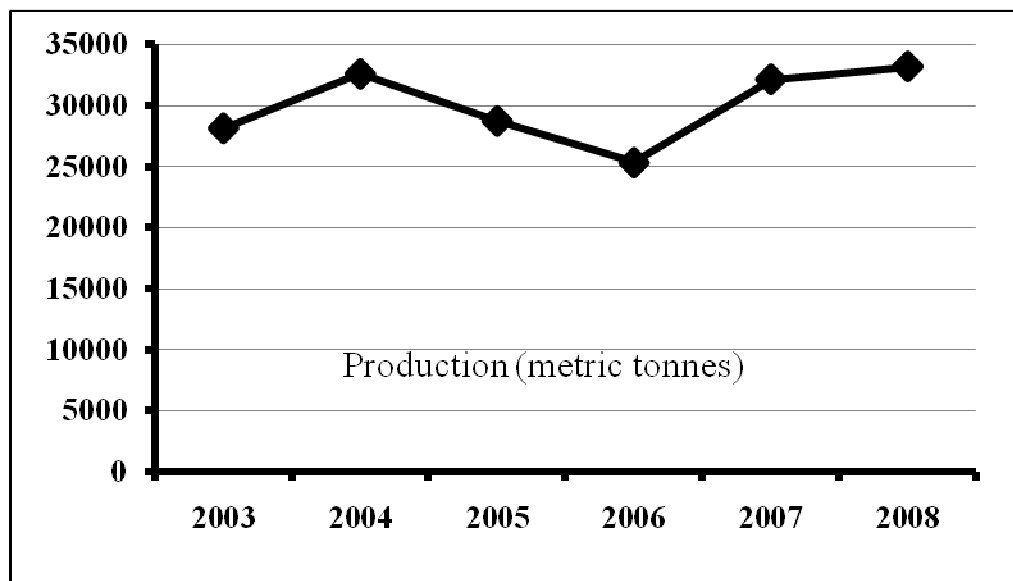


Fig. 1 a

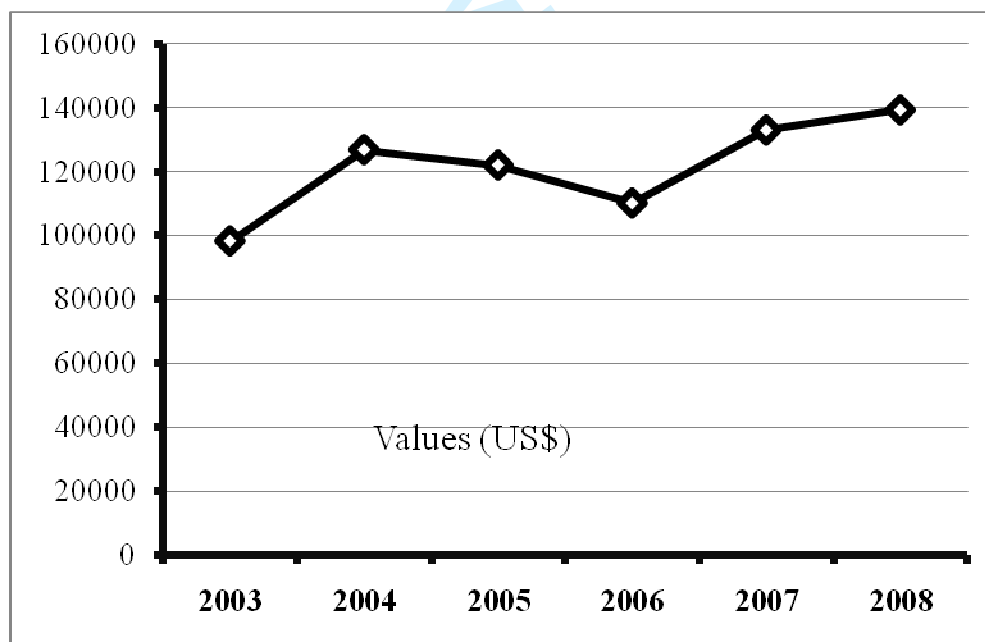


Fig. 1 b

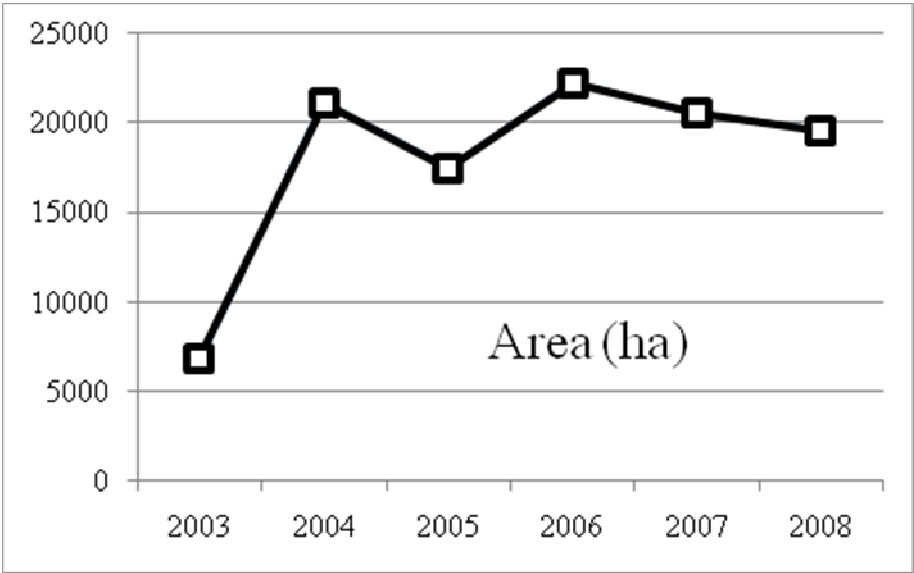


Fig. 1 c

Genetic relatedness of domestic strains of Asian seabass (*Lates calcarifer*, Bloch) in
Thailand inferred from microsatellite genetic markers

Wansuk Senanan^{a*}, Jamjun Pechsiri^b, Supapon Sonkaew^a, Uthairat Na-Nakorn^c, Nipon
Sean-In^d and Renu Yashiro^d.

* Corresponding author: wansuk@buu.ac.th; telephone, 66-38-103-092 ext. 3092; Fax: 66-38-393-496.

^a Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University, Chon Buri, Thailand 20131

^b Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University, Songkhla, Thailand, 90000

^c Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok, Thailand 10900

^d Rayong Coastal Fisheries Research and Development Center, Rayong, Thailand 21000

Abstract

Asian seabass (*Lates calcarifer*) is an economically important species in the Indo-Pacific region. After more 30 years of hatchery production in Thailand, there is still a lack of genetic information crucial for the development of a selective breeding program. We examined genetic variation and relatedness in hatchery strains (seven samples: CHN, RACF, a selectively bred RACF-F1, NSCF, SKCF, NICA, and STCF) compared to the wild counterparts (three samples: CHT, TRT and NST) using 11 microsatellite loci. Microsatellite variation within all samples was relatively high (Allele per locus, $A=10.53\pm1.67$; allelic richness, $Ar=9.62\pm1.29$; observed heterozygosity= 0.79 ± 0.01 ; expected heterozygosity = 0.77 ± 0.04). Genetic diversity indices within most hatchery strains, except for RACF-F1, did not differ from those of wild populations ($p>0.05$) although wild samples had a slightly higher A and Ar values ($A=12.18\pm0.78$; $Ar=10.59\pm0.75$) than the hatchery samples (excluding RACF-F1, $A=10.24\pm0.97$; $Ar=9.58\pm0.92$). A selectively bred RACF-F1 had the lowest allelic diversity ($A=7.27$; $Ar=6.99$) and lowest N_e estimate ($N_e = 7.8$). All genetic relatedness estimators revealed similar insights with most hatchery strains having relatedness values comparable to those of the wild populations ($p>0.05$). A selectively bred RACF-F1 had the highest genetic relatedness values (mean $r_{xy}=0.075-0.204$).

