

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH**

**ỨNG DỤNG DI TRUYỀN PHÂN TỬ VÀ DI TRUYỀN  
SỐ LƯỢNG PHỤC VỤ CHỌN GIỐNG CÁ TRA  
KHÁNG BỆNH GAN THẬN MỦ**

**Chuyên ngành: Nuôi trồng Thủy sản**

**Mã số: 9 62 03 01**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC NÔNG NGHIỆP**

**Thành phố Hồ Chí Minh – 12/2022**

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH**

**ỨNG DỤNG DI TRUYỀN PHÂN TỬ VÀ DI TRUYỀN  
SỐ LƯỢNG PHỤC VỤ CHỌN GIỐNG CÁ TRA  
KHÁNG BỆNH GAN THẬN MỦ**

**Chuyên ngành: Nuôi trồng Thủy sản**

**Mã số: 9 62 03 01**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC NÔNG NGHIỆP**

**Thành phố Hồ Chí Minh – 12/2022**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi cam đoan những công bố trong luận án “**Ứng dụng di truyền phân tử và di truyền số lượng phục vụ chọn giống cá tra kháng bệnh gan thận mũ**” là trung thực và một phần kết quả trong nghiên cứu thuộc đề tài ‘Ứng dụng công nghệ sinh học chọn giống cá tra kháng bệnh gan thận mũ’, thuộc Đề án phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực thủy sản đến năm 2020 - Bộ Nông Nghiệp và Phát triển Nông thôn’ và đề tài “Cung cấp cá tra chọn giống cho người dân Đồng bằng sông Cửu Long”, thuộc chương trình VLIR-OUS, mã số đề tài SI-2019-01-26. Những số liệu trong luận án được phép công bố với sự đồng ý của các chủ nhiệm đề tài. Các số liệu và kết quả trình bày trong luận án này chưa từng được tác giả khác công bố trong bất kì công trình nào khác.

**TÁC GIẢ LUẬN ÁN**

## LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc tới TS. Nguyễn Văn Sáng và TS. Nguyễn Hữu Thịnh, những người thầy hướng dẫn khoa học đã tận tình định hướng, hướng dẫn và hỗ trợ tôi trong suốt thời gian nghiên cứu và hoàn thành nội dung các chuyên đề, bài báo và luận án. Tôi luôn trân trọng và biết ơn sâu sắc về những hỗ trợ quý báu từ hai Thầy trong những năm học vừa qua.

Xin được gửi lời cảm ơn đến Ban chủ nhiệm cùng toàn thể các Thầy/Cô Giảng viên, Cán bộ và Viên chức của Khoa Thủy Sản và của phòng Sau đại học thuộc trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh đã có những góp ý về chuyên môn hữu ích cũng như tạo điều kiện thuận lợi về thời gian và các thủ tục hành chính để tôi có thể hoàn thành chương trình học tập, nghiên cứu và luận án.

Xin chân thành cảm ơn Ban Lãnh đạo Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II cùng các phòng chức năng đã tạo mọi điều kiện cho tôi trong suốt quá trình nghiên cứu. Chân thành cảm ơn các cán bộ tại Trại Nghiên cứu Thực nghiệm Thủy sản Gò Vấp, Trung tâm Quan trắc Môi trường và Bệnh Nam Bộ, Trung tâm Quốc gia Giống Thủy sản Nước ngọt Nam Bộ và Trung tâm Công nghệ Sinh học (thuộc Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II) đã giúp đỡ và tạo mọi điều kiện về cơ sở vật chất cho tôi trong suốt quá trình thực nghiệm. Ngoài ra, tôi xin gửi lời cảm ơn đến Phòng thí nghiệm Đa dạng Di truyền và Tiến hóa (Laboratory of Biodiversity and Evolutionary Genomics), Khoa Sinh học, Đại học KU Leuven (Vương quốc Bỉ) với những hỗ trợ về công nghệ và kĩ thuật để thực hiện thí nghiệm.

Xin được gửi lời biết ơn sâu sắc đến Ban giám hiệu, Ban chủ nhiệm Khoa Sinh học cùng toàn thể các Thầy/Cô Giảng viên, Cán bộ, Viên chức trường Đại học Sư Phạm Tp. Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện thuận lợi về giảng dạy để tôi có thể hoàn thành chương trình học tập và luận án.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến ThS. Nguyễn Hữu Phúc, ThS. Võ Hồng Phượng, TS. Nguyễn Thanh Vũ, ThS. Trần Văn Nhiên, CN. Nguyễn Hoàng Thông, CN. Lê Hoàng Khôi Nguyên, CN. Nguyễn Thị Thảo Sương, CN. Huỳnh Thị Trúc Quân và SV. Lưu Tăng Phúc Khang đã luôn sát cánh, đồng viên, chia sẻ mọi khó khăn với tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Và cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến hai bên gia đình đã luôn đồng viên để tôi có thể thực nghiệm và hoàn thành luận án đúng thời gian cho phép.

Một lần nữa tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành, sâu sắc với tất cả sự giúp đỡ quý báu trên.

Tp. HCM, ngày 15 tháng 12 năm 2022

**Tác giả luận án**

## TÓM TẮT

Nghiên cứu chọn giống cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) kháng bệnh gan thận mù thể hệ G1 và các giải pháp kỹ thuật cho chọn lọc cá tra kháng bệnh thể hệ tiếp theo với các nội dung và kết quả đạt được là:

- Ước tính các thông số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mù ở thể hệ G1 cá tra và đề xuất chọn lọc:

Nghiên cứu đã sản xuất 155 gia đình full-sib và half-sib, ương đến kích cỡ cá giống còn lại 130 gia đình và đánh dấu từ PIT 7.664 con cá giống thuộc 130 gia đình cho thí nghiệm đánh giá khả năng kháng bệnh trong 2 bể, 16.000 L/bể. Số lượng cá cho vào bể 1, bể 2 là 3.832/bể, mật độ cá là 1 cá/4,1 lít nước, nhiệt độ từ 26 - 28°C. Chúng vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* Gly09M được sử dụng để gây cảm nhiễm cá thí nghiệm bằng phương pháp cohabitant kết hợp (tỉ lệ ghép cá cohabitant là 35% và liều bổ sung vi khuẩn là  $10^5$  CFU/mL). Ngoài ra, các cá thể thuộc 130 gia đình cá giống sau đánh dấu cũng được thả nuôi đánh giá tăng trưởng trong ao, trung bình 45 con/gia đình, tổng 5.838 cá thể được thả nuôi trong ao 2.000 m<sup>2</sup>. Sau 156 ngày nuôi, thu hoạch và thu thập số liệu về tỉ lệ sống, khối lượng, chiều dài. Ngoài ra, ở giai đoạn cá hương, 33 gia đình với 50 cá thể/gia đình được tiến hành cảm nhiễm bằng phương pháp ngâm nhằm đánh giá khả năng kháng bệnh gan thận mù và ước tính các thông số di truyền ở giai đoạn này. Nghiên cứu áp dụng mô hình tuyến tính hỗn hợp cá thể ước tính thông số di truyền trên tính trạng kháng bệnh giai đoạn cá hương, cá giống và tính trạng tăng trưởng, tỉ lệ sống lúc thu hoạch. Kết quả cho thấy, hệ số di truyền trên cá giống tại giai đoạn cắt ngang tỉ lệ sống toàn bộ 50%, 25% trong thí nghiệm cảm nhiễm bệnh gan thận mù ở mức trung bình đến cao (0,22 - 0,38); đồng thời nếu chọn lọc tăng khả năng kháng bệnh ở giai đoạn cá giống không làm giảm khả năng kháng bệnh ở giai đoạn cá hương và tăng trưởng khi thu hoạch nhờ vào tương quan thuận giữa các tính trạng với nhau. Nghiên cứu đã đề xuất được tính trạng sống chết tại cắt ngang tỉ lệ sống toàn bộ cá thí nghiệm 50% và 25% để xử lý số liệu nhằm ước tính giá trị chọn giống cho chọn lọc.

- Nghiên cứu các giải pháp kỹ thuật hỗ trợ nâng cao hiệu quả của chọn giống cá tra kháng bệnh trong tương lai với các kết quả đạt được:

- Nghiên cứu chỉ thị phân tử microsatellite truy xuất phả hệ các gia đình cá tra phục vụ chọn giống: nghiên cứu sử dụng 10 microsatellite trong 01 bộ chỉ thị multiplex PCR. Nghiên cứu thực hiện sàng lọc các microsatellite đa hình, ổn định, phù hợp cho truy xuất phả hệ trên 50 mẫu cá tra bố mẹ G0, 50 mẫu cá con G1 và truy xuất phả hệ trên 50 gia đình bằng phương pháp xác định bố mẹ dựa trên khả năng. Các chỉ thị microsatellite trong phân tích truy xuất phả hệ được tính tần số null-alen, tỉ lệ lỗi ghi nhận kiểu gen và tỉ lệ mismatch. Kết quả cho thấy, 10 microsatellite đều ổn định, đa hình và phù hợp cho truy xuất phả hệ. Khi truy xuất phả hệ trên 50 gia đình sử dụng 10 microsatellite, Pahy-02 có tần số null-alen cao nên bị loại trừ ra khỏi truy xuất phả hệ. Bộ chỉ thị còn lại gồm 9 microsatellite có tỉ lệ truy xuất cả bố và mẹ đúng trong tất cả các gia đình cao (93,4%), đặc biệt trên gia đình con bố có half-sib (94,0%). Do đó, có thể ứng dụng 9 chỉ thị microsatellite vào truy xuất các gia đình cá tra chọn giống thay cho phương pháp đánh dấu vật lí như dấu PIT.

- Đánh giá và đề xuất chỉ tiêu miễn dịch tiềm năng là tình trạng kháng bệnh gan thận mũ phục vụ chọn giống: nghiên cứu lựa chọn hai nhóm gia đình cá giống kháng bệnh cao và thấp (3 gia đình/nhóm) thông qua giá trị chọn giống ước tính (EBV) tại giai đoạn cắt ngang tỉ lệ cá sống toàn bộ cá thí nghiệm 50% trong thí nghiệm cảm nhiễm. Hai nhóm gia đình kháng bệnh cao và thấp này tiếp tục được gây cảm nhiễm nhằm đánh giá khả năng đáp ứng miễn dịch và xác định các chỉ tiêu miễn dịch giúp đánh giá được khả năng kháng bệnh của các cá thể phục vụ chọn giống. Tổng 119 cá thể KBC và KBT được thu mẫu máu và mẫu mô để đánh giá khả năng đáp ứng miễn dịch (tổng hồng cầu, tổng bạch cầu, bạch cầu đơn nhân, trung tính, lympho, trung tâm đại thực bào sắc tố ở gan, thận và lách và khả năng thực bào của đại thực bào, hiệu giá kháng thể) qua các thời điểm: ngay trước khi cảm nhiễm, 24, 48, 264 và 312 giờ sau cảm nhiễm. Kết quả cho thấy các chỉ tiêu miễn dịch đều có tiềm năng xác định các cá thể thuộc nhóm KBC hay KBT ở các thời điểm 24 - 48 hpi và 264 - 312 hpi, đặc biệt giai đoạn 24 - 48 hpi với các chỉ tiêu miễn dịch gồm bạch cầu trung tính, hiệu giá kháng thể, trung tâm đại thực bào ở gan.

## SUMMARY

Research on selective breeding of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) resistant to Bacillary Necrosis of Pangasius (BNP) in G1 and technical solutions to apply for the next generation of selection were carried out and achieved main results as following:

- Genetic parameters' estimation for resistance to BNP and suggestion for selection in the G1 generation:

There were 155 full-sib and half-sib families produced. There were 130 families successfully nursed up till tagging size. Fish to be challenged (a total of 7,664 fish) were tagged by Passive Integrated Transponder (PIT) and then transferred to two replicate tanks, 16,000 litres each tank. The number of fish stocked in tank 1 and tank 2 was 3,832/tank, respectively and the density in challenge-test tanks was 1 fish/4.1 litres of water. The water temperature was from 26 - 28°C. Bacterial strain *Edwardsiella ictaluri* Gly09M was used in the challenge-test experiment by combined cohabitant method with the ratio of cohabitant fish to the number of test fish 35% and bacteria addition to the test tanks at a density of  $10^5$  bacteria/mL water applied. Moreover, siblings of 130 challenged families, 45 individuals per family and a total of 5,838 fish, were also tagged and communally stocked in an earthen pond of 2,000 m<sup>2</sup> for growth test. After 156 days, fish were harvested and recorded data on body weight, body length and survival. In addition, genetic parameters' estimation was also done from challenge experiment data on fry stage. Thirty three families with 50 individuals per family were used for the experiment. Linear mixed model was used to estimate genetic parameters of BNP resistance at fry, fingerling stage and growth and survival at harvest. The heritability at 50%, 25% and the end of the challenge test truncated points in the fingerling stage was medium to high (0.22 - 0.38). Moreover, selection for improving disease resistance in the fingerling stage did not adversely change to the resistance to this disease in the fry stage and growth and survival at harvest due to their positive correlation between them. The study proposed survival traits at 50% and 25% truncated points are used to estimate breeding values.

- Study technical solutions to improve the efficiency of future selection:



- Research on microsatellite markers to determine the pedigree of striped catfish families for selective breeding: the study used 10 microsatellites from one multiplex PCR sets which have been previously developed and optimized. The research firstly screened for the polymorphic and stable microsatellites on 50 samples of parental base population (G0) and 50 samples of their offsprings (G1) for parentage assignment by the likelihood-based method. All microsatellite markers in pedigree were calculated for null-allele frequency, genotyping error rate, and mismatches. Ten microsatellites were stable and polymorphic, which were suitable for parentage assignment. However, Pahy-02 showed a relatively high frequency of null-allele on the tested samples. As a result, this research analysed data to verify the relationship between parent and offspring on only 9 microsatellites with the exclusion of Pahy-02. The accurate rate of parentage assignment reached 93.4%, of which the rate for families with none half-sib was 93.0% and the rate for families with half-sib was 94.0%. This result implied that 9 microsatellite makers can be used in the parentage assignment in striped catfish families instead of using PIT tag.

- Evaluation and selection of potential immune response markers to be the trait of BNP resistance in selective breeding: this study selected two groups of resistant and susceptible families (3 families each group) through average estimated breeding values for disease resistance at 50% truncated point survival in the challenged experiments. The two groups, resistant and susceptible families were again infected to assess the immune responses and identify suitable immune response characters for selective breeding purposes. A total of 119 individuals was used to collect blood and tissue samples for analysis (including total red blood cell, white blood cell, monocytes, neutrophils, lymphocytes, and melano-macrophage centers in liver, kidney and spleen and phagocytosis of macrophages, antibody titers) at the truncated points: prior infection, 24, 48, 264 and 312 hour post infection (hpi). The results show that all immunological indicators have the potential to identify individuals belonging to the resistant or susceptible families group at the time of 24 - 48 hpi and 264 - 312 hpi, especially the period of 24 - 48 hpi with immune parameters as neutrophils, antibody titers, and liver macrophage centers.

# MỤC LỤC

## TRANG

Trang tựa .....	i
Lời cam đoan.....	ii
Lời cảm ơn .....	iii
Mục lục.....	ix
Danh mục các ký hiệu, chữ viết tắt .....	xv
Danh mục tên khoa học các loài .....	xviii
Danh mục các bảng .....	xix
Danh mục các hình .....	xxi
Danh mục phụ lục .....	xxiii
<b>MỞ ĐẦU .....</b>	<b>1</b>
<b>CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....</b>	<b>7</b>
1. 1. Tổng quan về nghề nuôi cá tra .....	7
1.1.1. Tình hình sản xuất và xuất khẩu cá tra.....	7
1.1.2. Tình hình dịch bệnh và các phương pháp phòng, trị bệnh cho cá tra .....	7
1.2. Chọn giống kháng bệnh các đối tượng thủy sản .....	9
1.2.1. Chọn giống kháng bệnh các đối tượng thủy sản trên thế giới .....	9
1.2.1.1. Các đối tượng và các tính trạng được chọn giống trên thế giới .....	9
1.2.1.2. Các chương trình chọn giống kháng bệnh trên thế giới .....	10
1.2.2. Chọn giống kháng bệnh các đối tượng thủy sản ở Việt Nam .....	18
1.2.2.1. Các đối tượng và các tính trạng được chọn giống ở Việt Nam.....	18
1.2.2.2. Chọn giống theo tính trạng kháng bệnh ở Việt Nam .....	19
1.3. Các giải pháp kỹ thuật hỗ trợ nâng cao hiệu quả của chọn giống trên động vật thủy sản .....	21
1.3.1. Các ứng dụng của chỉ thị phân tử để truy xuất phả hệ trong các chương trình chọn giống trên động vật thủy sản .....	21
1.3.1.1. Các chỉ thị phân tử được dùng trong truy xuất phả hệ.....	21
1.3.1.2. Microsatellite dùng trong truy xuất phả hệ .....	23

1.3.2. Các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch được nghiên cứu phục vụ chọn giống kháng bệnh trên động vật thủy sản .....	24
<b>CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>28</b>
2.1. Phương pháp cho nội dung 1 về ứng dụng di truyền số lượng ước tính các thông số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mù ở thế hệ G1 cá tra và đề xuất chọn lọc .....	28
2.1.1. Nuôi vỗ cá bố mẹ G0, phối ghép cặp để sản xuất gia đình đàn con G1, ương nuôi các gia đình G1 đến kích cỡ đánh dấu và đánh dấu từng cá thể.....	28
2.1.1.1. Nuôi vỗ cá bố mẹ G0 .....	28
2.1.1.2. Phối ghép cặp để sản xuất gia đình đàn con G1.....	29
2.1.1.3. Ấp trứng cá tra.....	29
2.1.1.4. Ương cá bột lên cá hương .....	30
2.1.1.5. Ương nuôi các gia đình cá hương đến kích cỡ đánh dấu .....	30
2.1.1.6. Đánh dấu các gia đình và thuần dưỡng sau đánh dấu .....	31
2.1.2. Cảm nhiễm bệnh gan thận mù các cá thể và gia đình cá hương và cá giống G1 để đánh giá khả năng kháng bệnh .....	33
2.1.2.1. Thuần cá thí nghiệm và chuẩn bị vi khuẩn trước thí nghiệm cảm nhiễm....	33
2.1.2.2. Kiểm tra cá trước thí nghiệm cảm nhiễm.....	33
2.1.2.3. Cảm nhiễm bệnh gan thận mù các gia đình cá hương và cá giống.....	34
2.1.2.4. Theo dõi các thông số môi trường và tái phân lập vi khuẩn trong quá trình cảm nhiễm .....	35
2.1.2.5. Thu thập số liệu.....	36
2.1.3. Nuôi tăng trưởng các cá thể và gia đình cá giống G1 để đánh giá tăng trưởng và tỉ lệ sống lúc thu hoạch.....	36
2.1.3.1. Nuôi tăng trưởng các gia đình cá giống .....	36
2.1.3.2. Thu thập số liệu.....	37
2.1.4. Ước tính hệ số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mù ở giai đoạn cá hương và cá giống và tính trạng tăng trưởng và tỉ lệ sống lúc thu hoạch ở G1 .....	37

2.1.4.1. Hệ số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mũ .....	37
2.1.4.2. Hệ số di truyền các tính trạng tăng trưởng và tỉ lệ sống lúc thu hoạch.....	38
2.1.5. Ước tính tương quan di truyền giữa các tính trạng kháng bệnh hai giai đoạn cá hương và cá giống, kháng bệnh giai đoạn cá giống với tính trạng tăng trưởng và tỉ lệ sống lúc thu hoạch.....	39
2.1.5.1. Tương quan di truyền giữa các tính trạng kháng bệnh hai giai đoạn cá hương và cá giống .....	39
2.1.5.2. Tương quan giữa các tính trạng kháng bệnh ở giai đoạn cá giống .....	39
2.1.5.3. Tương quan di truyền giữa kháng bệnh giai đoạn cá giống với tính trạng tăng trưởng và tỉ lệ sống lúc thu hoạch.....	40
2.1.6. Ước tính hiệu quả chọn lọc của tính trạng kháng bệnh gan thận mũ giai đoạn cá giống trên quần thể G1 .....	40
2.1.7. Đề xuất định hướng chọn lọc thế hệ G1.....	40
2.2. Phương pháp cho nội dung 2 về nghiên cứu các giải pháp kĩ thuật hỗ trợ nâng cao hiệu quả của chọn giống cá tra kháng bệnh trong tương lai.....	41
2.2.1. Phương pháp về ứng dụng di truyền phân tử nghiên cứu bộ chỉ thị phân tử microsatellite truy xuất phả hệ các gia đình cá tra phục vụ chọn giống.....	41
2.2.1.1. Vật liệu nghiên cứu .....	41
2.2.1.2. Phương pháp tách chiết ADN tổng số, PCR và điện di mao quản, ghi nhận sản phẩm .....	43
2.2.1.3. Sàng lọc các microsatellite ổn định, đa hình và phù hợp cho thử nghiệm truy xuất phả hệ .....	45
2.2.1.4. Thử nghiệm truy xuất phả hệ trên 50 gia đình gồm 90 cá bố mẹ G0 và 500 cá con G1 .....	46
2.2.2. Phương pháp về đánh giá và đề xuất chỉ tiêu miễn dịch tiềm năng là tính trạng kháng bệnh gan thận mũ phục vụ chọn giống trong tương lai.....	48
2.2.2.1. Lựa chọn hai nhóm gia đình kháng bệnh cao và thấp dựa vào giá trị EBV giai đoạn cá giống .....	48

2.2.2.2. Cảm nhiễm và đánh giá các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu và đặc hiệu của hai nhóm gia đình kháng bệnh cao và thấp.....	48
2.2.2.3. Đánh giá và đề xuất chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch làm chỉ tiêu xác định khả năng kháng bệnh gan thận mù .....	50
<b>CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN .....</b>	<b>53</b>
3.1. Ứng dụng di truyền số lượng ước tính các thông số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mù ở thế hệ G1 cá tra và đề xuất chọn lọc .....	53
3.1.1. Nuôi vỗ cá bố mẹ G0, phối ghép cặp để sản xuất gia đình đàn con G1, ương nuôi các gia đình G1 đến kích cỡ đánh dấu và đánh dấu từng cá thể .....	53
3.1.1.1. Kết quả nuôi vỗ cá bố mẹ G0.....	53
3.1.1.2. Kết quả ương nuôi các gia đình từ giai đoạn cá bột đến giai đoạn đánh dấu .....	55
3.1.1.3. Kết quả đánh dấu các gia đình cá giống.....	56
3.1.2. Kết quả cảm nhiễm bệnh gan thận mù các cá thể và gia đình cá hương và cá giống G1 để đánh giá khả năng kháng bệnh.....	56
3.1.2.1. Kết quả thí nghiệm thăm dò liều cảm nhiễm .....	56
3.1.2.2. Kết quả thí nghiệm cảm nhiễm trên 33 gia đình cá hương và 130 gia đình cá giống để đánh giá khả năng kháng bệnh .....	61
3.1.3. Kết quả nuôi tăng trưởng các cá thể và gia đình cá giống G1 để đánh giá tăng trưởng và tỉ lệ sống lúc thu hoạch.....	68
3.1.4. Kết quả ước tính các hệ số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mù ở giai đoạn cá hương và cá giống, tính trạng tăng trưởng và tỉ lệ sống lúc thu hoạch ở G1 .....	70
3.1.4.1. Hệ số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mù .....	71
3.1.4.2. Hệ số di truyền các tính trạng tăng trưởng và tỉ lệ sống lúc thu hoạch.....	75
3.1.5. Kết quả ước tính tương quan di truyền giữa các tính trạng kháng bệnh hai giai đoạn cá hương và cá giống, kháng bệnh giai đoạn cá giống với tính trạng tăng trưởng và tỉ lệ sống lúc thu hoạch.....	76

3.1.5.1. Tương quan di truyền giữa các tính trạng kháng bệnh hai giai đoạn cá hương và cá giống .....	76
3.1.5.2. Tương quan di truyền giữa các tính trạng kháng bệnh quan sát của 130 gia đình cá giống .....	78
3.1.5.3. Tương quan di truyền giữa kháng bệnh giai đoạn cá giống với tính trạng tăng trưởng và tỉ lệ sống lúc thu hoạch.....	79
3.1.6. Hiệu quả chọn lọc ước tính trên tính trạng kháng bệnh gan thận mũ giai đoạn cá giống trên quần thể G1 .....	84
3.1.7. Đề xuất định hướng chọn lọc thế hệ G1.....	84
3.2. Kết quả ứng dụng di truyền phân tử nghiên cứu các giải pháp kỹ thuật hỗ trợ nâng cao hiệu quả của chọn giống cá tra kháng bệnh trong tương lai.....	86
3.2.1. Kết quả ứng dụng di truyền phân tử nghiên cứu bộ chỉ thị phân tử microsatellite truy xuất phả hệ các gia đình cá tra phục vụ chọn giống.....	86
3.2.1.1. Kết quả sàng lọc các microsatellite ổn định, đa hình và phù hợp cho thử nghiệm truy xuất phả hệ.....	86
3.2.1.2. Kết quả thử nghiệm truy xuất phả hệ trên 50 gia đình gồm 90 cá bố mẹ G0 và 500 cá con G1.....	90
3.2.1.3. Đánh giá về khả năng ứng dụng giải pháp kỹ thuật đánh dấu bằng chỉ thị phân tử vào chọn giống cá tra kháng bệnh gan thận mũ các thế hệ tiếp theo .....	96
3.2.2. Kết quả đánh giá và đề xuất chỉ tiêu miễn dịch tiềm năng là tính trạng kháng bệnh gan thận mũ phục vụ chọn giống trong tương lai .....	96
3.2.2.1. Kết quả lựa chọn hai nhóm gia đình kháng bệnh cao và thấp dựa vào giá trị EBV giai đoạn cá giống .....	96
3.2.2.2. Đánh giá các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu và đáp ứng miễn dịch đặc hiệu của hai nhóm gia đình kháng bệnh cao và thấp.....	98
3.2.2.3. Đánh giá và đề xuất chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch làm chỉ tiêu xác định khả năng kháng bệnh gan thận mũ .....	105

3.2.2.4. Đánh giá về khả năng ứng dụng giải pháp kỹ thuật chẩn đoán khả năng kháng bệnh với các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch vào chọn giống cá tra kháng bệnh gan thận mũ các thế hệ tiếp theo .....	117
<b>KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ .....</b>	<b>120</b>
1. Kết luận .....	120
2. Kiến nghị .....	121
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>122</b>
<b>DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN .....</b>	<b>134</b>
<b>PHỤ LỤC .....</b>	<b>135</b>

## DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
AIC	Akaike Information Criterion	Giá trị kiểm định mô hình
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism	Đa hình độ dài đoạn nhân chọn lọc
AUC	Area Under the Curve	Khu vực dưới đường cong
$\sigma_A^2$	Additive genetic variance	Phương sai di truyền cộng gộp
$\sigma_C^2$	Common environmental variance	Phương sai ảnh hưởng của môi trường ương riêng rẽ đến kích cỡ đánh dấu
$\sigma_E^2$	Residual variance	Phương sai số dư
$\sigma_P^2$	Phenotypic variance	Phương sai kiểu hình
bp	Base pair	Cặp bazơ
BMA	Bayesian Model Average	Mô hình tiên lượng theo Bayes
BHIB	Brain Heart Infusion Broth	Môi trường nuôi cấy vi sinh vật
$\beta$	-	Hệ số hồi quy
$c^2$	Common environmental effect	Ảnh hưởng môi trường ương riêng rẽ đến kích cỡ đánh dấu
Ctv	-	Cộng tác viên
CV	Coefficient of variation	Hệ số biến thiên
CFU	Colony Forming Unit	Đơn vị hình thành khuẩn lạc
DO	Dissolved Oxygen	Hàm lượng oxy hòa tan
EBV	Estimated Breeding Value	Giá trị chọn giống ước tính
e	-	Ảnh hưởng ngẫu nhiên của số dư
<i>E. ictaluri</i>	<i>Edwardsiella ictaluri</i>	Vi khuẩn <i>Edwardsiella ictaluri</i>
GIFT	Genetically Improved Farmed Tilapia	Cá rô phi đã cải thiện di truyền
HCG	Hormon Chorionic Gonadotropin	Kích dục tổ màng đê mê
H <sub>E</sub>	Expected heterozygosity	Dị hợp tử mong đợi
H <sub>O</sub>	Observed heterozygosity	Dị hợp tử quan sát



$h^2$	Heritability	Hệ số di truyền
HGKT	–	Hiệu giá kháng thể
hpi	Hour post infection	Giờ sau gây cảm nhiễm
HL	Harvest length	Chiều dài tổng lúc thu hoạch
HR	Hazard ratio	Tỉ số Hazard
HW	Harvest weight	Khối lượng thân lúc thu hoạch
HWE	Hardy-Weinberg Equilibrium	Cân bằng Hardy-Weinberg
i	Selection intensity	Cường độ chọn lọc
KBC	–	Kháng bệnh cao
KBT	–	Kháng bệnh thấp
LD <sub>50</sub>	50 Lethal Dose	Liều gây chết 50% động vật thí nghiệm
LYM	Lymphocyte	Bạch cầu lympho
MONO	Monocyte	Bạch cầu đơn nhân
$\mu$	–	Trung bình
N <sub>A</sub>	Number of allele	Số lượng alen
NEU	Neutrophil	Bạch cầu trung tính
ODD	ODD ratio	Tỉ số ODD
PA	Phagocytic activity	Hoạt lực thực bào
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng khuếch đại gen
PI	Phagocytic index	Chỉ số thực bào
PIC	Polymorphic Information Content	Thông tin đa hình
PIT	Passive Integrated Transponder	Dấu từ PIT
$r_A$	Additive correlation	Tương quan di truyền cộng gộp
$r_G$	Genetic correlation	Tương quan di truyền
R	Response to selection	Hiệu quả chọn lọc
SNP	Single nucleotide polymorphism	Đa hình nucleotide đơn
Sen	Sensitivity	Độ nhạy

Spe	Specificity	Độ đặc hiệu
SSR	Simple sequence repeat	Đoạn có trình tự đơn lặp lại
SUR	Survival	Tính trạng sống/chết
THC	–	Tổng hồng cầu
TBC	–	Tổng bạch cầu
TB	–	Trung bình
TIME	Survival time	Thời gian sống
TTĐTĐTB	–	Trung tâm đại thực bào sắc tố
VASEP	Viet Nam Association of Seafood Exporters and Producers	Hiệp hội Chế biến và Xuất khẩu Thủy sản Việt Nam
VIE	Visible Implant Elastomer	Đánh dấu bằng phẩm màu huỳnh quang
Viện NCNTTS	–	Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản
VIF	Variance Inflation Factor	Hệ số kiểm định tính đa cộng tuyến
WSSV	White Spot Syndrome Virus	Vi-rút gây bệnh đốm trắng

## DANH MỤC TÊN KHOA HỌC CÁC LOÀI

Tên Latinh các loài	Tên tiếng Việt
<i>Crassostrea gigas</i>	Hàu Thái Bình Dương
<i>Cyprinus carpio</i>	Cá chép
<i>Ictalurus punctatus</i>	Cá nheo Mỹ
<i>Haliotis tuberculata</i>	Bào ngư Châu Âu
<i>Labeo rohita</i>	Cá rô hu
<i>Lates calcarifer</i>	Cá vược
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Tôm thẻ chân trắng
<i>Lota lota L</i>	Cá tuyết
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Tôm càng xanh
<i>Megalobrama amblycephala</i>	Cá tráp
<i>Meretrix lyrata</i>	Nghêu trắng
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Cá hồi Coho
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Cá hồi vân
<i>Oreochromis spp.</i>	Cá rô phi đỏ
<i>Oreochromis niloticus</i>	Cá rô phi
<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	Cá tra
<i>Peneaus monodon</i>	Tôm sú
<i>Salmo salar</i>	Cá hồi Đại Tây Dương
<i>Salvelinus fontinalis</i>	Cá hồi chấm hồng
<i>Sparidae</i>	Cá tráp

## DANH MỤC CÁC BẢNG

<b>BẢNG</b>	<b>TRANG</b>
<b>Bảng 1.1.</b> Kết quả nghiên cứu khả năng kháng bệnh gan thận mũ trên các quần thể cá tra tại Viện NCNTTS II giai đoạn 2008 - 2015 .....	20
<b>Bảng 2.1.</b> Trình tự môi của các microsatellite được sử dụng trong nghiên cứu .....	42
<b>Bảng 3.1.</b> Số lượng cá tra bố mẹ ghép cặp sinh sản thế hệ G1.....	53
<b>Bảng 3.2.</b> Kết quả nuôi vỗ và chỉ tiêu sinh sản của cá bố mẹ .....	54
<b>Bảng 3.3.</b> Kết quả ương nuôi riêng rẽ các gia đình .....	55
<b>Bảng 3.4.</b> Kết quả đánh dấu từ PIT các gia đình phục vụ chọn giống .....	56
<b>Bảng 3.5.</b> Các thông tin thủy lý hóa nước trong quá trình cảm nhiễm.....	61
<b>Bảng 3.6.</b> Thống kê mô tả các tính trạng quan sát theo thời gian trong thí nghiệm cảm nhiễm trên 33 gia đình cá ở giai đoạn cá hương.....	66
<b>Bảng 3.7.</b> Thống kê mô tả các tính trạng quan sát theo thời gian trong thí nghiệm cảm nhiễm trên 130 gia đình cá ở giai đoạn cá giống.....	68
<b>Bảng 3.8.</b> Thống kê mô tả các tính trạng tăng trưởng, tỉ lệ sống lúc thu hoạch.....	70
<b>Bảng 3.9.</b> Các phương sai thành phần và hệ số di truyền ước tính ( $h^2$ ) cho tính trạng kháng bệnh gan thận mũ cắt ngang theo tỉ lệ sống khác nhau ở giai đoạn cá hương.....	71
<b>Bảng 3.10.</b> Các phương sai thành phần và hệ số di truyền ước tính ( $h^2$ ) cho tính trạng kháng bệnh gan thận mũ cắt ngang theo tỉ lệ sống khác nhau ở giai đoạn cá giống.....	74
<b>Bảng 3.11.</b> Các phương sai thành phần và hệ số di truyền ước tính ( $h^2$ ) cho tính trạng tăng trưởng, tỉ lệ sống lúc thu hoạch .....	76
<b>Bảng 3.12.</b> Tương quan di truyền giữa tính trạng tỉ lệ sống và thời gian sống của 33 gia đình cá hương và 33 gia đình cá giống.....	77
<b>Bảng 3.13.</b> Tương quan di truyền giữa tính trạng tỉ lệ sống và thời gian sống ở giai đoạn cá giống.....	79

<b>Bảng 3.14.</b> Tương quan di truyền giữa tính trạng tăng trưởng và tỉ lệ sống lúc thu hoạch và tính trạng kháng bệnh gan thận mù tại các cắt ngang trong quá trình cảm nhiễm .....	80
<b>Bảng 3.15.</b> Hiệu quả chọn lọc ước tính cho tính trạng kháng bệnh gan thận mù giai đoạn cá giống trên quần thể G1 .....	84
<b>Bảng 3.16.</b> Thông tin đa dạng di truyền chung của 10 microsatellite trên quần thể bố mẹ G0 và đàn con G1 trong nghiên cứu .....	88
<b>Bảng 3.17.</b> Kết quả xác định phả hệ 50 gia đình cá tra chọn giống bằng 10 microsatellite.....	91
<b>Bảng 3.18.</b> Các sai số ước tính trong quá trình truy xuất .....	93
<b>Bảng 3.19.</b> Kết quả xác định phả hệ 50 gia đình cá tra chọn giống bằng 9 microsatellite.....	94
<b>Bảng 3.20.</b> Khả năng truy xuất phả hệ mô phỏng của bộ chỉ thị gồm các microsatellite .....	95
<b>Bảng 3.21.</b> Xác suất (%) xác định được cá thể thuộc gia đình kháng bệnh cao hay thấp của các thông số miễn dịch.....	106
<b>Bảng 3.22.</b> Mô hình đơn biến dự đoán khả năng phân biệt cá thể kháng bệnh cao hay thấp của các thông số miễn dịch .....	108
<b>Bảng 3.23.</b> Mô hình đa biến dự đoán khả năng phân biệt cá thể kháng bệnh cao hay thấp của các thông số miễn dịch.....	110
<b>Bảng 3.24.</b> Khả năng phân biệt các cá thể kháng bệnh cao hay thấp của các thông số miễn dịch giai đoạn 24 - 48 giờ sau cảm nhiễm .....	117

## DANH MỤC CÁC HÌNH

<b>HÌNH</b>	<b>TRANG</b>
<b>Hình 2.1.</b> Sơ đồ bố trí thí nghiệm Nội dung 1 về ứng dụng di truyền số lượng ước tính các thông số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mỡ ở thể hệ G1 cá tra và đề xuất chọn lọc .....	32
<b>Hình 2.2.</b> Sơ đồ bố trí thí nghiệm Nội dung 2 về ứng dụng di truyền phân tử nghiên cứu bộ chỉ thị phân tử microsatellite truy xuất phả hệ các gia đình cá tra phục vụ chọn giống.....	41
<b>Hình 2.3.</b> Biểu đồ hình ảnh tín hiệu của microsatellite Pahy-06 (motif lặp là 2 nucleotide). .....	45
<b>Hình 2.4.</b> Sơ đồ bố trí thí nghiệm Nội dung 2 về đánh giá và đề xuất chỉ tiêu miễn dịch tiềm năng là tính trạng kháng bệnh gan thận mỡ.....	52
<b>Hình 3.1.</b> Tỷ lệ chết tích lũy (%) của cá hương trong thí nghiệm thăm dò.....	57
<b>Hình 3.2.</b> Liều LD <sub>50</sub> cá hương nhiễm vi khuẩn chủng Gly09M qua các ngày cảm nhiễm .....	58
<b>Hình 3.3.</b> Tỷ lệ chết tích lũy (%) của cá giống trong thí nghiệm thăm dò xác định tỷ lệ ghép cá.....	59
<b>Hình 3.4.</b> Tỷ lệ chết tích lũy (%) của cá giống trong thí nghiệm thăm dò: xác định liều bổ sung vi khuẩn vào bể cảm nhiễm.....	60
<b>Hình 3.5.</b> Kết quả kiểm tra các đặc điểm về hình thái của tác nhân gây bệnh phân lập được từ cá bệnh trong quá trình cảm nhiễm.. .....	62
<b>Hình 3.6.</b> Đường biểu diễn Kalper-Meier xác suất sống sót tích lũy của 33 gia đình. ....	65
<b>Hình 3.7.</b> Đường biểu diễn Kalper-Meier xác suất sống sót tích lũy của 130 gia đình. ....	67
<b>Hình 3.8.</b> Khối lượng, chiều dài và tỷ lệ chết của 130 gia đình cá khi thu hoạch. ...	69
<b>Hình 3.9.</b> Một số alen đặc hiệu được khuếch đại trong phản ứng Multiplex PCR.....	87

<b>Hình 3.10.</b> Đường biểu diễn Kalper-Meier xác suất sống sót tích lũy của hai nhóm gia đình cá tra kháng bệnh cao (KBC) và thấp (KBT). .....	97
<b>Hình 3.11.</b> So sánh tổng hồng cầu sau khi cảm nhiễm <i>E. ictaluri</i> của hai nhóm gia đình cá tra KBC và KBT. ....	99
<b>Hình 3.12.</b> So sánh tổng bạch cầu và các loại bạch cầu sau khi cảm nhiễm <i>E. ictaluri</i> của hai nhóm gia đình cá tra KBC và KBT. ....	100
<b>Hình 3.13.</b> So sánh số lượng trung tâm đại thực bào sắc tố và hoạt lực thực bào của đại thực bào sau khi cảm nhiễm <i>E. ictaluri</i> của hai nhóm gia đình cá tra KBC và KBT. ....	101
<b>Hình 3.14.</b> So sánh hiệu giá kháng thể sau khi cảm nhiễm <i>E. ictaluri</i> của hai nhóm gia đình cá tra KBC và KBT. ....	103
<b>Hình 3.15.</b> Đường cong ROC các giai đoạn trong quá trình cảm nhiễm.. ....	112
<b>Hình 3.16.</b> Xác suất (%) liên quan đến xác định được cá thể thuộc gia đình KBC hay KBT qua mô hình BMA tại giai đoạn 24 - 48 hpi. ....	115
<b>Hình 3.17.</b> Độ nhạy và độ đặc hiệu của mô hình phân biệt khả năng kháng bệnh giai đoạn 24 - 48 hpi.. ....	116

## DANH MỤC PHỤ LỤC

<b>Phụ lục 1.</b> Thông tin thông số di truyền của tính trạng kháng bệnh gan thận mỡ trên quần thể G0.....	136
<b>Phụ lục 2.</b> Danh sách cá bố mẹ G0 nuôi vỗ cho sinh sản G1.....	136
<b>Phụ lục 3.</b> Kiểm tra mức độ thành thực cá bố mẹ G0 – Phục vụ sinh sản tạo G1 ..	136
<b>Phụ lục 4.</b> Tỉ lệ nở, tỉ lệ thụ tinh của các đợt sinh sản gia đình G1 từ bố mẹ G0 ..	138
<b>Phụ lục 5.</b> Thông tin chi tiết về sinh sản, đánh dấu, cảm nhiễm và nuôi tăng trưởng các gia đình cá .....	139
<b>Phụ lục 6.</b> Thông tin thu mẫu xét nghiệm bệnh của các gia đình cá trước và sau khi cảm nhiễm.....	140
<b>Phụ lục 7a.</b> Các chỉ tiêu theo dõi cho thí nghiệm cảm nhiễm.....	143
<b>Phụ lục 7b.</b> Các chỉ tiêu theo dõi cho thí nghiệm nuôi tăng trưởng.....	144
<b>Phụ lục 8.</b> Thông tin về các ảnh hưởng đưa vào mô hình ước tính các thông số di truyền .....	145
<b>Phụ lục 9.</b> Các phương pháp phân tích định lượng các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch của hai nhóm gia đình kháng bệnh cao và kháng bệnh thấp.....	145
<b>Phụ lục 10.</b> Tỉ lệ đẻ trứng của cá cái G0, sinh sản tạo G1 .....	147
<b>Phụ lục 11.</b> Tỉ lệ nở, tỉ lệ thụ tinh của các đợt sinh sản gia đình G1 từ bố mẹ G0	148
<b>Phụ lục 12.</b> Các thông tin thủy lý hóa nước .....	149
<b>Phụ lục 13.</b> Kết quả đánh dấu các gia đình cá .....	149
<b>Phụ lục 14.</b> Kết quả số cá chết trong thí nghiệm thăm dò liều cảm nhiễm trên cá hương.....	150
<b>Phụ lục 15.</b> Kết quả số cá chết trong thí nghiệm thăm dò liều cảm nhiễm trên cá giống .....	150
<b>Phụ lục 16.</b> Kết quả phát hiện tác nhân gây bệnh trong thí nghiệm cảm nhiễm trên cá hương và cá giống.....	152



<b>Phụ lục 17.</b> Biểu hiện triệu chứng, bệnh tích của 33 gia đình cá hương trong quá trình cảm nhiễm.....	153
<b>Phụ lục 18.</b> Biểu hiện triệu chứng, bệnh tích của 130 gia đình cá giống trong quá trình cảm nhiễm .....	155
<b>Phụ lục 19.</b> Tỷ lệ chết và thời gian chết trên 130 gia đình cá giống trong quá trình cảm nhiễm tại các giai đoạn cắt ngang .....	159
<b>Phụ lục 20.</b> Kết quả ước tính hệ số di truyền trên cá hương từ ASReml .....	160
<b>Phụ lục 21.</b> Tương quan EBV giữa các tính trạng kháng bệnh trên cá hương và cá giống .....	161
<b>Phụ lục 22.</b> Kết quả xử lý đa dạng di truyền 50 cá thể bố mẹ .....	163
<b>Phụ lục 23.</b> Kết quả xử lý đa dạng di truyền 50 cá thể đàn con.....	164
<b>Phụ lục 24.</b> Truy xuất phả hệ với 10 microsatellite .....	165
<b>Phụ lục 25.</b> Kiểm tra tần số null-alen của 10 microsatellite trên 90 cá thể bố mẹ và 500 cá thể con .....	166
<b>Phụ lục 26.</b> Truy xuất phả hệ với 9 microsatellite .....	167
<b>Phụ lục 27.</b> Kết quả chọn lọc nhóm gia đình kháng bệnh cao và thấp dựa vào EBV giai đoạn cá hương và cá giống .....	168
<b>Phụ lục 28.</b> Tỷ lệ chết và thời gian chết của 6 gia đình cá giống trong thí nghiệm cảm nhiễm .....	168
<b>Phụ lục 29.</b> Thí nghiệm thăm dò chọn thời điểm thu mẫu máu phân tích miễn dịch .....	169
<b>Phụ lục 30.</b> Sự thay đổi của các thông số miễn dịch qua các giai đoạn cảm nhiễm .....	170
<b>Phụ lục 31.</b> Sự thay đổi của các thông số miễn dịch qua các giai đoạn cảm nhiễm .....	172
<b>Phụ lục 32.</b> Kết quả xử lý mô hình tối ưu BMA từ phần mềm R phiên bản 3.5.2 (đại diện tại giai đoạn 24 giờ sau cảm nhiễm).....	173

# MỞ ĐẦU

## 1. Đặt vấn đề

Việt Nam hiện là nước đứng thứ tư trên toàn thế giới về sản xuất thủy sản với tổng sản lượng là 4,134 triệu tấn (FAO, 2020). Trong đó, sản lượng nuôi trồng cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) là 1,56 triệu tấn và giá trị xuất khẩu là 1,61 tỉ USD trong năm 2021 (VASEP, 2021). Việc nuôi cá tra thâm canh phải đối mặt với dịch bệnh xảy ra thường xuyên (Le và Cheong, 2010). Trong đó, bệnh gan thận mũ do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* (*E. ictaluri*) là một trong những bệnh phổ biến trên cá tra có thể gây chết cá với tỉ lệ đạt đến 90% nếu không được chữa trị kịp thời (Nguyễn Thị Thúy Liễu và ctv., 2011; Từ Thanh Dung và ctv., 2015). Bệnh gan thận mũ xuất hiện nhiều nhất trên cá dưới 4 tháng tuổi, đặc biệt giai đoạn cá hương 21 - 30 ngày tuổi, cá giống 40 - 90 ngày tuổi với tỉ lệ cá nhiễm bệnh lần lượt là 46% và 30% (Tran và ctv., 2020) và hầu như không thấy cá bệnh ở giai đoạn khối lượng trên 900 g (Lý Thị Thanh Loan, 2009). Có nhiều phương pháp phòng và trị bệnh cho cá hiện nay như sử dụng kháng sinh, tăng sức đề kháng thông qua bổ sung chất kích thích miễn dịch vào thức ăn, sử dụng vắc-xin và chọn giống. Tuy nhiên, khi người nuôi sử dụng kháng sinh chưa đúng cách dẫn đến tiềm ẩn nguy cơ như sự kháng thuốc ở vi khuẩn (Từ Thanh Dung và ctv., 2010), dư lượng kháng sinh trong sản phẩm nên không đáp ứng tiêu chuẩn quốc tế về xuất khẩu. Ngoài ra, người nuôi có thể tăng sức đề kháng cho cá bằng cách bổ sung chất kích thích miễn dịch (Bùi Thị Bích Hằng và Nguyễn Hoàng Vũ, 2019) hay sử dụng vắc-xin giúp mang lại hiệu quả một phần nhưng phải tiến hành lâu dài và phụ thuộc vào các yếu tố kỹ thuật. Vì vậy, các phương án này thường chưa được ứng dụng rộng rãi trong thực tế sản xuất (Das và Sahoo, 2014). Chọn giống kháng bệnh theo cách tiếp cận di truyền số lượng là giải pháp tối ưu cho hướng phát triển bền vững các đối tượng cá nuôi (Galina, 2017).

Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II (Viện NCNTTS II) đã tạo ra được quần đàn cá tra bố mẹ chọn giống kháng bệnh gan thận mũ (G0) với hệ số di truyền ước

tính của tính trạng kháng bệnh là 0,27 và hiệu quả chọn lọc là 8,3% (Trình Quốc Trọng và ctv., 2016a, b). Quần thể cá tra bố mẹ kháng bệnh gan thận mũ thế hệ đầu tiên (G0) đã được thành lập, tuy nhiên, để kiểm chứng hệ số di truyền ở G0 và mang lại hiệu quả chọn lọc cao trên tính trạng kháng bệnh tại giai đoạn cá giống và tăng trưởng sau thu hoạch, cần tiếp tục chọn lọc qua nhiều thế hệ. Ngoài ra, bệnh gan thận mũ xảy ra từ giai đoạn cá hương (Tran và ctv., 2020) đòi hỏi chọn giống ở giai đoạn này nhưng thông tin di truyền ở cá hương chưa được công bố. Đồng thời, cần nghiên cứu tương quan di truyền giữa khả năng kháng bệnh ở hai giai đoạn cá hương và cá giống để có giải pháp để nâng cao khả năng kháng bệnh đồng thời ở giai đoạn cá hương và giống. Vì vậy, cần có nghiên cứu ước tính các thông số di truyền trên tính trạng kháng bệnh ở giai đoạn cá hương và cá giống, tăng trưởng, tỉ lệ sống lúc thu hoạch nhằm định hướng cho chọn lọc con giống có khả năng kháng bệnh ở giai đoạn cá giống nhưng vẫn đảm bảo có khả năng kháng bệnh ở giai đoạn cá hương và khả năng tăng trưởng khi thu hoạch trong thế hệ thứ nhất (G1).

Trong chương trình chọn giống cá tra kháng bệnh gan thận mũ hiện nay sử dụng phương pháp đánh dấu vật lí (dấu từ PIT, Passive Integrated Transponder) để phân biệt các cá thể. Tuy nhiên, khi áp dụng đánh dấu PIT có hạn chế là các gia đình cá phải được ương riêng rẽ đến kích cỡ cá giống 15 - 20 g/con và mất thời gian khoảng 3 - 4 tháng. Do đó, ảnh hưởng của môi trường ương riêng rẽ ( $c^2$ ) ở các gia đình đến kích cỡ đánh dấu cao và phần nào ảnh hưởng đến độ chính xác khi ước tính các thông số di truyền, từ đó ảnh hưởng đến độ chính xác của chọn lọc. Hiện nay các chương trình chọn giống cá tra đang hướng đến phát triển chỉ thị phân tử (như microsatellite) để thay thế đánh dấu từ PIT. Các chỉ thị phân tử microsatellite đã được nghiên cứu để truy xuất phả hệ các gia đình cá tra chọn giống với kết quả truy xuất đạt chưa cao (81,3%; Bùi Thị Liên Hà và ctv., 2017) nên chưa thể áp dụng vào chương trình chọn giống. Vì vậy cần nghiên cứu tiếp tục để hoàn thiện bộ chỉ thị microsatellite với khả năng truy xuất cao nhằm áp dụng vào các chương trình chọn giống cá tra.

Hiện nay, các chương trình chọn giống cá tra kháng bệnh gan thận mũ sử dụng tính trạng khả năng sống sót theo dạng nhị phân (sống/chết) để xử lí số liệu sau thí

nghiệm cảm nhiễm nhằm ước tính các thông số di truyền cho chọn lọc. Thông tin về tính trạng sống/chết khi kết thúc mô hình gây bệnh thực nghiệm chưa phản ánh đầy đủ tình trạng của thủy sản trong quá trình cảm nhiễm nên có thể làm giảm độ chính xác của chọn lọc trong các chương trình chọn giống (Galina, 2017). Vì vậy, ngoài sử dụng tính trạng sống/chết, một số nghiên cứu đã cho thấy các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch là tính trạng biểu thị khả năng kháng bệnh như các loại tế bào máu, số lượng trung tâm đại thực bào sắc tố và nồng độ kháng thể (Camp và ctv., 2000; Faggion và ctv., 2021). Trên cá tra, các cơ chế đáp ứng miễn dịch thông qua sự thay đổi số lượng tổng hồng cầu, bạch cầu, hiệu giá kháng thể khi nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* đã được nghiên cứu (Trần Thị Phương Dung và ctv., 2019). Tuy nhiên, việc tìm kiếm chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch phản ánh khả năng kháng bệnh cùng với tính trạng sống/chết để áp dụng vào xử lý số liệu cho chọn lọc vẫn chưa được thực hiện. Vì vậy, cần có nghiên cứu xác định chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch phản ánh khả năng kháng bệnh phục vụ chọn giống cá tra kháng bệnh gan thận mũ trong tương lai.

Từ các luận giải trên, nghiên cứu “*Ứng dụng di truyền phân tử và di truyền số lượng phục vụ chọn giống cá tra kháng bệnh gan thận mũ*” được tiến hành để ước tính được các thông số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mũ ở giai đoạn cá hương, cá giống, tăng trưởng và tỉ lệ sống lúc thu hoạch nhằm chọn lọc nâng cao tỉ lệ sống của cá tra giống trong thế hệ G1. Đồng thời, nghiên cứu các giải pháp kỹ thuật như đánh giá khả năng truy xuất phả hệ bằng bộ chỉ thị phân tử microsatellite và đánh giá tiềm năng sử dụng các chỉ tiêu miễn dịch như là tính trạng kháng bệnh gan thận mũ, đây là cơ sở tối ưu hóa chương trình chọn giống cá tra kháng bệnh áp dụng trong tương lai nhằm nâng cao sự chính xác của chọn lọc từ đó tăng hiệu quả chọn lọc.

## **2. Mục tiêu nghiên cứu**

### *2.1. Mục tiêu chung*

Nghiên cứu ước tính các thông số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mũ và đề xuất phương án chọn lọc cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) kháng bệnh gan thận mũ thế hệ G1 và phát triển các kỹ thuật nhằm tối ưu hóa chương trình chọn giống cá tra kháng bệnh gan thận mũ dài hạn.

## 2.2. Mục tiêu cụ thể

- Nghiên cứu ước tính các thông số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mũ và đề xuất phương án chọn lọc cá tra thế hệ G1.

- Nghiên cứu các giải pháp kỹ thuật nhằm áp dụng cho chọn lọc kháng bệnh gan thận mũ nhằm tăng hiệu quả cho chương trình chọn giống cá tra kháng bệnh trong tương lai.

## 3. Nội dung nghiên cứu

*Nội dung 1. Ứng dụng di truyền số lượng ước tính các thông số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mũ ở thế hệ G1 cá tra và đề xuất chọn lọc:*

Công việc 1. Nuôi vỗ cá bố mẹ G0, phối ghép cặp để sản xuất gia đình đàn con G1, ương nuôi các gia đình G1 đến kích cỡ đánh dấu và đánh dấu từng cá thể.

Công việc 2. Cảm nhiễm bệnh gan thận mũ các cá thể và gia đình cá hương và cá giống G1 để đánh giá khả năng kháng bệnh.

Công việc 3. Nuôi tăng trưởng các cá thể và gia đình cá giống G1 để đánh giá tăng trưởng và tỉ lệ sống lúc thu hoạch.

Công việc 4. Ước tính hệ số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mũ ở giai đoạn cá hương và cá giống, tính trạng tăng trưởng và tỉ lệ sống lúc thu hoạch ở G1.

Công việc 5. Ước tính tương quan di truyền giữa các tính trạng kháng bệnh hai giai đoạn cá hương và cá giống, kháng bệnh giai đoạn cá giống với tính trạng tăng trưởng và tỉ lệ sống lúc thu hoạch.

Công việc 6. Ước tính hiệu quả chọn lọc của tính trạng kháng bệnh gan thận mũ giai đoạn cá giống trên quần thể G1.

Công việc 7. Đề xuất định hướng chọn lọc thế hệ G1.

*Nội dung 2. Nghiên cứu các giải pháp kỹ thuật hỗ trợ nâng cao hiệu quả của chọn giống cá tra kháng bệnh trong tương lai:*

*Nội dung 2.1. Ứng dụng di truyền phân tử nghiên cứu bộ chỉ thị phân tử microsatellite truy xuất phả hệ các gia đình cá tra phục vụ chọn giống*

Công việc 1. Sàng lọc các microsatellite ổn định, đa hình và phù hợp cho thử nghiệm truy xuất phả hệ.

Công việc 2. Thử nghiệm truy xuất phả hệ trên 50 gia đình gồm 90 cá bố mẹ G0 và 500 cá con G1.

*Nội dung 2.2. Đánh giá và đề xuất chỉ tiêu miễn dịch tiềm năng là tính trạng kháng bệnh gan thận mù phục vụ chọn giống trong tương lai*

Công việc 1. Lựa chọn hai nhóm gia đình kháng bệnh cao và thấp dựa vào giá trị EBV giai đoạn cá giống.

Công việc 2. Cảm nhiễm và đánh giá các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu và đặc hiệu của hai nhóm gia đình kháng bệnh cao và thấp.

Công việc 3. Đánh giá và đề xuất chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch làm chỉ tiêu xác định khả năng kháng bệnh gan thận mù cho chọn giống trong tương lai.

#### **4. Phạm vi nghiên cứu**

Nghiên cứu này sử dụng đàn bố mẹ chọn giống kháng bệnh gan thận mù (G0) được thành lập từ đề tài KC.06 tại Viện NCNTTS II. Nghiên cứu ước tính các thông số di truyền (hệ số di truyền, tương quan di truyền, hiệu quả chọn lọc) tính trạng kháng bệnh gan thận mù của 33 gia đình cá hương, 130 gia đình cá giống; tăng trưởng và tỉ lệ sống nuôi thương phẩm của 130 gia đình ở giai đoạn nuôi thương phẩm trên quần thể cá tra trong một thế hệ G1 nhằm đề xuất định hướng chọn lọc cá tra kháng bệnh G1 và các thế hệ tiếp theo.

Nghiên cứu tiến hành thí nghiệm cảm nhiễm với chủng vi khuẩn *E. ictaluri* Gly09M. Nghiên cứu kế thừa và kiểm chứng lại quy trình cảm nhiễm bằng phương pháp cho cá bệnh tiếp xúc với cá khỏe, sau đó bổ sung vi khuẩn (phương pháp cohabitant kết hợp) đã được thiết lập từ đề tài KC.06.

Nghiên cứu chỉ sử dụng 01 bộ chỉ thị phân tử gồm 10 microsatellite (Pahy-01, Pahy-02, Pahy-03, Pahy-04, Pahy-06, Pahy-10, Pahy-13, Pahy-15, Pahy-17, Pahy-18) phát triển bởi Nguyễn Văn Sáng và ctv. (2020). Nghiên cứu thử nghiệm truy xuất phả hệ trên 50 gia đình.

Đối với đề xuất chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch làm chỉ tiêu xác định khả năng kháng bệnh gan thận mù, nghiên cứu thực hiện thí nghiệm cảm nhiễm trên hai nhóm gia đình kháng bệnh cao và thấp ở quy mô thí nghiệm 3 gia đình/nhóm. Nghiên cứu

phân tích chỉ với 11 chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch phổ biến, dễ thực hiện trong các nghiên cứu chẩn đoán bệnh và đại diện cho đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu (gồm tổng hồng cầu, tổng bạch cầu, bạch cầu đơn nhân, trung tính, lympho, trung tâm đại thực bào sắc tố ở gan, thận và lách và khả năng thực bào của đại thực bào) và đáp ứng miễn dịch đặc hiệu (hiệu giá kháng thể).

## **5. Ý nghĩa khoa học, thực tiễn và tính mới của luận án**

### ***5.1. Ý nghĩa khoa học***

Nghiên cứu bổ sung thêm cơ sở khoa học về ứng dụng di truyền số lượng và di truyền phân tử, các giải pháp kỹ thuật vào chương trình chọn giống cá tra kháng bệnh gan thận mũ, đóng góp vào cơ sở dữ liệu chung về di truyền chọn giống thủy sản kháng bệnh. Đây cũng là tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo về chọn giống cá tra kháng bệnh tại nhiều giai đoạn ương nuôi.

### ***5.2. Ý nghĩa thực tiễn***

Nghiên cứu chọn giống cá tra kháng bệnh có thể áp dụng vào thực tiễn sản xuất tạo ra các con giống có khả năng kháng bệnh, trực tiếp là trên cá tra kháng bệnh G1 và tiếp theo trên các thế hệ về sau. Qua đó, giúp người nuôi giảm bớt rủi ro và hạn chế việc sử dụng hóa chất, kháng sinh trong ương nuôi, góp phần vào phát triển bền vững nghề nuôi cá tra phục vụ xuất khẩu.

### ***5.3. Tính mới của luận án***

Lần đầu tiên trong chọn giống cá tra kháng bệnh, nghiên cứu đã ước tính được các thông số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mũ ở giai đoạn cá hương cho quần thể cá tra tại Viện NCNTTS II.

Nghiên cứu áp dụng thành công bộ chỉ thị gồm 9 microsatellite mới để truy xuất phả hệ các gia đình cá tra phục vụ chọn giống, có thể thay thế việc đánh dấu từ PIT trong tương lai.

Lần đầu tiên nghiên cứu xác định được các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch phục vụ cho công tác chọn giống kháng bệnh gan thận mũ trên cá tra nhằm nâng cao hiệu quả chọn lọc cá tra kháng bệnh trong tương lai.

# CHƯƠNG 1

## TỔNG QUAN TÀI LIỆU

### 1. 1. Tổng quan về nghề nuôi cá tra

#### 1.1.1. Tình hình sản xuất và xuất khẩu cá tra

Cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) là một trong những loài cá da trơn nước ngọt có giá trị kinh tế cao được nuôi phổ biến ở đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) (Phan và ctv., 2009). Về sản xuất giống cá tra, cả nước có khoảng 120 cơ sở sản xuất giống chủ yếu ở 12 tỉnh gồm An Giang, Đồng Tháp, Tiền Giang, Cần Thơ, Vĩnh Long, Bến Tre, Hậu Giang, Sóc Trăng, Trà Vinh, Kiên Giang, Tây Ninh và Quảng Nam. Trong đó, các tỉnh Cần Thơ, An Giang và Đồng Tháp là những vùng nuôi lớn nhất (chiếm hơn 75% tổng sản lượng cá tra cả nước) (VASEP, 2020). Diện tích ương nuôi cá tra giống gần 4.000 ha với sản lượng nuôi cá tra đạt 1,56 triệu tấn và giá trị xuất khẩu đạt 1,61 tỉ USD trong năm 2021 theo báo cáo của Hiệp hội Chế biến và Xuất khẩu Thủy sản Việt Nam (VASEP, 2021). Cá tra được xác định là sản phẩm quốc gia được Thủ tướng phê duyệt tại Quyết định số 439/QĐ-TTg của Thủ Tướng Chính phủ ngày 16/04/2012 và là đối tượng chủ lực để thực hiện tái cơ cấu ngành nông nghiệp (Thủ tướng Chính phủ, 2012).

#### 1.1.2. Tình hình dịch bệnh và các phương pháp phòng, trị bệnh cho cá tra

Sản xuất cá tra đang phải đối mặt với nhiều khó khăn như việc thâm canh hóa làm cho dịch bệnh bùng phát mạnh (Từ Thanh Dung và ctv., 2010; Le và Cheong, 2010). Vào cuối năm 1998, bệnh gan thận mũ trên cá tra được ghi nhận xuất hiện lần đầu tiên tại các tỉnh An Giang, Đồng Tháp và Cần Thơ ở cá nuôi thâm canh, sau đó bệnh lan dần đến các vùng nuôi cá lân cận (Ferguson và ctv., 2001). Cá bị bệnh gan thận mũ thường bỏ ăn và bơi lờ đờ trên mặt nước với có dấu hiệu bệnh lí bên ngoài là cá gầy và mắt hơi lồi, xuất huyết ở các góc vây, đuôi (Ferguson và ctv., 2001; Dung và ctv., 2012; Pirarat và ctv., 2016), khi giải phẫu gan, thận và tỳ tạng cá xuất hiện nhiều đốm trắng đục kích cỡ 1 - 3 mm (Ferguson và ctv., 2001). Tác nhân gây bệnh này được xác định là do vi khuẩn *E. ictaluri* (Crumlish và ctv., 2002). Hiện nay, bệnh gan thận mũ là một trong những bệnh phổ biến trên cá tra (Tran và ctv., 2020). Bệnh gan thận



mủ xuất hiện trên mọi giai đoạn ương, nuôi nhưng nhiều nhất trên cá dưới 4 tháng tuổi, đặc biệt giai đoạn cá hương 21 - 30 ngày tuổi, cá giống 40 - 90 ngày tuổi với tỉ lệ cá nhiễm bệnh lần lượt là 46% và 30% (Tran và ctv., 2020). Lý Thị Thanh Loan (2009) cho thấy, tỉ lệ cá mắc bệnh gan thận mủ giảm dần theo sự tăng khối lượng và không thấy cá bệnh ở giai đoạn khối lượng trên 900 g. Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương (2009) cho thấy độc lực của các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* trên cá tra trong khoảng từ  $<10^2$  đến  $10^6$  CFU/mL và tại nồng độ  $6,4 \times 10^5$  CFU/mL vi khuẩn *E. ictaluri* gây chết cá với tỉ lệ 53% (Đặng Thụy Mai Thy và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2010). Bệnh thường xảy ra vào thời điểm giao mùa và đến hết mùa mưa từ tháng 5 đến tháng 12, tập trung từ tháng 7 đến tháng 11 (Lý Thị Thanh Loan và ctv., 2009) và có thể gây chết cá với tỉ lệ đạt đến 90% nếu không được chữa trị kịp thời (Nguyễn Thị Thúy Liễu và ctv., 2011; Từ Thanh Dung và ctv., 2015). Bệnh gây thiệt hại lớn cho người nuôi cá tra hàng năm ở ĐBSCL (Từ Thanh Dung và ctv., 2015).

Hiện nay, nhiều biện pháp phòng và trị bệnh gan thận mủ cho cá tra đã được nghiên cứu và sử dụng trong thực tiễn như sử dụng kháng sinh, tăng sức đề kháng thông qua bổ sung chất kích thích miễn dịch vào thức ăn, sử dụng vắc-xin và chọn giống. Phương pháp kiểm soát bệnh do vi khuẩn gây ra trên cá tra chủ yếu vẫn dựa vào kháng sinh (Nguyễn Quốc Thịnh và ctv., 2014). Tuy nhiên, khi người nuôi sử dụng kháng sinh chưa đúng cách dẫn đến tiềm ẩn nguy cơ như sự kháng thuốc ở vi khuẩn (Từ Thanh Dung và ctv., 2010; Nguyễn Thiện Nam và ctv., 2010), dư lượng kháng sinh trong sản phẩm nên không đáp ứng tiêu chuẩn quốc tế về xuất khẩu do ảnh hưởng đến sức khỏe con người. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu cho thấy có thể tăng sức đề kháng cho cá bằng cách bổ sung chất kích thích miễn dịch như vitamin C và chitosan (Bùi Thị Bích Hằng và ctv., 2015; Bùi Thị Bích Hằng và Nguyễn Hoàng Vũ, 2019). Hiện tại, vắc-xin ALPHAJECT Panga 1 phòng bệnh gan thận mủ cho cá tra do công ty PHARMAQ sản xuất đã được Cục Thú Y - Bộ Nông Nghiệp và Phát triển nông thôn Việt Nam cấp phép lưu hành (Lê Minh Khôi và ctv., 2021). Thông qua thử nghiệm tiêm vắc-xin phòng bệnh gan thận mủ cho cá tra cho thấy việc tiêm vắc-xin trên là an toàn và không gây ảnh hưởng đến sinh trưởng của cá tra trong ao nuôi thương phẩm (Từ Thanh Dung, 2011). Phương pháp bổ sung chất kích thích miễn dịch vào thức ăn hay tiêm vắc-xin giúp mang lại hiệu quả nhưng phải tiến hành lâu

dài, giá thành cao, chỉ có khả năng phòng bệnh trong một khoảng thời gian nhất định và người nuôi vẫn còn hoài nghi về hiệu quả của các phương pháp này (Phu và ctv., 2015). Vì vậy, các phương pháp này chưa được ứng dụng rộng rãi trong thực tế sản xuất.

Nhằm đáp ứng nhu cầu về con giống kháng bệnh của các trại sản xuất giống cá tra tại khu vực ĐBSCL, giai đoạn 2012 - 2015, Viện NCNTTS II đã thành lập được quần thể cá tra bố mẹ kháng bệnh gan thận mũ (G0) trong đề tài trọng điểm cấp Nhà nước thuộc Chương trình KC.06, Bộ Khoa học Công nghệ “Nghiên cứu chọn giống cá tra kháng bệnh gan thận mũ”. Quần thể G0 bao gồm nhóm chọn lọc (710 con, thuộc 120 gia đình) và nhóm đối chứng (120 con, thuộc 25 gia đình), khối lượng cá trung bình của hai nhóm 8,0 kg/con. Đàn G0-kháng bệnh này có hiệu quả chọn lọc ước tính là 8,3% được sử dụng làm cá bố mẹ để sản xuất quần thể cá tra kháng bệnh gan thận mũ tiếp theo (Trình Quốc Trọng và ctv., 2016a, b).

## **1.2. Chọn giống kháng bệnh các đối tượng thủy sản**

### **1.2.1. Chọn giống kháng bệnh các đối tượng thủy sản trên thế giới**

#### **1.2.1.1. Các đối tượng và các tính trạng được chọn giống trên thế giới**

Theo Neira (2010) báo cáo có hơn 101 chương trình chọn giống thủy sản từ năm 1983 với số lượng nhiều nhất là chọn lọc cá rô phi, theo sau là cá hồi Đại Tây Dương, cá hồi vân và cá rô hu. Các tính trạng được chọn giống trên đối tượng thủy sản phổ biến là tăng trưởng, kháng bệnh, hệ số chuyển đổi thức ăn, tuổi thành thực, tỉ lệ phôi, số lượng trứng và kích thước trứng (Gjedrem và Baranski, 2009). Trong đó, tính trạng tỉ lệ phôi và kháng bệnh là các tính trạng khó cải thiện thông qua chọn lọc và tính trạng tăng trưởng là tính trạng quan trọng, dễ đo đạc và đánh giá trong chọn lọc. Ngoài ra, hệ số di truyền tính trạng tăng trưởng thường cao nên hiệu quả chọn lọc cao hơn các tính trạng khác (Gjedrem, 2005).

Chương trình chọn giống trên tính trạng tăng trưởng thành công nổi bật đầu tiên trên đối tượng cá hồi Đại Tây Dương từ năm 1971, sau năm thế hệ chọn giống, tăng trưởng của cá hồi chọn giống đã tăng 113% so với cá hồi tự nhiên (Gjedrem, 2005). Sau đó, các chương trình chọn giống trên tính trạng tăng trưởng đã triển khai và áp dụng trên các đối tượng khác nhau như cá rô phi vân (Charo-Karisa và ctv., 2006), cá tráp (Xiong và ctv., 2017). Ngoài ra, chọn giống tăng trưởng cũng được tiến hành

trên các đối tượng giáp xác như tôm thẻ (Argue và ctv., 2002), nhuyễn thể như hào và nghêu (Gjedrem, 2005; Gjedrem và Baranski, 2009). Đối tượng thủy sản tăng trưởng nhanh chóng có nhiều lợi thế như rút ngắn được chu kỳ nuôi, đạt kích cỡ thu hoạch sớm hơn, giảm rủi ro và tránh thành thực sớm ảnh hưởng đến chất lượng con giống nên đây là tính trạng quan trọng nhất được thực hiện phần lớn trong các chương trình chọn giống (Gjedrem và Baranski, 2009). Ngoài ra, các chương trình chọn giống cũng được triển khai trên các tính trạng khác như hệ số chuyển đổi thức ăn trên cá hồi vân trong mùa sinh trưởng ở nước ngọt (Wahlroos và ctv., 2003), tuổi thành thực trên cá hồi vân và cá hồi Đại Tây Dương (Kolstad và ctv., 2006; Gjedrem và Baranski, 2009). Từ năm 1990, chương trình chọn giống kháng bệnh đầu tiên được thực hiện trên cá hồi Đại Tây Dương kháng bệnh hoại tử huyết (Galina, 2017). Sau đó, các chương trình chọn giống kháng bệnh đã được triển khai rộng rãi trên nhiều đối tượng thủy sản khác nhau như cá hồi coho (Yáñez và ctv., 2016), cá rô phi vằn (Liu và ctv., 2016), cá tráp (Xiong, 2017), tôm thẻ chân trắng (Trinh và ctv., 2019), v.v.. Qua các nghiên cứu cho thấy tính trạng kháng bệnh có thể cải thiện về di truyền qua các thế hệ chọn giống (Galina, 2017).

Việc sử dụng con giống đã qua chọn lọc trên thế giới tăng từ 5,0% đến 8,2% giai đoạn 2002 - 2010 (Gjedrem và ctv., 2012). Các chương trình chọn giống trên đối tượng thủy sản đã và đang được thực hiện đem lại hiệu quả rõ rệt qua từng thế hệ chọn giống và đang đóng góp lớn vào việc nâng cao sản lượng nuôi trồng thủy sản trên toàn thế giới (Nguyễn Hữu Hùng, 2019).

#### **1.2.1.2. Các chương trình chọn giống kháng bệnh trên thế giới**

Tiến trình chung trong một chương trình chọn giống bao gồm các bước: (1) xác định mục tiêu chọn giống: là cải thiện di truyền của các tính trạng qua nhiều thế hệ nhằm nâng cao chất lượng sản phẩm (Gjedrem, 2005); (2) tạo lập quần thể ban đầu: quần thể ban đầu có tính biến dị di truyền cao sẽ đồng nghĩa với mức độ cận huyết tích lũy thấp trong quá trình chọn giống, đảm bảo hiệu quả chương trình chọn giống về lâu dài (Cruz và ctv., 2004); (3) thiết kế ghép phối: nhằm sản xuất một số lượng lớn các gia đình full-sib (các cá thể cùng bố cùng mẹ) và half-sib (các cá thể cùng bố khác mẹ hoặc cùng mẹ khác bố) đồng loạt (Dupont-Nivet và ctv., 2006); (4) đánh dấu để phân biệt các cá thể: sau khi tiến hành ghép phối và sản xuất các gia đình đồng

loạt, các gia đình được ương riêng rẽ trong các giai và bể riêng biệt cho đến khi đạt đến kích cỡ đánh dấu và được đánh dấu để phân biệt các cá thể phục vụ chọn giống; (5) đánh giá tính trạng trong chọn giống: sau khi đánh dấu, các cá thể thuộc các gia đình có thể được gây cảm nhiễm hay nuôi tăng trưởng, sau đó các tính trạng kháng bệnh hay tăng trưởng sẽ được đánh giá phục vụ chọn giống; (6) ước tính các thông số di truyền gồm: hệ số di truyền, tương quan di truyền, giá trị chọn giống ước tính và hiệu quả chọn lọc; (7) tiến hành chọn lọc: dựa vào giá trị chọn giống của từng cá thể và gia đình để tiến hành chọn lọc; (8) chọn lọc tiếp tục và phát tán đàn cá đã qua chọn lọc: các cá thể cá có giá trị chọn giống cao được chọn lọc để làm bố mẹ cho quá trình chọn giống tiếp theo hay có thể sản xuất cho cung cấp giống (Gjedrem, 2005).

#### ***Mục tiêu cho chương trình chọn giống kháng bệnh***

Mục tiêu chính trong chọn giống kháng bệnh hiện nay là tăng khả năng sống sót của động vật thủy sản nhằm giảm thiệt hại kinh tế trong nuôi trồng thủy sản. Cải thiện được tính trạng kháng bệnh qua các thế hệ chọn giống là điều kiện thúc đẩy sự phát triển trong tương lai của nghề nuôi thủy sản (Galina, 2017).

#### ***Thiết kế ghép phối để sản xuất các gia đình***

Thiết kế ghép phối nhằm sản xuất gia đình được sử dụng trong các chương trình chọn giống kháng bệnh gồm ghép phối theo cặp đơn trên cá tráp (Xiong và ctv., 2017), ghép phối thứ bậc trên cá hồi Đại Tây Dương (Kjøglum và ctv., 2008), cá rohu (Mahapatra và ctv., 2008a), cá rô phi vằn (Shoemaker và ctv., 2017), ghép phối giai thừa một phần trên cá hồi vân (Henryon và ctv., 2005), cá rô phi vằn (Wonmongkol và ctv., 2018), ghép phối giai thừa trên cá vược Châu Âu (*Dicentrarchus labrax*) (Doan và ctv., 2016). Trong đó, ghép phối theo cặp đơn không thể tách ra được các phương sai di truyền cộng gộp và phương sai ảnh hưởng  $c^2$  (tác động của môi trường ương riêng rẽ các gia đình full-sib). Đối với ghép phối thứ bậc, thành phần phương sai di truyền con bố và con mẹ chiếm 1/4 phương sai di truyền cộng gộp, phương sai di truyền con mẹ có thể bị ước tính tăng do không tách được di truyền theo mẹ, di truyền tính trội và tác động của môi trường ương riêng rẽ. Ghép phối giai thừa toàn phần thì tách được di truyền tính trội với ảnh hưởng môi trường chung, di truyền theo mẹ và tác động của môi trường ương riêng rẽ đến đánh dấu (Gjedrem, 2005). Trong các chương trình chọn giống, ghép phối thứ bậc ( $n$  đực x  $2n$  cái =  $2n$  gia đình) và giai

thừa một phần ( $2n$  đực x  $2n$  cái =  $4n$  gia đình) được áp dụng rộng rãi. Trong đó, ghép phối thứ bậc được sử dụng phổ biến nhất trong các chương trình chọn giống vì tính đơn giản, dễ ứng dụng (Gjedrem, 2005).

### ***Đánh dấu để phân biệt các cá thể phục vụ chọn giống***

Sau khi thiết kế ghép phối và tiến hành sản xuất các gia đình đồng loạt, các gia đình được ương riêng rẽ trong các giai và bể riêng biệt cho đến khi đạt đến kích cỡ đánh dấu. Một số phương pháp đánh dấu đã được sử dụng trong các chương trình chọn giống kháng bệnh trên thủy sản như cắt vây trên cá tráp (Xiong và ctv., 2017), đánh dấu phẩm màu huỳnh quang (VIE: Visible Implant Elastomer) trên tôm (Huang, 2012; Trinh và ctv., 2019) hay đánh dấu bằng cắt vây kết hợp xăm (cold branding) trên cá hồi Đại Tây Dương (Gjedrem và ctv., 1991), xăm trên cá hồi vân (Gjøen và ctv., 1997). Từ năm 1980, dấu từ PIT được sử dụng phổ biến trong các chương trình chọn giống trên các đối tượng thủy sản (Gjedrem và ctv., 2012). Dấu từ PIT là một dạng chip điện tử (mỗi chip có một số riêng) được đánh vào cơ hoặc xoang bụng cá. Dấu từ PIT được sử dụng rộng rãi trong các chương trình chọn giống kháng bệnh như trên cá rohu (Mahapatra và ctv., 2008b), cá hồi Đại Tây Dương (Gjerde và ctv., 2009), cá rô phi vằn (Shoemaker và ctv., 2017; Wonmongkol và ctv., 2018), cá tra (Nguyen và ctv., 2019a, b). Dấu từ PIT giúp phân biệt đến từng cá thể với tỉ lệ tồn dấu cao trong các chương trình chọn giống. Tuy nhiên, dấu từ PIT và thiết bị đọc dấu thường có giá thành cao (Gjedrem và Baranski, 2009) và không phù hợp với cá thể có khối lượng trung bình dưới 10 g và có chiều dài dưới 60 mm (Ferrari và ctv., 2014). Truy xuất phả hệ bằng cách sử dụng các chỉ thị phân tử như chỉ thị microsatellite (simple sequence repeat - trình tự lặp lại đơn) nhằm thay thế đánh dấu từ PIT đã được nghiên cứu và sử dụng trong các chương trình chọn giống kháng bệnh, cụ thể trên cá tráp (Antonello và ctv., 2009), cá vược Châu Âu (Faggion và ctv., 2021).

### ***Cảm nhiễm trong chọn giống kháng bệnh***

Trong chương trình chọn giống, đặc điểm kháng bệnh cần được đánh giá một cách chính xác. Một phương pháp đo lường phổ biến là đánh giá khả năng sống/chết của các cá thể thuộc các gia đình cá trong một giai đoạn sống nhất định. Tuy nhiên, hệ số di truyền về tỉ lệ sống trên cá hương và cá giống trong môi trường nuôi thấp do các điều kiện môi trường ảnh hưởng đến tỉ lệ sống của cá. Một phương pháp thay thế

là gây cảm nhiễm các gia đình cá giống trong điều kiện môi trường chuẩn hóa với một mầm bệnh nhất định (Gjedrem, 2015). Tuy nhiên, khả năng kháng bệnh của cá trong thí nghiệm cảm nhiễm cần phản ánh được khả năng sống sót của cá trong môi trường nuôi (Galina, 2017).

Phương pháp gây bệnh thực nghiệm phải được chuẩn hóa trước khi áp dụng vào các nghiên cứu chọn lọc khả năng kháng bệnh cụ thể (Ødegård và ctv., 2007a, b). Các chương trình chọn giống thường áp dụng ba phương pháp gây cảm nhiễm chính: (1) tiêm trực tiếp mầm bệnh vào cơ thể thủy sản; (2) cho mầm bệnh vào nước để ngâm thủy sản; (3) cho thủy sản bệnh (thủy sản được tiêm với mầm bệnh và dùng gây nhiễm) sống chung với thủy sản khỏe (phương pháp cohabitant). Đối với phương pháp tiêm, mầm bệnh trực tiếp xâm nhập vào cơ thể thủy sản nên dễ dàng kiểm soát được liều vi khuẩn gây bệnh nhưng đòi hỏi nhiều nhân lực trong một thời gian ngắn. Tuy nhiên, trong phương pháp này mầm bệnh trực tiếp xâm nhập vào cơ thể thủy sản nên không đánh giá được hiệu quả kháng bệnh của hệ miễn dịch bên ngoài cơ thể thủy sản. Đây không phải là phương pháp gây bệnh tối ưu cho đánh giá khả năng kháng bệnh chính xác phục vụ chọn giống (Nordmo và ctv., 1998). Trong phương pháp ngâm, lượng mầm bệnh xâm nhập vào cơ thể thủy sản để gây bệnh không kiểm soát được và không loại trừ được các yếu tố ngẫu nhiên tác động làm thủy sản chết. Phương pháp này chủ yếu sử dụng cho thủy sản kích thước nhỏ để gây nhiễm với mầm bệnh (Galina, 2017). Trong điều kiện thí nghiệm với số lượng thủy sản thí nghiệm nhiều và cần một lượng rất lớn mầm bệnh thì phương pháp này không mang tính khả thi cao (Nordmo và ctv., 1998). Đối với phương pháp cohabitant, khả năng mầm bệnh xâm nhập và vượt qua các môi trường miễn dịch không đặc hiệu và đặc hiệu bên ngoài và bên trong của cơ thể cá được đánh giá tổng thể (Gomez và ctv., 2014). Phương pháp cohabitant là phương pháp tối ưu nhất trong việc tự nhiên hóa tái hiện bệnh trong điều kiện thực nghiệm (Ødegård và ctv., 2011a). Nhìn chung, các phương pháp gây bệnh thực nghiệm có thể khác nhau giữa các nghiên cứu nhưng hệ số di truyền đều ước tính qua đánh giá khả năng sống sót được xử lý theo tính trạng sống/chết khi cảm nhiễm (Antonello và ctv., 2009).

### ***Đánh giá tính trạng kháng bệnh***

Chương trình chọn giống kháng bệnh thực hiện trên ba nhóm tác nhân gây bệnh chủ yếu là vi khuẩn (Yáñez và ctv., 2016), vi-rút (Wetten và ctv., 2007; Kjøglum và ctv., 2008) và kí sinh trùng (Salte và ctv., 2010). Nhằm đạt độ tin cậy trong xử lí số liệu ước tính các thông số di truyền trên tính trạng kháng bệnh, các gia đình cá tối thiểu 30 gia đình (Glover và ctv., 2005; Gjedrem, 2005) với số cá thể là 30 - 50 cá thể/gia đình được nuôi chung để gây cảm nhiễm và thu thập số liệu nhằm đánh giá khả năng kháng bệnh trong các chương trình chọn giống (Gjedrem, 2015), trong khi ước tính các thông số di truyền trên tính trạng khác như tăng trưởng thì các gia đình cá phải từ 52 - 104 gia đình (Charo-Karisa và ctv., 2007; Khaw và ctv., 2008) với số cá thể là 24 - 50 cá thể/gia đình được đánh dấu (Kause và ctv., 2002; Charo-Karisa và ctv., 2007). Khi đánh giá khả năng kháng bệnh có thể đếm số lượng mầm bệnh trên bề mặt cơ thể hay đo lường mức độ tổn thương mô trong cơ quan như mạch máu và lách (Galina, 2017). Tuy nhiên, các chỉ số về số lượng tế bào mầm bệnh trên bề mặt cơ thể hay mức độ tổn thương mô ít khi là tính trạng đo đạc cho các thí nghiệm quy mô lớn và thường bị hạn chế do các phân tích rất chi tiết nhằm thể hiện phản ứng của vật chủ với mầm bệnh. Vì vậy, tính trạng sống/chết khi kết thúc mô hình gây bệnh thực nghiệm (khả năng đề kháng) là tiêu chí được sử dụng rộng rãi nhất để xác định mức độ kháng bệnh (Galina, 2017) do tính trạng này phản ánh các đáp ứng tích lũy của tất cả các tương tác giữa vật chủ và mầm bệnh trong suốt thời gian bệnh (Wiegertjes và ctv., 1996). Ngoài ra, để xác định mức độ kháng bệnh, các chương trình chọn giống thường bổ sung đo thời gian sống của các cá thể (đôi khi được xem là khả năng chịu đựng) (Ødegård và ctv., 2011a, b). Vì vậy, đánh giá đầy đủ khả năng kháng bệnh dựa vào khả năng đáp ứng của vật chủ đối với mầm bệnh bao gồm: 1) khả năng đề kháng (trái ngược với nhạy cảm) là khả năng vật chủ giảm sự xâm nhập của mầm bệnh (hạn chế sự xâm nhập của mầm bệnh vào mô đích và gây tổn thương mô); 2) khả năng chịu đựng là khả năng vật chủ khi đã bị nhiễm bệnh thì giảm tác động của tác nhân gây bệnh để duy trì sự sống trong giai đoạn nhiễm bệnh (Galina, 2017).

#### ***Ước tính các thông số di truyền***

Các thông số di truyền được ước tính trong một chương trình chọn giống bao gồm: (1) hệ số di truyền: biểu thị khả năng truyền được các đặc tính tốt của tính trạng

cho thế hệ sau, đây là tham số quan trọng trong di truyền số lượng (Getabalew và ctv., 2019); (2) tương quan di truyền: thể hiện chiều hướng tương quan và mức độ tương quan giữa các tính trạng số lượng; (3) giá trị chọn giống ước tính (Estimated Breeding Value - EBV): là một giá trị liên quan đến các gen có thể truyền được cho thế hệ sau, được tính toán từ kiểu hình của vật nuôi. Tổng giá trị di truyền về gen là tổng di truyền cộng gộp, di truyền trội, di truyền át chế (Gjedrem, 2005); (4) hiệu quả chọn lọc: là đại lượng biểu thị mức độ tăng của tính trạng trên quần thể đã qua chọn lọc so với quần thể chưa qua chọn lọc hay đối chứng (Gjedrem, 2005).

Các mô hình toán được sử dụng để ước tính các thông số di truyền trong các chương trình chọn giống kháng bệnh phụ thuộc vào tính trạng kháng bệnh, cụ thể tính trạng kháng bệnh là: (1) khả năng sống/chết (biến nhị phân, 1/0: sống/chết) tại thời điểm kết thúc thí nghiệm. Đối với dạng số liệu này thường được xử lý theo mô hình tuyến tính hỗn hợp cá thể (Yáñez và ctv., 2016; Wonmongkol và ctv., 2018), mô hình ngưỡng (các số liệu chuyển về logit hay probit) chuyển biến quan sát thành biến liên tục (Xiong và ctv., 2017); (2) khả năng sống/chết (biến nhị phân, 1/0: sống/chết) liên tục trong một khoảng thời gian theo dõi nhất định. Trong các nghiên cứu, thường tính trạng ghi nhận kiểu này được xử lý theo mô hình tính điểm sự sống theo thời gian (giờ hay ngày) (Wonmongkol và ctv., 2018; Pham và ctv., 2020a); (3) thời gian sống của các cá thể thí nghiệm (theo ngày hoặc theo giờ). Dạng số liệu này đã được xử lý theo mô hình hàm mối nguy (Leeds và ctv., 2010) và mô hình tuyến tính hỗn hợp cá thể (Perry và ctv., 2004; Wonmongkol và ctv., 2018). Trong các mô hình trên, mô hình tuyến tính thường được sử dụng vì tính đơn giản, kết quả dễ biện luận và khả năng dự đoán giá trị chọn giống gần tương đương so với các mô hình khác (Ødegård và ctv., 2011a). Khi đánh giá các mô hình xử lý số liệu cho chọn lọc các gia đình kháng bệnh gan thận mũ trên cá tra, Pham và ctv. (2020a) đã cho thấy tương quan giữa các mô hình tuyến tính, mô hình ngưỡng, mô hình tính điểm sự sống cao (0,81 - 0,99) tại các thời điểm cắt ngang của quá trình cảm nhiễm và mô hình tuyến tính thích hợp hơn mô hình ngưỡng khi xử lý số liệu trong nghiên cứu này. Thông thường các thí nghiệm gây bệnh thực nghiệm kết thúc khi tỉ lệ chết đạt tối thiểu 50% hay đến khi cá ngừng chết thì ước tính thông số di truyền chính xác nhất (Nordmo và ctv., 1998; Ødegård và ctv., 2011a; Pham và ctv., 2020a).



### *Hệ số di truyền*

Hệ số di truyền ( $h^2$ ) có giá trị trong khoảng 0 - 1 và được chia thành các khoảng như sau: 0 - 0,1 (thấp), >0,1 - 0,3 (trung bình), >0,3 - 1 (cao) (Trần Đình Trọng và Đặng Hữu Lanh, 2005). Một số nghiên cứu cho thấy hệ số di truyền tính trạng kháng bệnh đạt từ trung bình đến cao (0,15 - 0,62) (Kjølglum và ctv., 2008; Gjerde và ctv., 2009; Wonmongkol và ctv., 2018) nên có thể cải thiện khả năng kháng bệnh thông qua chọn giống (Gjedrem, 2015; Galina, 2017). Tuy nhiên, trong một số ít nghiên cứu khác lại cho thấy hệ số di truyền tính trạng kháng bệnh thấp (0,01 - 0,10) (Trinh và ctv., 2019) nên khó cải thiện khả năng kháng bệnh thông qua chọn giống.

### *Tương quan di truyền của hai tính trạng*

Tương quan di truyền là một đại lượng biểu thị mức độ trùng lặp các gen cùng quy định nhiều tính trạng (Galina, 2017). Trong đó, một gen chi phối nhiều tính trạng có thể cùng chiều hoặc khác chiều (tính đa hiệu của gen) là nguyên nhân chính của các mối tương quan di truyền thuận hay nghịch. Hệ số tương quan di truyền ( $r_G$ ) thể hiện chiều hướng tương quan và mức độ tương quan giữa các tính trạng số lượng. Tương quan di truyền giữa hai tính trạng chủ yếu được ước tính theo hiệp phương sai của ảnh hưởng di truyền cộng gộp của hai tính trạng và phương sai của ảnh hưởng di truyền cộng gộp của tính trạng thứ nhất và tính trạng thứ hai (Falconer và Mackay, 1996) hay tương quan di truyền giữa giá trị chọn giống ước tính (EBV) của các tính trạng theo mô hình toán phù hợp cho từng tính trạng (Henryon và ctv., 2002). Hệ số tương quan di truyền có mức thang đo từ -1 đến 1. Nếu hai tính trạng khảo sát có tương quan nghịch ( $-1 \leq r_G < 0$ ) thì sự cải thiện một tính trạng mong muốn sẽ dẫn đến sự thay đổi không thuận lợi cho tính trạng còn lại, ngược lại nếu hai tính trạng có tương quan thuận ( $0 < r_G \leq 1$ ) thì khi cải thiện tính trạng này sẽ đồng thời cải thiện luôn tính trạng còn lại (Gjedrem, 2005). Tương quan di truyền thuận được chia thành các khoảng như sau: >0 - 0,25 (thấp), >0,25 - 0,75 (trung bình), >0,75 - 1 (cao) (Kuthu và ctv., 2017).

Tương quan giữa tăng trưởng và khả năng kháng bệnh trong chương trình chọn giống thủy sản chủ yếu là tương quan thuận (Galina, 2017). Một số nghiên cứu cụ thể về tương quan di truyền thuận ( $r_G = 0,03 - 0,99$ ) giữa khả năng kháng bệnh và tăng trưởng (Nguyen và ctv., 2019b; Trinh và ctv., 2019) cho thấy khi cải thiện tính trạng

kháng bệnh có thể sẽ không ảnh hưởng tiêu cực hay cải thiện đồng thời một phần tính trạng tăng trưởng trong chọn giống (Gjedrem, 2005). Tuy nhiên, trong một số ít nghiên cứu khác như trên tôm thẻ chân trắng kháng bệnh đốm trắng lại cho thấy tương quan nghịch giữa tính trạng kháng bệnh và tăng trưởng ( $r_G = -0,46$ ) (Argue và ctv., 2002). Mối tương quan nghịch này cho thấy, rất khó để cải thiện tính trạng khối lượng thông qua tính trạng kháng bệnh một cách gián tiếp để mang lại hiệu quả cao cho hai tính trạng đồng thời và cần có hai chương trình chọn giống độc lập cho hai tính trạng này.

Nghiên cứu về khả năng kháng bệnh trên nhiều giai đoạn cảm nhiễm của tôm thẻ chân trắng cho thấy tương quan di truyền về tỉ lệ chết giữa sáu giai đoạn kế tiếp nhau trong quá trình cảm nhiễm cao từ 0,82 - 0,99 (Trinh và ctv., 2019). Nghiên cứu trên nhiều giai đoạn phát triển của cá hồi Đại Tây Dương và cá hồi vân cho thấy hệ số di truyền tính trạng tỉ lệ chết thấp (0,04 - 0,09), tương quan di truyền về tỉ lệ chết giữa hai giai đoạn kế tiếp nhau trong quá trình sống từ thấp đến trung bình 0,18 - 0,46 (Rye và ctv., 1990).