Analysis of molecular variance and pair-wise Φ_{PT} values indicated genetic differentiation among most samples ($p<0.05$). Principal component analysis (PCA) revealed genetic structure among samples. The wild samples taken from the upper Gulf of Thailand (CHN and TRT) were genetically distinct from that taken from the lower Gulf of Thailand (NST). The hatchery samples were divided into three genetically distinct groups: eastern Thailand (CHN, RACF, NSCF and SKCF), Southern Thailand (Songkhla province, NICA) and the Andaman Sea (STCF). Our results indicated a current broodstock

1 management strategy can maintain reasonable genetic diversity within populations and
2 genetic distinction among hatchery strains. However, to develop a selective breeding
3 program, a mating design needs to prevent rapid increase in genetic relatedness and
4 inbreeding in a selectively bred population.
5 Keywords: Asian seabass, *Lates calcifer*, genetic relatedness, microsatellite variation

1 **Introduction**

2 Aquaculture of brackish and marine finfish continues to have an increasing role in
3 global fisheries production (FAO, 2010) as the marine capture production has reached the
4 plateau since 1985. Current world aquaculture production dominates by only a handful
5 marine finfish species; there is much potential for emerging species, such as Asian seabass.
6 Asian seabass or barramundi (*Lates calcarifer*) is an important food fish species in the
7 Asia-Pacific region (Chou and Lee, 1997). Aquaculture contributes to most of the Asian
8 seabass production in several countries including Thailand. In 2009, aquaculture
9 production of Asian seabass from Thailand reached 16,300 tons, worth more than a billion
10 Baht (DOF, 2010); Thailand contributed to at least 30% of the world aquaculture
11 production of the same year (49,299 tons; FAO, 2005-2010). Other major producers include
12 Indonesia, Malaysia, Taiwan and Australia. Thailand is also a major international supplier
13 of fry and fingerlings and has been successful in producing seeds for more than 30 years (at
14 least 10 generations) from domestic broodstock strains derived from cage aquaculture. A
15 current technological bottleneck for this aquaculture industry in Thailand and elsewhere is
16 the lack of genetically improved strains (e.g., Yue et al., 2009; Robinson et al., 2010).

17 A prerequisite of a successful selective breeding program is an appropriate base
18 population, a synthetic population harboring adequate genetic diversity and containing
19 selectable and desirable characteristics. For aquaculture, a base population can consist of a
20 single pool of several genetically diverse strains (e.g., Genetically Improved Farmed
21 Tilapia (GIFT), Eknath et al., 1998), or one or a few good performing strains (e.g.,
22 Norwegian Salmonid selective breeding program, Gjedrem et al., 1991). The breeding
23 designs and schemes typically thrive for maximize genetic gain and minimize the
24 inbreeding rate (Gjedrem, 2005). To choose an appropriate approach for Asian seabass, one
25 would at least need genetic diversity and performance data.

1 Although the Thai domestic strains of Asian seabass can be produced and
2 maintained in captivity for many generations, each life stage is managed by different
3 groups of small-scale farmers. As a consequence, breeders typically obtained from net cage
4 aquaculture are lacking pedigrees. Even though the domestic strains lend themselves to
5 hatchery and farmed production, their genetic diversity is currently unknown. Farmers
6 suspected the loss of genetic variation in some of these strains as they began to observe the
7 emergence of non desirable characters, such as deformed operculum, slow growth and high
8 vulnerability to diseases. In other fish species, loss of within-population genetic diversity
9 can lead to a number of undesirable outcomes including compromises in growth and health
10 due to inbreeding depression (e.g., Su et al., 1996; Fessehayee et al., 2007; Moss et al.,
11 2007).

12 In addition to mating sibs due to the lack of breeder pedigrees, hatchery practices
13 can reduce the strains' effective population sizes (N_e), typically smaller than census size
14 (Miller and Kapuscinski, 2003). Typical hatchery practices that may lower N_e include
15 using small numbers of breeders and unequal numbers of males and females, as well as
16 facilitating large variance in reproductive success among families. Group spawning, a
17 common technique for breeding Asian seabass and other commercially important fish
18 species, can lead to extremely skewed parental contribution in the successive generations
19 and can reduce N_e substantially (Frost et al., 2006; Blonk et al., 2009; Trippel et al., 2009).
20 Size grading of fry and juvenile, a common technique to reduce mortality due to
21 cannibalism in this species could also further skew the family size (Frost et al., 2006).

22 To counteract the potential inbreeding problem in a broodstock, hatchery operators
23 sometimes introduce new genetic material despite the lack of genetic data or documented
24 pedigrees. This strategy has proved to be successful in maintaining reasonable level of
25 genetic diversity in some freshwater fish species in Thailand such as Siamese fighting fish,

Betta splendens (Mejui et al., 2007) and the striped catfish, *Pagasianodon hypophthalmus* (Na-Nakorn and Moeikum, 2009). The genetic diversity data generated from our study will provide insights on the effects of current management strategies on genetic diversity of Asian seabass strains; this small-scale, fragmented aquaculture system in Thailand may provide an alternative to a large aquaculture operation.

Hypervariable genetic markers, such as microsatellite loci, are ideal for estimating genetic relatedness in the absence of actual pedigree (e.g., Norris et al., 2000; McDonald et al., 2004; Sekino et al., 2004). Many authors has developed microsatellite loci for Asian seabass to aid population genetics and parentage studies (Zhu et al., 2006; Yue et al., 2002; Wang et al., 2007; Zhu et al., 2010). Yue et al. (2009) found that wild populations of Asian seabass in South East Asia still harbor considerable amount of genetic diversity compared to hatchery strains in Singapore, Taiwan and Australia. Our analysis built on this study to examine hatchery strains in Thailand, an area with highest diversity revealed by Yue et al. (2009).

We examined genetic relatedness within domestic broodstock strains of Asian seabass in Thailand using 11 microsatellite loci. We also investigated the genetic impacts of a breeding technique used to generate a first generation selectively bred population (one hatchery strain) compared a founder generation (most hatchery strains). The genetic diversity and relatedness data provided insights on the genetic impacts of current management schemes, the value of these strains as genetic resources for a base population; the presence of unique genepools, and the lesson learn from a selective breeding attempt by a government hatchery.

Material and methods

Fish samples and DNA extraction

We analyzed two sets of samples. The first set included fry from two full-sib families consisting of 34-36 individuals per family. We used this sample set to obtain referenced relatedness estimates. We obtained these individuals from a group spawning event, involving 10 individuals (CHN1-CHN10) at a private hatchery (CHN). The second set of samples included adult Asian seabass from hatchery and wild populations. We analyzed genetic variation and genetic relatedness of seven captive broodstock populations compared to three wild populations in Thailand (Table 1; Figure 1). The seven captive samples of breeders came from a private farm in Chon Buri (CHN), Rayong Coastal Fisheries Research and Development Center (RACF, RACF-F1), Nakhon Si Thammarat Coastal Fisheries Research and Development Center (NSCF), Satun Coastal Fisheries Research and Development Center (STCF), Songkhla Coastal Fisheries Research and Development Center (SKCF) and National Institute for Coastal Aquaculture (NICA). RACF-F1 is the first generation selectively bred population derived from RACF. These samples represent areas in eastern and southern Thailand (Upper Gulf of Thailand, Lower Gulf of Thailand and the Andaman Sea) with concentrated hatchery activities. Wild samples came from Chantaburi (CHT), Trat (TRT), and Nakhon Si Thammarat (NST). We collected all individuals during February 2008 – December 2008. We obtained small pieces of fin clips from 31 - 65 individuals per sample. Fin clip tissue was preserved in 95% ethanol.

We extracted DNA from ethanol-preserved fin clips using a standard salting-out protocol (adapted from Aljanabi & Martinez 1997). Briefly, we incubated small pieces of fin clip tissue in lysis buffer (10mM Tris HCl, 2mM EDTA, 0.4M NaCl, 10% SDS, and 20 µg of Proteinase K) at 55 °C overnight. We precipitated the lysis protein using 300 µl of 6M sodium chloride. The DNA was precipitated and washed using 100% and 70% ethanol, respectively. We quantified extracted DNA using 1% gel electrophoresis (BIO-RAD

SubcellGT) and visualized the Ethidium Bromide stained bands under a UV transilluminator (VILBER LOURMAT ETX-40M). The DNA band intensity was compared against a known size and quantity standard (0.2 ug of M13 DNA ladder, Fermentas). Extracted samples were arrayed into 96-well plates for PCR.

Resolving microsatellite variation

We evaluated genetic diversity of Asian seabass samples using 11 microsatellite loci. These markers had already been developed by Zhu et al. (2006), Yue et al. (2002) and Wang et al. (2007). The 11 microsatellite loci were LcaM20F, LcaM27F, LcaM32, Lca50, Lca58, Lca70, Lca98, Lca184, Lca185, Lca260, and Lca285 (Table 2). One primer of each primer pair was labeled with fluorescent dye (6FAM, VIC, NED and PET) at the 5' end.

DNA was amplified using polymerase chain reaction (PCR). PCR was performed in a thermocycler (Biometra Tgradient). Each reaction mixture (10 µL) contained 3 µL template DNA solution (approximately 20 - 50 ng template DNA), 0.2 µM of each primer, 1.5 mM MgCl₂, 0.02 mM of each dNTP, 1 X reaction buffer (Fermentas), and 0.6 unit of *Taq* polymerase (Fermentas). Temperature profiles for the PCR consisted of three steps: (1) denaturing at 94° C for 2 minutes; (2) 33 cycles of denaturing at 94° C for 30 seconds, annealing at 50-57° C (depending on the primer pair) for 30 seconds, and elongating at 72° C for 30 seconds; and (3) elongating at 72° C for 5 minutes (adapted from Yue et al. 2006). We submitted PCR products to a commercial genetics analysis service (Gene System, Inc., Thailand) for electrophoresis and genotyping on an ABI3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems). Allele scores were determined relative to an internal size standard (LIZ 500) using the GeneMapper software v. 3.0 (Applied Biosystems). To verify the allele sizes among gels, we also included two positive controls within each gel.

Genetic data analysis

Parentage analysis

We obtained our full sib families from a group spawning episode, a typical breeding practice for Asian seabass. To determine the correct families, we assigned 89 individual fry (14-day old) to known genotypes of candidate parents (CHN01-CHN10) based on 11 microsatellite loci described above, using the software COLONY 2.0 (Jones and Wang, 2010). To infer parentage and sib groups, the software implemented a full-pedigree likelihood approach. The approach considers the likelihood of the entire pedigree structure and jointly infers parentage and sibships. It iterates possible pedigree configurations consisting of all individuals within a cluster. The algorithm searches the best pedigree configuration (full sibs, half sibs or non-related) based on the highest likelihood values. A cluster may consist of one individual or more than one individuals linked through sibship or parentage. Individuals in different clusters are unrelated. The data consisted of genotypes of the candidate fathers (CFS), candidate mothers (CMS), and offspring (OFS). In our case, because the sexes of males and females were difficult to distinguish, we used the same parental genotype data for both CFS and CMS, with the probability of sampling true fathers and mothers of 0.5. Other input parameters for the analysis included the population allele frequencies, calculated from the CHN sample; 1% genotyping error rates; and polygamous mating systems for both males and females.

Within- and among-population genetic variation

We described genetic variation within each population using standard population genetic estimators, such as the number of allele per locus, allelic richness, heterozygosity and F-statistics (F_{IS}). These values were evaluated using the GENALEX 6.3 (Peakall and Smouse, 2006) and the Microsatellite Analyzer software (MSA, Dieringer and Schlötterer, 2003). Allelic richness is a measure of the number of allele per locus that corrects for

unequal sample size among samples; it was calculated based on the smallest sample size within each locus (Dieringer and Schlötterer, 2003). We tested for the deviation of observed genotype proportions from those expected under Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and tested for non-random association of genotypes among loci (linkage disequilibrium) using the Markov chain exact tests (Guo and Thompson, 1992) implemented within the software GENEPOP version 3.4 (Raymond and Rousset, 1995; p-value estimated from 10,000 dememorization numbers, in 100 batches with 5,000 iterations per batch). Probability thresholds for the HWE and linkage disequilibrium tests were adjusted by Bonferonni correction (Rice, 1989). Differences of the number alleles per locus, allelic richness, observed and expected heterozygosity averaged across all loci among samples were tested using t tests (SOFA statistics version 1.0.6, Paton-Simpson & Associates, Ltd.).

To assess among-population genetic variation, we partitioned the overall genetic variation to two sources of variation, namely within population and among population, using analysis of molecular variance (AMOVA; Excoffier, 2007), an analogue of univariate analysis of variance (ANOVA). To determine pair-wise differentiation among samples, we estimated pair-wise Φ_{PT} statistics based on the AMOVA framework and exact test p values for a given Φ_{PT} value (9999 permutations) using GENALEX 6.3 (Peakall and Smouse, 2006). We also performed global and pairwise genic differentiation among samples using exact tests implemented in GENEPOP (Raymond and Rousset, 1995)

To graphically illustrate genetic relationships among samples, we used a centered, scaled principal component analysis (PCA) emphasizing the variability between samples (inter-class PCA). An advantage of this multivariate approach is that we maximize the amount of information provided by the multilocus genotypes. In addition, it does not assume Hardy-Weinberg equilibrium or linkage disequilibrium. PCA was implemented in

the adegenet (Jombart, 2008) and ade4 (Dray and Dufour, 2007) packages, developed in the R statistical language (R Development Core Team, 2008).