Trên cá hồi Đại Tây Dương, tương quan di truyền ước tính giữa tính trạng kháng bệnh trong điều kiện thí nghiệm và sau nuôi thương phẩm trên tính trạng kháng bệnh hoại tử tụy tạng (Infectious Pancreatic Necrosis, IPN) dao động từ 0,78 - 0,83. Kết quả cho thấy khả năng kháng bệnh sau cảm nhiễm ở giai đoạn cá nhỏ sẽ phản ánh khá chính xác khả năng kháng bệnh khi nuôi thương phẩm (Wetten và ctv., 2007).

Phạm và ctv. (2020b) cũng đã thử nghiệm mô hình có và không  $c^2$  cho xử lý số liệu kháng bệnh gan thận mũ trên quần thể cá tra đã chọn lọc theo tính trạng tăng trưởng qua ba thế hệ cho thấy, mô hình không  $c^2$  ước tính hệ số di truyền trên tính trạng kháng bệnh từ 0,11 - 0,13 so với mô hình có  $c^2$  thì hệ số di truyền từ 0,06 - 0,09.

#### *Hiệu quả chọn lọc*

Một số chương trình chọn giống kháng bệnh đạt được hiệu quả chọn lọc cao từ 12,4 đến 19% (Fjalestad và ctv., 1997; Leeds và ctv., 2010). Hiệu quả chọn lọc trên các tính trạng kháng bệnh thường cao và phù hợp với các ước tính hệ số di truyền cao ở các tính trạng kháng bệnh (Gjedrem, 2015; Galina, 2017).

### ***Phương pháp chọn lọc***

Những phương pháp chọn lọc trong các chương trình chọn giống bao gồm: chọn lọc cá thể, chọn lọc gia đình, chọn lọc nội bộ gia đình, chọn lọc bố mẹ thông qua thử nghiệm đàn con, chọn lọc phá hệ, chọn lọc kết hợp (Gjedrem, 2005). Những cá thể được chọn là những cá thể có giá trị chọn giống ước tính (EBV) cao từ các gia đình có giá trị EBV cao nhất. Đối với tính trạng kháng bệnh thông qua gây bệnh thực nghiệm với mầm bệnh, một số cá thể thí nghiệm đã chết và các cá thể còn lại đã nhiễm bệnh. Do đó, phương pháp chọn lọc duy nhất có thể áp dụng cho tính trạng kháng bệnh là chọn lọc gia đình, trong đó giá trị chọn giống của các gia đình có các cá thể chưa qua gây bệnh thực nghiệm được ước tính bằng thông qua sử dụng dữ liệu từ sự sống sót của các cá thể thuộc gia đình đó trong thí nghiệm cảm nhiễm (Gjedrem, 2005; Galina, 2017). Nếu chọn giống theo hướng cải thiện đồng thời nhiều tính trạng thì áp dụng phương pháp chọn lọc kết hợp nhiều tính trạng (Gjedrem, 2005).

#### **1.2.2. Chọn giống kháng bệnh các đối tượng thủy sản ở Việt Nam**

##### **1.2.2.1. Các đối tượng và các tính trạng được chọn giống ở Việt Nam**

Chương trình chọn giống trên tính trạng tăng trưởng đầu tiên ở thủy sản tại Việt Nam bắt đầu từ năm 1984 trên đối tượng cá chép với mục đích tạo giống cá lai có sức tăng trưởng về khối lượng lớn hơn cá chép hoang dã Việt Nam (Trần Mai Thiên, 1998). Từ năm 1999, Viện NCNTTS I đã tiến hành chọn giống cá rô phi vằn với vật liệu ban đầu là dòng cá rô phi vằn dòng GIFT (*O. niloticus*) thế hệ thứ năm nhập nội từ Philippines (Nguyễn Công Dân và ctv., 2003). Sau đó, chương trình chọn giống cá rô phi vằn tiến hành thêm trên tính trạng khả năng chịu lạnh (Luan, 2008). Từ năm 2010, chương trình chọn giống nâng cao tốc độ tăng trưởng cá rô phi vằn trong môi trường nước lợ, mặn áp dụng phương pháp chọn lọc gia đình được tiến hành tại Viện NCNTTS I (Nguyễn Hữu Ninh và ctv., 2013). Từ năm 2001, Viện NCNTTS II đã tiến hành chương trình chọn giống cá tra theo tính trạng tăng trưởng (Nguyễn Văn Sáng và ctv., 2009) và tiếp tục được tiến hành qua ba thế hệ (Nguyễn Văn Sáng và ctv., 2011a, b; 2012; 2013; 2015). Từ năm 2007 - 2015, Viện NCNTTS II đã tiến hành chọn lọc trên tính trạng tăng trưởng tôm càng xanh (Đình Hùng và ctv., 2011) và tôm sú (Nguyễn Văn Hào, 2016).

Đối với tính trạng kháng bệnh, từ năm 2009, Viện NCNTTS II đã đưa tính trạng này vào nội dung chương trình chọn giống cá tra (Phạm Đình Khôi và ctv., 2010) và sau đó triển khai chọn giống kháng bệnh tiếp tục trên các quần thể cá tra khác nhau. Chương trình chọn giống kháng bệnh đốm trắng trên tôm thẻ chân trắng tại Viện NCNTTS III cũng được tiến hành (Trinh và ctv., 2019).

#### **1.2.2.2. Chọn giống theo tính trạng kháng bệnh ở Việt Nam**

Phần lớn các nghiên cứu về chọn giống trên các đối tượng thủy sản tại Việt Nam tập trung chủ yếu cải thiện khả năng tăng trưởng. Các chương trình chọn giống thủy sản trên tính trạng kháng bệnh còn khiêm tốn với hai nghiên cứu chính đã thực hiện là trên tôm thẻ chân trắng và cá tra.

(i) Trên đối tượng tôm thẻ chân trắng, vật liệu cho chọn giống ban đầu (G0) là quần thể con lai tạo ra từ lai hỗn hợp các dòng tôm có nguồn gốc từ Mexico, Ecuador, Colombia, Mỹ, Thái Lan và Indonesia. Chương trình chọn giống nâng cao khả năng tăng trưởng thực hiện qua ba thế hệ G1 (2015), G2 (2016) và G3 (2017) tại Viện NCNTTS III. Nghiên cứu tiến hành trên quần thể tôm có nguồn gốc từ quần thể đã được chọn lọc trên tính trạng tăng trưởng thế hệ thứ ba (G3). Tính trạng kháng bệnh đốm trắng được đánh giá và chọn lọc bằng phương pháp ngâm trực tiếp tôm vào bể cảm nhiễm trong một ngày với quy mô 15.000 cá thể thuộc 50 gia đình full-sib và half-sib. Thông qua xử lý số liệu bằng mô hình tuyến tính hỗn hợp cá thể đã ước tính hệ số di truyền tính trạng kháng bệnh từ 0,01 - 0,38 tại các giai đoạn cắt ngang từ ngày 1 đến ngày 15 của quá trình cảm nhiễm (Trinh và ctv., 2019).

(ii) Trên đối tượng cá tra, năm 2009 - 2012, Viện NCNTTS II thực hiện nghiên cứu khả năng kháng bệnh gan thận mũ trên các quần thể tăng trưởng G2-2001; G2-2001; G2-2002; G2-2003 bằng phương pháp cohabitant hay cohabitant kết hợp (cá cohabitant tiếp xúc với cá thí nghiệm hay cá cohabitant tiếp xúc với cá thí nghiệm và cải tiến có bổ sung vi khuẩn vào trong bể cảm nhiễm). Các nghiên cứu sử dụng mô hình tuyến tính cá thể hỗn hợp, mô hình ngưỡng và mô hình tính điểm sự sống theo ngày. Nghiên cứu bước đầu đã ước tính hệ số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mũ nằm trong khoảng 0,01 - 0,17 (Bảng 1.1) tùy theo quần thể và thế hệ chọn giống, phương pháp gây bệnh thực nghiệm (Pham và ctv., 2020a). Tiếp nối đề tài vừa nêu, đề tài ‘Nghiên cứu chọn giống cá tra kháng bệnh gan thận mũ’ (2012 - 2015)

được thực hiện với mục tiêu nhằm xây dựng quần thể ban đầu có tính biến dị di truyền cao phục vụ chọn giống dài hạn cá tra kháng bệnh gan thận mũ. Nghiên cứu đã thu thập ba nhóm cá tự nhiên có nguồn gốc từ Campuchia, kết hợp với nhóm cá chọn giống theo tính trạng tăng trưởng sẵn có để làm nguồn vật liệu ban đầu (G0). Vật liệu là 177 gia đình gồm 9.714 cá thể (trung bình 55 cá thể/gia đình). Đề tài đã xác định được các thông số kỹ thuật cho kết quả cảm nhiễm bệnh gan thận mũ bằng phương pháp cohabitant kết hợp như sau: cá cohabitant được tạo ra bằng cách tiêm vi khuẩn *E. ictaluri* mật độ  $2 \times 10^5$  CFU/cá vào xoang bụng, được thả vào bể với cá thí nghiệm 2 ngày sau khi tiêm, tỉ lệ ghép cá cohabitant bằng 35% cá thí nghiệm, mật độ cá trong bể 1 con/4,2L, nhiệt độ nước ở mức 26°C. Bổ sung vi khuẩn hai ngày sau khi cho cá cohabitant và cá thí nghiệm sống chung với liều  $10^5$  CFU/mL. Theo dõi vớt cá thí nghiệm chết và mổ thu lại dấu PIT mỗi 3 giờ/lần, ghi nhận giờ cá chết. Thu ngẫu nhiên 10% số cá chết vào các ngày chết cao điểm để xác định tác nhân gây bệnh. Thí nghiệm kết thúc khi cá không còn chết trong 5 ngày liên tục. Kết quả cho thấy tỉ lệ cá chết của bể 1 là 46,9%, của bể 2 là 24,4% và hai bể là 39,0%. Đề tài sử dụng mô hình tuyến tính hỗn hợp cá thể để ước tính các thông số di truyền. Kết quả cho thấy hệ số di truyền ước tính của tính trạng gan thận mũ trên cá tra giống là 0,37, hiệu quả chọn lọc ước tính là 8,3% và tương quan giữa khả năng kháng bệnh và tăng trưởng là 0,26 (Trịnh Quốc Trọng và ctv., 2016a, b).

**Bảng 1.1.** Kết quả nghiên cứu khả năng kháng bệnh gan thận mũ trên các quần thể cá tra tại Viện NCNTTS II giai đoạn 2008 - 2015

Quần thể	Số cá thể/số gia đình thí nghiệm	Tỉ lệ cá thí nghiệm chết (%)	Hệ số di truyền ( $h^2$ )
G2-2001 <sup>#</sup>	2.155/ 81	25,0	0,01 - 0,10
G2-2002 <sup>#</sup>	1.988/ 64	3,0 - 5,7	-
G2-2003 <sup>#</sup>	5.689/ 187	83,1 - 84,0	0,08 - 0,17
G3-2001 <sup>#</sup>	6.177/ 233	87,0	0,01 - 0,08
G0-2012 <sup>*</sup>	9.714/177	39,0	0,37

<sup>#</sup>: Quần thể tăng trưởng; <sup>\*</sup>: Quần thể kháng bệnh; Các quần thể được đặt tên theo thể hệ-năm thành lập.

### **1.3. Các giải pháp kĩ thuật hỗ trợ nâng cao hiệu quả của chọn giống trên động vật thủy sản**

#### **1.3.1. Các ứng dụng của chỉ thị phân tử để truy xuất phả hệ trong các chương trình chọn giống trên động vật thủy sản**

Hiện nay, các chương trình chọn giống dựa trên phương pháp chọn lọc kết hợp đòi hỏi sản xuất nhiều gia đình và phân biệt các cá thể giữa các gia đình với nhau. Một trong những phương pháp đánh dấu thường được sử dụng phổ biến trong các chương trình chọn giống cá trên toàn thế giới và Việt Nam là sử dụng dấu từ PIT (Gjedrem, 2005). Dấu từ PIT được sử dụng để đánh dấu cá từ 15 - 25 g trong chương trình chọn giống (Gjedrem và Baranski, 2009). Tuy nhiên, sử dụng dấu từ PIT có một số hạn chế như: (1) hạn chế nghiên cứu di truyền ở giai đoạn đầu do kích thước cá thể nhỏ không đánh dấu được; (2) khi nuôi riêng rẽ các gia đình chờ đến kích thước đánh dấu đòi hỏi nhiều các đơn vị nuôi (ao, lồng, bể nuôi) (Estoup và ctv., 1998), tức là cơ sở hạ tầng của chương trình chọn giống phải được đảm bảo. Do số lượng bể nuôi riêng rẽ các gia đình có giới hạn trong các chương trình chọn giống nên gây ảnh hưởng đến thiết kế ghép phối (Vandeputte và ctv., 2011); (3) do cá ương nuôi đến kích cỡ cá giống cho đánh dấu nên ảnh hưởng của môi trường ương riêng rẽ ở các gia đình phải được tính toán và phần nào ảnh hưởng đến độ chính xác của ước tính các phương sai thành phần từ đó làm ảnh hưởng đến ước tính hệ số di truyền, hiệu quả chọn lọc; (4) ở hầu hết các loài cá, việc đánh dấu này trên cá con là khó khăn và tốn nhiều thời gian, gây tổn thương mô và tạo stress cho cá. Đồng thời, đánh dấu vật lí có khả năng mất dấu (Thanh và ctv., 2019). Truy xuất phả hệ bằng chỉ thị phân tử được bắt đầu nghiên cứu trong các chương trình chọn giống thủy sản nhờ có nhiều ưu điểm khắc phục được các hạn chế của phương pháp đánh dấu từ PIT nêu trên. Vì vậy, thông tin phả hệ truy xuất được bằng chỉ thị phân tử giúp việc ước tính các thông số di truyền chính xác trong chọn giống các loài thủy sản (Gjedrem và Baranski, 2009).

##### **1.3.1.1. Các chỉ thị phân tử được dùng trong truy xuất phả hệ**

Chỉ thị phân tử đa hình nào có tính ổn định và chỉ thị đó có thể truyền từ bố mẹ sang cá thể con đều có thể được sử dụng để truy xuất phả hệ. Việc lựa chọn các chỉ thị phân tử cho truy xuất phả hệ phụ thuộc vào kết quả sàng lọc của bộ chỉ thị tham

khảo từ các nghiên cứu trước và thông tin bộ gen của sinh vật vì những yếu tố này quyết định chi phí của việc truy xuất (Flanagan và Jones, 2018).

Nghiên cứu truy xuất phả hệ đầu tiên sử dụng chỉ thị phân tử trên đối tượng cá chép tại Israel với chỉ thị allozyme, kết quả truy xuất được số lượng gia đình là rất thấp (<10) (Brody và ctv., 1981). Sau đó, các chỉ thị khác như AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism - đa hình độ dài đoạn nhân chọn lọc) cũng được ứng dụng trong truy xuất phả hệ, chủ yếu trên thực vật. Sau này, chỉ thị microsatellite được sử dụng phổ biến trong truy xuất phả hệ (Jones và ctv., 2010). Microsatellite đã được sử dụng hiệu quả trong các nghiên cứu xác định phả hệ trên 20 loài thủy sản trên thế giới với kết quả truy xuất ước tính cao như trên cá trắm (*Ctenopharyngodon idella*) (99,6%, Fu và ctv., 2013), cá tuyết (*Lota lota* L.) (97%, Ashton và ctv., 2016), cá rô phi vằn (*Oreochromis niloticus*) (100%, Liu và ctv., 2021). Gần đây, SNP (Single nucleotide polymorphism - đa hình nucleotide đơn) được nghiên cứu sử dụng để truy xuất phả hệ trên thủy sản như cá hồi vân với khả năng truy xuất chính xác có thể đạt hơn 98% với 68 SNP (Liu và ctv., 2016).

Tại Việt Nam, Nguyễn Hữu Ninh và Lư Thị Hà Giang (2012) sử dụng 8 chỉ thị microsatellite để truy xuất phả hệ trên 30 gia đình cá tra gồm 900 cá thể con. Kết quả truy xuất được bố mẹ của 94% cá thể con, trong đó có 6% số cá thể con được xác định là có nhiều hơn một cặp bố mẹ. Bùi Thị Liên Hà và ctv. (2017) đã sử dụng 11 microsatellite (CB12, CB13, CB14, CB15, CB18, CB19, Ph7, Ph21, Phy01, Phy03 và PSP-G579) trong truy xuất phả hệ 5 gia đình cá tra được giấu phả hệ bằng phần mềm VITASSIGN với thuật toán loại trừ, số lượng mismatch cho phép là 2. Kết quả truy xuất số cá con vào một gia đình duy nhất đạt trung bình (76%). Truy xuất phả hệ khi chỉ sử dụng 7 microsatellite (bốn microsatellite có có tính đa hình thấp và không tuân theo quy luật Mendel đã bị loại trừ) đã làm tăng tỉ lệ truy xuất đạt 81,3%. Thanh và ctv. (2019) đã sử dụng 5 microsatellite từ các nghiên cứu trước, tối ưu thành hai bộ multiplex PCR để phục vụ cho truy xuất phả hệ chỉ trên 5 gia đình cá tra full-sib bằng phần mềm VITASSIGN với thuật toán loại trừ, số lượng mismatch cho phép tối đa là 1. Kết quả cho thấy 62,7% cá thể con có thể được xác định các cặp bố mẹ của chúng với số lượng 0 mismatch và tỉ lệ truy xuất tăng lên 89,3% sau khi cho phép 1 mismatch. Truy xuất phả hệ khi chỉ sử dụng 4 microsatellite (một microsatellite có

tần số null-alen cao đã bị loại trừ) đã làm tăng tỉ lệ truy xuất đạt 68% với 0 mismatch và 90,7% với 1 mismatch. Các chỉ thị microsatellite truy xuất phủ hệ trong các nghiên cứu trước đây trên cá tra được phát triển bằng phương pháp truyền thống gồm các bước xây dựng thư viện hệ gen, xác định microsatellite bằng lai phân tử và giải trình tự để xác định vùng thiết kế mỗi do trình tự hệ gen cá tra chưa được công bố (Zane và ctv., 2002). Gần đây, với thông tin hệ gen của cá tra (VN\_pangasius) được thu thập từ cơ sở dữ liệu NCBI (GenBank assembly accession: GCA\_003671635.1) được công bố vào năm 2018 (Kim và ctv., 2018), đây là cơ sở giúp cho việc phát triển chỉ thị phân tử microsatellite mới và chuyên biệt. Các microsatellite có thể được xác định bằng phương pháp nhanh chóng thông qua công cụ tin sinh học, khắc phục được các khuyết điểm của phương pháp phát triển chỉ thị microsatellite truyền thống. Các bộ mỗi cũng được thiết kế để hoạt động trong điều kiện PCR đồng nhất nhằm phát triển các phản ứng multiplex PCR. Qua đánh giá sơ bộ mức độ đa hình của các chỉ thị, Nguyễn Văn Sáng và ctv. (2020) xác định được 10 microsatellite có tiềm năng ứng dụng trong truy xuất phủ hệ, phục vụ cho chọn giống lâu dài trên cá tra. Nếu phương pháp đánh dấu PIT được thay thế bằng phương pháp truy xuất phủ hệ bằng chỉ thị phân tử thì hiệu quả chọn lọc có thể tăng thêm 25% qua 15 thế hệ chọn giống (Gjøen, 2004).

Khi so sánh các loại chỉ thị phân tử dùng trong truy xuất phủ hệ cho thấy, chỉ thị microsatellite thường có khả năng truy xuất tốt với số ít các chỉ thị nhưng cần tính đa hình cao của mỗi chỉ thị. Trong khi chỉ thị AFLP và SNP thực hiện truy xuất với số lượng nhiều chỉ thị hơn nhưng chỉ yêu cầu tính đa hình thấp của mỗi chỉ thị. Vì vậy, microsatellite là chỉ thị được nghiên cứu ứng dụng rộng rãi để truy xuất phủ hệ do số lượng chỉ thị sử dụng ít hơn các loại chỉ thị khác (Jones và ctv., 2010).

### **1.3.1.2. Microsatellite dùng trong truy xuất phủ hệ**

Microsatellite là những đoạn ADN ngắn chứa một motif (từ 1 đến 6 bp) lặp lại nhiều lần. Các microsatellite phân bố rộng rãi trong bộ gen của các sinh vật nhân thực. Microsatellite là chỉ thị đồng tính trội, tính đa hình cao, dựa trên kỹ thuật PCR giúp việc ghi nhận số liệu một cách dễ dàng và tuân theo quy luật di truyền Mendel nên được dùng phổ biến trong truy xuất phủ hệ trên thủy sản (Das và Sahoo, 2014; Flanagan và Jones, 2018). Phản ứng multiplex PCR đã được phát triển và sử dụng



rộng rãi để truy xuất phá hệ trên thủy sản. Multiplex PCR làm giảm thao tác PCR với số lượng mẫu lớn do đó giảm nguy cơ lỗi thao tác (Thanh và ctv., 2019). Các nghiên cứu sử dụng chỉ thị microsatellite hầu hết đều sử dụng phương pháp điện di mao quản làm kỹ thuật xác định alen vì chi phí và độ chính xác phù hợp. Với các hệ thống điện di này, bộ phận ghi nhận tín hiệu có thể phân biệt nhiều màu huỳnh quang của mỗi giúp tăng độ phân giải của việc điện di từ đó xác định chính xác kích thước của đoạn ADN hơn (Herlin và ctv., 2007).

Các phương pháp cơ bản của truy xuất phá hệ là: (1) loại trừ (exclusion-based method); (2) xác định bố mẹ dựa trên khả năng (likelihood-based method) gồm phương pháp phân bố phân định và phân bố một phần. Phương pháp phân bố một phần có các đặc tính tốt hơn so với phân bố phân định (Yue và Xia, 2014); (3) phân tích bố mẹ bằng xác suất đầy đủ (Full Probability Parentage Analysis); (4) tái cấu trúc lại bố mẹ (Parental Reconstruction) và (5) truy xuất dựa trên tái cấu trúc quan hệ anh em (Sibship Reconstruction) (Jones và ctv., 2010; Flanagan và Jones, 2018). Khi sử dụng microsatellite thì phương pháp xác định bố mẹ dựa trên khả năng cho hiệu quả truy xuất cao hơn (khoảng 1,18 lần trên cá tráp) so với phương pháp loại trừ (Antonello và ctv., 2009). Phương pháp này có thể xử lý lỗi ghi nhận kiểu gen và lỗi đột biến trong việc tính toán (Jones và ctv., 2010).

Năng lực truy xuất phá hệ với độ tin cậy cao có thể đạt được khi sử dụng ít hơn 10 microsatellite hay có thể đến 50 microsatellite tùy thuộc quần thể nghiên cứu (Glaubitz và ctv., 2003).

### **1.3.2. Các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch được nghiên cứu phục vụ chọn giống kháng bệnh trên động vật thủy sản**

Việc tìm kiếm chỉ thị biểu thị khả năng kháng bệnh của thủy sản là một nhiệm vụ khó khăn đối với chọn giống (Das và Sahoo, 2014). Tình trạng sống/chết khi kết thúc mô hình gây bệnh thực nghiệm là tiêu chí được sử dụng rộng rãi nhất để xác định mức độ kháng bệnh của thủy sản (Galina, 2017) nhưng tình trạng sống sót của thủy sản trong thí nghiệm cảm nhiễm (có thể thủy sản không bị nhiễm bệnh, thủy sản đã bị nhiễm bệnh, phục hồi, không còn mầm bệnh hoặc còn mầm bệnh) vẫn chưa được xác định. Khi thủy sản đã khỏi bệnh nhưng vẫn chứa mầm bệnh có thể là một mối đe dọa khởi đầu cho các đợt bùng phát dịch bệnh tiếp theo (Galina, 2017). Do

đó, thông tin về tính trạng sống/chết khi kết thúc mô hình gây bệnh thực nghiệm chưa phản ánh đầy đủ tình trạng của thủy sản trong quá trình cảm nhiễm có thể làm giảm độ chính xác của chọn lọc trong các chương trình chọn giống (Galina, 2017). Vì vậy, cần tìm kiếm thêm phương pháp đánh giá tính trạng kháng bệnh khác, ví dụ như các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch, xem xét độ chính xác phản ánh khả năng kháng bệnh của động vật thủy sản cùng với khả năng sống sót thông qua sống/chết để áp dụng vào tính toán và chọn lọc (Ødegård và ctv., 2011a).

Các đáp ứng miễn dịch trong quá trình cảm nhiễm của thủy sản cũng có thể là các chỉ thị hữu ích biểu thị khả năng kháng bệnh phục vụ chọn giống (Das và Sahoo, 2014) do: (1) trong môi trường nuôi, thủy sản thường tiếp xúc với nhiều loại mầm bệnh nên việc cải thiện di truyền khả năng kháng bệnh đối với một số bệnh cụ thể có thể không phải là giải pháp bền vững nhất. Mầm bệnh có thể tiến hóa để thích nghi với áp lực chọn lọc ngày càng tăng do vật chủ kháng thuốc. Do đó, chọn giống có thể là chọn các đáp ứng miễn dịch chung của thủy sản với nhiều loại mầm bệnh; (2) ngoài việc đánh giá khả năng kháng bệnh qua sức đề kháng, việc đo lường khả năng chịu đựng có thể cho phép chúng ta định lượng các tác động của tương tác giữa kiểu gen của thủy sản và mầm bệnh. Điều này có thể dẫn đến ước tính chính xác hơn về giá trị chọn giống cho chọn lọc. Vì vậy, các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch cần được đánh giá và sau đó có thể được ước tính thông số di truyền để có thể là một tiêu chí cho chọn lọc (Galina, 2017).

Các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch đã được đánh giá trong các chương trình chọn giống kháng bệnh, cụ thể Camp và ctv. (2000) thực hiện nghiên cứu khả năng sống sót và phản ứng miễn dịch của các gia đình cá nheo Mỹ (*Ictalurus punctatus*) kháng bệnh và miễn cảm sau cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri*. Vật liệu tiến hành thí nghiệm là 15 gia đình (40 cá/gia đình). Nghiên cứu tiến hành cảm nhiễm bằng phương pháp tắm trong 4 giờ với nồng độ vi khuẩn đưa vào trong bể là  $4 \times 10^6$  CFU/mL. Qua cảm nhiễm, nghiên cứu xác định hai nhóm gia đình có tỉ lệ sống cao nhất (kháng bệnh) và thấp nhất (miễn cảm) trong suốt 28 ngày cảm nhiễm. Hai nhóm gia đình (2 gia đình/nhóm) được tái cảm nhiễm để đánh giá khả năng đáp ứng miễn dịch qua các chỉ tiêu nồng độ cortisol, kháng thể, các loại bạch cầu trong máu như lympho B, lympho T, số lượng trung tâm đại thực bào sắc tố (TTĐTĐTB) trong các mô gan, thận

sau và lách tại ngày 3, 7, 14 trong giai đoạn cảm nhiễm với số lượng cá phân tích là 3 cá/chỉ tiêu/gia đình. Thông qua phân tích phương sai để so sánh sự khác biệt về chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch hai nhóm gia đình kháng bệnh trên phần mềm SAS cho thấy, sự khác biệt trong đáp ứng miễn dịch (bạch cầu lympho B, lympho T và TTĐTB ở lách và thận sau) của nhóm gia đình cá da trơn kháng bệnh cao so với các gia đình mẫn cảm với vi khuẩn *E. ictaluri*. Trong những gia đình mẫn cảm và kháng bệnh không thấy sự khác biệt về nồng độ cortisol và kháng thể sau khi cảm nhiễm vi khuẩn.

Sahoo và ctv. (2011) thực hiện nghiên cứu đáp ứng miễn dịch của các gia đình cá rohu (*Labeo rohita*) kháng bệnh và mẫn cảm ở Ấn Độ sau cảm nhiễm với vi khuẩn *A. hydrophila*. Vật liệu tiến hành thí nghiệm là 25 gia đình (15 gia đình kháng bệnh cao và 10 gia đình kháng bệnh thấp) với tỉ lệ sống trung bình của các nhóm gia đình tương ứng là 72,74% và 41,98% từ chương trình chọn giống cá rohu kháng bệnh thế hệ đầu tiên. Nghiên cứu tiến hành cảm nhiễm bằng phương pháp tiêm vi khuẩn vào phúc mạc bụng 30 cá/nhóm gia đình kháng bệnh với liều  $9,55 \times 10^6$  CFU/kg/cá. Qua cảm nhiễm trong 10 ngày, thu mẫu máu 30 cá thuộc gia đình kháng bệnh cao và 24 cá thuộc nhóm gia đình thấp để phân tích các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch gồm: hoạt động tăng hô hấp, hoạt động của myeloperoxidase, hoạt động của ceruloplasmin, hoạt động của antiprotease, nồng độ protein tổng số, nồng độ đường trong máu, hiệu giá kháng thể, hoạt động ngưng kết vi khuẩn. Thông qua kiểm định t-test cho giá trị trung bình để so sánh sự khác biệt về chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch hai nhóm gia đình kháng bệnh cho thấy, hoạt động tăng hô hấp trong thực bào ở máu, hoạt động của myeloperoxidase, hoạt động của ceruloplasmin cao hơn ở nhóm kháng bệnh cao so với kháng bệnh thấp trong khi nồng độ đường trong máu và hiệu giá kháng thể trong huyết thanh thấp hơn. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong hoạt động của antiprotease, hoạt động ngưng kết vi khuẩn giữa hai nhóm gia đình.

Các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch đã được ước tính các thông số di truyền nhằm phục vụ chọn giống kháng bệnh. Faggion và ctv. (2021) đã thực hiện nghiên cứu về khả năng kháng bệnh hoại tử thần kinh do vi-rút NNV (Nervous Necrosis Virus) gây ra ở cá vược Châu Âu. Vật liệu tiến hành thí nghiệm là 625 cá thể con cho thí nghiệm cảm nhiễm được sản xuất tại trại giống thương mại thông qua thụ tinh nhân tạo các cá thể bố mẹ khoảng 7 - 8 tuổi. Nghiên cứu tiến hành cảm nhiễm bằng phương pháp

tiêm 0,1 mL huyền phù vi-rút ( $10^{8.3}$  TCID/mL) vào cơ của cá. Cá được kiểm tra triệu chứng, bệnh tích và tình trạng sống/chết ba lần một ngày. Tiến hành thu thập các chỉ tiêu miễn dịch như nồng độ cortisol và hiệu giá kháng thể tại thời điểm kết thúc thí nghiệm ở 29 ngày sau cảm nhiễm. Nghiên cứu ước tính các thành phần phương sai di truyền bằng cách sử dụng mô hình ngưỡng sire-dam đối với tình trạng sống/chết và mô hình cá thể đơn biến đổi với khối lượng cơ thể, nồng độ cortisol và hiệu giá kháng thể. Kết quả cho thấy, hệ số di truyền ước tính đối với tỉ lệ chết từ 0,15 - 0,23; nồng độ cortisol, hiệu giá kháng thể và trọng lượng cơ thể lần lượt là 0,19, 0,36 và 0,57. Tương quan di truyền của tỉ lệ chết với hiệu giá kháng thể (- 0,36) cho thấy, hiệu giá kháng thể có thể đóng một vai trò như một tính trạng kháng bệnh và việc lựa chọn những cá thể có giá trị chọn giống về hiệu giá kháng thể cao có thể tăng khả năng kháng bệnh.

Trên cá tra, các cơ chế đáp ứng miễn dịch khi nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* đã được nghiên cứu, cụ thể Nguyễn Thị Thúy Liễu và ctv. (2011) cho thấy có sự thay đổi rõ rệt về số lượng và hình dạng tế bào máu như sự xuất hiện của hồng cầu đa nhân và hồng cầu không nhân ở cá tra bị bệnh. Ở cá bệnh, bạch cầu lympho giảm 3,15 lần nhưng bạch cầu trung tính và bạch cầu đơn nhân lại tăng cao so với cá khỏe. Ngoài ra, Trần Thị Phương Dung và ctv. (2019) cũng cho thấy khi nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* số lượng hồng cầu cá giảm mạnh và có sự xuất hiện của hồng cầu không nhân và hồng cầu thoái hóa. Các loại bạch cầu lympho, bạch cầu đơn nhân hay bạch cầu trung tính nhìn chung giảm ở thời điểm sau hai tuần nhưng tăng trở lại sau bốn tuần cảm nhiễm. Ngoài ra, Từ Thanh Dung và ctv. (2013) cho thấy, ở cá tra bệnh có sự tăng về hiệu giá kháng thể trong hai tháng khảo sát. Hiện nay, hệ số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mũ ở quần thể cá tra chọn giống trong quá trình cảm nhiễm đối với vi khuẩn *E. ictaluri* đã được ước tính ( $h^2 = 0,37$ ; Trịnh Quốc Trọng và ctv., 2016a, b) nhưng sự khác biệt trong đáp ứng miễn dịch giữa các gia đình cá tra kháng bệnh và việc xác định các chỉ thị miễn dịch có thể biểu thị khả năng kháng bệnh kết hợp với tỉ lệ sống/chết trong quá trình cảm nhiễm giúp chọn lọc có hiệu quả hơn vẫn chưa được công bố.

## **CHƯƠNG 2**

### **VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

**2.1. Phương pháp cho nội dung 1 về ứng dụng di truyền số lượng ước tính các thông số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mỡ ở thế hệ G1 cá tra và đề xuất chọn lọc**

**2.1.1. Nuôi vỗ cá bố mẹ G0, phối ghép cặp để sản xuất gia đình đàn con G1, ương nuôi các gia đình G1 đến kích cỡ đánh dấu và đánh dấu từng cá thể**

**2.1.1.1. Nuôi vỗ cá bố mẹ G0**

Thời gian nuôi vỗ trong 04 tháng từ tháng 04/2019 đến 08/2019.

Vật liệu chính của nghiên cứu là quần thể cá tra chọn giống kháng bệnh gan thận mỡ (G0) được tạo ra trong đề tài trọng điểm cấp Nhà nước thuộc Chương trình KC.06, Bộ Khoa học Công nghệ “Nghiên cứu chọn giống cá tra kháng bệnh gan thận mỡ” giai đoạn 2012 - 2015 thuộc Viện NCNTTS II (Thông tin thông số di truyền của tính trạng kháng bệnh gan thận mỡ trên quần thể G0 trình bày tại Phụ lục 1).

Nhằm đảm bảo số lượng các gia đình phục vụ chọn giống kháng bệnh khoảng 100 - 130 gia đình nhằm ước tính các thông số di truyền phục vụ chọn giống, nghiên cứu này chọn các cá bố mẹ từ 145 gia đình G0 gồm nhóm chọn lọc và nhóm đối chứng, trong các gia đình này chọn các cá thể có giá trị EBV cao nhất và chọn không quá 08 cá thể/gia đình nhằm giảm thiểu giá trị cận huyết (Gjedrem, 2005). Nghiên cứu nuôi vỗ 425 cá bố mẹ G0 bao gồm 325 con thuộc nhóm chọn lọc và 100 con nhóm đối chứng (danh sách cá bố và cá mẹ thuộc nhóm đối chứng và chọn lọc được lựa chọn nuôi vỗ dựa trên giá trị EBV trình bày chi tiết tại Phụ lục 2). Cá được nuôi vỗ trong ao 2.000 m<sup>2</sup> ở độ sâu mực nước 1,5 m. Cho cá ăn 02 lần/ngày với thức ăn viên công nghiệp có hàm lượng đạm 32%, tổng béo 12%, linoleic acid >2%, khi cho cá ăn có bổ sung một số vitamin (A, C, E, v.v.), dầu cá với liều lượng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Thay nước định kì 02 tuần/lần và khi cần thiết, nước thay được bơm từ hệ thống ao lắng. Kiểm tra mức độ thành thực cá nuôi vỗ sau hai tháng nuôi và trước khi cho sinh sản. Các kĩ thuật nuôi vỗ đã được phát triển và hoàn thiện từ các đề tài chọn giống cá tra kháng bệnh gan thận mỡ trước đây của Viện NCNTTS II

(Trình Quốc Trọng và ctv., 2016b). Kiểm tra mức độ thành thục cá bố mẹ G0 nuôi vỗ (Phụ lục 3): đối với cá cái, dùng que thăm trứng và xác định giai đoạn phát triển của trứng cá, đánh giá mức độ thành thục của buồng trứng cá cái theo các giai đoạn phát triển dựa vào màu sắc và kích thước trứng cá. Cá đạt thành thục và sẵn sàng tham gia sinh sản khi có trứng đang ở giai đoạn IV (Phạm Văn Khánh, 1996; Fariedah và ctv., 2018); đối với cá đực: kiểm tra thành thục bằng cách vuốt nhẹ bụng cá, nếu có tinh dịch chảy ra thì xác định cá đã thành thục và sẵn sàng tham gia sinh sản (Nguyễn Thị Hồng, 2014).

#### **2.1.1.2. Phối ghép cặp để sản xuất gia đình đàn con G1**

Thời gian phối ghép cặp để sản xuất gia đình đàn con G1 từ 22/08/2019 đến 09/10/2019. Nghiên cứu tiến hành phối ghép cặp các cá thể bố mẹ G0 để sản xuất gia đình đàn con G1 sau 4 đợt sinh sản (Đợt 1: 22/08/2019; đợt 2: 16/09/2019; đợt 3: 25/09/2019; đợt 4: 09/10/2019).

##### *Kỹ thuật sinh sản*

Dùng phương pháp sinh sản nhân tạo bằng cách tiêm HCG vào cơ lưng của cá (Nguyen và ctv., 2019b).

- + Đối với cá cái thì tiêm 3 liều gồm: liều dẫn (800 UI/kg), liều sơ bộ (1.200 UI/kg) sau liều dẫn 24 giờ, liều quyết định (4.500 UI/kg) sau liều sơ bộ 12 giờ.
- + Đối với cá đực thì tiêm 250 UI/kg cùng lúc với liều quyết định của cá cái.

##### *Kỹ thuật thụ tinh*

- + Phương pháp gieo tinh: áp dụng phương pháp gieo tinh khô (Datta và ctv., 2018).
- + Phương pháp phối: phép phối thứ bậc ( $n$  đực  $\times$   $2n$  cái =  $2n$  gia đình) (Gjedrem, 2005) được sử dụng trong nghiên cứu. Tinh trùng của một cá đực được thụ tinh với trứng của hai cá cái khác nhau. Áp dụng ghép phối tránh cận huyết (ghép phối giữa các cá thể có quan hệ huyết thống xa nhau).

#### **2.1.1.3. Ấp trứng cá tra**

Sau khi vuốt tinh và vuốt trứng cá tra, cho 0,5 mL tinh dịch vào 50 g trứng và dùng lông cánh gia cầm khuấy nhẹ, nhanh và đều trong thời gian 15 - 20 giây, cho một ít nước vào để hoạt hóa tinh trùng. Sau đó khử dính trứng bằng dung dịch tanin (Phạm Thế Hiển và ctv., 2009) với liều lượng 6 g/10 lít nước trong 30 giây.

Sau khi ấp nở, mỗi gia đình cho sinh sản và chọn 3.000 cá bột/gia đình ương lên cá hương và giống.

#### **2.1.1.4. Ương cá bột lên cá hương**

Cá sau khi nở 30 - 36 giờ thì hết noãn hoàng và bắt đầu ăn thức ăn bên ngoài. Do đó, khi cá nở được 20 - 30 giờ thì nhanh chóng đưa cá bột sang bể composite 1,5 m<sup>3</sup> (thể tích nước 1,0 m<sup>3</sup>) trong nhà giống để ương lên thành cá hương riêng biệt theo từng gia đình. Mật độ ương là 3.000 cá bột/gia đình/bể (Trịnh Quốc Trọng và ctv., 2016b).

Trong vòng sáu ngày đầu, cá được cho ăn *Artemia* 06 lần/ngày với mỗi lần 0,8 g/bể, mỗi ngày tăng thêm 0,1 g. Ngày thứ bảy, cho cá cho ăn thức ăn bột mịn chứa 42% đạm 03 lần/ngày với mỗi lần 2 g/bể, mỗi ngày tăng lên 0,5 g. Ngoài ra, từ ngày thứ 2 đến ngày thứ 10, có bổ sung thêm *Moina* 30 g/ngày/bể trong phần ăn của cá. Từ ngày thứ ba trở đi, tiến hành xi phông 02 ngày/lần, thay 30% nước khi các chỉ tiêu môi trường nước không đạt yêu cầu (Phạm và ctv., 2020a).

Sau khi sản xuất được 155 gia đình cá hương 17 ngày tuổi, nghiên cứu chọn 33 gia đình (tham khảo nghiên cứu của Glover (2005) thực hiện cảm nhiễm tối thiểu 30 gia đình) với số lượng cá nhiều ngẫu nhiên để vận chuyển đến Phòng thí nghiệm ươm thuộc Trung tâm Quan trắc môi trường và bệnh thủy sản Nam Bộ (Viện NCNTTS II) để tiến hành thí nghiệm cảm nhiễm trên cá hương.

#### **2.1.1.5. Ương nuôi các gia đình cá hương đến kích cỡ đánh dấu**

Chọn ngẫu nhiên 500 con cá hương 15 ngày tuổi từ mỗi gia đình để tiếp tục ương riêng biệt trong các giai lưới (1,5 × 2,0 × 1,0 m) đặt trong cùng một ao đất (2.000 m<sup>2</sup>) cho đến kích cỡ đánh dấu. Cho cá ăn bằng thức ăn viên chứa 28 - 32% đạm. Thay nước 04 lần/tháng và mỗi lần thay 30% thể tích nước ao bằng nước từ ao lắng. Kiểm tra tăng trưởng của cá cho đến khi cá đạt kích cỡ đánh dấu (Trịnh Quốc Trọng và ctv., 2016b).

Các chỉ tiêu đánh giá về sự sinh sản của các gia đình cá gồm tỉ lệ cá mẹ rụng trứng và tỉ lệ trứng vượt được tính theo công thức của Lê Văn Dân và Lê Tiến Hữu (2017); tỉ lệ thụ tinh của trứng (%) được tính theo công thức của Nguyễn Văn Huy và ctv. (2019); ấp trứng cá tra và ương nuôi các gia đình gồm tỉ lệ sống từ cá bột lên cá hương (%) được tính theo công thức của Đỗ Thị Thanh Hương và ctv. (2020); tỉ

lệ sống từ cá hương lên cá giống để đánh dấu (%) được tính theo công thức của Lê Quốc Việt và ctv. (2010). Các công thức được trình bày chi tiết tại Phụ lục 4.

#### **2.1.1.6. Đánh dấu các gia đình và thuần dưỡng sau đánh dấu**

Ngay sau khi kết thúc ương nuôi cá đến kích cỡ đánh dấu (15 - 25g, Gjedrem và Baranski, 2009), số gia đình cá còn lại là 130 gia đình được tiến hành đánh dấu từ PIT (dấu từ PIT có chiều dài 12 mm, đường kính 2 mm) vào cơ phía dưới vây lưng cá giống (Trịnh Quốc Trọng và ctv., 2016b) trong 12 - 13 ngày. Mỗi gia đình trong các gia đình cá giống sau khi đánh dấu từ PIT chia ra hai nhóm cho hai thí nghiệm cảm nhiễm và nuôi tăng trưởng. Số lượng cá đánh dấu PIT tham khảo từ nghiên cứu Gjedrem (2015) cho thấy để đạt độ tin cậy trong xử lý số liệu phục vụ chọn giống kháng bệnh cần đánh dấu từ 30 - 50 cá thể/gia đình.

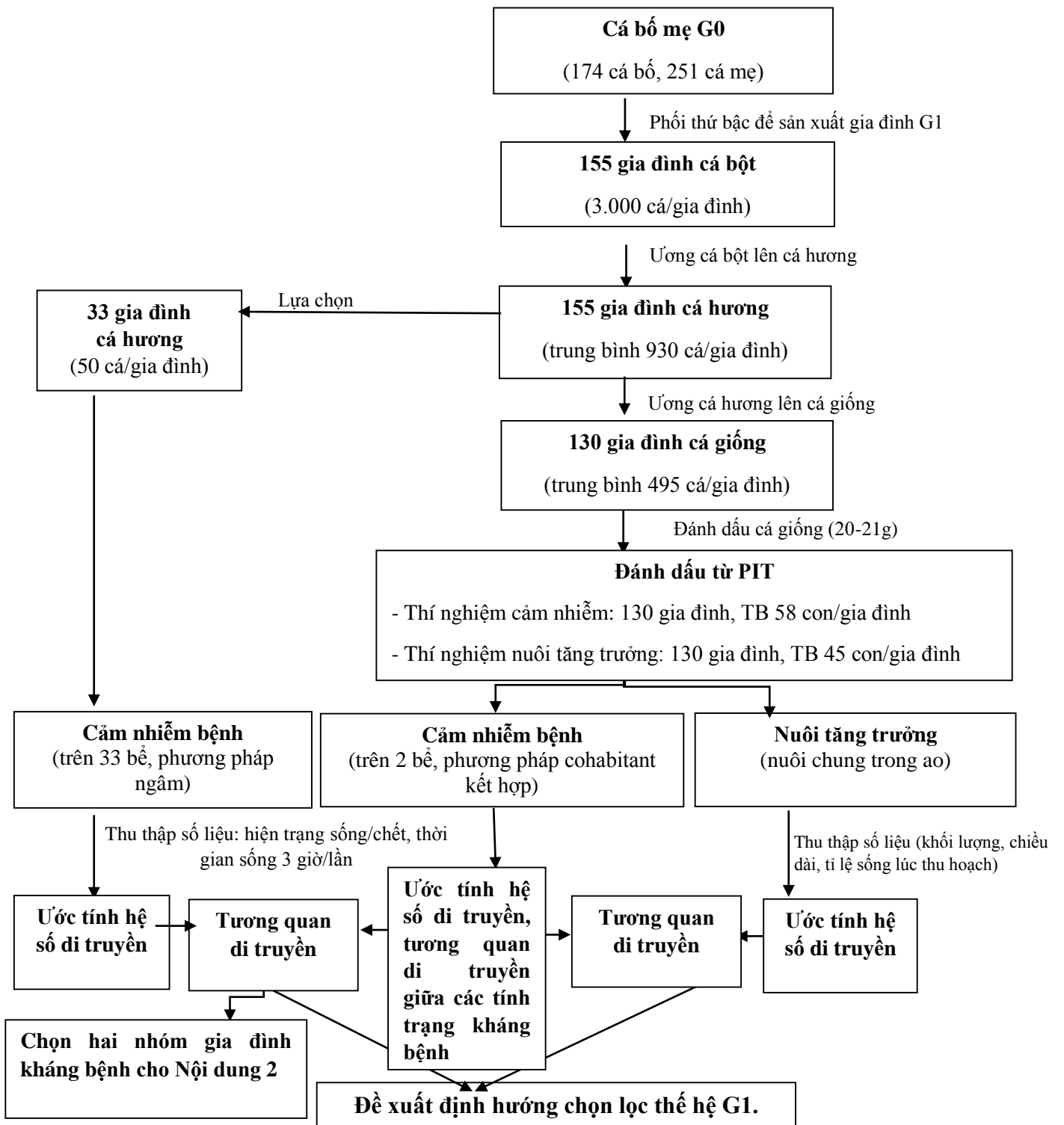
Đánh dấu PIT cho 7.664 cá (trung bình 58 con/gia đình) thuộc 130 gia đình cho thí nghiệm cảm nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh gan thận mũ.

Đánh dấu PIT cho 5.838 cá (trung bình 45 con/gia đình) cùng thuộc 130 gia đình cho thí nghiệm nuôi tăng trưởng trong ao.

Cá sau khi đánh dấu từ PIT được thuần dưỡng như sau: (1) với thí nghiệm cảm nhiễm bệnh, cá được thả vào bể xi măng 15 m<sup>3</sup> nuôi thuần dưỡng, có sục khí, mật độ khoảng 1 con/4 lít. Thuần dưỡng cá 07 ngày trước khi vận chuyển đến nơi tiến hành thí nghiệm cảm nhiễm bệnh; (2) với thí nghiệm nuôi tăng trưởng, cá được thả vào giai lưới kích thước 15 m<sup>2</sup> và lưu giữ khoảng 3 ngày để cá quen với môi trường nước mới sau đó thả nuôi trong ao (Nguyen và ctv., 2019c). Thông tin chi tiết về sinh sản, đánh dấu, cảm nhiễm và nuôi tăng trưởng các gia đình cá được trình bày tại Phụ lục 5.

Sau khi đánh dấu PIT cá, tiến hành bố trí các thí nghiệm Nội dung 1 về ứng dụng di truyền số lượng ước tính các thông số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mũ ở thế hệ G1 cá tra và đề xuất chọn lọc được trình bày chi tiết tại Hình 2.1.





**Hình 2.1.** Sơ đồ bố trí thí nghiệm Nội dung 1 về ứng dụng di truyền số lượng ước tính các thông số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mũ ở thế hệ G1 cá tra và đề xuất chọn lọc

## **2.1.2. Cảm nhiễm bệnh gan thận mũ các cá thể và gia đình cá hương và cá giống G1 để đánh giá khả năng kháng bệnh**

### **2.1.2.1. Thuần cá thí nghiệm và chuẩn bị vi khuẩn trước thí nghiệm cảm nhiễm**

Cá hương và cá giống đều được đưa về Phòng thí nghiệm ươm, Trung tâm Quan trắc môi trường và bệnh thủy sản Nam Bộ (Viện NCNTTS II) thuần trong thời gian 10 ngày trước khi tiến hành thí nghiệm cảm nhiễm. Tất cả các gia đình cá ngay sau khi cân khối lượng và đo chiều dài được đưa vào bể composite thể tích 90 L (đối với cá hương) và bể 30 m<sup>3</sup> (với cá giống) có lắp hệ thống sục khí thuần dưỡng.

Chủng vi khuẩn dùng cho thí nghiệm là chủng *E. ictaluri* Gly09M (chủng vi khuẩn trong đề tài “Nghiên cứu vaccine phòng bệnh nhiễm khuẩn cho cá tra, cá basa, cá mú, cá giò và cá hồng mỹ nuôi công nghiệp”). Chủng vi khuẩn này đã được cấy truyền qua cá tra giống, phân lập và giữ giống vào tháng 11/2009 (Lê Hồng Phước và ctv., 2013). Chủng vi khuẩn được cấy chuyển và công cường độc, tái phân lập định kì 01 lần/năm tại Trung tâm Quan trắc môi trường và bệnh thủy sản Nam Bộ (Viện NCNTTS II). Vi khuẩn gây cảm nhiễm được phục hồi trên môi trường thạch máu cừu (Sheep Blood Agar) ở trong tủ ấm 48 giờ ở 28°C, sau đó chọn một đến hai khuẩn lạc nuôi tăng sinh trong 3 - 4 lít môi trường BHIB (Brain Heart Infusion Broth), lắc 85 rpm trong 24 giờ. Xác định mật độ vi khuẩn bằng máy so màu quang phổ ADN SmartSpec Plus ở bước sóng 550 nm ( $OD_{550nm} = 1$  tương ứng với mật độ vi khuẩn là  $1,2 \times 10^9$  CFU/mL) (Lê Hồng Phước và ctv., 2013).

### **2.1.2.2. Kiểm tra cá trước thí nghiệm cảm nhiễm**

Trước khi bố trí thí nghiệm cảm nhiễm, thu ngẫu nhiên 10 - 45 cá thí nghiệm để kiểm tra nhằm xác định đàn cá khỏe và không nhiễm bệnh trước khi cảm nhiễm (Antonello và ctv., 2009) (thông tin thu mẫu xét nghiệm bệnh của các gia đình cá trước khi cảm nhiễm trình bày tại Phụ lục 6). Phương pháp phân lập và kiểm tra vi khuẩn trên cá gồm ba phương pháp chủ yếu: (1) nhuộm Gram vi khuẩn: dùng dao cắt một phần nhỏ mẫu thận cá và phết nhẹ lên lam kính. Để mẫu khô tự nhiên, sau đó cố định lam và nhuộm Gram (Tùng Thanh Dung và ctv., 2010) bằng bộ kit thương mại của Công ty TNHH dịch vụ và thương mại Nam Khoa; (2) quan sát khuẩn lạc: thu vệt phết từ mô gan hoặc thận cá bệnh. Cấy mẫu vào đĩa thạch BA (Blood Agar) bổ sung 5% máu cừu và ủ ở 28°C trong 36 - 48 giờ. Sau 48 giờ nuôi cấy sẽ thấy được khuẩn lạc điển hình với

số lượng lớn (Hawke và ctv., 1998); (3) kiểm tra ADN vi khuẩn trên cá theo phương pháp của Panangala và ctv. (2007): mẫu ADN của vi khuẩn sau khi được li trích từ khuẩn lạc được tiến hành PCR và điện di (nghiên cứu sử dụng cặp mồi EiFd-1 (mồi ngược) GTAGCAGGGAGAAAGCTTGC và EiRs-1 (mồi xuôi) GAACGCTATTAACGCTCACACC để khuếch đại đoạn gen 16S RNA của vi khuẩn với kích thước 407 bp). Ngoài ra, trong quá trình cảm nhiễm có thu 1-2 mẫu nước để kiểm tra vi khuẩn trong nước bằng phương pháp nhuộm Giemsa.

### **2.1.2.3. Cảm nhiễm bệnh gan thận mũ các gia đình cá hương và cá giống**

#### ***Thí nghiệm cảm nhiễm thăm dò độc lực***

*Cá hương*: 1.350 cá hương được gây nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri* bằng phương pháp ngâm trong suốt thời gian thí nghiệm với các nghiệm thức (NT) tương ứng với các liều  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  và  $10^7$  CFU/mL và 0 CFU/mL (01 NT đối chứng không ngâm vi khuẩn và 01 NT đối chứng ngâm với BHI tương đương nồng độ ngâm vi khuẩn cao nhất). Mỗi NT lặp lại 03 lần với mật độ 1 cá/0,4 lít nước và nhiệt độ nước duy trì từ 26 - 28°C. Ghi nhận số lượng cá chết theo ngày trong suốt 13 ngày sau khi gây nhiễm. Liều gây chết 50% cá thí nghiệm ( $LD_{50}$ , lethal dose 50%) của vi khuẩn được xác định theo phương trình Probit (Finney, 1971) và kiểm chứng bằng công thức của Reed và Muench (1938).

*Cá giống*: 480 cá giống được gây nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri* dựa trên những thông số kỹ thuật đã được tối ưu từ kết quả đề tài KC.06 “Nghiên cứu chọn giống kháng bệnh gan thận mũ” (Trịnh Quốc Trọng và ctv., 2016b) như sau: cá cohabitant được tạo ra bằng cách tiêm vi khuẩn *E. ictaluri* mật độ  $2 \times 10^5$  CFU/cá vào xoang bụng. Huyền phù vi khuẩn *E. ictaluri* được bổ sung một lần vào bể thí nghiệm ở ngày thứ 2 sau khi cho cá cohabitant và cá thí nghiệm sống chung với nhau trong một bể. Thực hiện hai thí nghiệm thăm dò dựa trên kết quả liệu cảm nhiễm từ đề tài KC.06 (Trịnh Quốc Trọng và ctv., 2016b) gồm: (1) tỉ lệ ghép cá cohabitant theo hai nghiệm thức (NT) là 35% và 50%; (2) bổ sung vi khuẩn cho vào bể cảm nhiễm theo hai NT để bể cảm nhiễm đạt mật độ vi khuẩn  $10^5$  CFU/mL và  $10^6$  CFU/mL. Mỗi NT/thí nghiệm thăm dò lặp lại hai lần.

***Thí nghiệm cảm nhiễm trên 33 gia đình cá hương và 130 gia đình cá giống để đánh giá khả năng kháng bệnh***

### *Thí nghiệm cảm nhiễm trên 33 gia đình cá hương*

*Cá hương*: trong 155 gia đình cá hương 17 ngày tuổi ương riêng rẽ trong bể composite, chọn ngẫu nhiên 33 gia đình cá hương (do số lượng cá hạn chế nên nghiên cứu chọn số gia đình cá tối thiểu theo Glover (2005) thực hiện cảm nhiễm tối thiểu 30 gia đình) để tiến hành cảm nhiễm đánh giá khả năng kháng bệnh và ước tính các thông số di truyền. Tổng cộng có 1.650 cá thuộc 33 gia đình cá hương (50 con/gia đình) với khối lượng  $0,16 \pm 0,10$  g được gây cảm nhiễm bằng phương pháp ngâm cá với vi khuẩn *E. ictaluri* cho đến khi kết thúc thí nghiệm. Cá trong từng gia đình được cảm nhiễm trong bể riêng 30 L với mật độ cá trong bể là 1 cá/0,4 lít nước và nhiệt độ nước 26 - 28°C (Nguyen và ctv., 2019b). Liều gây nhiễm được xác định từ kết quả thí nghiệm thăm dò độc lực. Ghi nhận biểu hiện triệu chứng, bệnh tích, số lượng cá chết 3 giờ/lần sau khi gây nhiễm (Trịnh Quốc Trọng và ctv., 2016b).

### *Thí nghiệm cảm nhiễm trên 130 gia đình cá giống*

*Cá giống*: 7.664 cá thuộc 130 gia đình (trung bình 58 con/gia đình, chia đều theo gia đình cho 2 bể thí nghiệm lặp lại (Henryon và ctv., 2005; Mahapatra và ctv., 2008) với khối lượng cá thí nghiệm là  $20,90 \pm 12,00$  g được gây cảm nhiễm bằng phương pháp cohabitant kết hợp. Cá cohabitant có nguồn gốc từ 130 gia đình, nhưng được nuôi từ cá bột lên cá giống trên bể xi măng riêng biệt để phục vụ cho thí nghiệm cảm nhiễm, có khối lượng  $16,6 \pm 6,1$  g/con, được tiêm vi khuẩn vào xoang bụng với liều  $2 \times 10^5$  CFU/cá vào ngày 17/02/2020. Thí nghiệm cảm nhiễm 130 gia đình thực hiện trong 2 bể 16.000 L, số lượng cá cho vào bể 1, bể 2 và tổng hai bể tương ứng là 3.832, 3.832 và 7.664 con, mật độ cá là 1 cá/4,1 lít nước/bể, nhiệt độ 26 - 28°C (Nguyen và ctv., 2019b). Ghép cá cohabitant vào ngày 19/02/2020 và bổ sung vi khuẩn vào bể cảm nhiễm vào ngày 21/02/2020 với tỉ lệ ghép cá cohabitant và liều bổ sung vi khuẩn được xác định từ kết quả thí nghiệm thăm dò. Ghi nhận biểu hiện triệu chứng, bệnh tích, số lượng cá chết theo truy dấu từ PIT cho từng cá thể 3 giờ/lần (Trịnh Quốc Trọng và ctv., 2016b).

#### **2.1.2.4. Theo dõi các thông số môi trường và tái phân lập vi khuẩn trong quá trình cảm nhiễm**

Việc quản lý chất lượng nước trong quá trình cảm nhiễm gồm các chỉ tiêu pH, NH<sub>3</sub>, oxy hòa tan và nhiệt độ nước đo mỗi ngày một lần vào lúc 7 giờ sáng (Trịnh

Quốc Trọng và ctv., 2016b) bằng bộ KIT Sera (Đức) và nhiệt kế thủy ngân Alla (Pháp). Trong quá trình cảm nhiễm, nhằm đánh giá tình trạng sức khỏe cá trước cảm nhiễm và trong cảm nhiễm, nghiên cứu thu mẫu cá hương ngẫu nhiên trước cảm nhiễm 1 ngày, trong cảm nhiễm tại ngày 1, 2, 8 với số mẫu lần lượt là 10, 5, 5; 20; thu mẫu cá giống trước cảm nhiễm 1 ngày, trong cảm nhiễm tại ngày 1, 2, 6, 8, 13 với số mẫu lần lượt là 45, 9, 18, 5, 20, 54 (Phụ lục 6) (tham khảo nghiên cứu của Storset và ctv., 2007; Antonello và ctv., 2009). Tác nhân gây bệnh được phân lập từ cá bệnh và phát hiện bằng các phương pháp tại Mục 2.1.2.2.

#### **2.1.2.5. Thu thập số liệu**

Theo dõi tình trạng sống/chết của từng cá thể 3 giờ/lần (Phụ lục 7). Tình trạng tỉ lệ sống thông qua khả năng sống/chết (SUR, biến nhị phân) theo cá thể trong thí nghiệm cảm nhiễm mã hóa sống là 1 và chết là 0 lúc kiểm tra và tình trạng thời gian sống theo cá thể tính theo giờ (TIME, biến liên tục) (Nguyen và ctv., 2019b). Thời gian sống nếu cá thể còn sống tại một thời điểm cắt ngang trong thí nghiệm thì được mã hóa bằng thời gian sống trong toàn bộ thí nghiệm (504 giờ đối với cá hương và 528,5 giờ đối với cá giống) và nếu chết tại thời điểm trước thời điểm cắt ngang trong thí nghiệm thì lấy thời gian cá sống đến thời điểm thực tế đó. Các tình trạng SUR và TIME được tính tại ba thời điểm trong quá trình cảm nhiễm lần lượt là thời điểm tổng số cá thí nghiệm sống 50%, 25% và cuối thí nghiệm với tỉ lệ sống 7,2% với cá hương và 0,30% với cá giống, tương ứng là SUR50, SUR25, SUREND và TIME50, TIME25 và TIMEEND. Số liệu được quản lí và kiểm tra bằng phần mềm Microsoft Excel 2010.

### **2.1.3. Nuôi tăng trưởng các cá thể và gia đình cá giống G1 để đánh giá tăng trưởng và tỉ lệ sống lúc thu hoạch**

#### **2.1.3.1. Nuôi tăng trưởng các gia đình cá giống**

Cá giống: 5.838 cá thể thuộc 130 gia đình (trung bình 45 con/gia đình) với khối lượng trung bình  $21,00 \pm 12,30$  g được nuôi trong ao 2.000 m<sup>2</sup>, mực nước 1,5 m, mật độ trung bình 4,0 con/m<sup>2</sup>. Cá được cho ăn 02 lần/ngày vào lúc 07 giờ và 16 giờ với thức ăn viên (28 - 30% đạm). Khẩu phần ăn là 5 - 6% khối lượng thân trong 2 tháng đầu, 3 - 4% khối lượng thân từ tháng thứ 3 đến tháng thứ 4 và 1,5 - 2% khối lượng thân khi cá trên 4 tháng (Trịnh Quốc Trọng và ctv., 2016b). Định kì bổ sung vitamin C, khoáng chất, vitamin tổng hợp (B, D, E, v.v.), phòng bệnh nhiễm

khuẩn và kí sinh trùng theo đúng quy trình kĩ thuật. Các kĩ thuật nuôi khác được áp dụng theo quy trình đã được hoàn thiện để đánh giá tăng trưởng cho chọn giống tại Viện NCNTTS II như nhiệt độ nước nuôi tăng trưởng từ 25 - 32°C, pH thích hợp từ 7,0 - 8,5 và hàm lượng oxy hoà tan lớn hơn 3 mg/lít (Nguyễn Văn Sáng và ctv., 2009; 2013). Giá trị giới hạn các thông số trong nước phù hợp với QCVN 02-20:2014/BNNPTNT về nuôi cá tra trong ao. Hàng ngày, chú ý theo dõi hoạt động của cá, mức độ sử dụng thức ăn, tình hình thời tiết để điều chỉnh lượng thức ăn cho hợp lí. Thay nước cho ao nuôi khoảng 25 - 30% thể tích nước trong ao khi cần thiết.

### 2.1.3.2. Thu thập số liệu

Đo chiều dài tổng, cân khối lượng và xác định tình trạng sống/chết của cá giống vào thời điểm thu hoạch (Nguyen và ctv., 2019c) sau khi thả vào ao nuôi chung trong thời gian 156 ngày (5.192 con) (Phụ lục 7). Số liệu được quản lí và kiểm tra bằng phần mềm Microsoft Excel 2010.

### 2.1.4. Ước tính hệ số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mũ ở giai đoạn cá hương và cá giống và tính trạng tăng trưởng và tỉ lệ sống lúc thu hoạch ở G1

Đối với các tính trạng kháng bệnh (tỉ lệ sống, thời gian sống) và tăng trưởng (chiều dài, khối lượng, tỉ lệ sống lúc thu hoạch), nghiên cứu sử dụng mô hình tuyến tính hỗn hợp cá thể đưa vào mô hình toán các ảnh hưởng cố định thử nghiệm gồm đợt sinh sản, tuổi đánh dấu, thời gian thuần, tuổi cảm nhiễm, bể cảm nhiễm, cá mẹ, thời gian nuôi trình bày tại Phụ lục 8 để ước tính hệ số di truyền. Trong đó, ảnh hưởng của các yếu tố cố định có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) theo kiểm định Wald-F được đưa vào mô hình chính để xử lí số liệu.

#### 2.1.4.1. Hệ số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mũ

*Hệ số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mũ ở giai đoạn cá hương*

Mô hình tuyến tính hỗn hợp cá thể được dùng để ước tính các thành phần phương sai các tính trạng, nhưng không bao gồm "cá mẹ" là ảnh hưởng của môi trường ương riêng rẽ đến đánh dấu do thời gian ương nuôi ngắn ( $\sigma_G^2$  = phương sai di truyền,  $\sigma_E^2$  = phương sai số dư và phương sai kiểu hình,  $\sigma_P^2 = \sigma_G^2 + \sigma_E^2$ ) là:

$$y_{ij} = \mu + Tank_i + cá thể_j + e_{ij} \quad (\text{Mô hình 1})$$

trong đó  $y_{ij}$  là tình trạng (sống hoặc chết) của cá thể  $j$  khi kết thúc thí nghiệm cảm nhiễm,  $\mu$  là trung bình tỉ lệ sống của quần thể cá thí nghiệm sau hiệu chỉnh các yếu

tổ ảnh hưởng,  $Tank$  là ảnh hưởng cố định của bể cảm nhiễm, cá thể $_j$  là ảnh hưởng ngẫu nhiên của cá thể  $j$  và  $e_{ij}$  là ảnh hưởng của số dư.

Hệ số di truyền của tính trạng tỉ lệ sống (sống = 1, chết = 0) và thời gian giống là:

$$h^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_G^2 + \sigma_E^2}. \text{ Mô hình 1 này được sử dụng bởi Pham và ctv. (2020b).}$$

*Hệ số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mũ ở giai đoạn cá giống*

Mô hình tuyến tính hỗn hợp cá thể được dùng để ước tính các thành phần phương sai các tính trạng, bao gồm "cá mẹ ( $dam$ )" là ảnh hưởng của môi trường ương riêng rẽ đến đánh dấu ( $\sigma_G^2$  = phương sai di truyền,  $\sigma_E^2$  = phương sai số dư và phương sai kiểu hình,  $\sigma_P^2 = \sigma_G^2 + \sigma_E^2$ ) là:

$$y_{ijkl} = \mu + \beta_1 \times Nursetime_i + Tank_j + cá thể_k + dam_l + e_{ijkl} \quad (\text{Mô hình 2})$$

trong đó  $y_{ijkl}$  là tình trạng (sống hoặc chết, SUR) và thời gian chết (TIME) của cá thể  $k$  ở các cắt ngang và khi kết thúc thí nghiệm cảm nhiễm,  $\mu$  là trung bình của quần thể cá thí nghiệm sau hiệu chỉnh các yếu tố ảnh hưởng,  $\beta_1$  hệ số hồi quy của hiệp biến thời gian ương cho đến khi đánh dấu ( $Nursetime$ ),  $Tank$  là ảnh hưởng cố định của hai bể thí nghiệm, cá thể $_k$  là ảnh hưởng ngẫu nhiên của cá thể  $k$ ,  $dam_l$  là ảnh hưởng của môi trường ương riêng rẽ đến đánh dấu và  $e_{ijkl}$  là ảnh hưởng của số dư. Hệ số di truyền của tính trạng tỉ lệ sống và thời gian sống là:  $h^2 = \frac{\sigma_A^2}{\sigma_A^2 + \sigma_C^2 + \sigma_E^2}$  và ảnh hưởng của môi

trường ương riêng rẽ được ước tính là  $c^2 = \frac{\sigma_C^2}{\sigma_A^2 + \sigma_C^2 + \sigma_E^2}$ . Mô hình 2 này được sử dụng bởi Pham và ctv. (2020b).

#### 2.1.4.2. Hệ số di truyền các tính trạng tăng trưởng và tỉ lệ sống lúc thu hoạch

Mô hình tuyến tính hỗn hợp cá thể được sử dụng ước tính các thành phần phương sai tính trạng khối lượng (HW), chiều dài (HL) và tỉ lệ sống (SURGROW) lúc thu hoạch bao gồm  $\sigma_A^2$  = phương sai di truyền cộng gộp,  $\sigma_C^2$  = phương sai ảnh hưởng của môi trường chung,  $\sigma_E^2$  = phương sai số dư và phương sai kiểu hình  $\sigma_P^2 = \sigma_A^2 + \sigma_C^2 + \sigma_E^2$  là:

$$y_{ijklm} = \mu + \beta_1 \times Nursetime_i + \beta_2 \times Growday_j + Batch_k + cá thể_l + dam_m + e_{ijklm} \quad (\text{Mô hình 3})$$

trong đó  $y_{ijklm}$  là khối lượng của cá thể  $k$  khi thu hoạch,  $\mu$  là trung bình của quần thể sau hiệu chỉnh các yếu tố ảnh hưởng,  $\beta_1$  là hệ số hồi quy của hiệp biến thời gian ương

cho đến khi đánh dấu (*Nursetime*),  $\beta_2$  là hệ số hồi quy của hiệp biến thời gian nuôi tăng trưởng (*Growday*), *Batch* là ảnh hưởng cố định của đợt sinh sản, *cá thể<sub>l</sub>* là ảnh hưởng ngẫu nhiên của cá thể *l*, *dam<sub>m</sub>* là ảnh hưởng của môi trường ương riêng rẽ đến đánh dấu và *e<sub>ijklm</sub>* là ảnh hưởng ngẫu nhiên của số dư. Mô hình 3 này được sử dụng bởi Nguyễn Văn Sáng và ctv. (2012).

Hệ số di truyền được ước tính là  $h^2 = \frac{\sigma_A^2}{\sigma_A^2 + \sigma_C^2 + \sigma_E^2}$  và ảnh hưởng của môi trường ương riêng rẽ được ước tính là  $c^2 = \frac{\sigma_C^2}{\sigma_A^2 + \sigma_C^2 + \sigma_E^2}$ . Tương tự cho tính trạng HL, SURGROW.

### **2.1.5. Ước tính tương quan di truyền giữa các tính trạng kháng bệnh hai giai đoạn cá hương và cá giống, kháng bệnh giai đoạn cá giống với tính trạng tăng trưởng và tỉ lệ sống lúc thu hoạch**

#### **2.1.5.1. Tương quan di truyền giữa các tính trạng kháng bệnh hai giai đoạn cá hương và cá giống**

Để ước tính tương quan di truyền giữa cá hương và cá giống, 33 gia đình cá giống (tương ứng với 33 gia đình cá hương) được truy xuất từ 130 gia đình cá giống tham gia cảm nhiễm với số lượng là 1.361 con. Dựa vào khả năng sống/chết và thời gian sống của các cá thể trong mỗi gia đình tại các thời điểm cắt ngang trong thí nghiệm kết hợp với thông tin phả hệ, nghiên cứu này sử dụng mô hình tuyến tính hỗn hợp cá thể tính toán giá trị chọn giống ước tính (Estimated breeding value - EBV) của 33 gia đình cá hương và cá giống (Wonmongkol và ctv., 2018) bằng mô hình (1) và (2) Mục 2.1.4.1 và phần mềm ASReml v3 (Gilmour và ctv., 2014). Ước tính tương quan di truyền của các tính trạng kháng bệnh (tỉ lệ sống và thời gian sống) giữa 33 gia đình cá hương và cá giống tại các thời điểm cắt ngang trong quá trình cảm nhiễm là sử dụng tương quan Pearson ( $r_G$ ) giữa giá trị EBV của các gia đình (Ødegård và ctv., 2007a).

#### **2.1.5.2. Tương quan giữa các tính trạng kháng bệnh ở giai đoạn cá giống**

Tương quan di truyền ( $r_A$ ) giữa các tính trạng SUR50, SUR25, SUREND và TIME50, TIME25 và TIMEEND theo từng cặp được ước tính theo công thức (a):



$(r_A) = \frac{\sigma_{12}}{\sqrt{\sigma_1^2} \times \sqrt{\sigma_2^2}}$  trong đó  $\sigma_{12}$  là hiệp phương sai của ảnh hưởng di truyền của hai tính

trạng,  $\sigma_1^2$  và  $\sigma_2^2$  lần lượt là phương sai của ảnh hưởng di truyền theo ngắt đoạn theo mô hình toán (2) thuộc Mục 2.1.4.1, nhưng là mô hình hai biến (Falconer và Mackay, 1996).

### **2.1.5.3. Tương quan di truyền giữa kháng bệnh giai đoạn cá giống với tính trạng tăng trưởng và tỉ lệ sống lúc thu hoạch**

Tương quan di truyền ( $r_A$ ) giữa các tính trạng HW, HL và SURGROW được ước tính theo công thức (a) được sử dụng với phương sai và hiệp phương sai theo mô hình (3) thuộc Mục 2.1.4.2, nhưng là mô hình hai biến (Falconer và Mackay, 1996).

Đối với tương quan di truyền ( $r_A$ ) giữa HW, HL, SURGROW và các tính trạng kháng bệnh gan thận mũ (SUR50, SUR25, SUREND và TIME50, TIME25 và TIMEEND) theo công thức (a) được sử dụng với phương sai và hiệp phương sai theo mô hình toán (2) và (3) thuộc Mục 2.1.4.1 và 2.1.4.2, nhưng là mô hình hai biến (Falconer và Mackay, 1996).

### **2.1.6. Ước tính hiệu quả chọn lọc của tính trạng kháng bệnh gan thận mũ giai đoạn cá giống trên quần thể G1**

Hiệu quả chọn lọc ước tính của tính trạng kháng bệnh gan thận mũ được ước tính theo công thức  $R = i \times h^2 \times \sigma_p$  với  $i$  là cường độ chọn lọc tương ứng với phần bảng chọn lọc p (%) được tra từ Phụ lục A, trang 379 (Falconer và Mackay, 1996),  $h^2$  là hệ số di truyền và  $\sigma_p$  là độ lệch chuẩn của tính trạng (Gjedrem, 2005).

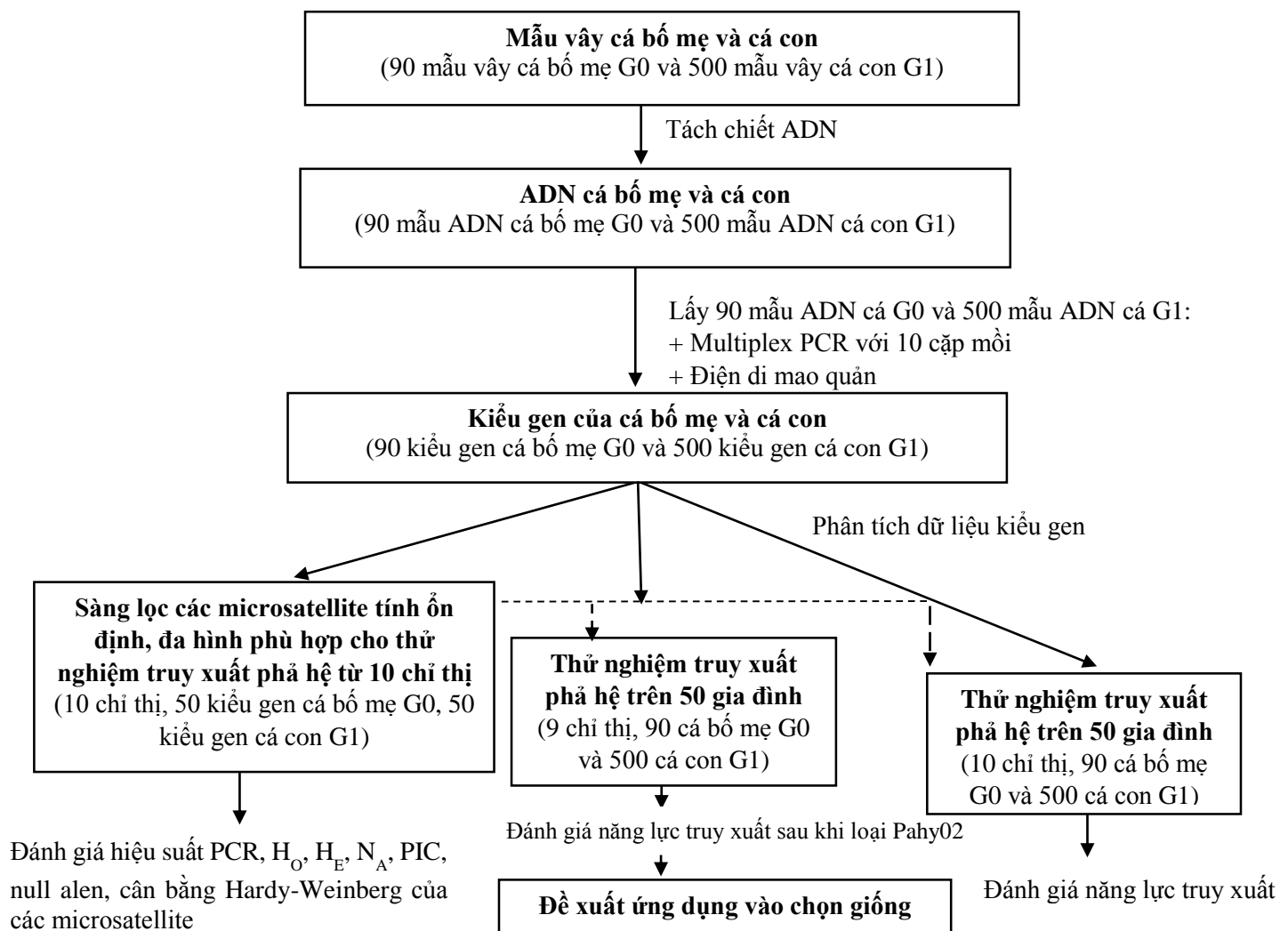
### **2.1.7. Đề xuất định hướng chọn lọc thế hệ G1**

Dựa vào các thông số di truyền ước tính (hệ số di truyền, tương quan di truyền, hiệu quả chọn lọc) để đề xuất chọn lọc (Gjedrem, 2005). Nghiên cứu từ các kết quả thông số di truyền trong Mục 2.1.4, 2.1.5, 2.1.6 trên tính trạng kháng bệnh giai đoạn cá hương và cá giống; tăng trưởng, tỉ lệ sống sau khi thu hoạch, nghiên cứu đề xuất tính trạng và ngưỡng cắt ngang trong quá trình cảm nhiễm nhằm xử lý số liệu chọn lọc và các phương án nhằm chọn lọc với các kì vọng: (1) ở giai đoạn cá giống, hệ số di truyền ước tính cao trên tính trạng kháng bệnh và mang lại hiệu quả tương ứng nếu áp dụng chọn lọc; (2) chọn lọc khả năng kháng bệnh ở cá giống không làm giảm khả năng kháng bệnh ở cá hương; (3) chọn lọc khả năng kháng bệnh ở cá giống không làm giảm khả năng tăng trưởng, tỉ lệ sống sau khi thu hoạch.

## 2.2. Phương pháp cho nội dung 2 về nghiên cứu các giải pháp kĩ thuật hỗ trợ nâng cao hiệu quả của chọn giống cá tra kháng bệnh trong tương lai

### 2.2.1. Phương pháp về ứng dụng di truyền phân tử nghiên cứu bộ chỉ thị phân tử microsatellite truy xuất phả hệ các gia đình cá tra phục vụ chọn giống

Nghiên cứu thử nghiệm bộ chỉ thị phân tử microsatellite truy xuất phả hệ các gia đình cá tra phục vụ chọn giống (Hình 2.2) qua hai bước chính (Bùi Thị Liên Hà và ctv., 2017; Thanh và ctv., 2019): (1) sàng lọc các microsatellite ổn định, đa hình và phù hợp cho thử nghiệm truy xuất phả hệ từ 10 microsatellite; (2) thử nghiệm truy xuất phả hệ trên 50 gia đình cá tra chọn giống.



**Hình 2.2.** Sơ đồ bố trí thí nghiệm Nội dung 2 về ứng dụng di truyền phân tử nghiên cứu bộ chỉ thị phân tử microsatellite truy xuất phả hệ các gia đình cá tra phục vụ chọn giống

### 2.2.1.1. Vật liệu nghiên cứu

#### *Mẫu vây các gia đình cá tra*

Mẫu cá tra (mẫu vây ngược với kích thước 0,5 cm) gồm 90 mẫu vây cá bố mẹ G0 và 500 mẫu cá con G1. Các nhóm cá bố mẹ và cá con được lưu trữ phủ hệ thông qua phương pháp đánh dấu từ PIT phân biệt từng cá thể.

#### *Các microsatellite*

Mười microsatellite ((Pahy-01, Pahy-02, Pahy-03, Pahy-04, Pahy-06, Pahy-10, Pahy-13, Pahy-15, Pahy-17, Pahy-18) sử dụng trong nghiên cứu này được phát triển và đánh giá có tính đa hình cao bởi Nguyễn Văn Sáng và ctv. (2020) (Bảng 2.1).

**Bảng 2.1.** Trình tự mỗi của các microsatellite được sử dụng trong nghiên cứu (Nguyễn Văn Sáng và ctv., 2020)

Chỉ thị	NST	Motif	Trình tự mỗi (5'-3')	Loại huỳnh quang	Nồng độ primer tối ưu ( $\mu$ M)
Pahy-01	Số 1	(TCA)11	F: GCACGTTTCACCTCCATCCA R: GTTGCAGGAAAACACCACGG	6FAM	0,2
Pahy-02	Số 4	(TG)24	F: AGCGTTTCTTATCCCGCCTC R: CAGACAGTTTCCCTGGTGGT	PET	0,4
Pahy-03	Số 5	(TG)23	F: AGGTGAAAATCCCCGAGCAG R: TCCCGATGCCAGAGAACCTA	VIC	0,2
Pahy-04	Số 6	(GT)15	F: TCAGTGCACGTCTTACCCAC R: CGTTGTGTGCCCTCAAAGTG	6FAM	0,2
Pahy-06	Số 8	(AC)20	F: TGAAGCGTGGAGAGAAGCTG R: GTAACCGTTTCTGGGGCTCA	NED	0,2
Pahy-10	Số 16	(TC)20	F: TCTTGAACACGTGGAGGAGC R: TATGGCTATGGCTGCTGAGC	NED	0,2
Pahy-13	Số 19	(AC)17	F: CACGCTGAGTGTGAAATGCC R: TGCTTTCCCATGATGCACCT	6FAM	0,2
Pahy-15	Số 21	(AC)20	F: ACCCTCTGTGGTGTCTTCA R: GGGACTCTGTGGAGCGTAAC	VIC	0,4
Pahy-17	Số 23	(AC)17	F: GCGCTGATGTGCTTTTATACTGA R: GATGCTGCCAGACACTGAGT	PET	0,2
Pahy-18	Số 25	(GT)20	F: CTTGACTTCCAAGGCACCT R: TGTGAGCTCATCCTCCCTCA	VIC	0,2

Các chỉ thị microsatellite được xác định bằng công cụ Phobos trên phần mềm Geneious Prime 2020.0.5 dựa trên trình tự các Scaffold từ trình tự hệ gen cá tra

(VN\_pangasius) được công bố tại cơ sở dữ liệu NCBI bởi Kim và ctv. (2018). Trong một bộ multiplex PCR, các cặp môi tạo sản phẩm DNA khuếch đại trong cùng một vùng kích thước được đánh dấu bằng huỳnh quang màu khác nhau tại đầu 5' của môi xuôi với các màu 6FAM (xanh da trời), VIC (xanh lá cây), PET (đỏ) và NED (vàng) (Ziegle và ctv., 1992) (Bảng 2.1). Việc lựa chọn màu đánh dấu huỳnh quang cho môi xuôi dựa theo kích thước sản phẩm khuếch đại được hỗ trợ thực hiện bởi Phòng thí nghiệm Đa dạng Di truyền và Tiến hóa (Laboratory of Biodiversity and Evolutionary Genomics), Khoa Sinh học, Đại học KU Leuven (Vương quốc Bỉ) và môi ngược không gắn huỳnh quang được đặt hàng tại Công ty PHUSA Biochem, môi xuôi có gắn huỳnh quang được đặt hàng tại Công ty Biolegio (Hà Lan).

### **2.2.1.2. Phương pháp tách chiết ADN tổng số, PCR và điện di mao quản, ghi nhận sản phẩm**

#### *Phương pháp thu mẫu và quản lý mẫu các quần thể*

Cá được bắt dưới ao và được truy dấu từ PIT để xác định là cá bố mẹ và cá con theo các gia đình. Các mẫu vây ngực được thu thập và đựng trong eppendofit có dán nhãn riêng biệt được mã hóa từng cá thể theo gia đình tại nơi đàn cá được lưu giữ ở Trung tâm Quốc gia Giống Thủy sản Nước ngọt Nam Bộ (Viện NCNTTS II).

#### *Phương pháp tách chiết ADN tổng số*

Mẫu vây được bảo quản trong cồn 75% có gắn nhãn riêng biệt và đặt trên đá ướt để vận chuyển đến phòng thí nghiệm. Các mẫu sau đó được bảo quản ở -20°C (Fishback, 1999) cho đến khi thực hiện tách chiết ADN.

Phương pháp kết tủa muối được sử dụng để tách chiết ADN (Gaaib và ctv., 2011). Mẫu vây ngực cá tra được cắt thành một lượng mẫu có kích thước khoảng 5 mm<sup>2</sup> và được cho vào ống 1,5 mL. Thêm vào ống chứa mẫu 500 µL dung dịch li giải (50 mM Tris HCl (pH 8,0), 20 mM EDTA (pH 8,0), 2% SDS) và bổ sung 5 µL proteinase K (20 mg/mL), vortex nhanh. Mẫu được ủ ở 55°C trong 2 giờ. Tiến hành thêm 250 µL dung dịch NaCl 6M, vortex mạnh. Mẫu được li tâm với lực li tâm 8.000 xg trong 15 phút. Care thận thu dịch nổi cho vào ống 1,5 mL mới. Thêm 1.000 µL ethanol 100% lạnh, ủ ở nhiệt độ 4°C trong 2 giờ. Sau đó li tâm với lực li tâm 10.000 xg trong 15 phút. Loại bỏ dịch nổi và rửa ADN bằng 500 µL ethanol 70%. Li tâm mẫu với lực li tâm 11.000 xg trong 5 phút. Loại bỏ dịch nổi và làm khô ADN bằng

máy gia nhiệt ở 55°C hoặc để ở nhiệt độ phòng. ADN được hòa tan trong dung dịch TE và bảo quản ở nhiệt độ -20°C.

ADN tách chiết được điện di trên gel agarose 1% để xác định sự hiện diện của ADN, đồng thời đo OD<sub>260/280</sub> để kiểm tra độ tinh sạch của ADN. Chọn ra những mẫu có nồng độ và độ tinh sạch cao ( $1,8 < OD_{260nm}/OD_{280nm} < 2$ ) để thực hiện các thí nghiệm (Trần Ngọc Hải và Phùng Thị Tuyên, 2013). Những mẫu tách chiết không đạt yêu cầu được tiến hành tách chiết lại để thu được sản phẩm ADN có nồng độ và độ tinh sạch cao.

#### *Phương pháp PCR*

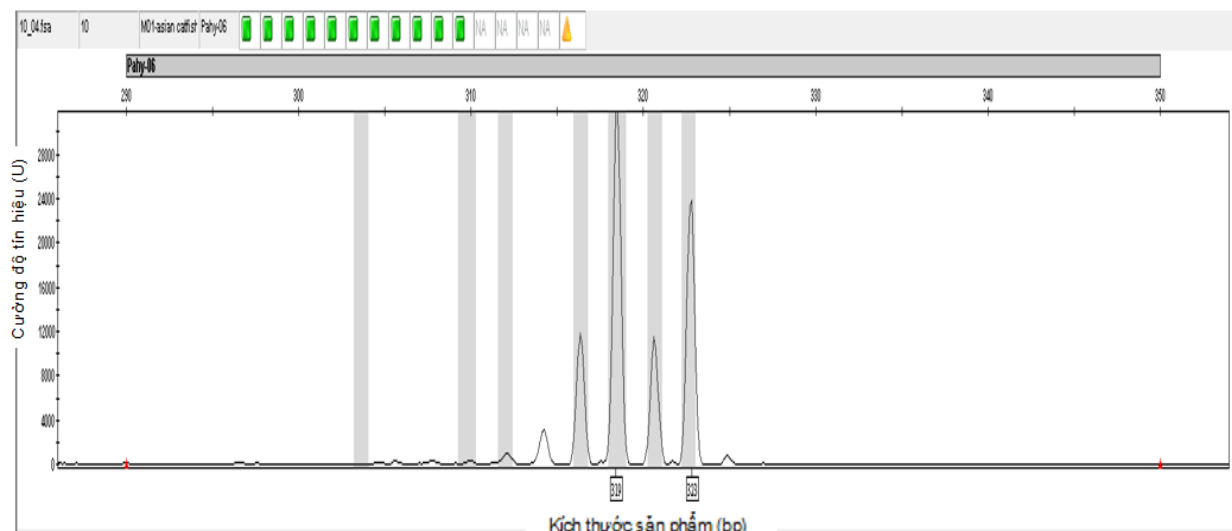
Phản ứng multiplex PCR được thực hiện trên máy BIO-RAD S1000™ Thermal Cycler System. Quá trình PCR sử dụng bộ Kit multiplex PCR (Cat.No/ID 206145) của công ty QIAGEN. Các điều kiện tối ưu cho phản ứng PCR được hoàn thiện tại Viện NCNTTS II. Mỗi phản ứng multiplex PCR được phát triển cho 10 microsatellite sử dụng 1,0 µL ADN khuôn, 5 µL multiplex PCR Master Mix (QIAGEN) và 0,2 µM hỗn hợp mồi (riêng Phay-02 và Pahy-15 là 0,4 µM hỗn hợp mồi). Điều kiện của phản ứng PCR như sau: 95°C trong 15 phút, 30 chu kỳ bao gồm 95°C trong 30 giây, 55°C trong 90 giây, 72°C trong 60 giây và giai đoạn kéo dài cuối cùng ở 60°C trong 30 phút (Nguyễn Văn Sáng và ctv., 2021).

#### *Phương pháp điện di mao quản*

Các sản phẩm PCR (1 µL) được trộn với 11,8 µL Hi-Di™ Formamide (dung dịch chống đứt gãy ADN) và 0,2 µL thang chuẩn GeneScan™ 500 LIZ® cho điện di mao quản trên hệ thống 3500 Genetic Analyzer tại Công ty TNHH dịch vụ và thương mại Nam Khoa. Sản phẩm PCR được xuất ra dạng hình ảnh các kích thước alen bằng phần mềm GeneMapper 5 (Applied Biosystems) phiên bản 1.2.0 (Nguyễn Văn Sáng và ctv., 2021).

#### *Phương pháp ghi nhận số liệu*

Dữ liệu điện di thể hiện dưới dạng biểu đồ hình ảnh, được phân tích trên phần mềm GeneMapper 5 phiên bản 1.2.0 (Nogueira và ctv., 2020). Biểu đồ thể hiện cường độ tín hiệu (đại diện cho số lượng sản phẩm khuếch đại) và kích thước của sản phẩm khuếch đại qua vị trí đỉnh peak trên trục hoành (Hình 2.3).



**Hình 2.3.** Biểu đồ hình ảnh tín hiệu của microsatellite Pahy-06 (motif lặp là 2 nucleotide).

Các mẫu được ghi nhận kích thước alen (Hình 2.3) phải đảm bảo yêu cầu về tín hiệu như sau: (1) biểu đồ ảnh phải có tín hiệu nền sạch; (2) peak có dạng đỉnh nhọn, cạnh dốc, thể hiện rõ phần chân; (3) tín hiệu của 2 alen trong trường hợp là dị hợp tử gần tương đương nhau, alen có kích thước nhỏ hơn có tín hiệu cao hơn alen còn lại (sự chênh lệch về tín hiệu giữa 2 alen trong trường hợp dị hợp tử là do đoạn ADN có kích thước ngắn được khuếch đại dễ hơn khi thực hiện phản ứng PCR); (4) các chỉ số kiểm soát chất lượng phân tích thể hiện trong phần mềm đều không xuất hiện kết quả xấu (thông tin đánh giá chất lượng tín hiệu thể hiện phía trên cùng của hình: hình vuông màu xanh là tốt, hình tam giác màu vàng là trung bình, hình tròn màu đỏ là kém) (Life technologies, 2014). Những mẫu phân tích không đáp ứng được các yêu cầu sẽ được PCR và phân tích lại.

### 2.2.1.3. Sàng lọc các microsatellite ổn định, đa hình và phù hợp cho thử nghiệm truy xuất phả hệ

Khảo sát tính ổn định và đa hình của 10 microsatellite thông qua hiệu suất PCR, thông số đa dạng di truyền và tuân theo cân bằng Hardy-Weinberg (HWE) (Bùi Thị Liên Hà và ctv., 2017) trên 50 cá thể bố mẹ G0 và 50 cá thể con G1.

Đánh giá tính ổn định của microsatellite qua hiệu suất PCR theo tính theo công thức:

$$\text{Hiệu suất PCR (\%)} = \frac{\text{Số mẫu có sản phẩm khuếch đại}}{\text{Tổng số mẫu PCR}} \times 100$$

Các thông số đa dạng di truyền của các microsatellite trên quần thể G0 và G1 như số lượng alen ( $N_A$ ), chỉ số thông tin đa hình (PIC), tỉ lệ dị hợp tử thực tế ( $H_O$ ), tỉ lệ dị hợp tử lí thuyết ( $H_E$ ), tần số null-alen và tuân theo cân bằng Hardy-Weinberg (HWE) của các microsatellite được kiểm định Bonferroni được tính toán bằng phần mềm CERVUS 3.0.7 (Saeki và ctv., 2015).