Genetic relatedness among individuals

To assess relatedness among individuals within each sample, we calculated six different estimators of the relatedness coefficient (r_{xy}) based on co-dominant genetic markers. These estimators represented two main approaches including the moment estimation (i.e., Lynch, 1988; Li (1993); Lynch and Ritland, 1999; Queller and Goodnight, 1989; Wang (2002)) and maximum likelihood estimation (i.e., Wang, 2007; Milligan, 2003). The first approach determines relationships by calculating the level of alleles shared between sample pairs. The latter classifies animals to a limited number of relationship classes. Each individual pair, the likelihood to fall into a possible relatedness class (e.g. full sib vs. unrelated) is calculated given their multilocus genotypes. We performed the analysis using the software COANCESTRY v. 1.0 (Wang, 2010). Input data included individual multilocus genotypes; allele frequency; and missing and error rates (0.05 and 0.01, respectively, for all loci in all samples).

To detect the statistical differences of r_{xy} values among samples, we conducted a bootstrap analysis (1,000 bootstrap replicates), implemented in COANCESTRY. The algorithm generated a distribution of r_{xy} values of each defined group within a testing pair. the difference in a mean relatedness of the two groups was statistically significant when it fell outside the 2.5 and 97.5 percentiles of the distribution curve ($p=0.05$).

Effective population size (N_e) estimation

N_e determines the rate of inbreeding and genetic drift. We calculated N_e of each sample based on linkage disequilibrium at unlinked loci using the software LDNe version

1.31 (Waples, 2006). Waples (2006) corrected a bias associated with the estimation of expected mean square correlation of allele frequencies at different loci [$E(\hat{r}^2)$]. We allowed the algorithm to include alleles with frequencies greater than 0.01 and to estimate confidence interval.

Results

All 11 microsatellite loci examined were polymorphic in all populations (Table 3). Lca27 was the most polymorphic while Lca50 was the least polymorphic. Across all population, the total number of alleles per locus ranged from six (Lca50) to 37 (Lca27) with an average number of allele ranging from 2.4 (Lca50) to 18.9 (Lca27). Observed heterozygosities averaged across all populations ranged from 0.46 (Lca50) to 0.92 (Lca32).

Genetic variation within samples

We detected a total of 203 alleles across all samples. Forty-four alleles were private alleles. All private alleles had a frequency less than 0.05. Thirty private alleles were detected in the wild samples. Within each sample, the number of alleles per locus averaged across all loci ranged from 7.27 (RACF-F1) to 13.0 (NST), and average allelic richness ranged from 6.99 (RACF-F1) to 11.27 (NST) (Table 3). Observed heterozygosities averaged across all loci ranged from 0.76 (RACF-F1) to 0.81 (SKCF). RACF-F1 has the lowest number of allele per locus, allelic diversity and observed heterozygosity averaged across loci ($p < 0.05$; average $A = 7.27$, $Ar = 6.99$ and $H_o = 0.66$). Expected heterozygosity did not differ significantly among groups ($p > 0.05$).

Genotypic frequencies of most samples were consistent with those expected under HWE (exact tests, $p \leq 0.0004$ after the Bonferroni correction for multiple comparisons of 110 tests). Of 110 tests, six tests deviated from the HW proportions (one locus in CHN, two

loci in RACF-F1, two loci in NICA, and one locus in CHT). The genotypic deviations at most loci were due to heterozygous excess ($H_o > H_e$). The exception was Lca98 in NICA. The HWE tests performed across loci showed the departure from HW expectation at two out of seven hatchery samples. We observed linkage disequilibrium in almost all hatchery samples (one to two pairs in CHN, NSCF, SKCF and STCF; 34 and 28 pairs in RACF-F1 and NICA respectively). In the wild samples, we observed the disequilibrium in NST (26 pairs)

Genetic relatedness

Of 89 individual fry analyzed from a group spawning episode, 71 were assigned to two families (37 and 34 for the families CHN4 x CHN10 and CHN7 x CHN8, respectively), with inclusion probability of 0.999 for both full sib families. The inclusion probability indicates how likely that all individuals within a given fullsib family are fullsibs. We then used these two fullsib families to generate referenced r_{xy} values. The remaining individuals were assigned to seven other full sib families, each of which consisted of one to five individuals (data not shown). Eight out of ten breeders participated in the mating, but only two individuals (CHN4 and CHN7) contributed to 93% of the individuals in the cohort (Figure 2).

All estimators gave a genetic relatedness value close to 0.5 for the two full sib families (Table 3). All estimators were highly correlated (correlation coefficient = 0.81-0.98; data not shown). Maximum likelihood estimators typically revealed higher estimates than the moment estimators. The relationships among samples were consistent across all estimators, with RACF-F1 had the highest relatedness values ($p < 0.05$; mean $r_{xy} = 0.075$ (Lynch and Ritland 1999 estimate) to 0.204 (Wang 2002 estimate)). The estimates for the remaining samples did not differ significantly ($p > 0.05$) across all estimators. Although the

r_{xy} values of NICA were not significantly different from the remaining samples, the maximum likelihood estimates revealed slightly higher r_{xy} values than the rest of the samples.

Ne estimates for most hatchery samples were comparable to those of wild populations (Table 4). The exceptions were RACF-F1 ($N_e = 7.8$, $CI = 6.4-9.3$) and NICA ($N_e = 17.4$, $CI = 15.3-19.8$).

Genetic variation among samples

All tests detected genetic differentiation among samples. Analysis of molecular variance (AMOVA) indicated that 6% of total variation was due to among-population differentiation ($p=0.001$). A global exact test also suggested a similar trend ($p<0.01$, genic differentiation among samples). Both pairwise exact tests and Φ_{PT} values suggested the similar pattern of differentiation (Table 5) with most sample pairs being genetically distinct (45 tests, $p\leq 0.001$). Exception were five and ten of 45 sample pairs for genetic differentiation and Φ_{PT} tests respectively. These sample pairs include a pair of wild samples from Upper Gulf of Thailand (CHT and TRT), four pairs of hatchery samples (RACF-NSCF, RACF-SKCF, NSCF-SKCF, and NSCF-CHN) and five pairs of hatchery-wild samples (CHN-CHT, RACF-CHT, NSCF-CHT, RACF-TRT, and NSCF-TRT). RACF-F1 (hatchery), NICA (hatchery), STCF (hatchery) and NST (wild) were genetically different in all pairwise tests.

PCA revealed genetic structure among samples (Figure 3). The first principal component differentiated RACF-F1 from the rest of the samples, while the second component differentiated NICA, STCF and NST from the remaining samples. The rest of the samples showed great overlap of their multilocus genotypes. Among wild samples, NST (Lower Gulf of Thailand) was most genetically distinct; the two samples from the

Upper Gulf of Thailand (CHT, and TRT) were not genetically different. Among the hatchery samples, RACF-F1, NICA and STCF were genetically different from CHN, RACF, NSCF and SKCF. Most hatchery samples had varying degree of genotype overlapping with wild samples from the Upper Gulf of Thailand, with CHN, RACF, NSCF, SKCF having greater overlap while RACF-F1 and NICA having lesser degree of overlap. STCF had greater degree of overlap with NST than the remaining samples.