#### **2.2.1.4. Thử nghiệm truy xuất phả hệ trên 50 gia đình gồm 90 cá bố mẹ G0 và 500 cá con G1**

##### *Truy xuất với 10 microsaellite*

Truy xuất thử nghiệm phả hệ bằng bộ chỉ thị gồm 10 microsatellite (Cruz và ctv., 2013) trên 50 gia đình cá G1 gồm 40 con bố, 50 con mẹ (sinh sản tạo ra 20 gia đình theo con bố có half-sib và 30 gia đình theo con bố không có half-sib) và 500 cá thể con G1 (10 cá con/gia đình). Tập tin dữ liệu đưa vào để truy xuất trong các phân tích gồm ba tập tin excel mã hóa số liệu gồm kiểu gen con bố, con mẹ và con con (mỗi cá thể gồm các thông tin: ID, tên microsatellite, mỗi microsatellite gồm thông tin kích thước hai alen, cá thể nào không có dữ liệu bị khuyết thì ô chứa dữ liệu để trống). Dữ liệu được kiểm tra và phân tích bằng phần mềm COLONY 2.0.6.6 (Jones và Wang, 2010) với phương pháp xác định bố mẹ dựa trên khả năng (sử dụng thuật toán Maximum Likelihood kết hợp với Pair Likelihood) (Flanagan và ctv., 2018; Prechal và ctv., 2021) gồm các thông số được cài đặt như sau: trong phân tích có con bố half-sib, loài lưỡng bội, trong phân tích có tồn tại cận huyết, tốc độ chạy trung bình, tỉ lệ lỗi trong ghi nhận alen của mỗi microsatellite là 0,0001 (<3%, Vandeputte và ctv., 2006). Năng lực truy xuất của chỉ thị có tính đến lỗi ghi nhận kiểu gen trong khả năng truy xuất được tính toán từ phần mềm COLONY 2.0.6.6.

Các tỉ lệ để đánh giá năng lực truy xuất được tính toán theo Fu và ctv. (2013) trên các gia đình tham khảo thông tin phả hệ đã biết bằng cách sử dụng ba công thức (1), (2) và (3) sau:

+ Tỉ lệ cá con truy xuất được bố và mẹ ( $P_a$ , %):

$$P_a = \frac{A}{B} \times 100 \quad \text{(Công thức 1)}$$

A là số lượng các cá con truy xuất được bố và mẹ cho tất cả các gia đình (hay nhóm gia đình theo bố), B là tổng số lượng cá con của tất cả các gia đình (hay nhóm gia đình theo bố) được truy xuất.

+ Tỷ lệ cá con truy xuất *đúng* cả bố và mẹ ( $P_b$ , %):

$$P_b = \frac{A_i}{B} \times 100 \quad \text{(Công thức 2)}$$

$A_i$  là số lượng các cá con truy xuất *đúng* cả bố và mẹ cho tất cả các gia đình (hay nhóm gia đình theo bố),  $B$  là tổng số lượng cá con của tất cả các gia đình (hay nhóm gia đình theo bố) được truy xuất.

+ Tỷ lệ cá con truy xuất *đúng* bố (hoặc mẹ) ( $P_{f(m)}$ , %):

$$P_{f(m)} = \frac{A_{f(m)}}{B} \times 100 \quad \text{(Công thức 3)}$$

$A_{f(m)}$  là số lượng các cá con truy xuất *đúng* bố (hoặc mẹ) cho tất cả các gia đình (hay nhóm gia đình theo bố),  $B$  là tổng số lượng cá con của tất cả các gia đình (hay nhóm gia đình theo bố) được truy xuất.

Các chỉ thị microsatellite trong phân tích truy xuất phả hệ được tính tần số null-alen được tính bằng phần mềm CERVUS 3.0.7 (Castro và ctv., 2007) được kiểm định có ý nghĩa thống kê bằng phần mềm MICROCHECKER (Van Oosterhout và ctv., 2004), tỉ lệ lỗi ghi nhận kiểu gen được tính bằng phần mềm COLONY 2.0.6.6 (Wang và ctv., 2004). Mặc dù COLONY 2.0.6.6 có ưu điểm tính được khả năng truy xuất phả hệ chính xác nhưng không tính được tỉ lệ mismatch của các microsatellite, vì vậy tỉ lệ mismatch được tính bằng phần mềm VITAGGIGN 8.5. Nếu chỉ thị nào có tần số null-alen, tỉ lệ lỗi ghi nhận kiểu gen, tỉ lệ mismatch cao thì được loại ra khỏi phân tích (Bùi Thị Liên Hà và ctv., 2017; Thanh và ctv., 2019).

#### *Truy xuất với 9 microsaellite*

Sau khi truy xuất phả hệ với 10 microsatellite, chỉ thị microsatellite có tần số null-alen và sai số ghi nhận cao nên loại khỏi phân tích. Bộ chỉ thị còn lại dùng để truy xuất phả hệ với các bước thực hiện truy xuất phả hệ tương tự trong truy xuất với 10 microsatellite. Mô phỏng khả năng truy xuất của bộ chỉ thị theo phương pháp của Jerry và ctv. (2004) với thông số phân tích như sau: 10.000 lần lặp lại, 90 cá thể bố mẹ tiềm năng gồm 50 con mẹ và 40 con bố, 100% bố mẹ giả định được chọn mẫu và định kiểu gen. Tỉ lệ sai số ghi nhận kiểu gen là 0,01. Dữ liệu từ quá trình chạy lặp lại sau đó được sử dụng trong chương trình gán huyết thống của CERVUS 3.0.7 (Marshall và ctv., 1998) để đánh giá sự thành công truy xuất phả hệ qua tỉ lệ gán được bố mẹ với độ tin cậy 95%.



## **2.2.2. Phương pháp về đánh giá và đề xuất chỉ tiêu miễn dịch tiềm năng là tính trạng kháng bệnh gan thận mủ phục vụ chọn giống trong tương lai**

### **2.2.2.1. Lựa chọn hai nhóm gia đình kháng bệnh cao và thấp dựa vào giá trị EBV giai đoạn cá giống**

Hai nhóm gia đình kháng bệnh cao và thấp được xác định thông qua hai thí nghiệm cảm nhiễm cá giống (Camp và ctv., 2000). Dựa vào xếp hạng EBV trung bình của 130 gia đình tại giai đoạn cá giống chọn ngẫu nhiên 6 gia đình gồm 3 gia đình có EBV cao (nhóm KBC) và 3 gia đình có EBV thấp (nhóm KBT). Giá trị EBV của các gia đình cá được ước tính tại giai đoạn cắt ngang tỉ lệ cá sống còn 50% trong giai đoạn cảm nhiễm (Gjøen và ctv., 1997) là khoảng 168 giờ sau cảm nhiễm. Đánh giá xác suất sống sót tích lũy của hai nhóm gia đình cá kháng bệnh thông qua đường biểu diễn Kalper – Meier (Trịnh Quốc Trọng và ctv., 2016a) được thực hiện bằng phần mềm STATA phiên bản 14.0. Kiểm định Logrank được dùng để chỉ ra khác biệt xác suất sống sót tích lũy (Nguyễn Văn Tuấn, 2015) giữa hai nhóm cá kháng bệnh.

### **2.2.2.2. Cảm nhiễm và đánh giá các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu và đặc hiệu của hai nhóm gia đình kháng bệnh cao và thấp**

#### *Thí nghiệm cảm nhiễm thăm dò thời điểm thu mẫu máu phân tích chỉ tiêu miễn dịch*

Thí nghiệm thăm dò thời điểm thu máu cá cho cảm nhiễm được bố trí với các thông số kỹ thuật tương tự như thí nghiệm cảm nhiễm trên 130 gia đình cá giống được đề cập ở Mục 2.1.2.3. Thí nghiệm được bố trí gồm 2 bể 500 L gồm mỗi bể có 35 cá cohabitant và 100 cá thí nghiệm. Thời gian thu mẫu máu gồm: trước cảm nhiễm, 24 giờ đến 336 giờ sau cảm nhiễm (12 - 24 giờ/lần) để phân tích chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch của cá thí nghiệm (Camp và ctv., 2000; Sahoo và ctv., 2013). Thu mẫu trung bình 06 mẫu/bể/lần để phân tích chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch.

#### *Cảm nhiễm và đánh giá khả năng đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu và đáp ứng miễn dịch đặc hiệu hai nhóm gia đình kháng bệnh cao và thấp theo EBV*

Mỗi gia đình cá hương ương lên thành mỗi gia đình cá giống. Sau đó, mỗi gia đình cá giống được tách ra hai nhóm: (1) nhóm 1 các cá thể được cảm nhiễm để chọn được các gia đình cá tra giống kháng bệnh; (2) nhóm 2 các cá thể vẫn được lưu giữ trong giai tại ao. Sáu gia đình cá giống kháng bệnh cao và thấp G1 sau khi được xác

định, tiến hành đưa các cá thể của các gia đình này (30 cá thể/gia đình) (Sahoo và ctv., 2011) từ giai đến phòng thí nghiệm để thực hiện bố trí thí nghiệm đánh giá đáp ứng miễn dịch. Trước khi tiến hành thí nghiệm đánh giá khả năng đáp ứng miễn dịch, thuần cá trong 07 ngày. Sáu gia đình cá giống G1 (30 cá/gia đình) có khối lượng trung bình là 25 g được bố trí cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri* trong bể nhựa (70 × 30 × 30 cm, thể tích nước khi tiến hành thí nghiệm là 25 L) với mật độ 1 cá/2 L. Cách thức cảm nhiễm tương tự như thí nghiệm cảm nhiễm trên 130 gia đình cá giống được đề cập ở Mục 2.1.2.3.

#### *Thu thập các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch*

Tổng 119 cá thể (58 cá thể thuộc gia đình KBC và 61 cá thể thuộc gia đình KBT) được thu mẫu máu và mẫu mô để phân tích qua các thời điểm gồm: ngay trước khi cảm nhiễm, 24, 48, 264 và 312 giờ sau cảm nhiễm (hpi) (thời điểm được chọn từ thí nghiệm thăm dò) và thu mẫu trung bình 04 cá thể/gia đình/thời điểm. Số lượng mẫu máu và mô để phân tích chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch là 1.681 mẫu bao gồm 863 mẫu của cá thuộc nhóm gia đình KBT và 818 mẫu cá thuộc nhóm gia đình KBC. Thu mẫu máu từ động mạch chủ ở đuôi cá cho vào: (1) ống chứa dung dịch chống đông EDTA để tiến hành phân tích tổng hồng cầu, tổng bạch cầu và phết máu lên lam kính để tiến hành đếm các loại bạch cầu; (2) eppendorf để li tâm lấy huyết thanh và tiến hành thực hiện phân tích hiệu giá kháng thể. Thu mẫu mô : (1) sau khi mổ cá và dùng kẹp gấp lấy các mẫu mô: mô gan, thận sau, lách được nhuộm để phân tích số lượng trung tâm đại thực bào sắc tố; (2) mô thận trước để tiến hành phân tích khả năng thực bào của đại thực bào.

#### *Phân tích các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch*

Các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch của hai nhóm gia đình kháng bệnh cao và thấp được phân tích định lượng trong nghiên cứu gồm: (1) phương pháp định lượng tổng hồng cầu (THC) được tiến hành theo Budiari và ctv (2021); (2) phương pháp định lượng tổng bạch cầu (TBC) được tiến hành theo Budiari và ctv (2021); (3) phương pháp định lượng từng loại bạch cầu (bạch cầu đơn nhân (MONO), bạch cầu trung tính (NEU), bạch cầu lympho (LYM)) được tiến hành theo Hrubec và ctv. (2000); (4) phương pháp xác định hiệu giá kháng thể (HGKT) trong huyết thanh được tiến hành

theo phương pháp của Thrusfield và ctv. (2018) có hiệu chỉnh; (5) phương pháp nhuộm mô học và đếm số lượng trung tâm đại thực bào sắc tố (TTĐTB) ở gan, thận, lách được tiến hành theo Camp và ctv. (2000); (6) phương pháp xác định khả năng thực bào của tế bào thực bào thận trước của cá: xác định hoạt lực thực bào (PA) theo Paredes và ctv. (2013) và chỉ số thực bào (PI) theo Park và ctv. (2020). Phương pháp phân tích định lượng chỉ tiêu miễn dịch được trình bày chi tiết tại Phụ lục 9.

*Xử lý số liệu miễn dịch nhằm đánh giá khả năng đáp ứng miễn dịch của các gia đình kháng bệnh cao và thấp*

Số liệu chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch của hai nhóm gia đình KBC và KBT tại mỗi thời điểm được kiểm tra xác suất của phân phối chuẩn bằng thử nghiệm Skewness và Kurtosis. Kiểm định trung bình t - test hai nhóm độc lập được sử dụng để so sánh giá trị trung bình của các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch tại mỗi thời điểm giữa hai nhóm (Sahoo và ctv., 2011). Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình cộng/trừ sai số chuẩn (Mean  $\pm$  SE). Phân tích sự khác biệt về các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch giữa hai nhóm gia đình kháng bệnh được thực hiện trên phần mềm thống kê SPSS kiểm định sai khác có ý nghĩa ở xác suất  $p < 0,05$ .

### **2.2.2.3. Đánh giá và đề xuất chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch làm chỉ tiêu xác định khả năng kháng bệnh gan thận mũ**

Đánh giá và đề xuất chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch làm chỉ tiêu xác định khả năng kháng bệnh gan thận mũ thông qua các bước sau: (i) xác định các suất có liên quan đến giữa các thông số miễn dịch và nhóm gia đình kháng bệnh cao hay thấp; (ii) phát triển mô hình dự đoán với các chỉ tiêu miễn dịch giúp phân biệt được các cá thể kháng bệnh cao và thấp trong quá trình cảm nhiễm; (iii) đánh giá mô hình dự đoán với các chỉ tiêu miễn dịch giúp phân biệt được các cá thể kháng bệnh cao và thấp trong quá trình cảm nhiễm.

*Xác suất có liên quan đến giữa các thông số miễn dịch và nhóm gia đình kháng bệnh cao hay thấp*

Mô hình dự đoán cho việc phân biệt khả năng kháng bệnh được thiết lập từ các số liệu chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch của hai nhóm cá. Số liệu mã hóa của cá thuộc gia đình KBC và KBT lần lượt là 1 và 0. Số liệu chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch tại các thời

điểm thu mẫu đều là biến liên tục. Xác suất (%) liên quan đến việc xác định các cá thể thuộc nhóm KBC hay KBT được mô phỏng bằng mô hình hồi quy logistic Bayes đa biến với các tính trạng miễn dịch thực hiện trên phần mềm R phiên bản 3.5.2 (Nguyễn Văn Tuấn, 2015).

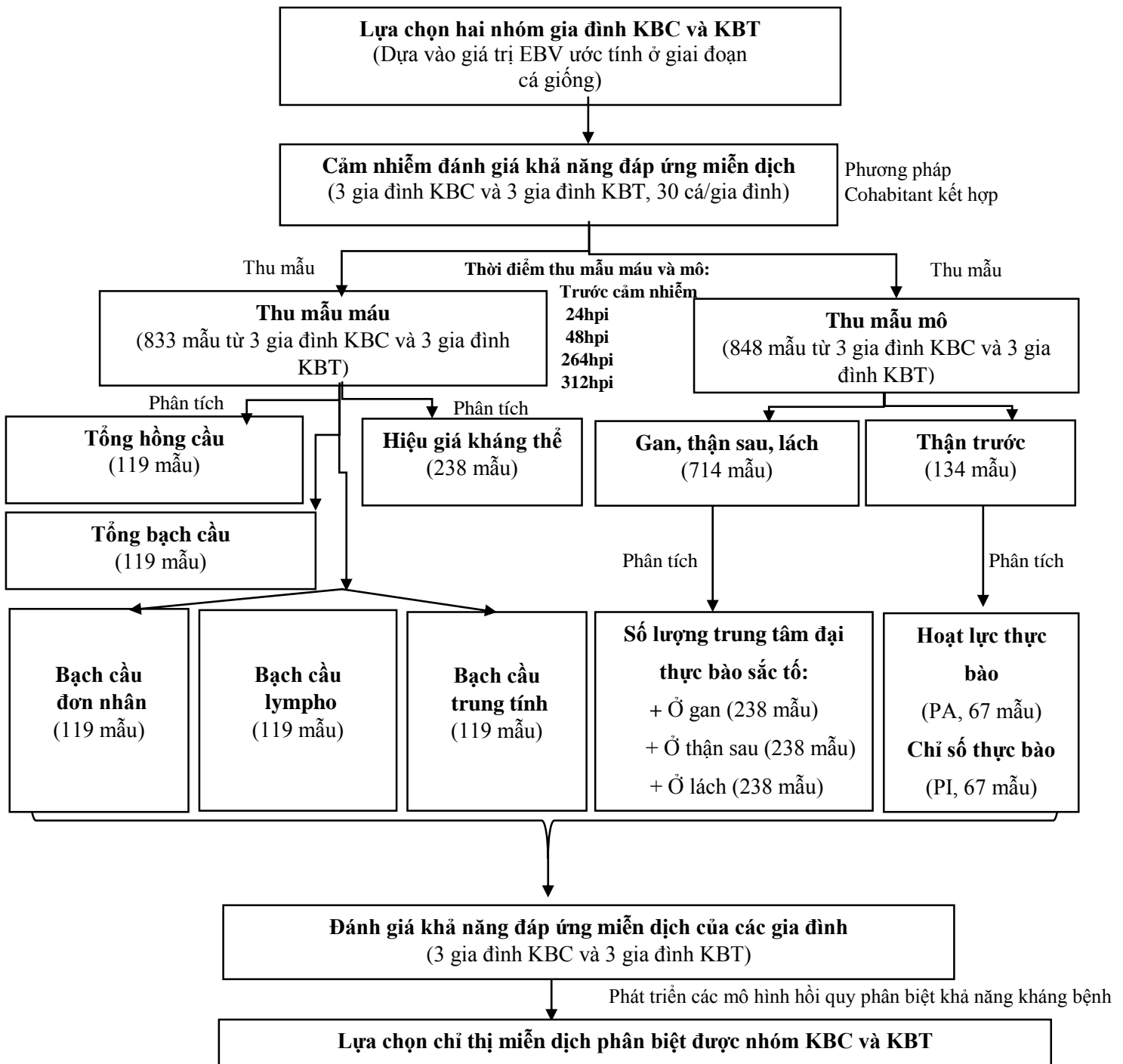
*Phát triển mô hình dự đoán với các chỉ tiêu miễn dịch giúp phân biệt được các cá thể kháng bệnh cao và thấp trong quá trình cảm nhiễm*

Phân tích hồi quy logistic đơn biến được sử dụng để xác định các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch có ý nghĩa trong việc phân biệt được các cá thể KBC và KBT trong quá trình cảm nhiễm. Sau đó, hồi quy logistic đa biến được sử dụng để phát triển mô hình xác định các cá thể kháng bệnh. Mô hình hồi quy được kiểm định với giá trị AIC (Akaike Information Criterion), Pseudo  $R^2$ , tính đa cộng tuyến qua hệ số VIF (Variance Inflation Factor) (Phan và ctv., 2018). Ngoài ra, tỉ số ODD (xác suất xác định được cá thể KBC/xác suất xác định được cá thể KBT) của các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch cũng được tính toán trong mô hình.

*Đánh giá mô hình dự đoán với các chỉ tiêu miễn dịch giúp phân biệt được các cá thể kháng bệnh cao và thấp trong quá trình cảm nhiễm*

Các giá trị để đánh giá mô hình xác định cá thể thuộc gia đình KBC hay KBT của mô hình tối ưu theo Phan và ctv. (2018) bao gồm: (1) độ nhạy (Sen - xác suất phân biệt được cá thể kháng bệnh cao chính xác); (2) độ đặc hiệu (Spe - xác suất phân biệt được cá thể kháng bệnh thấp chính xác). Độ nhạy và độ đặc hiệu có giá trị dao động từ 0 đến 1. Việc lựa chọn mô hình phân biệt được kháng bệnh cao hay thấp cần đáp ứng cân bằng giữa độ nhạy và độ đặc hiệu trong việc phân biệt cá thể kháng bệnh cao và thấp; (3) biểu đồ ROC có trục tung (y) là tỉ lệ kháng bệnh cao khi thử nghiệm cho kết quả kháng bệnh cao là thật (độ nhạy) và trục hoành (x là 1 trừ cho độ đặc hiệu) là tỉ lệ kháng bệnh cao là giả khi xét nghiệm miễn dịch lại cho kết quả là kháng bệnh cao. Một cách mô hình hóa tốt nhất là ước tính diện tích dưới đường biểu diễn ROC (đường nối giữa các điểm có độ nhạy và độ đặc hiệu) gọi là AUC. Mô hình có giá trị AUC cao có thể phân biệt cá thể thuộc gia đình kháng bệnh cao hay thấp tốt; (4) giá trị ngưỡng phân biệt tối ưu (cut off-value) là ngưỡng mà từ giá trị đó đáp ứng miễn dịch mà có độ nhạy và độ đặc hiệu cao (xác suất phân biệt cá thể sai là thấp).

Sơ đồ bố trí thí nghiệm tổng quát Nội dung 2 về đánh giá và đề xuất chỉ tiêu miễn dịch tiềm năng là tính trạng kháng bệnh gan thận mù được trình bày tại Hình 2.4.



**Hình 2.4.** Sơ đồ bố trí thí nghiệm Nội dung 2 về đánh giá và đề xuất chỉ tiêu miễn dịch tiềm năng là tính trạng kháng bệnh gan thận mù

## CHƯƠNG 3

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Ứng dụng di truyền số lượng ước tính các thông số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mũ ở thế hệ G1 cá tra và đề xuất chọn lọc

##### 3.1.1. Nuôi vỗ cá bố mẹ G0, phối ghép cặp để sản xuất gia đình đàn con G1, ương nuôi các gia đình G1 đến kích cỡ đánh dấu và đánh dấu từng cá thể

###### 3.1.1.1. Kết quả nuôi vỗ cá bố mẹ G0

Nghiên cứu nuôi vỗ 425 cá bố mẹ G0 bao gồm 325 con (133 cá bố và 192 cá mẹ) có giá trị chọn giống ước tính (EBV) trung bình là 0,121 thuộc 120 gia đình chọn lọc và 100 con (41 cá bố và 59 cá mẹ) có giá trị EBV trung bình là -0,007 thuộc 25 gia đình đối chứng (cá bố và cá mẹ thuộc nhóm đối chứng và chọn lọc được lựa chọn nuôi vỗ dựa trên EBV). Thông tin chi tiết về số lượng, khối lượng, giá trị EBV cá bố và cá mẹ thuộc nhóm đối chứng và chọn lọc được chọn để nuôi vỗ trình bày tại Bảng 3.1.

**Bảng 3.1.** Số lượng cá tra bố mẹ G0 ghép cặp sinh sản thế hệ G1

Nhóm cá bố mẹ G0	Giới tính	Số lượng	Khối lượng (kg)	EBV kháng bệnh
Chọn lọc	Cái	192	8,5 ± 1,2	0,118 ± 0,088
	Đực	133	8,4 ± 1,3	0,124 ± 0,084
	Toàn nhóm	325	8,5 ± 1,5	0,121 ± 0,086
Đối chứng	Cái	59	8,4 ± 1,0	-0,001 ± 0,02
	Đực	41	8,3 ± 1,0	-0,013 ± 0,043
	Toàn nhóm	100	8,4 ± 1,0	-0,007 ± 0,033

Số liệu trình bày dưới dạng  $TB \pm SD$ : trung bình ± độ lệch chuẩn.

Kết quả nuôi vỗ và chỉ tiêu sinh sản của cá bố mẹ G0 được trình bày chi tiết tại Bảng 3.2. Tỷ lệ thành thực cá bố mẹ là 100% cho cả cá mẹ và cá bố sau bốn tháng nuôi vỗ. Chế độ dinh dưỡng và môi trường nuôi tốt cho sự phát triển của cá nuôi vỗ nên kết quả này cao hơn các quần thể cá tra chọn giống ở hệ hệ trước (69,8 - 92,5%, Nguyễn Văn Sáng và ctv., 2013; 78,6 - 98,2%, Nguyễn Văn Sáng và ctv., 2016). Cá mẹ thành thực tốt cùng chế độ dinh dưỡng hợp lý nên tỷ lệ cá mẹ rụng trứng và trứng vượt được cao lần lượt là 93 - 100% và 11,7% (Phụ lục 10).

Tỷ lệ trứng vượt được cao hơn so với kết quả sinh sản tạo đàn bố mẹ G0 trước đây (3,3 - 10,1%, Trịnh Quốc Trọng và ctv., 2016b). Tỷ lệ thụ tinh của trứng trung bình là 78,6% (55 - 91%) và tỷ lệ cá con nở của các gia đình trung bình là 89,7% (80 - 98%) (Bảng 3.2 và Phụ lục 11). Nghiên cứu đã tạo ra được 155 gia đình (bao gồm 127 gia đình chọn lọc và 28 gia đình đối chứng), trong đó có 92 gia đình full-sib và 63 gia đình half-sib. Các thông tin thủy lý hóa nước trong quá trình nuôi vỗ cá bố mẹ G0 được trình bày tại Phụ lục 12.

**Bảng 3.2.** Kết quả nuôi vỗ và chỉ tiêu sinh sản của cá bố mẹ

Chỉ tiêu	Kết quả
- Số lượng cá mẹ (con)	251
- Số lượng cá bố (con)	174
- Khối lượng bắt đầu nuôi vỗ (kg/con)	8,5 ± 1,3
- Khối lượng khi sinh sản (kg/con)	9,3 ± 1,5
- Tỷ lệ thành thực tham gia sinh sản sau bốn tháng nuôi vỗ (%)	100
- Tỷ lệ cá mẹ rụng trứng (%)	93,0 - 100,0
- Tỷ lệ trứng vượt được (số kg trứng/kg cá mẹ) (%)	11,7 ± 5,3
- Tỷ lệ thụ tinh của trứng (%)	78,6 ± 10,6
- Tỷ lệ cá con nở trung bình của các gia đình (%)	89,7 ± 5,0

Số liệu trình bày dưới dạng TB ± SD: trung bình ± độ lệch chuẩn

### 3.1.1.2. Kết quả ương nuôi các gia đình từ giai đoạn cá bột đến giai đoạn đánh dấu

Sau thời gian ương từ cá bột lên cá giống để đánh dấu, số lượng các gia đình G1 ương nuôi đạt 130 gia đình (108 gia đình chọn lọc và 22 gia đình đối chứng, số lượng gia đình hao hụt là 25 gia đình so với khi thả ương cá hương) (Bảng 3.3). Tỷ lệ sống cá tra giai đoạn cá hương lên cá giống (44,7%) tương đương với nghiên cứu khác (45,3%, Lê Đức Liêm và ctv., 2017). Số lượng gia đình cá giống vẫn đáp ứng cho thí nghiệm cảm nhiễm là 130 gia đình (77 gia đình full-sib và 53 gia đình half-sib), trong 130 gia đình cá giống tham gia thí nghiệm cảm nhiễm đều có cá thể tham gia nuôi tăng trưởng. Các thông tin thủy lý hóa nước trong quá trình ương nuôi trong bể composite và ao ương được trình bày tại Phụ lục 12.

**Bảng 3.3.** Kết quả ương nuôi riêng rẽ các gia đình

Chỉ tiêu	Trung bình
<i>Giai đoạn cá bột lên cá hương</i>	
- Số lượng gia đình ương (half-sib/full-sib) (gia đình)	155 (63/92)
- Số lượng cá bột/bể (gia đình) (con)	3.000
- Tỷ lệ sống cá bột lên cá hương (%)	31,6 ± 11,9
- Ngày tuổi cá hương (ngày)	21 - 33
- Trung bình số lượng hương/gia đình (con)	927,9 ± 358,5
<i>Giai đoạn cá hương lên cá giống</i>	
- Số lượng gia đình ương thành công (half-sib/full-sib) (gia đình)	130 (53/77)
- Tỷ lệ sống cá hương lên cá giống (%)	44,7 ± 11,5

Số liệu trình bày dưới dạng TB ± SD: trung bình ± độ lệch chuẩn



### 3.1.1.3. Kết quả đánh dấu các gia đình cá giống

Thời gian ương từ cá bột đến đánh dấu cho thí nghiệm cảm nhiễm bệnh từ 123 - 167 ngày và thí nghiệm nuôi tăng trưởng từ 141 - 184 ngày. Số lượng cá đánh dấu cho thí nghiệm cảm nhiễm và tăng trưởng lần lượt là 7.664 con và 5.838 con thuộc 130 gia đình với kích cỡ cá đánh dấu từ 20,9 - 21,0 g (Bảng 3.4). Thông tin đánh dấu các gia đình cá được trình bày tại Phụ lục 13. Trong các chương trình chọn giống cá kháng bệnh thường đánh dấu cá trong khoảng kích cỡ cá từ 15 - 25 g (Gjedrem và Baranski, 2009). Kích cỡ cá đánh dấu trong nghiên cứu (20,9 - 21,0 g) tương đồng với kích cỡ cá đánh dấu trong các chương trình chọn giống cá tra trước đây (20 - 23 g, Nguyen và ctv., 2019c) và phù hợp với kích cỡ cá đánh dấu cho chương trình chọn giống cá kháng bệnh.

**Bảng 3.4.** Kết quả đánh dấu từ PIT các gia đình phục vụ chọn giống

Chỉ tiêu	Cảm nhiễm bệnh gan thận mũ <sup>1</sup>	Nuôi tăng trưởng <sup>1</sup>
Thời gian ương (từ cá bột đến đánh dấu - <i>Nursetime</i> )	123 - 167	141 - 184
Số lượng cá đánh dấu (con)	7.664	5.838
Khối lượng cá đánh dấu (g) ± SD	20,9 ± 13,7	21,0 ± 12,3

<sup>1</sup>: thí nghiệm; Số liệu trình bày dưới dạng TB ± SD: trung bình ± độ lệch chuẩn.

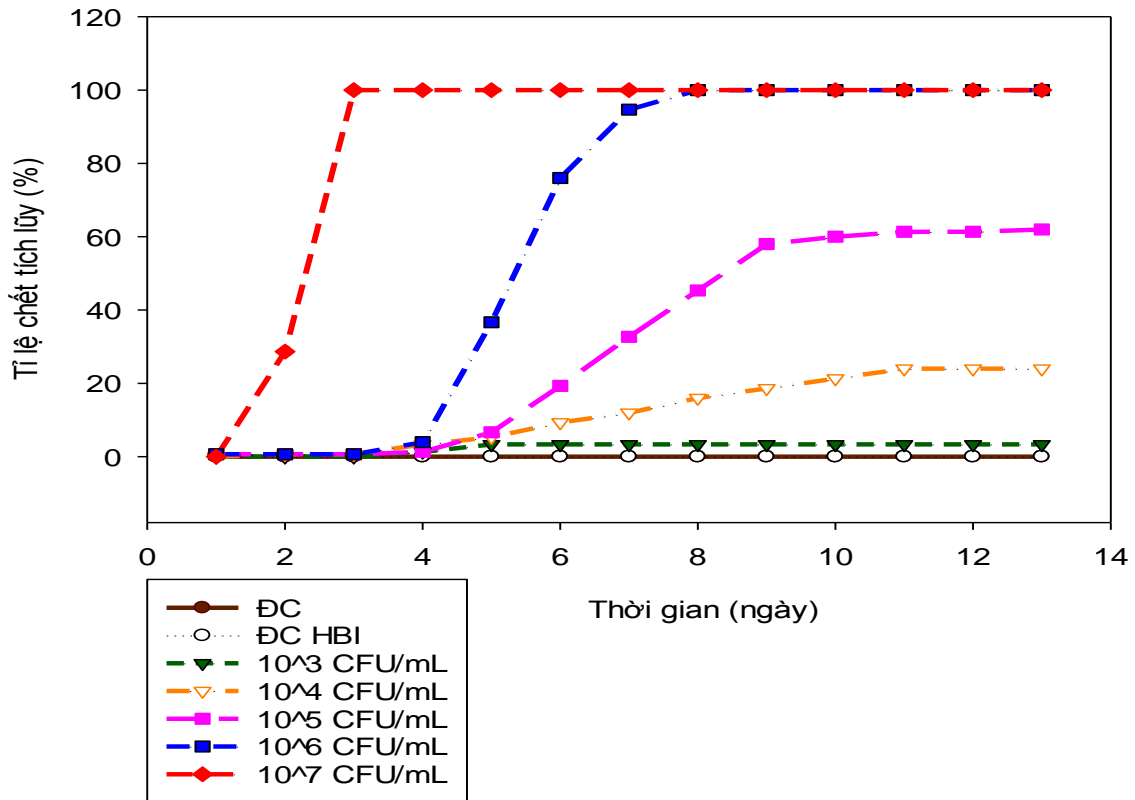
### 3.1.2. Kết quả cảm nhiễm bệnh gan thận mũ các cá thể và gia đình cá hương và cá giống G1 để đánh giá khả năng kháng bệnh

#### 3.1.2.1. Kết quả thí nghiệm thăm dò liều cảm nhiễm

*Kết quả thí nghiệm thăm dò liều cảm nhiễm trên cá hương*

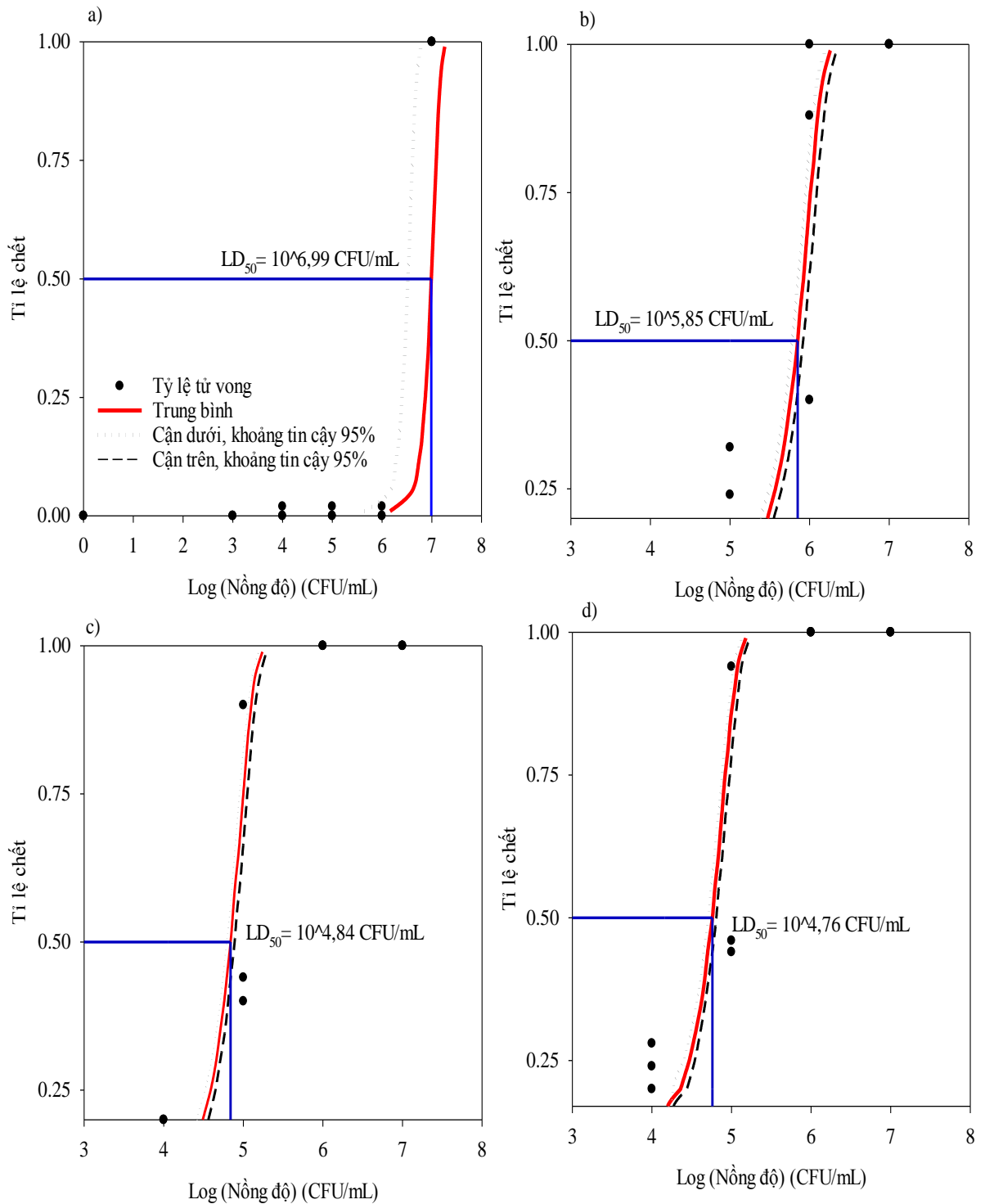
Độc lực và khả năng gây bệnh của chủng vi khuẩn *E. ictaluri* Gly09M được xác định qua thí nghiệm cảm nhiễm bằng phương pháp ngâm vi khuẩn ở năm mật độ là 10<sup>3</sup> CFU/mL, 10<sup>4</sup> CFU/mL, 10<sup>5</sup> CFU/mL, 10<sup>6</sup> CFU/mL và 10<sup>7</sup> CFU/mL. Kết quả thí nghiệm cho thấy chủng vi khuẩn *E. ictaluri* Gly09M gây chết cá với tỉ lệ từ 24 -

100%, đặc biệt cá chết nhiều nhất sau 5 ngày cảm nhiễm, tập trung từ ngày 5 - 9 (Hình 3.1 và Phụ lục 14).



**Hình 3.1.** Tỷ lệ chết tích lũy (%) của cá hương trong thí nghiệm thăm dò

Giá trị LD<sub>50</sub> của chủng vi khuẩn giảm qua các giai đoạn cảm nhiễm và tại ngày 13 sau cảm nhiễm đạt 10<sup>4.76</sup> CFU/mL (Hình 3.2). Kết quả nghiên cứu cho thấy độc lực vi khuẩn này cao hơn độc lực vi khuẩn chủng *E. ictaluri* AG khi ngâm cá tra giống đã gây chết 53,3% cá tra giống với khối lượng trung bình 10 g (Trần Hạnh Triết và ctv., 2014). Liều LD<sub>50</sub> của vi khuẩn *E. ictaluri* cũng được xác định trên cá tra là 7,5 - 10 g là 3,6 x 10<sup>5</sup> CFU/mL (Nguyễn Thị Ngọc Huyền và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2020). Trong chọn giống số lượng cá chết tối thiểu trong thí nghiệm cảm nhiễm có thể giúp xử lý số liệu chọn lọc là 50% (Ødegård và ctv., 2011a). Vì vậy, dựa vào kết quả LD<sub>50</sub> của vi khuẩn trên cá hương, nghiên cứu này chọn liều cảm nhiễm trên cá hương là 10<sup>5</sup> CFU/mL.



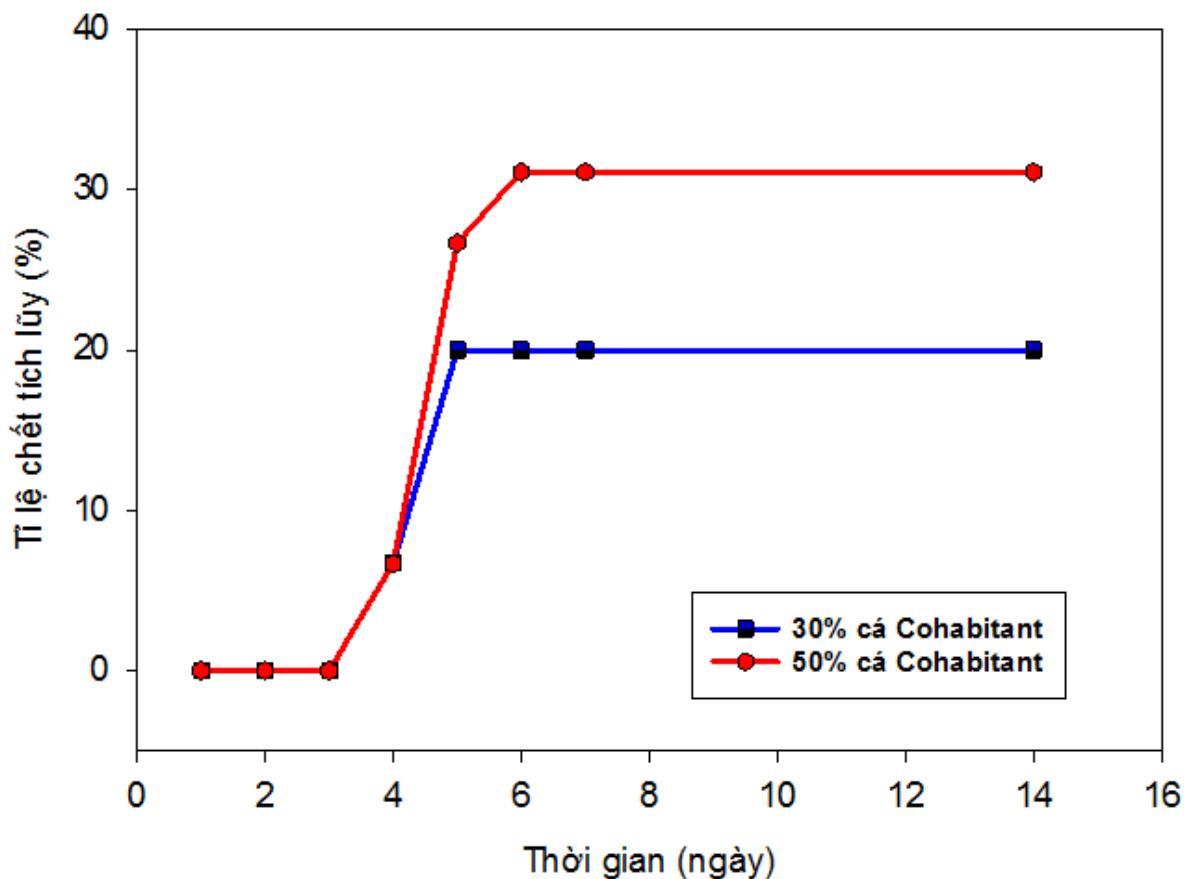
**Hình 3.2.** Liều LD<sub>50</sub> cá hương nhiễm vi khuẩn chủng Gly09M qua các ngày cảm nhiễm: tại ngày 3 (a), ngày 6 (b), ngày 9 (c) và ngày 13 (d).

Tóm lại, qua kết quả thí nghiệm thăm dò bằng phương pháp ngâm trên 33 gia đình cá hương cho thấy chủng vi khuẩn *E. ictaluri* Gly09M có độc lực và khả năng

gây bệnh trên cá tra hương 27 ngày tuổi với liều cảm nhiễm phù hợp cho thí nghiệm cảm nhiễm chọn giống cá tra hương là  $10^5$  CFU/mL.

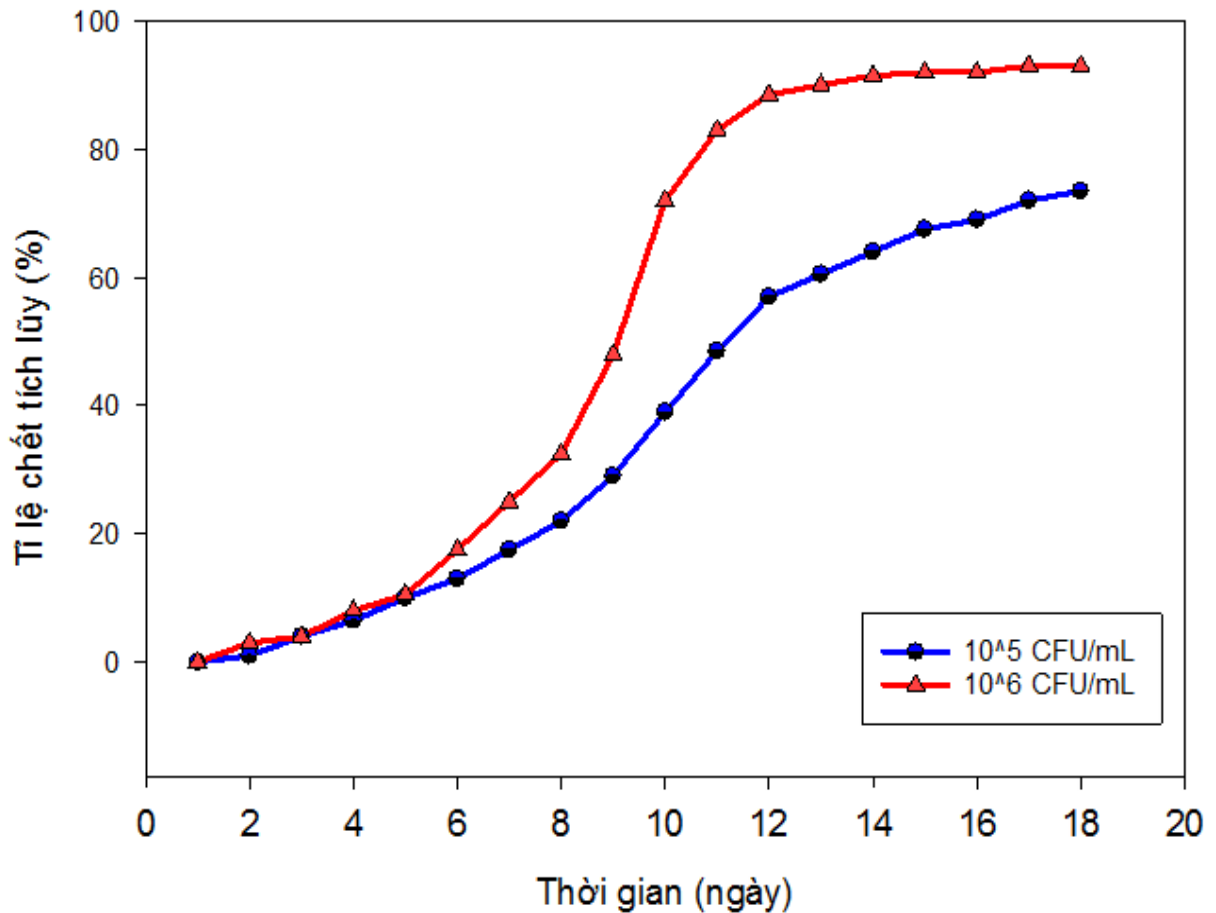
*Kết quả thí nghiệm thăm dò liều cảm nhiễm trên cá giống*

Kết quả cá chết trong hai thí nghiệm thăm dò tỉ lệ ghép cá cohabitant và liều bổ sung vi khuẩn vào bể cảm nhiễm được trình bày tại Phụ lục 15. Kết quả thí nghiệm thăm dò xác định tỉ lệ ghép cá cohabitant cho thấy tỉ lệ cá thí nghiệm chết tương ứng cho hai tỉ lệ ghép cá cohabitant (35% và 50%) lần lượt là 20,0%, 31,1% (Hình 3.3).



**Hình 3.3.** Tỉ lệ chết tích lũy (%) của cá giống trong thí nghiệm thăm dò xác định tỉ lệ ghép cá.

Kết quả qua thí nghiệm thăm dò xác định liều bổ sung vi khuẩn vào bể cảm nhiễm, tỉ lệ cá thí nghiệm chết tương ứng cho hai liều bổ sung vi khuẩn vào bể cảm nhiễm (bể cảm nhiễm có mật độ vi khuẩn đạt  $10^5$  CFU/mL và  $10^6$  CFU/mL) là 73,5% và 93,0% (Hình 3.4).