Discussion

Genetic variation within populations and effects of a current management scheme

The level of genetic variation detected in our study was comparable to that observed in Asian seabass populations in Southeast Asia and Australia analyzed by Yue et al. (2009). Even though we used fewer loci (11 loci) than Yue et al. (2009), who analyzed 14 microsatellite loci, we detected a comparable level of allelic diversity (total number of alleles = 210 and 203 and average A across all samples = 15 and 10.53 alleles/locus in Yue et al. (2009) and our study respectively). This level of genetic diversity observed in our wild samples was slightly higher than the values observed for one Thai sample from included in Yue et al. (2009) (average A and A_r = 10.71 and 8.50, respectively). This Thai population had the highest variation compared to other Southeast Asian and Australian samples (average A and A_r = 3.57 to 10.57 and 3.57 to 8.23, respectively, Yue et al., 2009). Despite a declining numbers of the wild populations in Thailand due to anthropogenic causes such as habitat alteration and overexploitation, our results along with Yue et al. (2009) indicated that wild populations of Asian seabass in Thailand can still provide valuable genetic resources for future genetic improvement of this species.

Surprisingly, most hatchery populations examined in our study seemed to retain level of genetic diversity comparable to that of the wild populations in our study and in Yue

et al. (2009). Cultured populations of many aquaculture species, including the Asian seabass hatchery populations in Taiwan and Australia (Yue et al., 2009), tend to lose genetic variation due to aquaculture practices, such as using a small number of founders (e.g., Marchant et al., 2009), mating an unequal number of males and females (Jackson et al., 2003), enabling high variance in family size in the offspring generations via size grading, and group spawning (e.g., Frost et al., 2006; Blonk et al., 2009; Trippel et al., 2009). The current broodstock management strategies in Thailand seemed to retain adequate level of genetic diversity; these strategies include the use of genetically diverse founders, the introduction of new genetic material and the current lack of a selective breeding scheme.

Management of Asian seabass broodstocks in Thailand have been independently carried out by several hatchery operators. Currently, there are more than 100 small-scale hatchery operations along the coastal areas of Thailand (Fisheries Statistic Research Center, Department of Fisheries, personal communication, 2009). In the past, hatchery operators may have also relied on locally available wild adults as breeders (DOF, 1984) as the number of cultured adults may not have been adequate; a government hatchery successfully developed techniques to breed and culture this species in captivity since 1970s (Cheong, 1989). During the last 10-15 years, however, most hatcheries in Thailand completely utilize breeders available from pond or cage aquaculture (relying on seeds produced from hatcheries), which are also distributed throughout the coastal areas.

To prevent genetic deterioration in some aquaculture species, fish farmers occasionally introduce new genetic material into their stock either from other cultured strains or the wild (e.g., Siamese fighting fish, *Betta splendens*, Mejuj et al., 2005; African catfish, *Clarias gariepinus*, Van der Bank et al., 1992; striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*, Na-nakorn and Moeikum, 2009). As a consequence, the mean number of

alleles and heterozygosities were improved. For Asian seabass, the introduction of novel genetic material by farmers/hatchery operator could have helped maintain genetic diversity. According to the hatcheries' records, Rayong and Songkhla Coastal Fisheries Research and Development Centers (RACF and SKCF samples) employed a similar management strategy, deliberately introducing individuals from distant locations. A more practical approach employed by most hatcheries (represented by a private hatchery, CHN sample; Nakorn Si Thammarat Coastal Fisheries Research and Development Center, NSCF sample) is to obtain breeders available locally from pond or cage aquaculture; the grow-out farmers typical use hatchery-produced seeds available locally and elsewhere upon availability. Therefore, in a long run, breeders obtained from local pond/cage aquaculture may represent diverse genetic background. Alternatively, few hatcheries, such as National Institute for Coastal aquaculture and Satun Coastal Fisheries Research and Development Center (NICA and STCF samples), brings in new genetic material only from local sources, either from the wild or cage aquaculture that raise seeds obtained the hatchery, to maintain genetic integrity.

None of the hatchery samples, except for RACF-F1, have undergone a systematic selective breeding process. The Rayong Coastal Fisheries Research Center established the RACF-F1 population by selecting fast growing progeny of a previous generation (RACF). Genetic reduction due to a domestication/selection process was apparent in the RACF-F1 sample. We also detected the departure from HWE across all loci and the linkage disequilibrium among many loci in this sample. The genetic diversity indices reflected at least two genetic processes. On one hand, genetic drift and/or inbreeding resulted in the loss of allelic diversity. Compared to the parental stock (RACF), this sample had reduced allelic diversity at all loci and overall heterozygosity. The heterozygosity values were not uniformly reduced, however. This observation may not be surprising as allelic diversity is

much more sensitive to genetic drift than heterozygosity levels (Allendorf and Luikart, 2007). On the other hand, selection may be responsible for the heterozygous excess at most loci even though we detected genotypic deviation from Hardy-Weinberg proportions at only two loci ($p \leq 0.0004$ after the Bonferroni corrections). Although the positive correlation between microsatellite heterozygosity values and performance traits may not always be detected (e.g., Borell et al., 2004), some studies suggests otherwise (e.g., Hansson and Westerberg, 2002).

Although microsatellite variation was high in these hatchery populations, RFLP analysis of the mitochondrial D-loop suggested otherwise. MtDNA revealed the reduction in haplotype diversity in hatchery populations in eastern and southern Thailand (RACF, CHN and NSCF; Yusmansyah, 2009). This observation may be expected as mtDNA tends to be more sensitive to genetic drift than nuclear DNA and it only reflects maternal lineages. The mtDNA variation suggested small numbers of females contributing to each hatchery population. The combination of markers may be more ideal for the monitoring of genetic diversity.

Genetic relatedness and effective population size (N_e)

Substantial elevation of genetic relatedness and reduction of N_e estimates within RACF-F1 ($r_{xy} = 0.075$ to 0.204 ; $N_e = 7.8$) indicated the genetic effects of selective breeding and domestication. We witnessed the rapid increase in genetic relatedness and reduction in N_e after only one generation of selective breeding. A parental generation, RACF, has relatively low genetic relatedness ($r_{xy} = -0.001$ to 0.058) and reasonably high N_e ($N_e = 88.7$), almost 10 folds higher than a value estimated for RACF-F1. This decline may be facilitated by a natural group spawning, a common breeding technique in this and several other commercial marine fish). It is difficult to know the numbers breeders genetically

1 contribute to the subsequent generation. A group spawning can lead to extremely skewed
2 family genetic contributions in the subsequent generation (most individuals are siblings).
3 Aquaculture stocks of several marine fish species relying on a similar breeding strategy
4 seem to encounter a similar problem (e.g., common sole, *Solea solea*, Blonk et al., 2009;
5 Senegal sole, *S. senegalensis*, Porta et al., 2006; haddock (*Melanogrammus aeglefinus*,
6 Trippel et al., 2009).

7 In Asian seabass, our parentage analysis suggested that almost 80% of individuals in
8 a cohort came from only two full sib families (71 out of 89 individuals analyzed) and only
9 two breeders contributed to more than 90% of offspring in a single spawning event. Frost
10 et al. (2006) found varying degree of family contribution in cohorts from two group mating
11 schemes (2 females and 7 males, and 1 female and 6 males); in both cases, only a few
12 families successfully formed cohorts with unequal contribution. In common sole, Blonk et
13 al. (2009) found 55% of the F1 offspring came from only two out of 28 families despite
14 higher number of breeders (14 females and 14 males; mean $r_{xy}=0.1$) in one group spawning
15 and 50% of the F1 offspring came from five out of 20 families (10 females and 10 males;
16 mean $r_{xy}=0.04$) in another mating. Furthermore, size grading of fry and fingerlings, a
17 typical practice to reduce mortality due to cannibalism in Asian seabass, can further distort
18 this contribution.

19 The magnitude of relatedness elevation varied upon species and mating schemes
20 (e.g., Blonk et al., 2009; Porta et al., 2006; Trippel et al., 2009). In our case, the values
21 increased from non-related (approximately 0) in RACF to mostly half and full sibs
22 (averaged $r_{xy} = 0.075$ to 0.204). In common sole, Blonk et al. (2009) detected an increase
23 of genetic relatedness from 0 in the parent generations to 0.04 and 0.1 in the F1 generations
24 in two different broodstock populations. In Senegal sole, Porta et al. (2006) observed both
25 rapid reduction of allelic diversity (mean $A_r = 13$, 8.75, and 6 for W(parent), and two sets

of cohorts respectively) and increase in genetic relatedness in the F1 generation ($r_{xy}=0$, 0 and 0.45. for W(parent), two sets of cohorts respectively). In haddock, Trippel et al. (2009) detected the increase in mean kinship values from 0.0004 in parental generation to 0.044 and 0.045 in the F1 generation.

.

Genetic differentiation among populations

AMOVA, Φ_{PT} values and PCA indicated some genetic structure among Asian seabass populations in Thailand. Wild populations located in the upper Gulf of Thailand (CHT and TRT) were genetically distinct from the lower Gulf of Thailand (NST). These findings are similar to the genetic structure in populations of several marine species inhabiting the Gulf of Thailand, such as black tiger prawn (*Peneaus monodon*; Supungul et al., 2001), tropical abalone (*Haliotis asinina*; Tang et al., 2004) and Asian moon scallop (*Amusium pleuronectes*, Mahidol et al., 2007). The population division may be explained by the distance between the populations (more than 400 km between NST and CHT-TRT) and the distinct water masses in the upper and lower Gulf of Thailand during monsoon seasons.

Most hatchery population studied (CHN, RACF, SKCF and NSCF) were genetically similar even though they may not have had direct interactions. For the samples obtained from three government hatcheries, RACF, NSCF, and SKCF, we expect to see some degree of similarity. According to the hatcheries' records (also described in Table 1), these hatcheries have directly exchanged broodstock or seeds with each other in the past. On the other hand, the interaction of these government hatcheries and the private hatchery (CHT) was not direct; however, most hatcheries had bought breeders from pond or cage aquaculture that sometimes used seeds supplied by hatcheries within the upper Gulf of Thailand (mainly from Chachoengsao province). Interestingly, all of these populations are

1 also genetically similar to wild populations obtained from the upper Gulf of Thailand (CHT
2 and TRT). This similarity reflects the importance of this natural genepool in the
3 development of these hatchery strains.

4 Genetic homogeneity among upper Gulf of Thailand populations and eastern
5 hatchery strains may also reflect the genetic effects of supplementary stocking carried out
6 by government and private sectors. Supplementary stocking of Asian seabass is a common
7 activity of government hatcheries in Thailand. Each year millions of fry are released from
8 these hatcheries. Thus far, genetic considerations have not been incorporated in the
9 stocking programs. Our results suggest that broodstock reared in hatcheries may have an
10 elevated level of genetic relatedness. The success of stocking programs is currently
11 unknown, but swamping a wild population with hatchery reared individuals may lower
12 genetic diversity as well as fitness of the wild populations (e.g., Miller et al., 2004).

13 Two samples from hatcheries intentionally exploiting local genetic resources (STCF
14 from the Andaman Sea and NICA from southern Thailand; Table1) were genetically
15 distinct from others. This genetic structure may be attributed to genetic uniqueness in the
16 genepools and/or genetic alteration of broodstocks due to genetic processes occurred in
17 captivity, such as genetic drift or selection. The latter factor may be especially important in
18 NICA, as N_e estimate for this sample was relatively low ($N_e = 17.4$) and that the linkage
19 disequilibria were present among all loci. A selectively bred population, RACF-F1, is an
20 excellent example of genetic differentiation due to genetic drift in a very short time. This
21 observation can also be detected in other fish species (e.g., Snoj et al., 2007). A
22 translocated population of Jadro softmouth trout (*Salmo obtusirostris*) was genetically
23 distinct from its original wild population in only 12 generations.

24 In the case of Asian seabass and probably many aquaculture species, geographic
25 distance between hatcheries does not explain the genetic structure of broodstock

1 populations. For example, NICA and SKCF samples came from two hatcheries in
2 approximately 100 km apart, but SKCF was more genetically similar to RACF and NSCF
3 located in another province and region of the country. The level of interaction among
4 hatcheries therefore is an important factor determining the genetic background of breeders
5 used in each location and level of genetic homogeneity.

6 Our genetic data revealed at least three clusters of hatchery strains, namely the
7 upper Gulf of Thailand (CHN, RACF), lower Gulf of Thailand (NICA) and the Andaman
8 Sea (STCF). Due to their history, SKCF and NSCF were more similar to the upper Gulf of
9 Thailand group, than the lower Gulf of Thailand. The three clusters are main geographic
10 locations for seabass hatcheries and farming. Maintaining their genetic identities may be
11 important to ensure adaptive potential and selective responses.

13 **Implications for broodstock management of *Lates calcarifer***

14 Two levels of genetic diversity, within and among population, are important
15 considerations for ensuring long-term sustainability of a hatchery or wild population. High
16 within population genetic variation prolongs the effects of inbreeding depression and high
17 level of among population genetic variation protects the adaptive potential of a population
18 (Allendorf and Luikart, 2007). For most Asian seabass hatchery strains in Thailand,
19 obtaining breeders from cage aquaculture have not substantially reduced genetic diversity
20 within a population. However, continuing this practice may need to be monitored, as
21 individuals in the aquaculture system may become closely related (currently lack of
22 pedigrees). Judging from the level of genetic diversity, most hatchery populations could
23 provide valuable genetic resources to the development of a base population(s) for a genetic
24 improvement program. This strategy, however, seems to genetically homogenize some
25 strains located in different geographic regions of the country.

1 Because genetic structure among hatchery strains exists, the strains in distant
2 geographic locations (i.e., upper and lower Gulf of Thailand and the Andaman Sea) may
3 need to be managed separately to maintain stock identities. Different stocks may also
4 possess distinct desirable qualities for aquaculture. Future research needs to evaluate the
5 performance differences of these stocks.

6 A challenge for a genetic improvement program for this species is the rapid increase
7 in genetic relatedness and reduction in N_e only after a single generation (discussed above).
8 It is a consequence of extremely skewed family genetic contributions in the subsequent
9 generations (most individuals are siblings) even though many hatcheries typically use an
10 equal proportion of male and female breeders and reasonably large numbers of breeders
11 (30-40 pairs). To monitor family contributions, a pedigree tracking system will be
12 necessary. An approach taken in our study will be highly applicable to help track pedigree
13 and determine the level of genetic relatedness among individuals in a selective breeding
14 program.