**Hình 3.4.** Tỷ lệ chết tích lũy (%) của cá giống trong thí nghiệm thăm dò xác định liều bổ sung vi khuẩn vào bể cảm nhiễm.

Qua hai thí nghiệm thăm dò, kết quả cho thấy tỷ lệ ghép cá cohabitant 35% và liều bổ sung vi khuẩn vào bể thí nghiệm để bể đạt mật độ vi khuẩn là  $10^5$  CFU/mL là phù hợp cho thí nghiệm cảm nhiễm chính thức vì tỷ lệ cá chết này (73,5%) có thể giúp xử lý số liệu chọn lọc ( $\geq 50\%$ , Ødegård và ctv., 2011a). Tỷ lệ cá chết trong thí nghiệm thăm dò cao hơn so với nghiên cứu chọn giống các quần thể cá tra khác (24,4 - 46,9%, Trịnh Quốc Trọng và ctv., 2016a; 53,4 - 60,9%, Nguyen và ctv., 2019b). Ngoài ra, thí nghiệm thăm dò ở mức nhiệt độ nước và pH (lần lượt là 25,8 - 26°C; 7,22 - 7,31, buổi sáng và 25,2 - 26,3°C; 7,22 - 7,36, buổi chiều) trong khoảng nhiệt độ và pH để vi khuẩn *E. ictaluri* phát triển và gây bệnh (nhiệt độ nước ở mức 22 - 28°C, Francis-

Floyd và ctv., 1987; pH đạt 6 - 8, Lê Hồng Phước, 2013). Vì vậy, các điều kiện như nhiệt độ, pH nước trong thí nghiệm thăm dò này thích hợp cho vi khuẩn phát triển gây bệnh trong thí nghiệm cảm nhiễm chính thức.

### 3.1.2.2. Kết quả thí nghiệm cảm nhiễm trên 33 gia đình cá hương và 130 gia đình cá giống để đánh giá khả năng kháng bệnh

*Kết quả chỉ tiêu môi trường và mầm bệnh thí nghiệm của 33 gia đình cá hương và 130 gia đình cá giống trong quá trình cảm nhiễm*

Trong quá trình thí nghiệm cảm nhiễm thì các thông số thủy lý hóa nước như pH (7,56 - 7,90) và nhiệt độ của nước (26,08 - 26,80°C) được duy trì ổn định cho sự phát triển của cá tra (các thông số thủy lý hóa nước phù hợp cho sự phát triển của cá tra là pH= 7 - 9, Trần Trung Giang và ctv., 2021; nhiệt độ: 24 - 36°C, Phan Vĩnh Thịnh và ctv., 2014) và hàm lượng DO (4,08 - 4,71) thì phù hợp cho quá trình trao đổi chất ở cá (3 - 7 mg/L, Phạm Quốc Nguyên và ctv., 2014) (Bảng 3.5). Đồng thời, nhiệt độ và pH của nước trong thí nghiệm thích hợp để vi khuẩn *E. ictaluri* phát triển để gây bệnh.

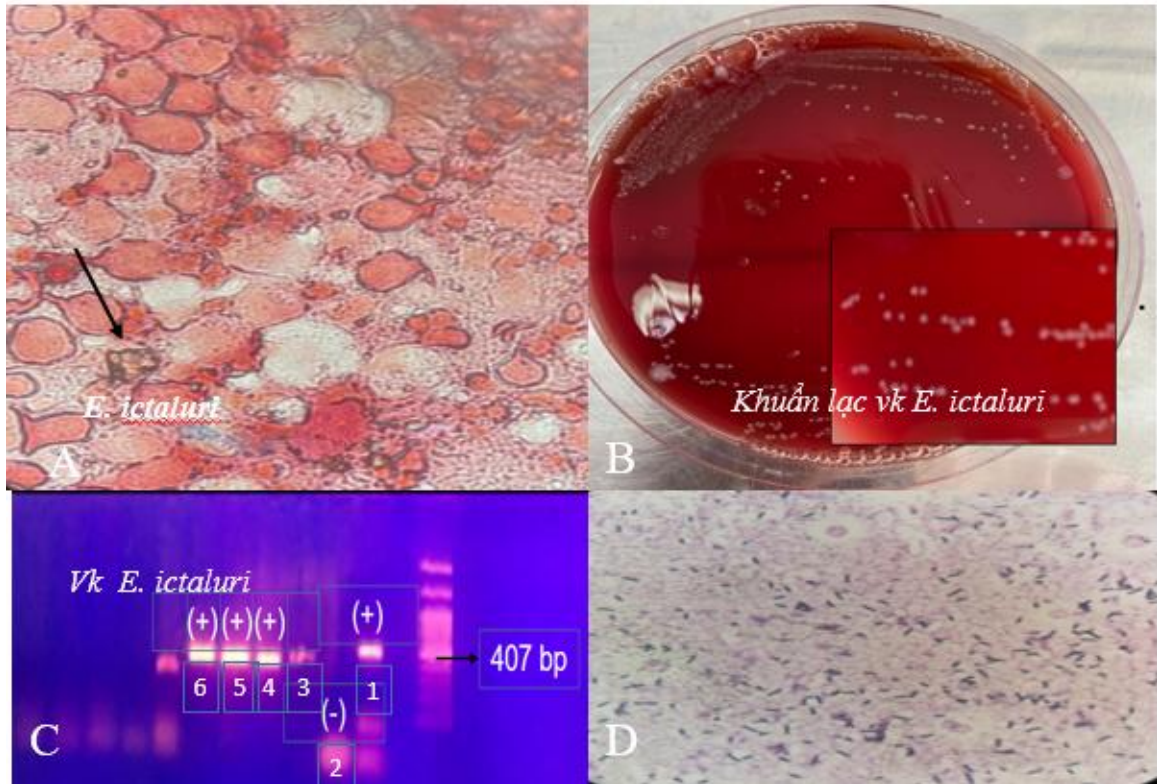
**Bảng 3.5.** Các thông tin thủy lý hóa nước trong quá trình cảm nhiễm

Các thông số trong quá trình cảm nhiễm	Cá hương	Cá giống
- pH	7,56 ± 0,17	7,90 ± 0,83
- NH <sub>3</sub> (mg/L)	0,06 ± 0,03	0,80 ± 0,21
- DO (mg/L)	4,71 ± 0,48	4,08 ± 1,52
- Nhiệt độ (°C)	26,08 ± 0,80	26,80 ± 1,60

*Số liệu trình bày dưới dạng TB ± SD: trung bình ± độ lệch chuẩn*

Khi kiểm tra cá trước cảm nhiễm cho thấy cá thí nghiệm không nhiễm khuẩn (Phụ lục 16). Trong quá trình cảm nhiễm vi khuẩn trên cá hương và cá giống thì theo dõi ở các nghiệm thức gây nhiễm khi cá lơ lờ hoặc vừa mới chết được sử dụng để tái phân lập và định danh tác nhân gây bệnh. Kết quả kiểm tra các đặc điểm về hình thái của tác nhân gây bệnh phân lập được từ cá bệnh trong quá trình cảm nhiễm được thể

hiện ở Hình 3.5 qua vệt phết mẫu mô có chứa vi khuẩn quan sát dưới kính hiển vi khi nhuộm gram; quan sát khuẩn lạc vi khuẩn trên môi trường thạch máu cừu sau 48 giờ sau khi tái phân lập; phát hiện vi khuẩn bằng kỹ thuật PCR và nhuộm vi khuẩn trong môi trường nước bằng cách nhuộm Giemsa ngay sau khi cảm nhiễm.



**Hình 3.5.** Kết quả kiểm tra các đặc điểm về hình thái của tác nhân gây bệnh phân lập được từ cá bệnh trong quá trình cảm nhiễm. Vệt phết mẫu mô có chứa vi khuẩn quan sát dưới kính hiển vi khi nhuộm gram (A). Khuẩn lạc vi khuẩn *E. ictaluri* phát triển trên môi trường thạch máu cừu sau 48 giờ sau khi tái phân lập (B). Kết quả phát hiện vi khuẩn bằng kỹ thuật PCR (M: thang chuẩn 100 bp; giếng 1: đối chứng (+), giếng 2: đối chứng (-); giếng 3, 4, 5, 6: mẫu ADN được trích từ thận và gan cá bệnh (C). Ảnh nhuộm vi khuẩn *E. ictaluri* trong môi trường nước bằng cách nhuộm Giemsa ngay sau khi cảm nhiễm tại vật kính 100X (D).

Kết quả kiểm tra các đặc điểm về hình thái của tác nhân gây bệnh phân lập được từ cá bệnh trong quá trình cảm nhiễm như sau: (i) vi khuẩn phân lập từ cá phát triển

thành khuẩn lạc có màu trắng đục, nhỏ li ti (đường kính thường <1,0 mm), khuẩn lạc sẽ phát triển rõ hơn, có màu trắng hơi trong, lồi và tròn với đường kính là 0,5 - 2 mm sau 48 giờ ủ ở 28°C trên môi trường thạch máu cừu. Quan sát dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 100X thấy vi khuẩn có hình que dài khoảng 1 µm, màu hồng khi nhuộm Gram (dạng trực khuẩn Gram âm); (ii) ADN li trích từ một số mẫu gan, thận của cá sau cảm nhiễm cho kết quả dương tính (+) với vạch ADN xuất hiện ở vị trí 407 bp khi được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR; (iii) khi vệt phết mẫu mô sau khi nhuộm Gram cho thấy có vi khuẩn dạng que dài, mảnh xâm nhập vào nằm rải rác hay tập trung thành từng cụm trong cấu trúc mô học; (iv) quan sát nước cảm nhiễm dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 100X thấy tồn tại vi khuẩn có hình que dài khoảng 1 µm, màu xanh tím khi nhuộm Giemsa (Hình 3.5). Các số liệu kiểm tra tác nhân gây bệnh chi tiết cá thí nghiệm trong quá trình cảm nhiễm bị nhiễm khuẩn được trình bày chi tiết ở Phụ lục 16. Các đặc điểm về hình thái, khuẩn lạc, ADN của tác nhân gây bệnh phân lập trong nghiên cứu này hoàn toàn giống với các đặc điểm của chủng vi khuẩn *E. ictaluri* công bố và chủng Gly09M dùng cho thí nghiệm ban đầu được công bố bởi Lê Hồng Phước và ctv. (2013).

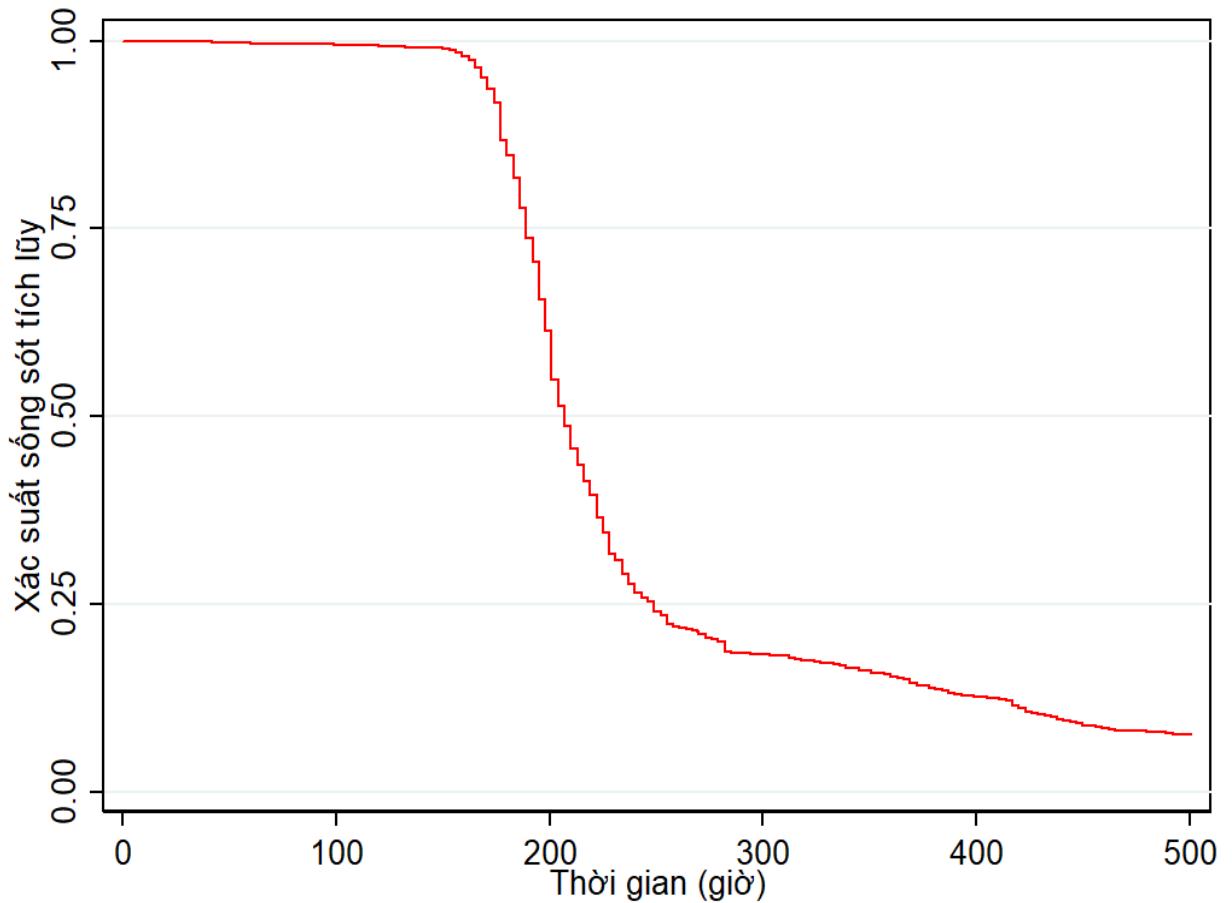
Trước khi cảm nhiễm, cá hương và cá giống thí nghiệm đều khỏe, bắt mồi và hoạt động bình thường, không có dấu hiệu bệnh. Hình thái bên ngoài của cá có màu sắc đồng nhất và nội quan bên trong (gan, thận và lách) biểu hiện bình thường. Tuy nhiên, sau 48 giờ cảm nhiễm trên cá hương và 12 giờ cảm nhiễm trên cá giống, tại mô thận cá ghi nhận vi khuẩn xuất hiện. Các triệu chứng bệnh quan sát được ở cá hương và cá giống bệnh sau khi cảm nhiễm *E. ictaluri* như cá sắp chết bơi lơ dờ trên mặt nước, nhào lộn và xoay tròn, ngứa bụng, thả trôi theo dòng nước rồi chìm xuống đáy. Cá chết thường có da hơi nhợt nhạt so với cá bình thường. Cá bệnh với các dấu hiệu bệnh tích điển hình bao gồm: (i) dấu hiệu bệnh tích bên ngoài cá bệnh như: xuất huyết (mắt, vây ngực, vây đuôi, vây bụng, đầu, da, mang), mắt lồi và màu sắc da nhợt



nhạt sau đó hoại tử ở các cơ quan này; khi cá bệnh nặng, nội tạng của một số cá bệnh có hiện tượng trương phồng, nhũn và có dịch trong xoang bụng; (ii) dấu hiệu bệnh tích trong nội quan biểu hiện theo thứ tự từ thận trước, thận sau, lách và cuối cùng biểu hiện trên gan với các triệu chứng theo mức độ bệnh gồm sưng, bầm, sung huyết, xuất huyết, hoại tử (đốm trắng nhỏ đường kính từ 1 - 3 mm). Tuy nhiên, các bệnh tích ở nội quan cá hương không rõ ràng như cá giống do cá có kích thước nhỏ khó quan sát; (iii) cấu trúc mô học của gan, thận, lách của cá hương và cá giống bị tổn thương như sau: thận của cá bị xuất huyết và nghẽn ở cầu thận; gan cá bị xuất huyết và nghẽn tĩnh mạch và đông máu, nhiều vùng tế bào gan bị sung huyết, xuất huyết và hoại tử; mô lách có những vùng bị hoại tử mất cấu trúc với nhiều trung tâm đại thực bào sắc tố xuất hiện (Phụ lục 17 và Phụ lục 18).

*Kết quả tỉ lệ sống, thời gian sống và thống kê mô tả tình trạng quan sát của 33 gia đình cá hương*

Xác suất sống sót tích lũy của các gia đình cá hương trong quá trình cảm nhiễm trình bày ở Hình 3.6. Các gia đình cá hương bắt đầu chết vào 144 giờ sau cảm nhiễm (hpi) (ngoại trừ gia đình thứ nhất chết từ giai đoạn 39 hpi) và chết nhiều nhất từ 168 - 264 hpi. Kết thúc thí nghiệm, tỉ lệ sống trung bình và thời gian sống trung bình của 33 gia đình cá hương là 7,2% và 248,30 giờ. Nghiên cứu tiến hành đánh giá các thông số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mũ thông qua các chỉ tiêu sống/chết (SUR) và thời gian sống (TIME) tại nhiều giai đoạn cắt ngang ở tỉ lệ sống toàn bộ 50% (SUR50; TIME50), 25% (SUR25; TIME25) và cuối thí nghiệm (SUREND; TIMEEND).



**Hình 3.6.** Đường biểu diễn Kalper-Meier xác suất sống sót tích lũy của 33 gia đình.

Thống kê mô tả các tính trạng về tỉ lệ sống và thời gian sống của 33 gia đình cá hương tại nhiều giai đoạn cắt ngang ở tỉ lệ sống toàn bộ 50% (SUR50; TIME50), 25% (SUR25; TIME25) và cuối thí nghiệm (SUREND; TIMEEND) được trình bày cụ thể tại Bảng 3.6. Kết quả cho thấy, thời điểm cắt ngang ở tỉ lệ sống toàn bộ 50%, 25% và kết thúc thí nghiệm của cá hương cho tính trạng tỉ lệ sống trung bình thực tế lần lượt là 49,6%, 24,0% và 7,2% và thời gian sống trung bình lần lượt là 342,80 giờ, 272,50 giờ, 248,30 giờ. Hệ số biến thiên về tính trạng tỉ lệ sống giữa các gia đình cá hương từ 101,01% đến 375,00%. Hệ số biến thiên về tính trạng thời gian sống giữa các gia đình cá hương từ 36,25% đến 47,78%.

**Bảng 3.6.** Thống kê mô tả các tính trạng quan sát theo thời gian trong thí nghiệm cảm nhiễm trên 33 gia đình cá ở giai đoạn cá hương

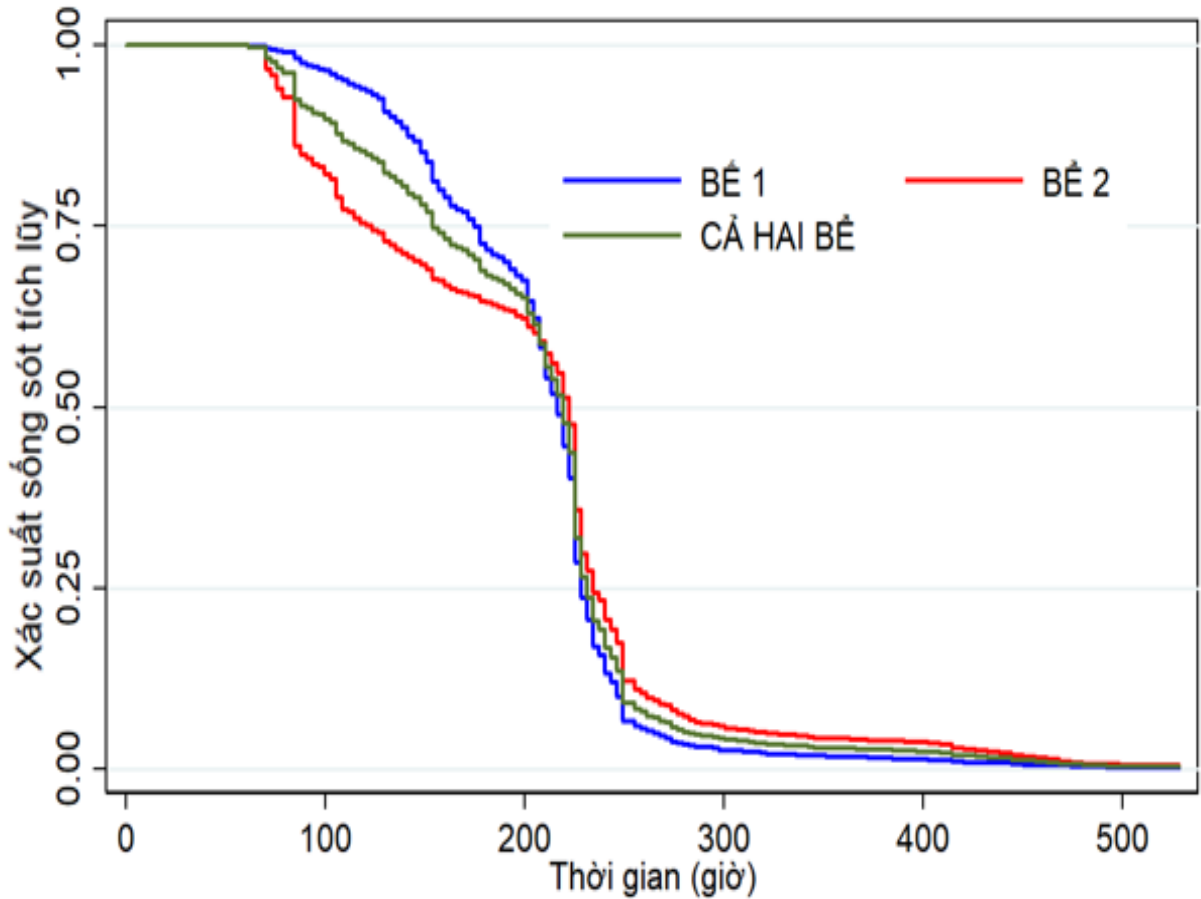
Tính trạng quan sát	Đơn vị	Số cá thể	Trung bình* <sup>1</sup>	Độ lệch chuẩn* <sup>1</sup>	Hệ số biến thiên* <sup>1</sup> (%)
SUR50	%	1.650	49,60	50,10	101,01
TIME50	Giờ	1.650	342,80	157,40	45,96
SUR25	%	1.650	24,00	42,72	178,00
TIME25	Giờ	1.650	272,50	130,20	47,78
SUREND	%	1.650	7,20	27,00	375,00
TIMEEND	Giờ	1.650	248,30	90,00	36,25

\*<sup>1</sup>: Đối với tính trạng sống/chết thì các số liệu trung bình, độ lệch chuẩn, hệ số biến thiên trong bảng tính toán theo tỉ lệ sống của các gia đình.

*Tỉ lệ sống, thời gian sống và thống kê mô tả các tính trạng này của 130 gia đình cá giống*

Các gia đình cá giống bắt đầu chết vào 61 giờ sau cảm nhiễm (hpi) và chết nhiều nhất từ 168 - 240 hpi ở hai bể có xu thế giống nhau. Sau đó cá chết giảm từ 240 hpi và ngừng chết tại giai đoạn 480 hpi (Hình 3.7). Kết quả này là tương đồng với thí nghiệm cảm nhiễm trên quần thể cá G0 khi cảm nhiễm cá chết bắt đầu ở giai đoạn trước 144 hpi sau khi cho cá cohabitant sống chung với cá thí nghiệm. Kết thúc thí nghiệm, tỉ lệ sống trung bình của 130 gia đình cá giống là 0,30%. Kết quả tỉ lệ sống của 130 gia đình cá giống gần tương tự với thí nghiệm cảm nhiễm trên đàn cá tra chọn giống tăng trưởng thế hệ thứ hai G2-2011 và G2-2012 (13 - 16,9%) khi cá cohabitant được tiêm vi khuẩn với liều  $1 \times 10^5$  CFU/cá và vi khuẩn được bổ sung vào bể cảm nhiễm với lượng  $2,5 \times 10^6$  CFU/mL (Pham và ctv., 2020b), nhưng thấp hơn thí nghiệm của Trịnh Quốc Trọng và ctv. (2016a, b) trên đàn cá tra chọn giống G0 với tỉ lệ cá sống của bể 1 là 53,1%, của bể 2 là 75,6% và trung bình của hai bể là 61%. Kết quả cho thấy cá thí nghiệm trong nghiên cứu này chết nhanh hơn (23 ngày so với 32

ngày) thí nghiệm của Trịnh Quốc Trọng và ctv. (2016a, b) trên đàn cá tra chọn giống G0.



**Hình 3.7.** Đường biểu diễn Kalper-Meier xác suất sống sót tích lũy của 130 gia đình.

Thời gian sống trung bình trong quá trình thí nghiệm của 130 gia đình cá giống là 201,91 giờ. Thời gian sống và tỉ lệ cá sống tại các thời điểm cắt ngang tỉ lệ sống toàn bộ 50%, 25%, kết thúc thí nghiệm của các gia đình cá giống được trình bày chi tiết ở Bảng 3.7 và Phụ lục 19. Qua thí nghiệm cảm nhiễm chính thức các gia đình cá giống, hệ số biến thiên (CV) tính trạng kháng bệnh gan thận mũ thông qua các chỉ tiêu sống/chết (SUR) và thời gian sống (TIME) theo các cắt ngang ở tỉ lệ sống toàn bộ 50%, 25% và cuối thí nghiệm với tỉ lệ sống 0,30% (SUR50, SUR25, SUREND và TIME50, TIME25, TIMEEND) tương ứng là 42,76%, 92,86%, 866,67% và 23,38%,

29,03% và 17,45% (Bảng 3.7). Kết quả cho thấy CV của TIME50, TIME25 và TIMEEND thấp hơn CV của SUR50, SUR25 và SUREND. Nguyên nhân do tính trạng TIME của các gia đình theo dõi theo 3 giờ/lần, trong khi SUR của các gia đình tại thời điểm cắt ngang tính theo số lượng cá thể chết tại thời điểm cắt ngang đó nên mức độ biến thiên của tính trạng TIME thấp hơn SUR tại các thời điểm. Nguyen và ctv. (2019b) công bố CV cho SUR60 cuối thí nghiệm thấp hơn (80,20%) trên cùng quần thể cá tra chọn giống kháng bệnh gan thận mũ nhưng ở thế hệ bố mẹ G0.

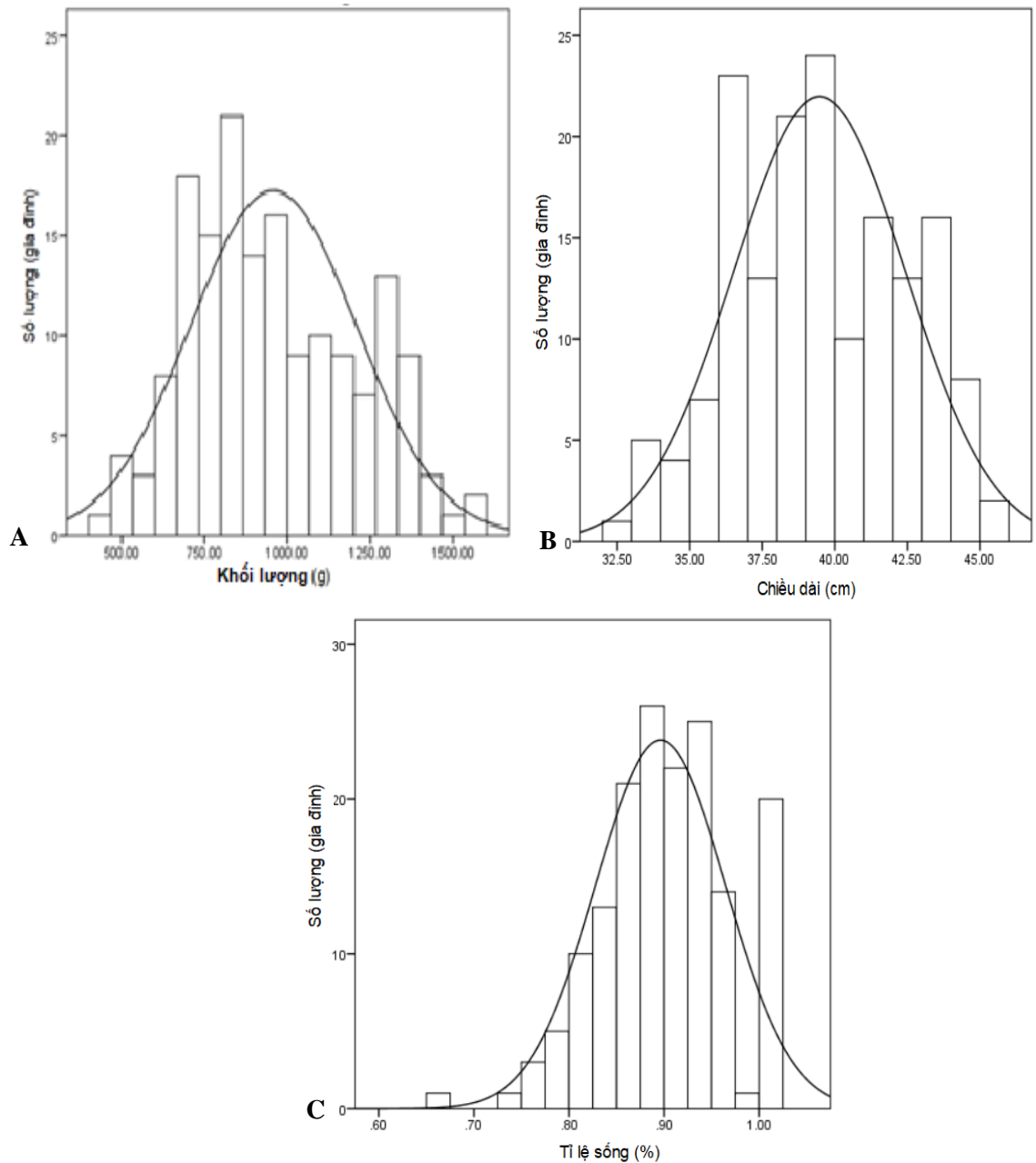
**Bảng 3.7.** Thống kê mô tả các tính trạng quan sát theo thời gian trong thí nghiệm cảm nhiễm trên 130 gia đình cá ở giai đoạn cá giống

Tính trạng quan sát	Đơn vị	Số cá thể	Trung bình* <sup>1</sup>	Độ lệch chuẩn* <sup>1</sup>	Hệ số biến thiên* <sup>1</sup> (%)
SUR50	%	7.664	47,73	20,41	42,76
TIME50	Giờ	7.664	334,05	78,13	23,38
SUR25	%	7.664	23,70	22,01	92,86
TIME25	Giờ	7.664	261,45	75,91	29,03
SUREND	%	7.664	0,30	2,60	866,67
TIMEEND	Giờ	7.664	201,91	35,25	17,45

\*<sup>1</sup>: Đối với tính trạng sống/chết thì các số liệu trung bình, độ lệch chuẩn, hệ số biến thiên trong bảng tính toán theo tỉ lệ sống của các gia đình.

### 3.1.3. Kết quả nuôi tăng trưởng các cá thể và gia đình cá giống G1 để đánh giá tăng trưởng và tỉ lệ sống lúc thu hoạch

Qua thí nghiệm nuôi tăng trưởng, 130 gia đình được thu thập số liệu về khối lượng (HW, g) và chiều dài chuẩn (HL, cm) và tỉ lệ sống (SURGROW, %). Kết quả về khối lượng, chiều dài chuẩn và tỉ lệ sống của 130 gia đình cá khi thu hoạch được thể hiện ở Hình 3.8.



**Hình 3.8.** Khối lượng, chiều dài và tỉ lệ chết của 130 gia đình cá khi thu hoạch. Khối lượng (**A**), chiều dài (**B**), tỉ lệ sống (**C**) sau khi thu hoạch trong thí nghiệm nuôi tăng trưởng.

Thông kê mô tả về các tính trạng tăng trưởng (khối lượng, chiều dài chuẩn và tỉ lệ sống) lúc thu hoạch của 130 gia đình được trình bày chi tiết tại Bảng 3.8. Khối lượng trung bình cá tại thời điểm thu hoạch là 868,40 g/con, chiều dài chuẩn trung

bình là 38,45 cm/con. Tỷ lệ sống cả đàn gồm nhiều gia đình là 88,93%. Hệ số biến thiên (CV) tính trạng chiều dài, khối lượng sau khi thu hoạch tương ứng là 9,07% và 32,14% (Bảng 3.8). Đồng thời, CV của SURGROW 35,27% thấp hơn nhiều so với SUREND trong quá trình cảm nhiễm. Nguyen và ctv. (2019b) công bố CV cho HW cuối thí nghiệm thấp hơn (29,9%) trên quần thể cá tra chọn giống khác nhằm nâng cao tốc độ tăng trưởng qua ba thế hệ tại Việt Nam.

**Bảng 3.8.** Thống kê mô tả các tính trạng tăng trưởng, tỉ lệ sống lúc thu hoạch

Tính trạng quan sát (đơn vị)	Số cá (n)	Trung bình* <sup>1</sup>	Độ lệch chuẩn* <sup>1</sup>	Hệ số biến thiên (%)* <sup>1</sup>
HL (cm)	5.192	38,45	3,49	9,07
HW (g)	5.192	868,40	279,10	32,14
SURGROW (1/0)	5.838	88,93	31,37	35,27

\*<sup>1</sup>: Đối với tính trạng sống/chết thì các số liệu trung bình, độ lệch chuẩn, hệ số biến thiên trong bảng tính toán theo tỉ lệ sống của các gia đình.

### 3.1.4. Kết quả ước tính các hệ số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mũ ở giai đoạn cá hương và cá giống, tính trạng tăng trưởng và tỉ lệ sống lúc thu hoạch ở G1

Chọn các thời điểm cắt ngang để ước tính các thông số di truyền: (i) Gjølén và ctv. (1997) nghiên cứu bệnh trên cá hồi và Ødegård và ctv. (2011) nghiên cứu các mô hình toán xử lý số liệu kháng bệnh thảo luận rằng tính trạng kháng bệnh cần được xem xét ở tỉ lệ sống xung quanh 50%, do nếu đạt tỉ lệ sống thấp hơn thì một số gia đình không còn cá thể sống dẫn đến làm sai lệch kết quả ở tính trạng sống/chết. Trong thí nghiệm cảm nhiễm trên các quần thể cá tra chọn giống tăng trưởng G2, nhóm tác giả Pham và ctv. (2020b, c) thảo luận rằng thí nghiệm cảm nhiễm nên kết thúc ở tỉ lệ sống xung quanh 50% vì khi đó có phương sai kiểu hình và hệ số di truyền cao hơn, có thể phản ánh đúng tính trạng kháng bệnh gan thận mũ hơn. Ngoài ra, Pham và ctv.

(2020b, c) cũng thảo luận rằng mô hình toán với tính trạng thời gian sống đến 50% có thể phản ánh tốt sự miễn cảm của cá tra với mầm bệnh *E. ictaluri* gây bệnh gan thận mũ; (ii) thời gian cá sống đạt ngưỡng 50% và 25% tổng số cá thí nghiệm là ngắn (< 80 giờ) sau đó cá thí nghiệm chết chậm hơn; (iii) thí nghiệm cảm nhiễm trong nghiên cứu hiện tại, cá thí nghiệm sống đạt tỉ lệ thấp là 7,2% ở cá hương và 0,30% ở cá giống khi kết thúc thí nghiệm gây khó khăn cho việc xử lý để đánh giá các biến dị di truyền; (iv) từ giai đoạn cá sống đạt ngưỡng 25% đến khi kết thúc thí nghiệm, sự tăng số lượng gia đình cá giống với toàn bộ cá thể trong gia đình chết cao (từ 24 gia đình đến 130 gia đình) dẫn đến tăng sai lệch kết quả ước tính các thông số di truyền. Do đó, đề tài đã tiến hành đánh giá các thông số di truyền của quần thể cá tra kháng bệnh G1 ở các thời điểm cắt ngang số cá thí nghiệm chết đạt 50%, 25% và khi kết thúc thí nghiệm.

### 3.1.4.1. Hệ số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mũ

*Hệ số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mũ ở giai đoạn cá hương*

**Bảng 3.9.** Các phương sai thành phần và hệ số di truyền ước tính ( $h^2$ ) cho tính trạng kháng bệnh gan thận mũ cắt ngang theo tỉ lệ sống khác nhau ở giai đoạn cá hương

Tính trạng quan sát	Phương sai thành phần			Hệ số di truyền ( $h^2 \pm se$ )
	$\sigma_G^2$	$\sigma_E^2$	$\sigma_P^2$	
SUR50	0,11	0,15	0,26	0,43 $\pm$ 0,09
TIME50	11.928,90	13.966,60	25.895,50	0,46 $\pm$ 0,09
SUR25	0,08	0,11	0,19	0,43 $\pm$ 0,09
TIME25	9.053,15	8.874,70	17.927,85	0,51 $\pm$ 0,10
SUREND	0,04	0,03	0,07	0,55 $\pm$ 0,10
TIMEEND	5.615,75	4.613,16	10.228,91	0,55 $\pm$ 0,10

$\sigma_A^2$ : phương sai di truyền,  $\sigma_E^2$ : phương sai của số dư,  $\sigma_P^2$ : phương sai kiểu hình,  $h^2$ : hệ số di truyền ước tính,  $se$ : sai số chuẩn.



Các ảnh hưởng cố định đưa vào mô hình để xử lý số liệu nhằm ước tính các thông số di truyền tính trạng kháng bệnh trên cá hương là tuổi cảm nhiễm và bề cảm nhiễm (trình bày ở Phụ lục 8). Kết quả cho thấy, hệ số di truyền ( $h^2$ ) ước tính cho cá hương về tỉ lệ sống và thời gian sống qua các thời điểm cắt ngang SUR50, SUR25 và SUREND đạt mức cao tương ứng là 0,43, 0,43, 0,55 và 0,46, 0,51, 0,55 (Bảng 3.9 và Phụ lục 20). Tất cả các ước tính đều khác không (zero) có ý nghĩa thống kê.

Hiện nay có rất ít thông tin được công bố về hệ số di truyền trên thủy sản cho tính trạng kháng bệnh ở các giai đoạn đầu trong quá trình phát triển (Nguyen và ctv., 2019a; Pham và ctv., 2020b). Trong nghiên cứu này,  $h^2$  ước tính trên tính trạng tỉ lệ sống và thời gian sống kháng vi khuẩn *E. ictaluri* ở cá hương đạt mức cao (0,43 - 0,55), kì vọng hiệu quả chọn lọc cao nếu áp dụng chọn lọc ở giai đoạn cá hương. Kết quả nghiên cứu tương tự với Nguyen và ctv. (2019a) và Pham và ctv. (2020b) cho rằng tính trạng tỉ lệ sống có thể di truyền ở giai đoạn đầu trong quá trình phát triển của cá. Trong nghiên cứu này khi xử lý số liệu với mô hình ước tính không bao gồm ảnh hưởng môi trường ương riêng rẽ đến đánh dấu ( $c^2$ ) lại cho độ chính xác cao hơn, kết quả phù hợp với nghiên cứu của Pham và ctv. (2020b), tuy nhiên  $h^2$  có thể bị tăng khi ước tính (Falconer và Mackay, 1996).

Đối với cá tra, chưa có nghiên cứu về  $h^2$  cho cá hương, nhưng ở cá tra giống hệ số này từ mức thấp (0,06 - 0,13, Pham và ctv., 2020b) đến trung bình (0,09 - 0,32; Nguyen và ctv., 2019b). Đối với các đối tượng khác trên thế giới hầu hết thực hiện cảm nhiễm trên cá giống là chính với  $h^2$  ở mức trung bình đến cao trong khoảng từ 0,38 - 0,62, cụ thể cá hồi Đại Tây Dương kháng vi khuẩn *A. salmonicida* (0,42 - 0,62) (Ødegård và ctv., 2007b; Kjøglum và ctv., 2008), cá hồi vân kháng vi khuẩn *Y. ruckeri* (0,21) và *F. psychrophilum* (0,07 - 0,23) (Henryon và ctv., 2005; Leeds và ctv., 2010), cá rô phi đỏ kháng vi khuẩn *Streptococcus iniae* (0,52) và *Streptococcus agalactiae* (0,38) (Shoemaker và ctv., 2017). Chỉ một số ít nghiên cứu  $h^2$  giai đoạn cá hương như trên cá hồi chấm hồng kháng vi khuẩn *A. salmonicida* mang lại kết quả ở mức cao (0,51, Perry và ctv., 2004) và cá bống biển kháng vi khuẩn *Photobacterium damsela subsp. piscicida*,  $h^2$  từ trung bình đến cao (0,18 - 0,45, Antonello và ctv., 2009). Lần đầu tiên trong nghiên cứu chọn giống cá tra kháng bệnh gan thận mũ, thí

nghiệm cảm nhiễm được tiến hành trên cá hương để ước tính được thông số di truyền ở giai đoạn này. Qua kết quả về hệ số di truyền cho thấy chọn giống kháng bệnh ở giai đoạn cá hương góp phần nâng cao tỉ lệ sống của cá tra giai đoạn này là khả thi. Tuy nhiên, cần xem xét với tương quan di truyền khả năng kháng bệnh với cá giống nhằm đề xuất hướng chọn lọc kết hợp giúp mang lại hiệu quả kháng bệnh trên nhiều giai đoạn sống của cá tra.

*Hệ số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mũ ở giai đoạn cá giống*

Hệ số di truyền ( $h^2$ ) cho tính trạng kháng bệnh thông qua khả năng sống/chết (SUR) ở mức trung bình, cao và thấp tương ứng là 0,2200, 0,3731 và 0,1304 cho các cắt ngang SUR50, SUR25 và SUREND (Bảng 3.10). Hệ số di truyền cho SUR trong nghiên cứu này cao hơn giá trị ước tính cùng mô hình toán trên cùng quần thể chọn giống kháng bệnh gan thận mũ ở thế hệ G0 với tỉ lệ sống ở 60,9% (0,19, Nguyen và ctv., 2019b) và trên các quần thể chọn giống tăng trưởng khi cảm nhiễm bệnh gan thận mũ với tỉ lệ sống ở 8,0 - 11,8% (0,11 - 0,13, Pham và ctv., 2020a). Ngoài ra,  $h^2$  cho tính trạng kháng bệnh thông qua thời gian sống (TIME) có hệ số di truyền ở mức trung bình và cao tương ứng là 0,2429, 0,3798 và 0,3618 (Bảng 3.10). Hệ số di truyền cho tính trạng thời gian chết (TIME) nhưng theo ngày cũng cho giá trị ước tính cao hơn SUR phù hợp với các nghiên cứu trước đây (0,23 so với 0,19) (Nguyen và ctv., 2019b). Kết quả này cho thấy ở cắt ngang tỉ lệ sống cuối thí nghiệm (SUREND và TIMEEND) có hệ số di truyền thấp nhất. Kết quả đề tài phù hợp với nghiên cứu của Trinh và ctv. (2019) cho thấy khi tỉ lệ sống giảm dần đến cuối thí nghiệm thì  $h^2$  cũng thấp hơn cho tính trạng kháng vi-rút đốm trắng (WSSV) trên tôm thẻ chân trắng, khi tỉ lệ sống giảm từ 92,1% xuống 42,8% thì  $h^2$  giảm từ 0,38 xuống 0,01. Tất cả giá trị  $h^2$  vừa nêu tại các giai đoạn cắt ngang trong quá trình cảm nhiễm đều khác zero có ý nghĩa thống kê. Do hiệu quả chọn lọc phụ thuộc vào hệ số di truyền (Gjedrem, 2005), nên với hệ số di truyền này cho phép chúng ta kết luận hiệu quả ở mức trung bình đến cao nếu chúng ta thực hiện chọn lọc cho tính trạng kháng bệnh gan thận mũ trên cá giống ở các cắt ngang tỉ lệ sống toàn bộ 50% và 25% và hiệu quả ở mức thấp nếu thực hiện chọn lọc cho tính trạng kháng bệnh gan thận mũ trên cá giống khi kết thúc thí nghiệm cảm nhiễm.

**Bảng 3.10.** Các phương sai thành phần và hệ số di truyền ước tính ( $h^2$ ) cho tính trạng kháng bệnh gan thận mỡ cắt ngang theo tỉ lệ sống khác nhau ở giai đoạn cá giống

Tính trạng	Phương sai thành phần				Hệ số di truyền ( $h^2$ , TB $\pm$ se)	Hệ số $c^2$ (TB $\pm$ se)
	$\sigma_A^2$	$\sigma_C^2$	$\sigma_E^2$	$\sigma_P^2$		
SUR50	0,0500	0,0070	0,1703	0,2273	0,2200 $\pm$ 0,03	0,0308 $\pm$ 0,03
TIME50	7404,3700	887,900	22192,800	30485,070	0,2429 $\pm$ 0,04	0,0291 $\pm$ 0,03
SUR25	0,0500	0,0040	0,0800	0,1340	0,3731 $\pm$ 0,04	0,0299 $\pm$ 0,03
TIME25	6191,7800	319,7000	9792,0300	16303,5100	0,3798 $\pm$ 0,04	0,0196 $\pm$ 0,02
SUREND	0,0003	0,0001	0,0021	0,0025	0,1304 $\pm$ 0,03	0,0395 $\pm$ 0,02
TIMEEND	1521,1600	82,5000	2601,3300	4204,9900	0,3618 $\pm$ 0,04	0,0196 $\pm$ 0,02

$\sigma_A^2$ : phương sai di truyền,  $\sigma_E^2$ : phương sai của số dư,  $\sigma_C^2$ : phương sai ảnh hưởng môi trường nuôi riêng rẽ các gia đình đến lúc đánh dấu,  $\sigma_P^2$ : phương sai kiểu hình,  $h^2$ : hệ số di truyền ước tính; se: sai số chuẩn.

Trong nghiên cứu này, việc sử dụng mô hình toán tuyến tính hỗn hợp cá thể để xử lý số liệu nhằm ước tính hệ số di truyền là phù hợp do hầu hết các tính trạng kháng bệnh gan thận mỡ như SUR50 và TIME50, TIME25 và TIMEEND của các gia đình cá đều có đồ thị biểu thị phân bố tập trung theo phân phối chuẩn, riêng SUR25 và SUREND đồ thị phân bố hơi lệch về bên trái (Phụ lục 19). Kết quả các ảnh hưởng đưa vào mô hình có ý nghĩa ( $p < 0,05$ ) trong mô hình là tuổi đánh dấu và bề cảm nhiễm, cá mẹ (trình bày ở Phụ lục 8). Mô hình toán sử dụng trong nghiên cứu này có điều chỉnh ảnh hưởng không đồng nhất về thời gian sinh sản của các gia đình nhằm ước tính các thông số di truyền chính xác. Tuy nhiên, việc sinh sản của các gia đình không đồng nhất về thời gian cũng là hạn chế trong nghiên cứu này. Với số lượng gia đình half-sib đạt được cho số liệu cảm nhiễm bệnh gan thận mỡ là 53, nghiên cứu đã sử dụng mô hình tuyến tính có bao gồm ảnh hưởng môi trường chung ( $c^2$ ) để xử lý số liệu. Cách tiếp cận này cũng phù hợp khi Nguyen và ctv. (2019b) và Pham và ctv. (2020a) cũng đã thử nghiệm mô hình có  $c^2$  cho xử lý số liệu kháng bệnh gan thận mỡ theo tính trạng sống/chết trên quần thể cá tra chọn giống kháng bệnh gan thận mỡ và tăng trưởng.