15 To identify unrelated founders, the genetic relatedness values can be used as a
16 criterion (e.g., Balou and Lacy, 1995). Sekino et al. (2004) and Sripairoj et al. (2007)
17 illustrated that mating individuals with values below the cut-off mean kinship for unrelated
18 individuals could increase the heterozygosity level in the next generation. The minimal
19 kinship (mk) selection approach (Balou and Lacy, 1995) generally preserves individuals
20 with rare genotypes. This selection may entails obtaining additional adults from a local
21 wild population.

24 **Acknowledgement**

25

1 We would like to thank Thailand Research Fund for the funding of this research
2 through the project entitled “Application of Genetics and Biotechnology for Sustainable
3 Development of AquacultureII” (Senior Research Scholar 2007) awarded to U. Na-Nakorn.
4 The Graduate School and the Faculty of Science of Burapha University provided partial
5 funding for S. Sonkaew. We greatly appreciate the assistance of the following colleagues
6 for providing the samples: Ms. Wadsana Maneerat and Seangthong Prasertwiriyaikul at
7 Talaythong Farm, Mr. Korkiet Koodkaew of the Nakhon Si Thammarat Coastal Fisheries
8 Research and Development Center, and the directors and staff of the following Department
9 of Fisheries centers: the National Institute of Coastal Aquaculture, the Songkhla Fisheries
10 Research and Development Center, the Satun Fisheries Research and Development Center.
11 We thank local fishermen and fish distributors for their kind assistance in collecting
12 samples.

Reference

- Aljanabi, S.M., Martinez, I., 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acid Research* 25, 4692-4693.
- Allendorf, F.W., Luikart, G., 2007. Conservation and the genetics of populations. Blackwell publishing, Malden, MA. 643 pp.
- Balou, J.D., Lacy, R.C., 1995. Identifying genetically important individuals for management of genetic variation in pedigreed populations. In: Ballou, J.D., Gilpin, M., Foose, T.J., (Eds.), *Populations Management for Survival and Recovery*. Columbia University Press, New York, pp. 76-111.
- Blonk, R.J.W., Komen, J., Kamstra, A., Crooijmans, R.P.M.A., van Arendonk, J.A.M., 2009. Levels of inbreeding in group mating captive broodstock populations of Common sole, (*Solea solea*), inferred from parental relatedness and contribution. *Aquaculture* 289, 26-31.
- Borrell, Y.J., Pineda, H., McCarthy, I., Va'zquez1, E., Sa'nchez1, J.A., Lizana1, G.B. 2004. Correlations between fitness and heterozygosity at allozyme and microsatellite loci in the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Heredity* 92, 585–593
- Cheong, L., 1989. Status of knowledge on farming of Seabass (*Lates calcarifer*) in South East Asia. *Advances in Tropical Aquaculture*, Tahiti (French Polynesia), 20 Feb - 4 Mar 1989.
- Chou, R., Lee, H.B., 1997. Commercial marine fish farming in Singapore. *Aquaculture Research* 28, 767–776.
- Dieringer, D., Schlötterer, C., 2003. Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes* 3, 167 – 169.

1 DOF (Department of Fisheries). 1984. Culture of seabass. SAFIS Extension Manual Series
2 11, Southeast Asian fisheries Development Center, Thailand. 24 pp.

3 DOF (Department of Fisheries). 2010. Status of Asian seabass in first quarter of 2010.
4 Fisheries Economics Division, Bangkok
5 (http://fishco.fisheries.go.th/fisheconomic/magazine/kapong_1_53.pdf, accessed
6 June 2011).

7 Dray, S., Dufour, AB. 2007. The ade4 package: implementing the duality diagram for
8 ecologists. Journal of Statistical Software 22, 1-20.

9 Eknath, A.E., Dey, M.M., Rye, M., Gjerde, B., Abella, T.A., Sevilleja, R., Tayamen, M.M.,
10 Reyes, R.A., Bentsen, H.B., 1998. Selective breeding for Nile tilapia for Asia.
11 Proceedings of the 6th World Congress on Genetics Applied in Livestock Production
12 27, 89-96.

13 Excoffier, L., 2007. Analysis of population subdivision, pp. 980–1020 in D.J. Balding, M.
14 Bishop and C. Cannings. (eds) Handbook of Statistical Genetics 3rd edition, volume
15 2. John Wiley & sons, Ltd., West Sussex, UK.

16 FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2005-2010. Fisheries
17 Topics: Resources. Main cultured species. Text by Rohana Subasinghe and David
18 Currie. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. (URL:
19 http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Lates_calcarifer/en#tcN90050)

20 FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2010. The states of the
21 world fisheries and aquaculture 2010. FAO Fisheries and Aquaculture Department,
22 Rome.

23 Fessehaye, Y., Komen, H., Rezk, A., van Arendonk, J.A.M., Bovenhuis, H., 2007. Effects
24 of inbreeding on survival, body weight and fluctuating asymmetry (FA) in Nile
25 tilapia, *Oreochromis niloticus* . Aquaculture 264, 27 – 35.

1 Frost, L.A., Evans, B.S., Jerry, D.R., 2006. Loss of genetic diversity due to hatchery culture
2 practices in Barramundi (*Lates calcarifer*). Aquaculture 261, 1056 -1064.

3 Gjedrem, J. (ed) 2005. Selection and breeding program in aquaculture. Springer, The
4 Netherlands. 364 pp.

5 Gjedrem, T., Gjøen, H.M. Gjerde, B., 1991. Origins of Norwegian farmed Atlantic Salmon.
6 Aquaculture 98, 41-50.

7 Guo, S.W., Thompson, E.A., 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg
8 proportion for multiple alleles. Biometrics 48, 361-372.

9 Hansson, B., Westerberg, L., 2002. On the correlation between heterozygosity and fitness
10 in natural populations. Molecular Ecology 11, 2467-2474.

11 Jackson, T.R., Martin-Robichaud, D.J., Reith, M.E., 2003. Application of DNA markers to
12 the management of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) broodstock.
13 Aquaculture 220, 245–259.

14 Jombart, T. 2008. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers.
15 Bioinformatics 24, 1403-1405.

16 Jones, O.R., Wang, J. 2010. COLONY: a program for parentage and sibship inference from
17 multilocus genotype data. Molecular Ecology Resources 10, 551–555.

18 Li, C.C., Weeks, D.E., Chakravarti, A., 1993. Similarity of DNA fingerprints due to chance
19 and relatedness. Human Heredity 43, 45-52.

20 Lynch, M., 1988. Estimation of relatedness by DNA fingerprinting. Molecular Biology and
21 Evolution 5, 584-599.

22 Lynch, M., Ritland, K., 1999. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers.
23 Genetics 152, 1753-1766.

1 Mahidol, C., Na-Nakorn, U., Sukmanomon, S., Taniguchi, N., Nguyen, T.T.T., 2007
2 Mitochondrial DNA diversity of the Asian moon scallop, *Amusium pleuronectes*
3 (Pectinidae) in Thailand. Marine Biotechnology 9, 352-359.

4 Marchant, S., Haye, P.A., Marín, S.A., Winkler, F.M., 2009. Genetic variability revealed
5 with microsatellite markers in an introduced population of the abalone *Haliotis*
6 *discus hannai* Ino Aquaculture Research 40, 298-304

7 McDonald, G.J., Danzman, R.G., Ferguson, M.M., 2004. Relatedness determination in the
8 absence of pedigree information in three cultured strains of rainbow trout
9 (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 233, 65 – 68.