### **3.1.4.2. Hệ số di truyền các tính trạng tăng trưởng và tỉ lệ sống lúc thu hoạch**

Ước tính bằng mô hình tuyến tính có bao gồm ảnh hưởng môi trường chung ( $c^2$ ), hệ số di truyền ( $h^2$ ) cho tính trạng khối lượng (HW) và chiều dài (HL) cho quần thể G1 trong nghiên cứu này ở mức cao tương ứng là  $0,48 \pm 0,17$  và  $0,47 \pm 0,18$  và khác zero có ý nghĩa thống kê (Bảng 3.11). Kết quả cho thấy nếu chọn lọc nâng cao tốc độ tăng trưởng thì hiệu quả mang lại sẽ cao. Hệ số di truyền cho HW trong nghiên cứu này trên G1 cao hơn  $h^2$  cùng quần thể chọn giống kháng bệnh gan thận mỡ nhưng ở thế hệ bố mẹ G0 là  $0,35 \pm 0,12$  (Trịnh Quốc Trọng và ctv., 2016a). Hệ số này cho HW cũng cao hơn với số liệu xử lý trên quần thể cá tra khác chọn giống nâng cao tốc độ tăng trưởng qua ba thế hệ tại Việt Nam ( $0,34 \pm 0,04$ ) (Nguyen và ctv., 2019c). Ảnh hưởng môi trường chung ( $c^2$ ) cho HW và HL trong nghiên cứu này ( $0,18 \pm 0,07$

và  $0,23 \pm 0,08$ ) khác zero có ý nghĩa thống kê và cũng nằm trong khoảng công bố cho hai tính trạng này ở cùng quần thể cá tra nhưng ở thể hệ khác (Nguyen và ctv., 2019c). Hệ số di truyền cho tỉ lệ sống lúc thu hoạch sau nuôi tăng trưởng ở mức trung bình ( $0,23 \pm 0,02$ ) và khác zero có ý nghĩa thống kê (Bảng 3.11). Giá trị này gần tương đương ( $0,27 \pm 0,03$ ) với công bố của Nguyen và ctv. (2019c) ước tính trên quần thể cá tra chọn giống khác nhằm nâng cao tốc độ tăng trưởng qua ba thế hệ tại Việt Nam. Nếu chọn giống theo tăng trưởng và tỉ lệ sống lúc thu hoạch thì sẽ mang lại hiệu quả tương ứng cao và trung bình.

**Bảng 3.11.** Các phương sai thành phần và hệ số di truyền ước tính ( $h^2$ ) cho tính trạng tăng trưởng, tỉ lệ sống lúc thu hoạch

Tính trạng	Phương sai thành phần				Hệ số di truyền ( $h^2$ , TB $\pm$ se)	Hệ số $c^2$ (TB $\pm$ se)
	$\sigma_A^2$	$\sigma_C^2$	$\sigma_E^2$	$\sigma_P^2$		
HL	3,97	1,51	2,83	8,30	$0,48 \pm 0,17$	$0,18 \pm 0,07$
HW	25.532,50	12.539,30	15.796,70	53.868,00	$0,47 \pm 0,18$	$0,23 \pm 0,08$
SURGW	0,02	0,01	0,06	0,10	$0,23 \pm 0,02$	$0,10 \pm 0,05$

$\sigma_A^2$ : phương sai di truyền,  $\sigma_E^2$ : phương sai của số dư,  $\sigma_C^2$ : phương sai ảnh hưởng môi trường nuôi riêng rẽ các gia đình đến lúc đánh dấu,  $\sigma_P^2$ : phương sai kiểu hình,  $h^2$ : hệ số di truyền ước tính; se: sai số chuẩn.

### 3.1.5. Kết quả ước tính tương quan di truyền giữa các tính trạng kháng bệnh hai giai đoạn cá hương và cá giống, kháng bệnh giai đoạn cá giống với tính trạng tăng trưởng và tỉ lệ sống lúc thu hoạch

#### 3.1.5.1. Tương quan di truyền giữa các tính trạng kháng bệnh hai giai đoạn cá hương và cá giống

Mối tương quan di truyền giữa khả năng kháng *E. ictaluri* thông qua tỉ lệ sống và thời gian sống tại các thời điểm khác nhau trong quá trình cảm nhiễm trên cá hương

và cá giống từ tương quan nghịch đến thuận, nhưng thấp ( $-0,18 \div 0,26$ ) (Bảng 3.12 và Phụ lục 21).

**Bảng 3.12.** Tương quan di truyền giữa tính trạng tỉ lệ sống và thời gian sống của 33 gia đình cá hương và 33 gia đình cá giống

Tương quan	SUR50 <sup>1</sup>	SUR25 <sup>1</sup>	SUREND <sup>1</sup>	TIME50 <sup>1</sup>	TIME25 <sup>1</sup>	TIMEEND <sup>1</sup>
SUR50 <sup>2</sup>	0,04	0,02	-0,18	– <sup>(3)</sup>	–	–
SUR25 <sup>2</sup>	-0,03	0,00	-0,02	–	–	–
SUREND <sup>2</sup>	0,04	0,18	0,26	–	–	–
TIME50 <sup>2</sup>	–	–	–	0,10	0,07	-0,01
TIME25 <sup>2</sup>	–	–	–	-0,03	-0,04	-0,06
TIMEEND <sup>2</sup>	–	–	–	0,15	0,14	0,09

<sup>1</sup>: giai đoạn cá hương; <sup>2</sup>: giai đoạn cá giống; <sup>3</sup>: không ước tính trong mô hình.

Chọn giống kháng bệnh giai đoạn đầu đời có thể hữu ích cho việc cải thiện di truyền nếu tương quan di truyền cao với giai đoạn cá lớn. Tuy nhiên, những mối tương quan như vậy trên tính trạng kháng bệnh ít được đo lường trên các đối tượng thủy sản (Perry và ctv., 2004). Tương quan di truyền theo EBV của tính trạng tỉ lệ sống và thời gian sống trên hai giai đoạn phát triển cá tra chưa có báo cáo nào được đưa ra. Trong nghiên cứu này đã chỉ ra các mối tương quan di truyền giữa khả năng kháng *E. ictaluri* thông qua tỉ lệ sống và thời gian sống tại các thời điểm khác nhau trong quá trình cảm nhiễm trên cá hương và cá giống. Trong đó, tương quan di truyền theo EBV của tính trạng tỉ lệ sống và thời gian sống tại giai đoạn cắt ngang tỉ lệ sống toàn bộ 50%, 25% và kết thúc thí nghiệm giữa giai đoạn cá hương và cá giống theo mô hình tuyến tính tương ứng là 0,04, 0,00, 0,26 và 0,10, -0,04, 0,09. Như vậy cho thấy chọn lọc tính trạng kháng bệnh gan thận mũ ở cá giống không làm giảm khả năng kháng bệnh ở cá hương, nhưng khả năng kháng bệnh ở hai giai đoạn này không phải là một tính trạng vì tương quan giữa chúng được tìm thấy thấp. Nguyên nhân

giải thích là có thể do hai nhóm gen khác nhau chi phối hai giai đoạn nhưng có chung một số gen điều khiển khả năng kháng bệnh như giải thích của Falconer và Mackay (1996) và Gjedrem (2005).

Trong các nghiên cứu di truyền chọn giống thì quy mô gia đình, cấu trúc gia đình full-sib và half-sib có vai trò quan trọng giúp ước tính các thông số di truyền chính xác. Nghiên cứu này thực hiện ước tính tương quan di truyền khả năng kháng bệnh trên quy mô gia đình cá hương và cá giống hạn chế là 33 gia đình cá hương và 33 gia đình cá giống. Vì vậy, cần nâng cao số lượng gia đình trong những nghiên cứu tiếp theo để có thể tách được  $c^2$  và ước tính tương quan giữa hai giai đoạn chính xác hơn.

Nghiên cứu này bước đầu là tham khảo hữu ích để áp dụng cho chọn giống cá tra kháng bệnh gan thận mũ trên nhiều giai đoạn sống. Tuy nhiên, bước đầu có thể thấy do tương quan di truyền thuận và thấp, tức nếu chọn lọc tính trạng kháng bệnh gan thận mũ ở cá giống (hoặc cá hương) thì có thể mang lại hiệu quả không cao cho tính trạng kháng bệnh ở giai đoạn còn lại. Vì vậy, để nâng cao khả năng kháng bệnh đồng thời ở giai đoạn cá hương và giống, cần thiết phải áp dụng chọn lọc hai tính trạng đồng thời. Khi đó một chỉ số chọn giống (index) cần được thành lập dựa trên việc kết hợp giá trị kinh tế và giá trị chọn giống của từng tính trạng.

### **3.1.5.2. Tương quan di truyền giữa các tính trạng kháng bệnh quan sát của 130 gia đình cá giống**

Tương quan di truyền giữa các tính trạng kháng bệnh quan sát của 130 gia đình cá giống được trình bày cụ thể ở Bảng 3.13. Tương quan di truyền ( $r_A$ ) giữa tính trạng kháng bệnh dạng sống/chết (SUR), thời gian sống (TIME) ở các cắt ngang ở tỉ lệ sống 50%, 25% và cuối thí nghiệm và giữa chúng với nhau là tương quan thuận và trong khoảng từ thấp đến cao (0,18 - 0,99) (Bảng 3.13). Tương quan giữa hai tính trạng ở cùng thời điểm cắt ngang gần như tuyệt đối (0,99 giữa SUR50 với TIME50; 0,94 giữa SUR25 với TIME25) và cao (0,55) giữa SUREND với TIMEEND. Trong các  $r_A$  giữa

SUR các cắt ngang (a), TIME các cắt ngang (b) và giữa SUR với TIME các cắt ngang (c) thì xu hướng  $r_A$  cao hơn ở (b) trong khoảng 0,87 - 0,90 và (c) trong khoảng 0,81 - 0,90 so với (a) 0,79 giữa SUR50 và SUR25. Tương quan  $r_A$  cao được công bố cho SUR (0,80 - 0,99) giữa các cắt ngang trong quá trình cảm nhiễm bệnh đốm trắng trên tôm thẻ chân trắng (Trình và ctv., 2019).

**Bảng 3.13.** Tương quan di truyền giữa tính trạng tỉ lệ sống và thời gian sống ở giai đoạn cá giống

Tính trạng	SUR50	TIME50	SUR25	TIME25	SUREND	TIMEEND
SUR50	–	– <sup>(1)</sup>	–	–	–	–
TIME50	0,99 ± 0,00	–	–	–	–	–
SUR25	0,79 ± 0,06	0,72 ± 0,06	–	–	–	–
TIME25	0,90 ± 0,03	0,87 ± 0,04	0,94 ± 0,02	–	–	–
SUREND	0,18 ± 0,12	0,22 ± 0,11	0,39 ± 0,10	0,33 ± 0,10	–	–
TIMEEND	0,86 ± 0,04	0,86 ± 0,03	0,81 ± 0,03	0,90 ± 0,03	0,55 ± 0,10	–

–<sup>1</sup>: không ước tính trong mô hình.

### 3.1.5.3. Tương quan di truyền giữa kháng bệnh giai đoạn cá giống với tính trạng tăng trưởng và tỉ lệ sống lúc thu hoạch

Nghiên cứu này ước tính mối tương quan di truyền ( $r_A$ ) thuận giữa HW và HL và gần tuyệt đối (0,99) và hai tính trạng này có thể xem như là một. Tương quan di truyền nghịch giữa HW và SURGROW ở mức  $-0,13 \pm 0,12$ , khác zero không có ý nghĩa thống kê. Vì vậy, chọn lọc nâng cao HW không ảnh hưởng đến tỉ lệ sống lúc thu hoạch. Kết quả này là thấp hơn so với thế hệ G0 ( $0,13 \pm 0,08$ ) (Nguyen và ctv., 2019b), thấp hơn cá tra chọn giống tăng trưởng thế hệ G2 ( $0,45 \pm 0,23$ ) và G1 ( $0,09 \pm 0,19$ ) (Pham và ctv., 2020b). Hệ số  $r_A$  giữa HW với HL và SURGROW ở quần thể cá tra khác chọn giống qua 3 thế hệ nâng cao tốc độ tăng trưởng tại Việt Nam tương



tự tương ứng là thuận cao (0,94) và thuận (0,27) được tìm thấy (Nguyen và ctv., 2019c).

Tương quan di truyền ( $r_A$ ) thuận và thấp tương ứng 0,16, 0,13 và 0,37 giữa HW với SUR50, SUR25 và SUREND được ước tính và chỉ có  $r_A$  giữa HW với SUREND khác zero có ý nghĩa thống kê (Bảng 3.14).

**Bảng 3.14.** Tương quan di truyền giữa tính trạng tăng trưởng và tỉ lệ sống lúc thu hoạch và tính trạng kháng bệnh gan thận mũ tại các cắt ngang trong quá trình cảm nhiễm

Tính trạng	SUR50	TIME50	SUR25	TIME25	SUREND	TIMEEND
HW	0,16	0,28	0,13	0,30	0,37	0,39
	±	±	±	±	±	±
	0,10	0,10	0,10	0,09	0,09	0,08
SURGW	0,36	0,39	0,32	0,37	0,10	0,37
	±	±	±	±	±	±
	0,15	0,15	0,15	0,15	0,17	0,15

Hệ số tương quan di truyền giữa HW và các SUR cao hơn trong nghiên cứu về khả năng kháng bệnh gan thận mũ do vi khuẩn *E. ictaluri* trên cá tra chọn giống tăng trưởng thế hệ G2-2003 và G3-2001 ở Việt Nam ( $r_A = 0,03$ ; Nguyen và ctv., 2019b; 0,16 - 0,19; Pham và ctv., 2020b) và thấp hơn trong nghiên cứu về kháng bệnh tụ huyết do vi khuẩn *A. hydrophila* trên cá tráp ( $r_A = 0,60$ ; Xiong và ctv., 2017). Trong khi đó,  $r_A$  thuận và trung bình tương ứng là 0,28, 0,30 và 0,39 giữa HW với TIME50, TIME25 và TIMEEND và tất cả các giá trị  $r_A$  này khác zero có ý nghĩa thống kê được ghi nhận. Hệ số tương quan di truyền giữa HW và các TIME cao hơn nghiên cứu về khả năng kháng bệnh xuất huyết do vi khuẩn *A. salmonicida* trên cá hồi chấm hồng ( $r_A = 0,15$ ; Perry và ctv., 2004). Ngoài ra,  $r_A$  thuận giữa SURGROW và SUR50,

SUR25, SUREND, TIME50, TIME25, TIMEEND và cũng có chung xu hướng như HW, dao động trong khoảng 0,10 - 0,39 được ghi nhận trong nghiên cứu này. Tất cả các giá trị  $r_A$  này khác zero có ý nghĩa thống kê, ngoại trừ giữa SURGROW với SUREND. Từ kết quả này cho thấy, nếu chọn lọc được áp dụng cho tính trạng kháng bệnh gan thận mũ, thì có khả năng mang lại hiệu quả một phần hoặc không ảnh hưởng đến tính trạng tăng trưởng hay tỉ lệ sống khi thu hoạch ở quần thể cá tra G1 này. Tương quan di truyền xung quanh zero và thuận giữa HW và kháng bệnh thông qua SUR cũng đã công bố trên quần thể cá tra chọn giống tăng trưởng G2 ở Việt Nam (0,16 - 0,19, Pham và ctv., 2020a) và khi xử lí chung G3 với cùng quần thể chọn giống kháng bệnh gan thận mũ trong nghiên cứu này nhưng thế hệ bố mẹ G0 (0,03, Nguyen và ctv., 2019b). Xu hướng này cũng tìm thấy giữa HW và tính trạng thời gian sống (TIME) theo ngày khi xử lí chung G3 với cùng quần thể chọn giống kháng bệnh gan thận mũ trong nghiên cứu này nhưng thế hệ bố mẹ G0 (0,13, Nguyen và ctv., 2019b).

Việc lựa chọn ngưỡng chết và tính trạng kháng bệnh phù hợp cho chọn lọc ở giai đoạn cá giống G1 dựa vào kết quả ước tính hệ số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mũ ở giai đoạn cá hương và cá giống và dựa vào tính trạng tăng trưởng và tỉ lệ sống lúc thu hoạch và tương quan di truyền giữa chúng.

***- Xác định tính trạng kháng bệnh cho chọn lọc ở giai đoạn cá giống:***

Trong thực tế, tính trạng sống/chết khi kết thúc mô hình gây bệnh thực nghiệm được sử dụng rộng rãi nhất hiện nay để đánh giá khả năng kháng hoặc nhạy cảm với mầm bệnh, đặc biệt là trong trường hợp bệnh do vi-rút hoặc vi khuẩn gây ra (Camp và ctv., 2000). Ngoài việc phân tích khả năng sống/chết nghiên cứu này cũng phân tích khả năng kháng bệnh thông qua chỉ tiêu thời gian cá sống tính từ ban đầu thí nghiệm cho đến khi chết trong toàn bộ quá trình cảm nhiễm. Kết quả cho thấy trên cá giống, thời gian sống là một tính trạng tốt cho chọn lọc do hệ số di truyền ước tính từ trung bình đến cao (0,24 - 0,38) và tương quan với tỉ lệ sống tại từng thời điểm cắt ngang cao (0,57 - 0,99). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Gitterle và ctv.

(2006), Ødegård và ctv. (2006), Nguyen và ctv. (2019b) cho thấy cùng với tính trạng nhị phân (sống/chết) thì thời gian sống của các cá thể trong quá trình cảm nhiễm có thể là một tiêu chí trong chọn giống cá kháng bệnh. Tuy nhiên, thời gian sống cho đến khi cá chết chỉ được biết cho những cá thể đã chết, đối với những cá thể còn sống thì không biết được (Ødegård và ctv., 2011a). Vì vậy, tính trạng sống/chết vẫn là tính trạng chính nhằm xử lý số liệu cho chọn lọc và tính trạng thời gian sống được dùng để kiểm chứng với kết quả tính trạng sống/chết.

Hệ số tương quan giữa phương sai di truyền của tính trạng tính trạng sống/chết (tỉ lệ sống) và thời gian sống tại “tầng cắt ngang” là trung bình đến cao ( $r_A = 0,55 - 0,99$ ). Trong đó, tương quan tại cắt ngang tỉ lệ sống toàn bộ 50% theo tính trạng thời gian sống và tỉ lệ sống thì tương quan phương sai di truyền đạt cao nhất ( $r_A = 0,99$ ). Ngoài ra, phương sai kiểu hình và phương sai di truyền cho tính trạng thời gian sống (TIME) có xu hướng giảm từ cắt ngang 50% sang 25% (7.404,37 giờ so với 6.191,78 giờ; 30.485,07 giờ so với 16.303,51 giờ). Kết quả cho thấy có thể sử dụng tính trạng TIME tại ngưỡng cắt ngang tỉ lệ sống 50% để kiểm chứng cho các kết quả chọn lọc dựa trên tính trạng tỉ lệ sống.

***- Xác định thời điểm xử lý số liệu sống/chết cho chọn lọc ở giai đoạn cá giống:***

Việc xác định thời điểm chính xác để ước tính các thông số di truyền mang lại nhiều ý nghĩa trong chọn lọc, việc này dựa trên các kết quả và luận giải sau: (i) tỉ lệ cá chết khi kết thúc thí nghiệm cao (SUREND) trong nghiên cứu này (99,70%) đã dẫn đến các phương sai di truyền tồn tại rất thấp (0,0003) khi phân tích các thông số di truyền ở điểm cuối của thí nghiệm cho tính trạng tỉ lệ sống. Hệ số di truyền tính trạng tỉ lệ sống cho thấy hiệu quả ở mức trung bình đến cao nếu chúng ta thực hiện chọn lọc cho tính trạng kháng bệnh gan thận mũ trên cá giống ở các cắt ngang tỉ lệ sống toàn bộ 50% (SUR50), 25% (SUR25) và thấp nếu thực hiện chọn lọc cho tính trạng kháng bệnh gan thận mũ trên cá giống khi kết thúc thí nghiệm cảm nhiễm; (ii) tại các cắt ngang tỉ lệ sống toàn bộ 25%, số gia đình cá còn sống là 113 gia đình, hệ

số biến thiên (92,86%) cao hơn giai đoạn cắt ngang tỉ lệ sống toàn bộ 50% (42,76%); (iii) SUREND có tương quan di truyền ( $r_A$ ) thấp với cùng SUR và TIME ở các cắt ngang khác, trong khoảng 0,18 - 0,39 và có 2 trong 4 giá trị  $r_G$  này khác zero không có ý nghĩa thống kê. Kết quả này cùng với hệ số di truyền thấp của SUREND (0,1304) cho thấy, ở tính trạng tỉ lệ sống cuối thí nghiệm mà có tỉ lệ chết cao như thí nghiệm của nghiên cứu này (99,70%) có thể làm cho biến dị di truyền và ước tính tương quan di truyền với các cắt ngang khác thấp; (iv) tương quan di truyền giữa thời gian sống và tỉ lệ sống tại ngưỡng cắt ngang tỉ lệ sống 50% và 25% cao (0,99 và 0,94); (v) Gjøsøn và ctv. (1997) nghiên cứu bệnh trên cá hồi và Ødegård và ctv. (2011) nghiên cứu các mô hình toán xử lý số liệu kháng bệnh thảo luận rằng tính trạng kháng bệnh cần được xem xét ở tỉ lệ sống xung quanh 50%, do nếu đạt tỉ lệ sống thấp hơn thì một số gia đình không còn cá thể sống dẫn đến làm sai lệch kết quả chọn lọc. Trong nghiên cứu trên các thí nghiệm cảm nhiễm trên các quần thể cá tra chọn giống tăng trưởng G2, nhóm tác giả Phạm và ctv. (2020b, c) thảo luận rằng thí nghiệm cảm nhiễm nên kết thúc ở tỉ lệ sống xung quanh 50% vì khi đó có phương sai kiểu hình và hệ số di truyền cao hơn, có thể phản ánh đúng tính trạng kháng bệnh gan thận mũ hơn. Ngoài ra, Phạm và ctv. (2020b, c) cũng thảo luận rằng mô hình toán với tính trạng thời gian sống đến 50% có thể phản ánh tốt sự miễn cảm của cá tra với mầm bệnh *E. ictaluri* gây bệnh gan thận mũ; (vi) chọn lọc tính trạng kháng bệnh ở cá giống không làm giảm khả năng kháng bệnh ở cá hương (tương quan di truyền giữa các SUR và TIME tại các cắt ngang khác nhau thấp xung quanh zero từ  $-0,18 \div 0,26$ ).

Qua các luận giải (i, ii, iii, iv, v, vi), tỉ lệ chết trong thí nghiệm cao (99,70%) như hiện tại, chúng ta có thể xem xét chọn các tính trạng sống chết tại cắt ngang tỉ lệ sống toàn bộ cá thí nghiệm 50% và 25% (SUR50 hoặc SUR25) để xử lý số liệu nhằm ước tính giá trị chọn giống ước tính (EBV) phục vụ cho chọn lọc và dựa trên tính trạng thời gian sống tại cắt ngang tỉ lệ sống 50% (TIME50) để kiểm chứng kết quả chọn lọc. Ngoài ra, nếu chọn lọc được áp dụng cho tính trạng kháng bệnh gan thận

mủ theo SUR50 hoặc SUR25 thì không ảnh hưởng đến khả năng tăng trưởng của cá sau khi thu hoạch do tương quan thuận nhưng thấp ( $r_A = 0,13 - 0,16$ ) (tức nếu chọn lọc tính trạng kháng bệnh gan thận mủ theo SUR50 hoặc SUR25 thì có thể mang lại hiệu quả cho tính trạng tăng trưởng nhưng không cao) và có khả năng mang lại hiệu quả một phần tỉ lệ sống sau nuôi tăng trưởng do tương quan thuận có ý nghĩa thống kê so với zero ( $r_A = 0,32 - 0,36$ ) ở quần thể cá tra G1 này.

### 3.1.6. Hiệu quả chọn lọc ước tính trên tính trạng kháng bệnh gan thận mủ giai đoạn cá giống trên quần thể G1

Nhằm đảm bảo đủ số lượng cá bố mẹ cho nuôi vỗ để sản xuất các gia đình cho chọn giống thế hệ thứ hai (G2) (khoảng 420 cá bố mẹ tương đương với số cá thể bố mẹ G0 cho nuôi vỗ) và để hiệu quả chọn lọc tăng không quá 10%/thế hệ chọn lọc nhằm giảm thiểu tích lũy cận huyết nên nghiên cứu áp dụng tỉ lệ chọn lọc trong nghiên cứu này là 8% (tương đương chọn lọc 419 con/5.192 cá thể G1) thì hiệu quả chọn lọc ước tính cho thế hệ G1 cho tính trạng SUR50 (R-SUR50) và tính trạng SUR25 (R-SUR25) là 8,34 - 15,13% tùy thuộc vào tính trạng chọn lọc (Bảng 3.15), có nghĩa là thế hệ G2 được ước tính là sẽ có khả năng kháng bệnh cao hơn G1 từ 8,34 - 15,13% ở ngưỡng chết 50% và 25% (theo tính trạng sống/chết).

**Bảng 3.15.** Hiệu quả chọn lọc ước tính cho tính trạng kháng bệnh gan thận mủ giai đoạn cá giống trên quần thể G1

Hiệu quả chọn lọc ước tính (R)	Tỉ lệ chọn lọc (%)	Cường độ chọn lọc (i)	Hệ số di truyền ước tính ( $h^2$ )	Độ lệch chuẩn (%)	R (%)
R-SUR50	8,0	1,858	0,22	20,41	8,34
R-SUR25	8,0	1,858	0,37	22,01	15,13

Kết quả hiệu quả chọn lọc ước tính trên quần thể cá G1 (8,34 - 15,13%) cao hơn so với hiệu quả chọn lọc ước tính trên quần thể cá bố mẹ G0 (8,3%, Trịnh Quốc Trọng, 2016b). Đồng thời, R-SUR50 gần tương đương và R-SUR25 cao hơn so với kết quả

chọn lọc ước tính trên cá hồi vân kháng vi khuẩn *Vibrio salmonicida* (19%, Leeds và ctv., 2010). Kết quả ước tính này cho thấy việc chọn giống kháng bệnh gan thận mũ có tiềm năng mang lại hiệu quả trung bình đến cao trong các thế hệ chọn giống tiếp theo.

### 3.1.7. Đề xuất định hướng chọn lọc thế hệ G1

Nghiên cứu đề xuất có thể xem xét chọn các tính trạng sống chết tại cắt ngang tỉ lệ sống toàn bộ cá thí nghiệm 50% và 25% (SUR50 hoặc SUR25) để xử lí số liệu nhằm ước tính giá trị chọn giống ước tính (EBV) phục vụ cho chọn lọc. Hiệu quả chọn lọc ước tính cho thế hệ G1 cho tính trạng SUR50 (R-SUR50) và tính trạng SUR25 (R-SUR25) từ 8,34 - 15,13% tùy thuộc vào tính trạng tính trạng kháng bệnh gan thận mũ chọn lọc trên cá giống.

*Đánh giá về khả năng ứng dụng các kết quả của nghiên cứu vào chọn giống cá tra kháng bệnh gan thận mũ các thế hệ tiếp theo*

Nghiên cứu đã ứng dụng di truyền số lượng nhằm định hướng chọn lọc cá giống bố mẹ thế hệ thứ nhất (G1) và các thế hệ chọn giống kháng bệnh tiếp theo. Nghiên cứu đề xuất có thể xem xét chọn các tính trạng sống chết tại cắt ngang tỉ lệ sống toàn bộ cá thí nghiệm 50% và 25% (SUR50 hoặc SUR25) để xử lí số liệu nhằm ước tính giá trị chọn giống ước tính (EBV) phục vụ cho chọn lọc để mang lại hiệu quả chọn lọc từ 8,34 - 15,13%. Trong tương lai, các chương trình chọn giống cần tiếp tục chọn lọc qua nhiều thế hệ để mang lại hiệu quả chọn lọc tính trạng kháng bệnh gan thận mũ và một phần các tính trạng tăng trưởng và tỉ lệ sống lúc thu hoạch. Tuy nhiên, cần khắc phục một số hạn chế trong nghiên cứu hiện tại khi áp dụng: (1) ảnh hưởng của môi trường ương riêng rẽ các gia đình trước khi đánh dấu ( $c^2$ ) vẫn còn tồn tại và phần nào ảnh hưởng đến độ chính xác khi ước tính các thông số di truyền tính trạng kháng bệnh ở giai đoạn cá giống ( $c^2 = 0,0196 - 0,0395$ ) và tăng trưởng khi thu hoạch ( $c^2 = 0,018 - 0,23$ ), từ đó ảnh hưởng đến độ chính xác của chọn lọc. Theo Gjedrem (2005) thì giá trị ảnh hưởng  $c^2$  có thể giảm trong các chương trình chọn giống tiếp theo thông qua việc: a) rút ngắn thời gian sinh sản gia đình và thời gian ương đến kích cỡ đánh

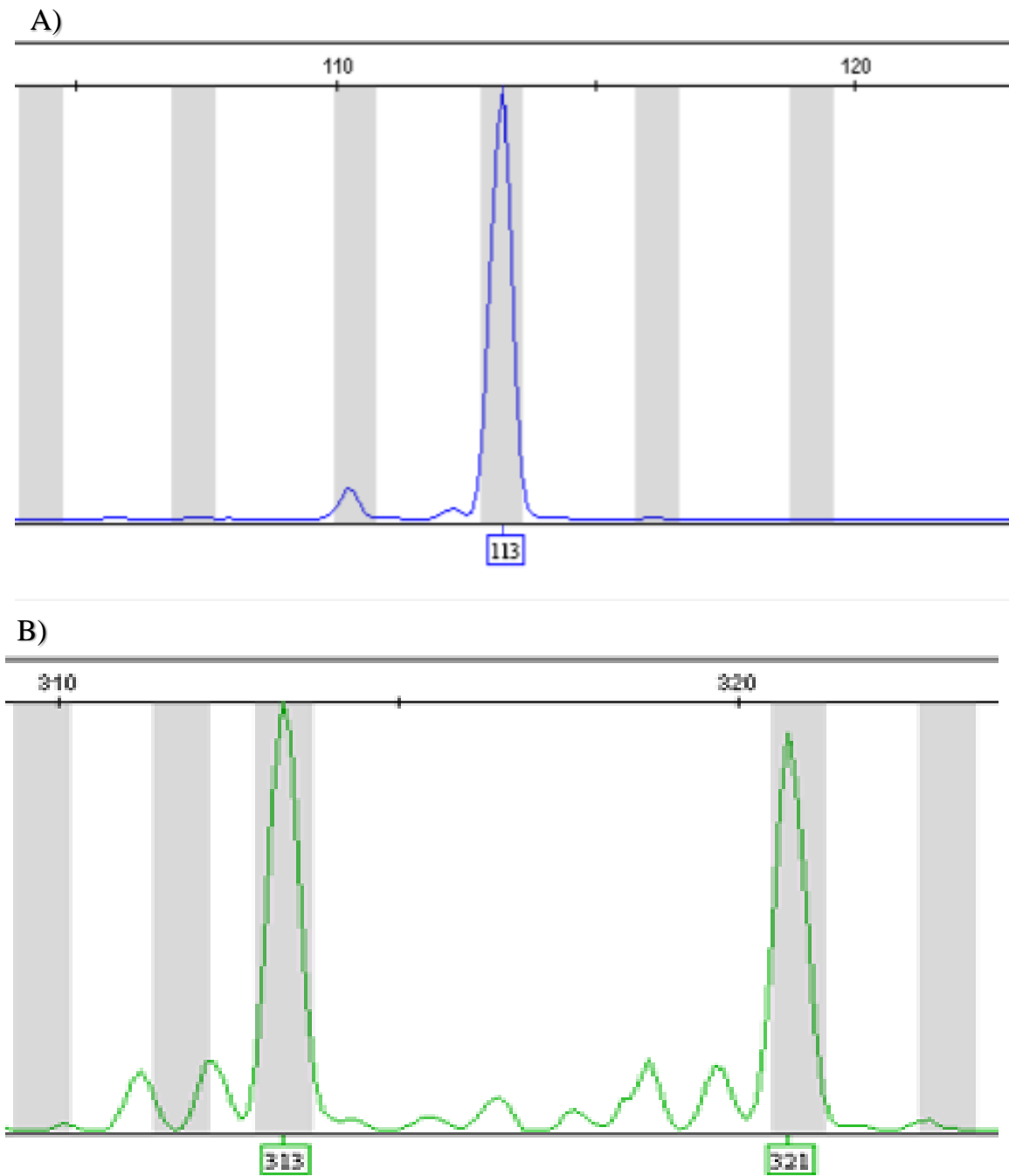
dấu, b) ứng dụng truy xuất phả hệ bằng chỉ thị phân tử thay thế đánh dấu vật lí như dấu PIT và thả cá vào ương nuôi đánh giá tính trạng khi cá còn nhỏ. Vì vậy, để làm giảm ảnh hưởng của môi trường ương riêng rẽ các gia đình trước khi đánh dấu ở thế hệ chọn giống tiếp theo thì cần rút ngắn thời gian sinh sản gia đình và thời gian ương đến kích cỡ đánh dấu và ứng dụng truy xuất phả hệ bằng chỉ thị phân tử; (2) cần nâng cao số lượng gia đình (>33 gia đình) và gia đình có nhóm half-sib tại giai đoạn cá hương trong những nghiên cứu tiếp theo để có thể tách được  $c^2$  nhằm ước tính hệ số di truyền và tương quan di truyền giữa các tính trạng kháng bệnh tại hai giai đoạn cá hương và cá giống chính xác hơn, từ đó có định hướng tiếp theo cho chọn lọc khả năng kháng bệnh cho hai giai đoạn.

### **3.2. Kết quả ứng dụng di truyền phân tử nghiên cứu các giải pháp kĩ thuật hỗ trợ nâng cao hiệu quả của chọn giống cá tra kháng bệnh trong tương lai**

#### **3.2.1. Kết quả ứng dụng di truyền phân tử nghiên cứu bộ chỉ thị phân tử microsatellite truy xuất phả hệ các gia đình cá tra phục vụ chọn giống**

##### **3.2.1.1. Kết quả sàng lọc các microsatellite ổn định, đa hình và phù hợp cho thử nghiệm truy xuất phả hệ**

Các microsatellite có sản phẩm được khuếch đại đặc hiệu phù hợp cho truy xuất phả hệ (Hình 3.9) và tỉ lệ khuếch đại alen của phản ứng multiplex PCR cao từ 98 - 100% (Bảng 3.16). Truy xuất phả hệ yêu cầu các chỉ thị phân tử phải có độ đa hình cao (Jones và ctv., 2010). Tổng số alen của từng chỉ thị trên nhóm mẫu cá tra (50 cá bố mẹ và 50 cá con) từ 5 - 14 alen, trong đó thấp nhất là chỉ thị Pahy-06, Pahy-10, Pahy-18 khuếch đại được 5 alen trên quần thể G1, cao nhất là chỉ thị Pahy-02, Pahy-04 khuếch đại được 14 alen trên quần thể G0 (Bảng 3.16 và Phụ lục 22; Phụ lục 23), tương đồng với các công bố trên cá da trơn *Pangasius* (7 - 10 alen, Volckaert và ctv., 1999) và trên cá tra (1 - 9 alen, Bùi Thị Liên Hà và ctv., 2017; 4 - 7 alen, Thanh và ctv., 2019) (Bảng 3.16).



**Hình 3.9.** Một số alen đặc hiệu được khuếch đại trong phản ứng Multiplex PCR.  
*Alen 113 của Pahy 01 (A) và Alen 313, 321 của Pahy-15 (B)*



**Bảng 3.16.** Thông tin đa dạng di truyền chung của 10 microsatellite trên quần thể bố mẹ G0 và đàn con G1 trong nghiên cứu

Quần thể	Microsatellite										Trung bình
	<i>Pahy-01</i>	<i>Pahy-02</i>	<i>Pahy-03</i>	<i>Pahy-04</i>	<i>Pahy-06</i>	<i>Pahy-10</i>	<i>Pahy-13</i>	<i>Pahy-15</i>	<i>Pahy-17</i>	<i>Pahy-18</i>	
<i>Nhóm mẫu bố mẹ G0 (n=50)</i>											
Hiệu suất PCR tổng (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Số lượng alen (N <sub>A</sub> )	6	14	11	14	7	7	8	13	8	9	9,70
Dị hợp tử quan sát (H <sub>0</sub> )	0,68	0,68	0,74	0,72	0,70	0,66	0,74	0,70	0,92	0,72	0,73
Dị hợp tử mong đợi (H <sub>E</sub> )	0,74	0,83	0,81	0,83	0,72	0,62	0,73	0,69	0,83	0,75	0,76
Thông tin đa hình (PIC)	0,69	0,80	0,78	0,80	0,67	0,57	0,68	0,64	0,79	0,70	0,71
Cân bằng di truyền											
Hardy-Weinberg (HWE)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	ND	NS	ND

Quần thể	Microsatellite										Trung bình
	<i>Pahy-01</i>	<i>Pahy-02</i>	<i>Pahy-03</i>	<i>Pahy-04</i>	<i>Pahy-06</i>	<i>Pahy-10</i>	<i>Pahy-13</i>	<i>Pahy-15</i>	<i>Pahy-17</i>	<i>Pahy-18</i>	
Tần số Null-alen	0,04	0,09	0,04	0,06	0,02	-0,03	-0,03	-0,02	-0,06	0,02	0,01
<i>Nhóm mẫu cá con G1 (n=50)</i>											
Hiệu suất PCR (%)	100	100	98,00	100	100	100	100	100	100	98,00	99,60
N <sub>A</sub>	6	10	8	10	5	5	7	7	8	5	7,10
H <sub>0</sub>	0,68	0,78	0,57	0,70	0,80	0,70	0,80	0,66	0,90	0,74	0,73
H <sub>E</sub>	0,69	0,75	0,76	0,83	0,65	0,62	0,70	0,60	0,83	0,71	0,71
PIC	0,63	0,72	0,72	0,80	0,58	0,55	0,66	0,55	0,79	0,65	0,67
HWE	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	ND	NS	ND
Tần số Null-alen	0,00	-0,03	0,15	0,08	-0,13	-0,06	-0,08	-0,08	-0,05	-0,02	-0,02

*NS: cân bằng di truyền Hardy-Weinberg với mức ý nghĩa ( $p < 0,01$ ) sau khi kiểm định Bonferroni;*

*ND: không tính được cân bằng Hardy-Weinberg*

Các microsatellite khảo sát trên quần thể G0 và G1 đều tuân theo quy luật Hardy-Weinberg ngoại trừ Pchy-17. Trong nghiên cứu này, chỉ số thông tin đa hình (PIC) trung bình của các microsatellite trên G0 và G1 lần lượt là 0,71 và 0,67, tỉ lệ dị hợp tử quan sát trung bình ( $H_o$ ) và tỉ lệ dị hợp tử mong đợi trung bình ( $H_E$ ) trên tất cả các microsatellite lần lượt là 0,73, 0,76 và 0,73, 0,71. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu về mức độ đa hình của chỉ thị microsatellite trên cá tra và các loài cá da trơn *Pangasius* (Hogan và May, 2002; Bùi Thị Liên Hà và ctv., 2017; Thanh và ctv., 2019). Như vậy, 10 chỉ thị microsatellite trong nghiên cứu này đều đa hình, đáp ứng được các yêu cầu để được sử dụng trong truy xuất phả hệ.

Qua kết quả sàng lọc các microsatellite trên quần thể cá tra G0 và G1 cho thấy, các microsatellite đều có tính ổn định, đa hình và phù hợp cho thử nghiệm truy xuất phả hệ. Ngoài ra, khi đánh giá đa dạng di truyền trên hai quần thể G0 và G1 cũng cho thấy, các chỉ thị microsatellite có tồn tại null-alen với tần số từ  $-0,13 \div 0,15$ . Tần số null-alen của các microsatellite trong nghiên cứu thấp, phù hợp với các nghiên cứu truy xuất phả hệ với xác suất xuất hiện null-alen thường nhỏ hơn 0,2 không làm ảnh hưởng nhiều đến khả năng truy xuất (Dakin và Avise, 2004). Tuy nhiên, việc sử dụng chỉ thị trong truy xuất phả hệ cần kiểm tra tỉ lệ lỗi ghi nhận alen, null-alen và tỉ lệ mismatch trong truy xuất, tránh làm giảm kết quả truy xuất.

### **3.2.1.2. Kết quả thử nghiệm truy xuất phả hệ trên 50 gia đình gồm 90 cá bố mẹ G0 và 500 cá con G1**

#### *Kết quả truy xuất phả hệ trên 50 gia đình với 10 microsaellite*

Truy xuất với 10 microsatellite cho kết quả phân tích số cá con được truy xuất đúng bố, mẹ, cả bố và mẹ lần lượt là 94,8%, 85,5% và 83,0% (Bảng 3.17 và Phụ lục 24). Trong đó, truy xuất gia đình con bố không có half-sib (I) đúng bố, mẹ, cả bố và mẹ lần lượt là 95,5%, 89,0% và 88,0%; gia đình con bố có half-sib (II) đúng bố, mẹ, cả bố và mẹ lần lượt là 91,5%, 73,5% và 69,5% (Bảng 3.17).

**Bảng 3.17.** Kết quả xác định phả hệ 50 gia đình cá tra chọn giống bằng 10 microsatellite

Các chỉ tiêu phân tích	Truy xuất trên 50 gia đình	
Số cá con được truy xuất bố mẹ (con)	500	
Tỉ lệ cá con truy xuất được bố và mẹ ( $P_a$ , %)	91,0	
Tỉ lệ cá con không truy xuất được bố và mẹ (%)	9,0	
Tỉ lệ cá con truy xuất đúng bố ( $P_f$ , %)	94,8	
Tỉ lệ cá con truy xuất đúng mẹ ( $P_m$ , %)	85,0	
Tỉ lệ cá con được truy xuất đúng cả bố và mẹ ( $P_b$ , %)	83,0	
	<i>Truy xuất trên hai nhóm gia đình theo bố</i>	
<i>Các chỉ tiêu phân tích</i>	<i>Gia đình I</i>	<i>Gia đình II</i>
Số cá con được truy xuất bố mẹ	300	200
Tỉ lệ cá con truy xuất đúng bố ( $P_f$ , %)	95,5	91,5
Tỉ lệ cá con truy xuất đúng mẹ ( $P_m$ , %)	89,0	73,5
Tỉ lệ cá con được truy xuất đúng cả bố và mẹ ( $P_b$ , %)	88,0	69,5

*I: gia đình con bố không có half-sib (n= 30); II: gia đình con bố có half-sib (n= 20).*

Kết quả truy xuất với 10 microsatellite cho thấy: (1) khả năng truy xuất đúng cả bố và mẹ (83,0%) thấp hơn so với một số nghiên cứu đã được báo cáo trên cá tra (90,7%, Thanh và ctv., 2019), cá hồi vân (93%, Fishback, 1999), bào ngư (>90%, Lafarga-de la Cruz và ctv., 2015) và cao hơn nghiên cứu truy xuất trên cá tra (81,3%, Bùi Thị Liên Hà và ctv., 2017); (2) Khả năng truy xuất phả hệ cũng phụ thuộc vào cấu trúc các gia đình khi truy xuất (Jones và ctv., 2010). Tỉ lệ truy xuất được cá con của gia đình không và có half-sib (I và II) gần tương đương nhau (98,0% và 97,0%). Tuy nhiên, việc truy xuất đúng bố, mẹ, cả bố và mẹ của các gia đình I (95,5%, 89,0% và 88,0%) cao hơn trong gia đình II (91,5%, 73,5% và 69,5%). Nguyên nhân có thể

là do các cá con thuộc các gia đình II có chung con bố nên có thể có các alen giống nhau từ bố dẫn đến khó truy xuất bố mẹ hơn các gia đình I. Với các chương trình chọn giống, phương pháp phối thứ bậc được áp dụng chủ yếu hiện nay (Gjedrem, 2005). Vì vậy, việc truy xuất được cá thể giữa gia đình II đóng vai trò quan trọng hơn gia đình I. Bộ chỉ thị lại có khả năng truy xuất tốt các gia đình I nhưng khả năng truy xuất yếu các gia đình II (i). Trong phân tích truy xuất phả hệ với 10 microsatellite này, khả năng truy xuất được đúng bố (94,8%) cao hơn truy xuất đúng mẹ (85,0%), chủ yếu không truy xuất được mẹ từ gia đình II (73,5%) (ii). Những hạn chế (i, ii) còn tồn tại trong việc truy xuất phả hệ với 10 microsatellite này.

Khả năng truy xuất đúng cả bố và mẹ trong các gia đình chọn giống với 10 microsatellite chưa cao (83,0%) có thể do sự tồn tại của lỗi ghi nhận kiểu gen và đột biến dẫn đến sự không tương thích giữa alen bố mẹ và cá thể con (Jones và ctv., 2010). Các sai số ước tính trong quá trình truy xuất với 10 microsatellite được trình bày tại Bảng 3.18. Trong nghiên cứu này, các microsatellite có sự tồn tại null-alen trên hai quần thể G0 và G1 với tần số -0,029 đến 0,065 (Phụ lục 25) cũng có thể ảnh hưởng đến kết quả truy xuất theo khuyến cáo của Dakin và Avise (2004). Đồng thời, lỗi ghi nhận kiểu gen của các chỉ thị cũng tồn tại với tần số thấp từ 0,000 đến 0,008. Mặc dù lỗi ghi nhận kiểu gen có thể cho phép nhỏ hơn 0,01 tuy nhiên vẫn ảnh hưởng đến kết quả truy xuất (Trinh và ctv., 2013b). Vì vậy, khi truy xuất phả hệ cần xử lý các vấn đề này để có kết quả truy xuất chính xác nhất (Marshall và ctv., 1998). Một trong những phương án khắc phục hạn chế này là loại bỏ các microsatellite có tần số null-alen và lỗi ghi nhận alen cao là giải pháp để nâng cao hiệu suất truy xuất phả hệ (Thanh và ctv., 2019). Chỉ thị Pahy-02 ngoài xuất hiện tần số null alen cao (0,065) thì lỗi ghi nhận kiểu gen cũng cao (0,007) dẫn đến tỉ lệ mismatch cao (0,134) (Bảng 3.18). Vì vậy, nghiên cứu đã xử lý truy xuất tiếp theo với 9 microsatellite mà không bao gồm Pahy-02.

**Bảng 3.18.** Các sai số ước tính trong quá trình truy xuất

Quần thể (n=590)	Chỉ thị microsatellite									
	Pahy-01	Pahy-02	Pahy-03	Pahy-04	Pahy-06	Pahy-10	Pahy-13	Pahy-15	Pahy-17	Pahy-18
Null alen*	0,005	0,065*	0,031	0,019	-0,029	-0,019	-0,027	-0,007	-0,017	0,002
Lỗi ghi nhận	0,000	0,007	0,000	0,001	0,003	0,000	0,008	0,001	0,002	0,000
Tần suất**	0,004	0,134	0,008	0,043	0,000	0,004	0,097	0,012	0,018	0,000

\*: Tần số null-alen cao có ý nghĩa thống kê sau khi hiệu chỉnh ( $p < 0,05$ );

\*\* : Tần suất mismatch khi truy xuất.