10 Meju, O., Sukmanomon, S., Na-Nakorn, U. 2005. Allozyme revealed substantial genetic
11 diversity between hatchery stocks of Siamese fighting fish, *Betta splendens*, in the
12 province of Nakornpathom, Thailand. Aquaculture 262, 86-94.

13 Miller, L.M., Close, T., Kapuscinski, A.R., 2004. Lower fitness of hatchery and hybrid
14 rainbow trout compared to naturalized populations in Lake Superior tributaries.
15 Molecular Ecology 13, 3379–3388.

16 Miller, L.M., Kapuscinski, A.R., 2003. Genetic guidelines for hatchery supplementation
17 programs. Pp. 329 – 355, in E. Hallerman (ed.) Population genetic: principles and
18 application for fisheries scientists. American Fisheries Society, Bethesda,
19 Maryland, USA.

20 Milligan, B.G., 2003 Maximum-likelihood estimation of relatedness. Genetics 163, 1153-
21 1167.

22 Moss, D.R., Arce, S.M., Otoshi, C.A., Doyle, R.W., Moss, S.M. 2007. Effects of
23 inbreeding on survival and growth of Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus)*
24 *vannamei*. Aquaculture 272S1, S30–S37

1 Na-Nakorn, U., Moeikum, T. 2009. Genetic diversity of domesticated stocks of striped
2 catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvag 1978) in Thailand: relevance to
3 broodstock management regimes. *Aquaculture* 297, 70-77.

4 Norris, A.T., Bradley, D.G., Cunningham, E.P., 2000. Parentage and relatedness
5 determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers.
6 *Aquaculture* 182. 73–83

7 Peakall, R., Smouse, P.E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population
8 genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288-295.

9 Porta, J., Porta, J.M., Martinez-Rodriguez, Alvarez, M.C., 2006. Genetic structure and
10 genetic relatedness of a hatchery stock of Senegal sole (*Solea senegalensis*) inferred
11 by microsatellites. *Aquaculture* 251, 46-55.

12 Queller, D.C., Goodnight, K.F., 1989. Estimating relatedness using genetic markers.
13 *Evolution* 4, 258-275.

14 R Development Core Team. 2008. R: A language and Environment for Statistical
15 Computing. R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria.
16 <http://www.R-project.org>.

17 Raymond, M., Rousset F., 1995. Genepop (version 1.2), population genetics software for
18 exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86, 248-249.

19 Rice W.R. (1989) Analyzing table of statistical tests. *Evolution* 43, 223 -225.

20 Robinson, N.A., Schipp, G., Bosmans, J., Jerry, D.R., 2010. Modelling selective breeding
21 in protandrous, batch-reared Asian seabass (*Lates calcarifer*, Bloch) using walkback
22 selection. *Aquaculture Research* 41, 643-655.

23 Sekino, M., Sugaya, T., Hara, M., Taniguchi, N., 2004. Relatedness inferred from
24 microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder
25 *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 233, 163-172.

- 1 Snoj, A., Razpet, A., Tomljanovic', T., Treer, T., Sus'nik, S. 2007. Genetic composition of
2 the Jadro softmouth trout following translocation into a new habitat. Conservation
3 Genetics 8, 1213–1217.
- 4 Sriphairoj, K., Kamonrat, W., Na-Nakorn, U., 2007. Genetic aspect in broodstock
5 management of the critically endangered Mekong giant catfish, *Pangasianodon*
6 *gigas* in Thailand. Aquaculture 264, 36-46.
- 7 Su, G., Liljedahl, L., Gall, G.A.E., 1996. Effects of inbreeding on growth and reproductive
8 traits in rainbow trout. Aquaculture 142, 139 – 148.
- 9 Supungul, P., Sootanan, P., Klinbunga, S., Kamonrat, W., Jarayabhand, P., Tassanakajon,
10 A., 2000. Microsatellite Polymorphism and the population structure of the black
11 tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand. Marine Biotechnology 2, 339–347.
- 12 Tang, S., Tassanakajon, A., Klinbunga, S., Jarayabhand, P., Menasveta, P., 2004.
13 Population structure of tropical abalone (*Haliotis asinina*) in coastal waters of
14 Thailand determined using microsatellite markers. Marine Biotechnology 6, 604-
15 611.
- 16 Trippel, E.A., Rideout, R.M., O'Rielly, P, Herbinger, C.M., Neil, S.R.E., Hamilton. 2009.
17 Communal spawning leads to high potential for inbreeding in gadoid aquaculture.
18 Aquaculture 296, 27-35.
- 19 Van der Bank, F.H., Grober, J.P, du Preez, H.H. 1992. A comparative biochemical genetic
20 study of three populations of domesticated and wild African catfish (*Clarias*
21 *gariepinus*) Comparative Biochemistry and Physiology B 101, 387-390.
- 22 Wang, C.M., Zhu, Z.Y., Lo, L.C., Feng, F., Lin, G., Yang, W.T., Li, J., Yue, G.H., 2007. A
23 microsatellite linkage map of Barramundi, *Lates calcarifer*. Genetics 175, 907–915.
- 24 Wang, J. 2007. Triadic IBD coefficients and applications to estimating pairwise relatedness.
25 Genetical Research 89, 135–153.

1 Wang, J. 2010. COANCESTRY: A program for simulating, estimating and analyzing
2 relatedness and inbreeding coefficients. *Molecular Ecology Resources* 11, 141-145.

3 Wang, J., 2002. An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics*
4 160, 1203-1215.

5 Waples, R.S., 2006. A bias correction for estimates of effective population size based on
6 linkage disequilibrium at unlinked gene loci. *Conservation Genetics* 7, 167-184.

7 Yue, G.H., Li, Y., Chao, T., Chau, R., Orban, L., 2002. Novel microsatellite from Asian
8 Seabass (*Lates calcarifer*) and their application to broodstock analysis. *Marine*
9 *Biotechnology* 4, 503 – 511.

10 Yue, G.H., Zhu, Z.Y., Lo, L.C., Wang, C.M., Lin, G., Feng, F., Pang, H.Y., Li, J., Gong, P.,
11 Liu, H.M., Tan, J., Chou, R., Lim, H., and Orban, L., 2009. Genetic variation and
12 population structure of Asian seabass (*Lates calcarifer*) in the Asia-Pacific region.
13 *Aquaculture* 293, 22-28.

14 Yusmansyah, 2009. Mitochondrial DNA variation of cultured and wild populations of
15 Asian seabass (*Lates calcarifer*) in Thailand. Master Thesis, Burapha University,
16 Thailand.

17 Zhu, Z.Y., Lin, G., Lo, L.C., Xu, Y.X., Feng, F., Chou, R., Yue, G.H., 2006. Genetic
18 analyses of Asian seabass stocks using novel polymorphic microsatellites.
19 *Aquaculture* 256, 167–173.

20 Zhu, Z.Y., Wang, C.M., Lo, L.C., Lin, G., Feng, F., Tan, J., Chou, R., Lim, H.S., Orban,
21 L., Yue, G.H. 2010. A standard panel of microsatellites for Asian seabass (*Lates*
22 *calcarifer*). *Animal Genetics* 41, 208-212.