*Kết quả truy xuất phả hệ trên 50 gia đình với 9 microsaellite*

Kết quả truy xuất với bộ chỉ thị còn lại 9 microsatellite cho kết quả truy xuất đúng cả bố và mẹ cao hơn (93,4%) so với 10 microsatellite (83,0%) (Phụ lục 26). Kết quả phân tích cho thấy số cá con được truy xuất đúng bố, mẹ, cả bố và mẹ tăng lên so với truy xuất bằng 10 microsatellite lần lượt là 96,0%, 94,2% và 93,4% (Bảng 3.19).

**Bảng 3.19.** Kết quả xác định phả hệ 50 gia đình cá tra chọn giống bằng 9 microsatellite

Các chỉ tiêu phân tích	Truy xuất trên 50 gia đình	
Số cá con được truy xuất bố mẹ (con)	500	
Tỉ lệ cá con truy xuất được ( $P_a$ , %)	94,8	
Tỉ lệ cá con không truy xuất được (%)	5,2	
Tỉ lệ cá con truy xuất đúng bố ( $P_f$ , %)	96,0	
Tỉ lệ cá con truy xuất đúng mẹ ( $P_m$ , %)	94,2	
Tỉ lệ cá con được truy xuất đúng cả bố và mẹ ( $P_b$ , %)	93,4	
	<i>Truy xuất trên hai nhóm gia đình theo bố</i>	
	<i>Gia đình I</i>	<i>Gia đình II</i>
Số cá con được truy xuất bố mẹ	300	200
Tỉ lệ cá con truy xuất đúng bố ( $P_f$ , %)	96,3	95,5
Tỉ lệ cá con truy xuất đúng mẹ ( $P_m$ , %)	94,0	94,5
Tỉ lệ cá con được truy xuất đúng cả bố và mẹ ( $P_b$ , %)	93,0	94,0

*I: gia đình con bố không có half-sib (n= 30); II: gia đình con bố có half-sib (n= 20).*

Kết quả này cho thấy việc loại bỏ microsatellite có null-alen và lỗi ghi nhận cao có thể nâng cao năng lực truy xuất bố và mẹ đúng lên 10,4%. Kết quả truy xuất với

9 microsatellite tương đương so với một số nghiên cứu đã được báo cáo trên cá hồi vân (93 - 95%, Fishback, 1999), cá tra (94%, Nguyễn Hữu Ninh và Lưu Thị Hà Giang, 2012) và cao hơn nghiên cứu truy xuất trên cá tra quần thể khác (81,3 - 90,7%, Bùi Thị Liên Hà và ctv., 2017; Thanh và ctv., 2019). Việc truy xuất đúng bố, mẹ, cả bố và mẹ của gia đình con bố không half-sib (I) lần lượt là 96,3%, 94,0% và 93,0% không chênh lệch nhiều so với truy xuất gia đình con bố có half-sib (II) (95,5%, 94,5% và 94,0%). Với kết quả truy xuất đúng bố, mẹ, cả bố và mẹ của các gia đình I và II cao (93% và 94%) thì bộ chỉ thị phân tử với 9 microsatellite hoàn toàn phù hợp áp dụng vào thực tiễn cho việc truy xuất phả hệ trên quần thể chọn giống tiếp theo. Bộ chỉ thị gồm 9 microsatellite khi truy xuất mô phỏng có thể đạt được tỉ lệ truy xuất cao là 100% (Bảng 3.20).

**Bảng 3.20.** Khả năng truy xuất phả hệ mô phỏng của bộ chỉ thị gồm các microsatellite

Microsatellite	Hệ số PIC*	Mô phỏng (%)
Pahy-04	0,854	0,0
Pahy-04-17	0,816	1,0
Pahy-04-17-03	0,792	13,0
Pahy-04-17-03-18	0,726	35,0
Pahy-04-17-03-18-01	0,698	56,0
Pahy04-17-03-18-01-13	0,696	78,0
Pahy-04-17-03-18-01-13-15	0,678	93,0
Pahy-04-17-03-18-01-13-15-6	0,671	100,0
Pahy-04-17-03-18-01-13-15-6-10	0,627	100,0

\*: Hệ số của microsatellite thêm vào phân tích; Mô phỏng khả năng truy xuất.

Trong các chương trình chọn giống thủy sản, truy xuất phả hệ 92,8% đã được ứng dụng cho chương trình chọn giống cá chép để ước tính hệ số di truyền (Prchal và ctv., 2021). Đồng thời, khi nghiên cứu truy xuất phả hệ trên hàu Thái Bình Dương



cho thấy, khi tăng số lượng các microsatellite thì khả năng truy xuất cũng tăng và khi mô phỏng với số lượng cá thể nhiều hơn so với thực tế nghiên cứu thì khả năng truy xuất cũng tăng (Li và ctv., 2009). Ngoài ra, bộ chỉ thị gồm 9 microsatellite trong nghiên cứu này cho kết quả khả năng truy xuất mô phỏng đạt được tỉ lệ cao (100%). Kết quả này cho thấy tiềm năng ứng dụng truy xuất phả hệ bằng chỉ thị microsatellite nhằm thay thế phương pháp đánh dấu từ PIT trong các chương trình chọn giống cá tra kháng bệnh trong các thế hệ tiếp theo là khả thi.

### **3.2.1.3. Đánh giá về khả năng ứng dụng giải pháp kĩ thuật đánh dấu bằng chỉ thị phân tử vào chọn giống cá tra kháng bệnh gan thận mũ các thế hệ tiếp theo**

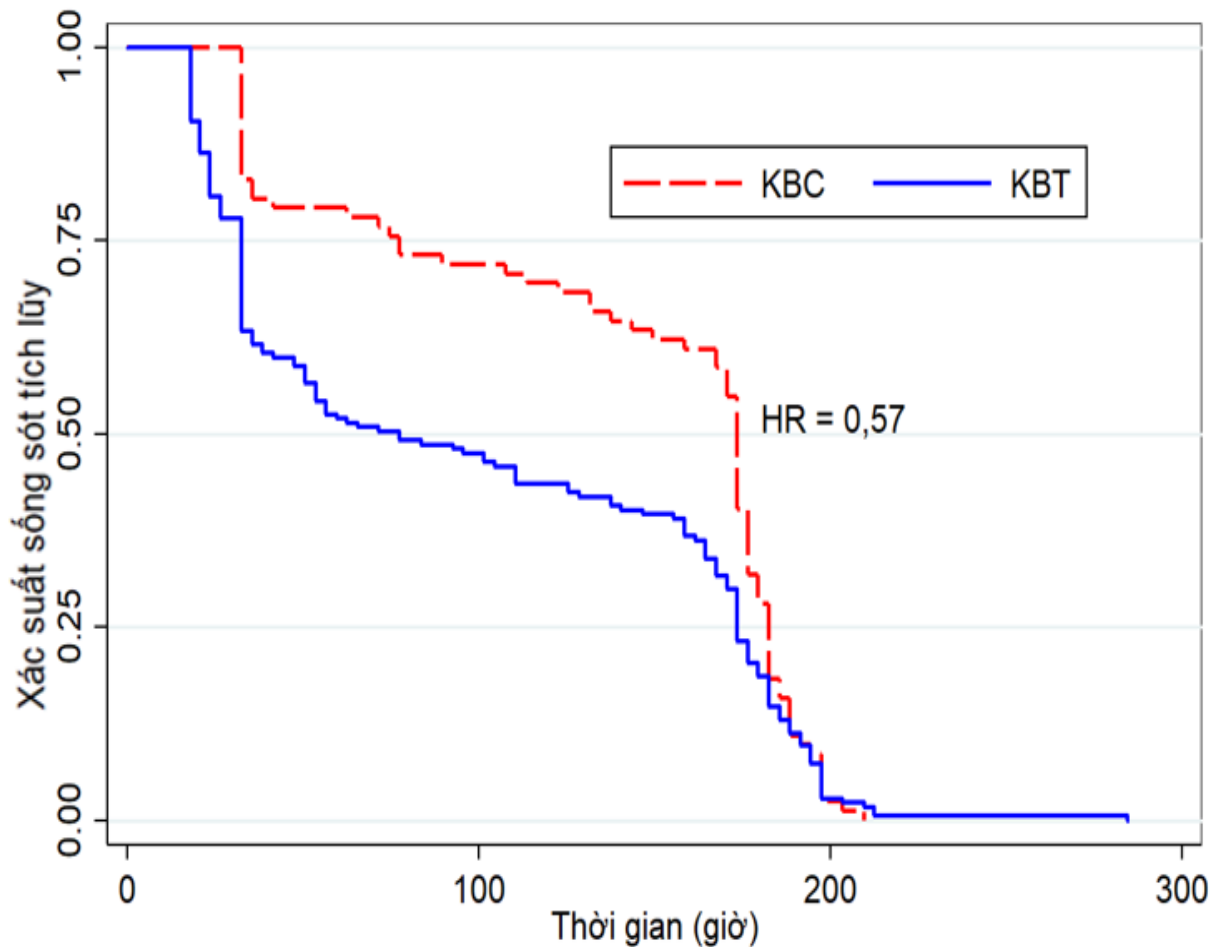
Nghiên cứu này đã sàng lọc được một bộ chỉ thị gồm 9 microsatellite và thử nghiệm truy xuất phả hệ đàn cá tra chọn giống với tỉ lệ truy xuất đúng cả bố và mẹ trong tất cả các gia đình cao, đặc biệt trên gia đình con bố có half-sib. Các chỉ thị phân tử trong nghiên cứu ổn định và có tính đa hình cao phù hợp với nghiên cứu truy xuất phả hệ trên cá tra. Kết quả này cho thấy tiềm năng ứng dụng truy xuất phả hệ bằng chỉ thị microsatellite nhằm thay thế phương pháp đánh dấu từ PIT trong chọn giống là khả thi, đặc biệt nếu tiếp tục sàng lọc và phát triển bổ sung thêm một số chỉ thị mới vào bộ chỉ thị hiện có thì sẽ tăng khả năng truy xuất từ đó có thể ứng dụng tốt hơn trong thực tiễn chọn giống.

### **3.2.2. Kết quả đánh giá và đề xuất chỉ tiêu miễn dịch tiềm năng là tính trạng kháng bệnh gan thận mũ phục vụ chọn giống trong tương lai**

#### **3.2.2.1. Kết quả lựa chọn hai nhóm gia đình kháng bệnh cao và thấp dựa vào giá trị EBV giai đoạn cá giống**

Qua thí nghiệm cảm nhiễm, dựa vào giá trị chọn giống ước tính (EBV) của 130 gia đình cá giống tại giai đoạn cắt ngang tỉ lệ cá sống 50% trong quá trình cảm nhiễm để xác định những gia đình kháng bệnh cao hay thấp. Nghiên cứu đã chọn được 3 gia đình kháng bệnh cao (giá trị EBV là 0,07; 0,05 và 0,06) và 3 gia đình kháng bệnh thấp (giá trị EBV là -0,05; 0,03; -0,03) (Phụ lục 27). Đường biểu diễn

Kalper-Meier xác suất sống sót tích lũy của hai nhóm gia đình cá tra kháng bệnh cao và thấp trong thí nghiệm cảm nhiễm xác định nhóm kháng bệnh được thể hiện qua Hình 3.10.



**Hình 3.10.** Đường biểu diễn Kalper-Meier xác suất sống sót tích lũy của hai nhóm gia đình cá tra kháng bệnh cao (KBC) và thấp (KBT).

Qua quá trình cảm nhiễm bệnh trên 6 gia đình này cho thấy, trung bình thời gian sống trong quá trình cảm nhiễm của nhóm kháng bệnh cao và thấp tương ứng là 153,47 giờ và 99,95 giờ. Sự khác biệt về thời gian sống hai nhóm kháng bệnh có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,01$ ). Tỷ lệ sống tích lũy đến khi kết thúc thí nghiệm của hai nhóm gia đình kháng bệnh cao và thấp đều là 0% (Phụ lục 28), tuy nhiên, đường biểu diễn Kaplan-Meier cho thấy xác suất sống sót tích lũy của các gia đình kháng bệnh thấp

bằng 0,57 của các gia đình kháng bệnh cao (Hình 3.10). Xác suất sống sót tích lũy của nhóm kháng bệnh cao thấp hơn nhóm kháng bệnh thấp là khoảng 43% (Hazard ratio = 0,57,  $p = 0,019$ ). Kiểm định Logrank cho thấy sự khác biệt xác suất sống sót tích lũy giữa hai nhóm cá kháng bệnh có ý nghĩa thống kê (giá trị  $p = 0,013$ ). Sự khác biệt xác suất sống sót tích lũy của hai nhóm kháng bệnh cao và thấp chủ yếu thể hiện trong giai đoạn 24 - 200 giờ sau cảm nhiễm (hpi) (Hình 3.10). Sáu gia đình kháng bệnh cao và thấp tiếp tục được gây cảm nhiễm nhằm đánh giá khả năng đáp ứng miễn dịch và xác định các chỉ thị miễn dịch giúp phân biệt được khả năng kháng bệnh của các cá thể phục vụ chọn giống.

### **3.2.2.2. Đánh giá các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu và đáp ứng miễn dịch đặc hiệu của hai nhóm gia đình kháng bệnh cao và thấp**

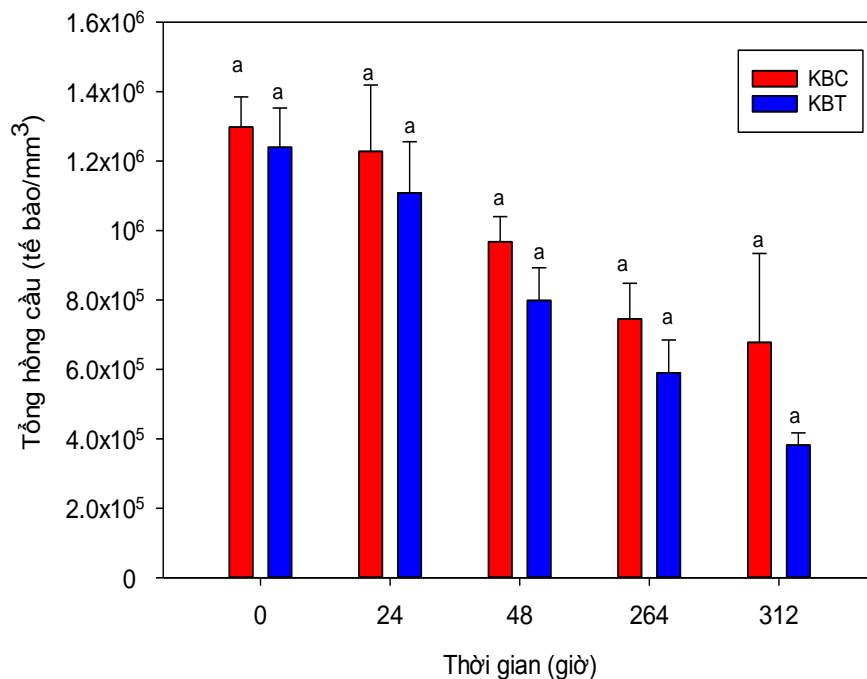
#### *Kết quả thí nghiệm thăm dò thu máu phân tích chỉ tiêu miễn dịch*

Thí nghiệm thăm dò nhằm xác định thời điểm thu mẫu để phân tích các chỉ tiêu miễn dịch của các gia đình cá tra chọn giống, kết quả về các đáp ứng miễn dịch gồm tổng hồng cầu, tổng bạch cầu, hiệu giá kháng thể trình bày tại Phụ lục 29. Kỳ vọng đánh giá một cách đầy đủ đáp ứng miễn dịch của các gia đình cá tại các giai đoạn: cá cảm nhiễm bắt đầu đáp ứng miễn dịch, đáp ứng miễn dịch mạnh và sự suy giảm đáp ứng miễn dịch trong quá trình cảm nhiễm. Giai đoạn cá cảm nhiễm bắt đầu đáp ứng miễn dịch với sự xâm nhiễm của vi khuẩn nhìn chung trong giai đoạn 24 - 48 hpi (các thông số miễn dịch bắt đầu tăng). Giai đoạn 60 - 168 hpi các thông số miễn dịch có dao động nhưng tăng không nhiều. Tuy nhiên, các yếu tố miễn dịch tăng đáng kể tại giai đoạn 264 hpi. Đây cũng là thời điểm cá lơ đờ và chết cao điểm trong thí nghiệm. Giai đoạn các thông số miễn dịch bắt đầu giảm trong thí nghiệm là tại 312 hpi (Phụ lục 29). Vì vậy, nghiên cứu quyết định thu máu cá tại các giai đoạn trước cảm nhiễm, 24 hpi, 48 hpi, 264 hpi, 312 hpi nhằm phân tích các đáp ứng miễn dịch cho 6 gia đình cá tra chọn giống được cảm nhiễm.

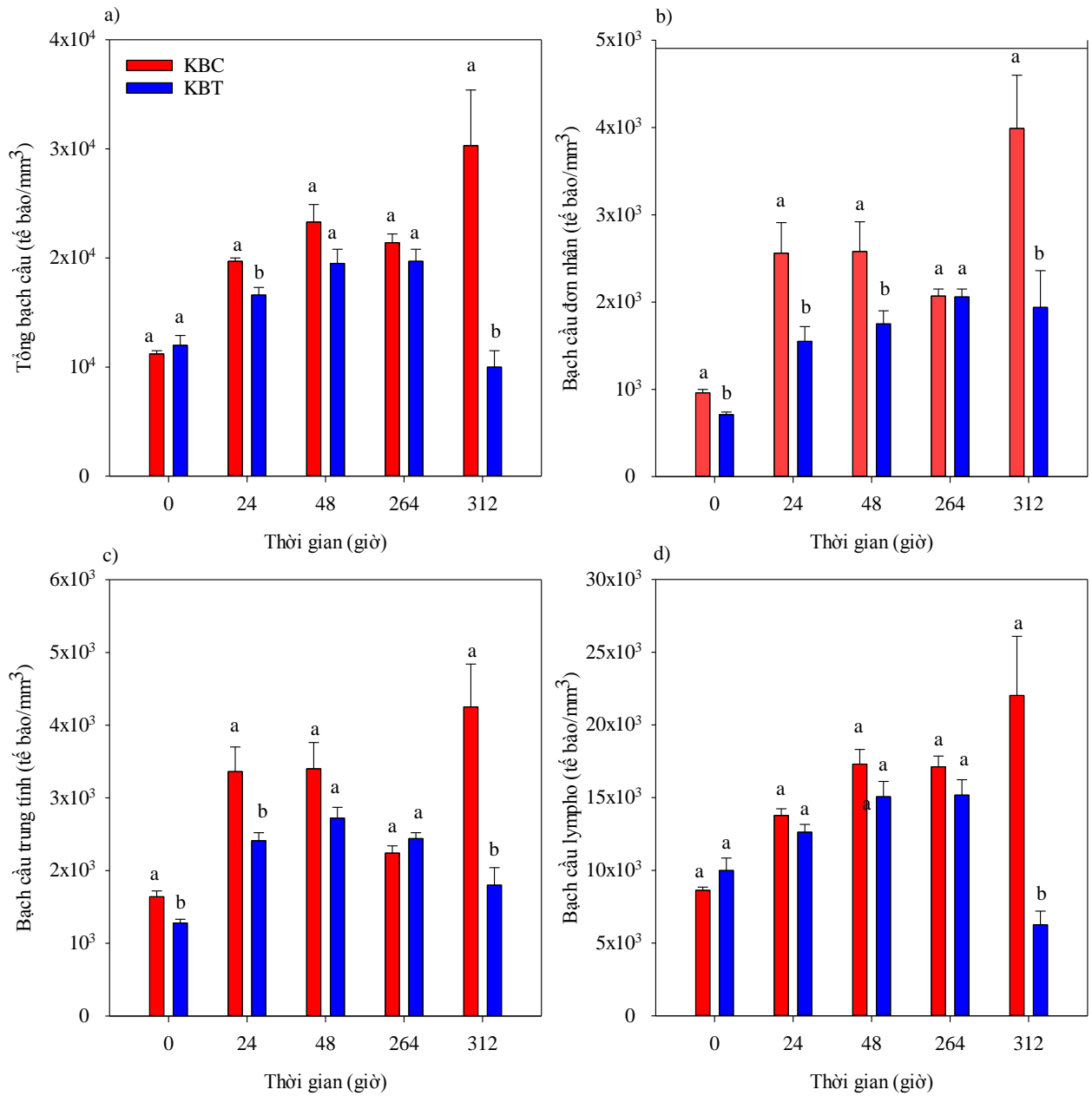
*Đánh giá khả năng đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu và đáp ứng miễn dịch đặc hiệu của hai nhóm gia đình kháng bệnh cao và thấp theo EBV*

Trong nghiên cứu này, mẫu máu và mẫu mô được thu tại năm thời điểm được xác định trong thí nghiệm thăm dò: trước cảm nhiễm, 24 hpi, 48 hpi, 264 hpi, 312 hpi. Các đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu (tổng hồng cầu, tổng bạch cầu, các loại bạch cầu trung tính, bạch cầu lympho, bạch cầu đơn nhân, trung tâm đại thực bào sắc tố ở gan, thận, lách, hoạt lực thực bào và chỉ số thực bào của đại thực bào) và đáp ứng miễn dịch đặc hiệu (hiệu giá kháng thể) của các gia đình cá tra chọn giống được trình bày chi tiết tại Phụ lục 30 và Phụ lục 31.

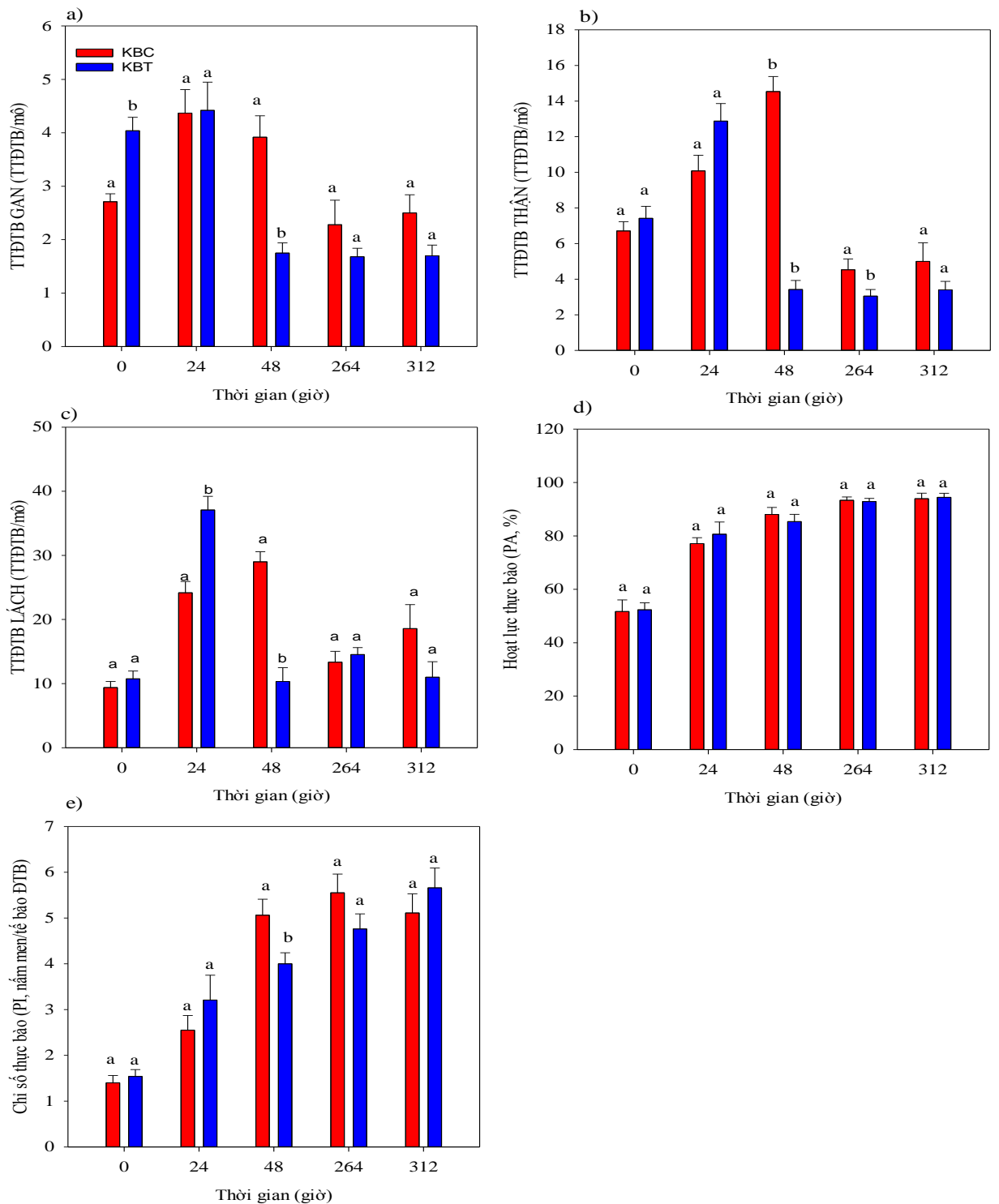
Sự biến động số lượng tổng hồng cầu, tổng bạch cầu, các loại bạch cầu trung tính, bạch cầu lympho, bạch cầu đơn nhân, số lượng TTĐTB tại gan, thận, lách và khả năng thực bào của đại thực bào trong quá trình cảm nhiễm hai nhóm gia đình cá chi tiết trong Hình 3.11, Hình 3.12 và Hình 3.13.



**Hình 3.11.** So sánh tổng hồng cầu sau khi cảm nhiễm *E. ictaluri* của hai nhóm gia đình cá tra KBC và KBT



**Hình 3.12.** So sánh tổng bạch cầu và các loại bạch cầu sau khi cảm nhiễm *E. ictaluri* của hai nhóm gia đình cá tra KBC và KBT. Số lượng tổng bạch cầu (a) và các loại bạch cầu đơn nhân (b), trung tính (c), lympho (d).



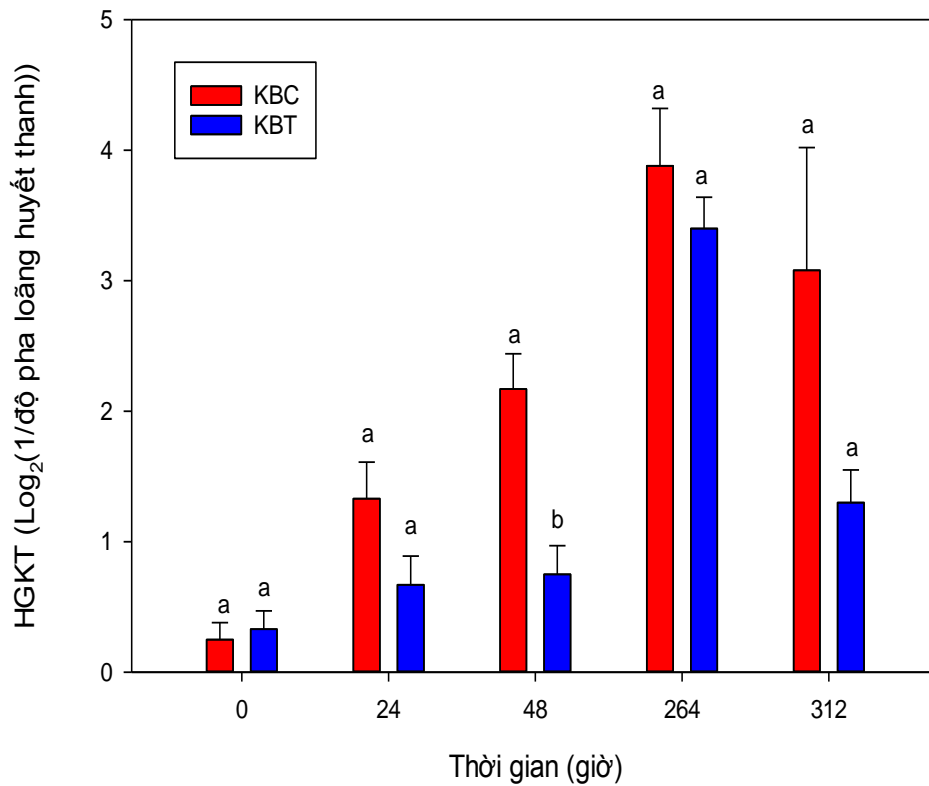
**Hình 3.13.** So sánh số lượng trung tâm đại thực bào sắc tố và hoạt lực thực bào của đại thực bào sau khi cảm nhiễm *E. ictaluri* của hai nhóm gia đình cá tra KBC và KBT. Ở gan (a), thận (b), lách (c), hoạt lực thực bào (d), chỉ số thực bào (e).

Số lượng tổng hồng cầu (THC) của cả hai nhóm KBC và KBT đều có khuynh hướng giảm dần từ trước cảm nhiễm đến 312 hpi (Hình 3.11). Tuy nhiên, THC nhóm cá KBT giảm nhiều hơn nhóm KBC (nhóm KBT giảm nhiều tại 48 hpi trong khi nhóm KBC chỉ giảm nhiều tại 264 hpi). Số lượng tổng hồng cầu nhóm KBC luôn cao hơn nhóm KBT tại tất cả các giai đoạn cảm nhiễm nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Số lượng tổng bạch cầu (TBC), bạch cầu trung tính (NEU), bạch cầu đơn nhân (MONO), bạch cầu lympho (LYM) của hai nhóm KBC và KBT có xu hướng tăng từ trước cảm nhiễm đến 48 hpi. Tuy nhiên, TBC, MONO, NEU, LYM của nhóm KBC luôn cao hơn nhóm KBT tại tất cả các giai đoạn trong quá trình cảm nhiễm (ngoại trừ NEU tại giai đoạn 264 hpi). Đặc biệt, TBC, MONO, NEU của nhóm KBC cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm KBT tại 24 hpi và 312 hpi ( $p < 0,05$ ) (Hình 3.12).

Gan, thận và lách là vị trí quan trọng diễn ra các hoạt động đáp ứng miễn dịch của cá (Galina, 2017). Sự tăng số lượng trung tâm đại thực bào sắc tố (TTĐTB) trong quá trình cảm nhiễm của hai nhóm gia đình cá để diệt khuẩn trong phản ứng viêm hệ thống và đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu (Shoemaker và ctv., 1997) cùng với bạch cầu NEU (Galina, 2017). Ngoài việc tăng số lượng TTĐTB thì khả năng thực bào (hoạt lực thực bào và chỉ số thực bào) của các loại tế bào đại thực bào cũng đóng vai trò quan trọng trong việc đáp ứng miễn dịch của cá. Sự hiện diện của trung tâm đại thực bào có màu vàng nâu hoặc nâu đen còn đóng vai trò kho lưu trữ những tế bào, mảnh vụn kháng nguyên (Ferguson, 2006). Số lượng TTĐTB ở gan, thận và lách nhóm KBC thấp hơn nhóm KBT từ trước cảm nhiễm đến 24 hpi nhưng từ giai đoạn 48 - 312 hpi thì TTĐTB ở gan, thận và lách nhóm KBC luôn cao hơn nhóm KBT, đặc biệt tại giai đoạn 48 hpi (ngoại trừ TTĐTB ở lách tại 264 hpi) (Hình 3.13). Nguyên nhân do TTĐTB của nhóm KBC ở gan, thận và lách tăng cao từ trước cảm nhiễm đến giai đoạn sau 48 hpi (riêng TTĐTB ở gan chỉ tăng đến 24 hpi) sau đó giảm

nhưng nhóm KBT tăng ít số lượng TTĐTB ở gan, thận, lách hơn nhóm KBC và chỉ tăng đến giai đoạn sau 24 hpi và sau đó cũng giảm (Phụ lục 30).

Hoạt lực thực bào PA của hai nhóm gia đình cá KBC và KBT đều tăng từ trước cảm nhiễm đến giai đoạn 312 giờ sau cảm nhiễm (hpi). Tại giai đoạn 48 hpi đến 312 hpi, nhóm KBC có PA cao hơn hay bằng nhóm KBT (Hình 3.13). Chỉ số thực bào PI của nhóm KBC tăng từ trước cảm nhiễm đến giai đoạn 264 hpi sau đó giảm đến giai đoạn 312 hpi. Đối với nhóm KBT chỉ số thực bào PI tăng từ trước cảm nhiễm đến giai đoạn 312 hpi. Chỉ số thực bào PI nhóm KBC cao hơn nhóm KBT từ 48 - 264 hpi, đặc biệt có ý nghĩa thống kê tại giai đoạn 48 hpi ( $p < 0,05$ ) (Hình 3.13).



**Hình 3.14.** So sánh hiệu giá kháng thể sau khi cảm nhiễm *E. ictaluri* của hai nhóm gia đình cá tra KBC và KBT.



Hiệu giá kháng thể (HGKT) của huyết thanh cá thuộc hai nhóm KBC, KBT có xu hướng tăng nhanh từ trước cảm nhiễm đến giai đoạn 264 hpi sau đó giảm tại thời điểm 312 hpi được thể hiện ở Hình 3.14. Tuy nhiên, HGKT nhóm KBC luôn cao hơn nhóm KBT trong toàn bộ quá trình cảm nhiễm, đặc biệt sự khác biệt có ý nghĩa thống kê tại thời điểm 48 hpi ( $p < 0,05$ ).

Nhìn chung, đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu và đặc hiệu của cá thuộc các gia đình KBC và KBT trong quá trình cảm nhiễm có các đặc điểm giống nhau bao gồm: (1) sự giảm số lượng tổng hồng cầu do vi khuẩn xâm nhập vào tế bào hồng cầu làm một số lượng lớn các tế bào hồng cầu bị vỡ, dẫn đến giảm khả năng vận chuyển oxy của tế bào hồng cầu, thiếu oxy tế bào ở mô, giảm chuyển hóa vật chất (Chen và ctv., 2019); (2) các loại bạch cầu của hai nhóm gia đình cá có xu hướng tăng qua các thời điểm cảm nhiễm nhằm chống lại sự xâm nhiễm của vi khuẩn (Benli và Yildiz, 2004). Bạch cầu NEU và MONO tăng đáng kể, đặc biệt trong giai đoạn đầu đáp ứng miễn dịch quá trình viêm xảy ra nhằm tạo ra phản ứng phòng vệ khẩn cấp cho cơ thể cá (Chen và ctv., 2019) và tham gia vào quá trình xử lý và trình diện kháng nguyên tạo ra đáp ứng miễn dịch đặc hiệu của cơ thể (Uribe và ctv., 2011; Petersen, 2003); (3) sự tăng số lượng TTĐTB và khả năng thực bào của đại thực bào trong quá trình cảm nhiễm của cá thuộc hai nhóm gia đình kháng bệnh nhằm diệt khuẩn trong phản ứng viêm hệ thống và đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu (Shoemaker, 1997); (4) hiệu giá kháng thể tăng ở các gia đình KBC và KBT trong quá trình cảm nhiễm nhằm tiêu diệt vi khuẩn (Galina, 2017).

Đáp ứng miễn dịch nhóm KBC cho thấy có hiệu quả hơn nhóm KBT trong quá trình cảm nhiễm: (1) số lượng hồng cầu nhóm KBC giảm ít hơn nhóm KBT; (2) số lượng TBC, NEU, MONO, LYM của nhóm KBC cao hơn nhóm KBT ở các giai đoạn sau cảm nhiễm (ngoại trừ NEU nhóm KBC thấp hơn KBT tại giai đoạn 264 hpi); (3) TTĐTB ở gan, thận và lách; khả năng thực bào của đại thực bào (PA, PI) nhóm KBC cao hơn hay không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm KBT từ giai đoạn 48

hpi; (4) hiệu giá kháng thể nhóm KBC cao hơn nhóm KBT trong các giai đoạn cảm nhiễm. Kết quả của nghiên cứu này tương tự với nghiên cứu của Camp và ctv. (2000) cho thấy sự khác biệt trong đáp ứng miễn dịch (đặc biệt bạch cầu LYM, TTĐTB chủ yếu ở lách và thận) của nhóm gia đình cá nheo Mỹ kháng bệnh cao hơn so với các gia đình mắc cảm với vi khuẩn *E. ictaluri* trong giai đoạn từ 3 - 14 ngày cảm nhiễm. Shoemaker và ctv. (1997) lại cho thấy hoạt tính diệt khuẩn của đại thực bào từ cá thể cá kháng bệnh (đạt 93,40%) lớn hơn đáng kể so với đại thực bào từ cá nhạy cảm (đạt 85,40%) và hoạt động diệt khuẩn của đại thực bào gia tăng tuyến tính từ 1 đến 3 giờ sau khi có sự hiện diện của vi khuẩn. Ngoài ra, nghiên cứu của Elibol-Flemming (2009) và Chen và ctv. (2019) cho thấy giai đoạn 24 - 72 giờ sau cảm nhiễm rất quan trọng trong mô hình để đánh giá hiệu quả của đáp ứng miễn dịch tự nhiên của cá nheo Mỹ thông qua tăng phản ứng của các tế bào thực hiện đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu, ức chế sự phát triển của vi khuẩn và cảm ứng phản ứng giai đoạn đáp ứng cấp tính tiếp theo. Kết quả tương đồng với nghiên cứu này cho thấy giai đoạn đầu cảm nhiễm 48 hpi có vai trò quan trọng trong đáp ứng miễn dịch của cá. Do đó, các gia đình nhóm KBT có đáp ứng miễn dịch kém hiệu quả hơn các gia đình nhóm KBC giai đoạn đầu cảm nhiễm có thể là một nguyên nhân dẫn đến số lượng cá chết ở nhóm KBT nhiều hơn nhóm KBC trong quá trình cảm nhiễm, đặc biệt giai đoạn từ 24 - 200 giờ sau cảm nhiễm.

### **3.2.2.3. Đánh giá và đề xuất chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch làm chỉ tiêu xác định khả năng kháng bệnh gan thận mũ**

*Xác suất xác định được cá thể thuộc gia đình kháng bệnh cao hay thấp của các thông số miễn dịch*

Các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch dễ thực hiện (ngoại trừ khả năng thực bào của đại thực bào) sau khi đưa vào phân tích cho kết quả xác định được mối liên quan đến đặc điểm kháng bệnh trong toàn bộ quá trình cảm nhiễm với xác suất liên quan từ 12,40 - 100% (Bảng 3.21).

**Bảng 3.21.** Xác suất (%) xác định được cá thể thuộc gia đình kháng bệnh cao hay thấp của các thông số miễn dịch

Chỉ tiêu miễn dịch	Đơn vị	24 - 48 hpi	264 - 312 hpi	24 - 312 hpi
Tổng hồng cầu	$10^5$ TB*/mm <sup>3</sup>	11,2	26,5	12,4
Tổng bạch cầu	$10^4$ TB*/mm <sup>3</sup>	19,5	41,3	23,7
NEU	$10^3$ TB*/mm <sup>3</sup>	88,6	9,1	25,3
MONO	$10^3$ TB*/mm <sup>3</sup>	11	15,3	69,1
LYM	$10^3$ TB*/mm <sup>3</sup>	17,9	39,2	18,1
HGKT	Độ pha loãng <sup>2</sup>	100	19	100
TTĐTB <sup>1</sup> ở gan	TTĐTB <sup>1</sup> /mô	100	22,2	63,1
TTĐTB <sup>1</sup> ở thận	TTĐTB <sup>1</sup> /mô	4,8	63	95,1
TTĐTB <sup>1</sup> ở lách	TTĐTB <sup>1</sup> /mô	12,3	5,8	41,8

\*: tế bào; <sup>1</sup>: trung tâm đại thực bào sắc tố; <sup>2</sup>: độ pha loãng của huyết thanh.

Kết quả cũng cho thấy có thể phân biệt các cá thể kháng bệnh cao và thấp thông qua một số chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch. Trong nghiên cứu này, phương pháp phân tích mô hình hồi quy logistic đa biến Bayes (BMA) được sử dụng nhằm xác định xác suất của chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch có liên quan đến cá thể kháng bệnh cao hay thấp trong toàn bộ quá trình cảm nhiễm (Phụ lục 32). Cách tiếp cận này phù hợp với nghiên cứu của Phan và ctv. (2018) trong thử nghiệm các mô hình chẩn đoán bệnh dựa trên các thông số huyết học ở người.

Các đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu đối với mầm bệnh có thể di truyền được (Camp và ctv., 2000) và những đáp ứng này thay đổi theo thời gian bởi các mối liên quan gây bệnh (Magnadottir, 2010). Nhìn chung, các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch đều có thể xác định được các cá thể thuộc nhóm KBC hay KBT tại tất cả thời điểm trong quá trình cảm nhiễm với xác suất liên quan  $\geq 4,80\%$  (Bảng 3.21). Các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch liên quan nhất giúp xác định các cá thể KBC hay KBT trong giai đoạn

24 - 48 hpi là NEU, HGKT và TTĐTB ở gan với xác suất lần lượt là 88,6%, 100% và 100% và trong giai đoạn 264 - 312 hpi là TTĐTB ở thận, LYM và TBC với xác suất lần lượt là 63%, 39,2% và 41,3%. Tuy nhiên, trong toàn bộ giai đoạn cảm nhiễm các yếu tố có ý nghĩa trong việc phân biệt các cá thể kháng bệnh là MONO, HGKT và TTĐTB ở thận. Các kết quả trên cho thấy việc phát triển mô hình với các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch nhằm xác định cá thể thuộc nhóm gia đình kháng bệnh cao hay thấp là khả thi.

*Phát triển mô hình dự đoán với các chỉ tiêu miễn dịch giúp phân biệt được các cá thể kháng bệnh cao và thấp trong quá trình cảm nhiễm*

Kết quả của nghiên cứu này đã chỉ ra các yếu tố miễn dịch khác nhau có thể xác định các cá thể KBC hay KBT tại từng thời điểm trong quá trình cảm nhiễm. Phân tích hồi quy logistic đơn biến cho thấy chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch như TBC, NEU, LYM, HGKT, TTĐTB ở gan và thận (ngoại trừ THC và TTĐTB ở lách) có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) trong việc xác định được cá thể KBC hay KBT tại các thời điểm trong quá trình cảm nhiễm (Bảng 3.22). Das và Sahoo (2014) cho thấy hoạt tính tan máu sẽ là một tính trạng biểu thị khả năng kháng bệnh kém hiệu quả trong chọn giống để tăng tỉ lệ sống sót. Tuy nhiên, nồng độ kháng thể lại là chỉ thị đáp ứng miễn dịch hiệu quả biểu thị khả năng kháng bệnh giữa nhóm KBC và KBT (Eide và ctv., 1994). Chọn lọc gián tiếp khả năng kháng bệnh dựa trên các thông số miễn dịch, thường là miễn dịch không đặc hiệu được xem như chọn lọc tính trạng kháng bệnh (Galina, 2017). Nghiên cứu này đã sử dụng phân tích mô hình hồi quy đơn biến và đa biến cho việc phát triển chỉ thị phục vụ chọn giống kháng bệnh (Bảng 3.22 và Bảng 3.23). Cách tiếp cận này phù hợp với nghiên cứu của Phan và ctv. (2018) trong thử nghiệm các mô hình chẩn đoán bệnh dựa trên các thông số huyết học ở người.

**Bảng 3.22.** Mô hình đơn biến dự đoán khả năng phân biệt cá thể kháng bệnh cao hay thấp của các thông số miễn dịch

Thông số miễn dịch	Tỉ số ODD	24 - 48 hpi	264 - 312 hpi	24 - 312 hpi
Số cá thể (119)	Giá trị p	48	47	95
THC	Tỉ số ODD	1,000001	1,000001	1,000001
	Giá trị p	0,29	0,16	0,09
TBC	Tỉ số ODD	1,000236	1,000146	1,000175
	Giá trị p	0,01	0,02	0,00
MONO	Tỉ số ODD	1,001428	1,000884	1,00111
	Giá trị p	0,01	0,07	0,00
NEU	Tỉ số ODD	1,001222	1,00068	1,000901
	Giá trị p	0,01	0,10	0,00
LYM	Tỉ số ODD	1,000179	1,000169	1,000168
	Giá trị p	0,08	0,01	0,00
HGKT	Tỉ số ODD	3,58	1,31	1,34
	Giá trị p	0,00	0,16	0,03
TTĐTĐTB ở gan	Tỉ số ODD	1,21	1,485104	1,14

Thông số miễn dịch	Tỉ số ODD	24 - 48 hpi	264 - 312 hpi	24 - 312 hpi
Số cá thể (119)	Giá trị p	48	47	95
	Giá trị p	0,01	0,02	0,00
TTĐTĐTB ở thận	Tỉ số ODD	1,45	1,688945	1,39
	Giá trị p	0,04	0,084	0,01
TTĐTĐTB ở lách	Tỉ số ODD	1,02	1,02	1,01
	Giá trị p	0,39	0,61	0,31

*Giá trị ODD: tỉ số xác suất phân biệt kháng bệnh cao khi tăng 1 đơn vị giá trị miễn dịch (1 độ lệch chuẩn với các chỉ số máu);*

*Giá trị p: giá trị kiểm định có ý nghĩa thống kê.*

**Bảng 3.23.** Mô hình đa biến dự đoán khả năng phân biệt cá thể kháng bệnh cao hay thấp của các thông số miễn dịch

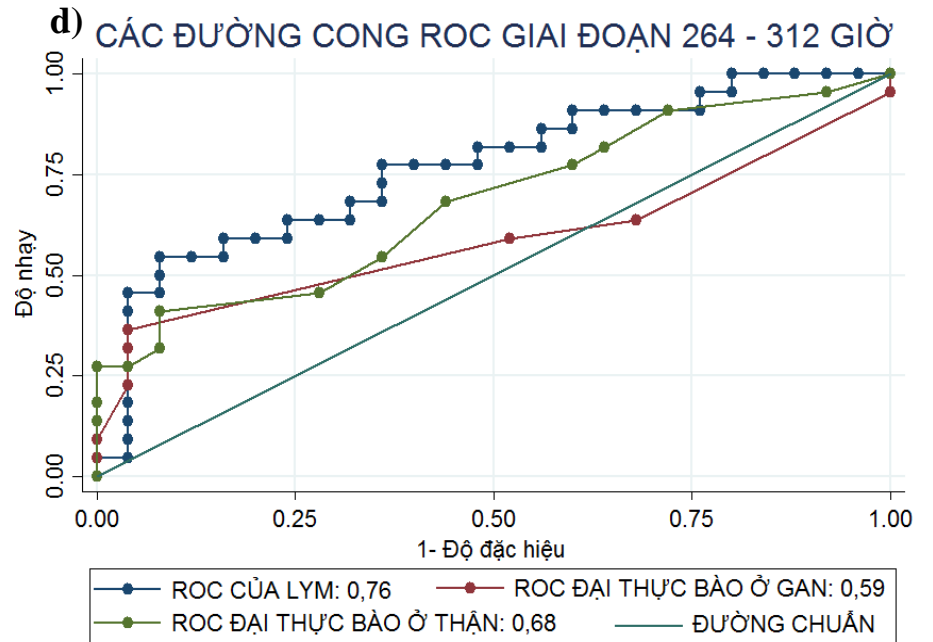
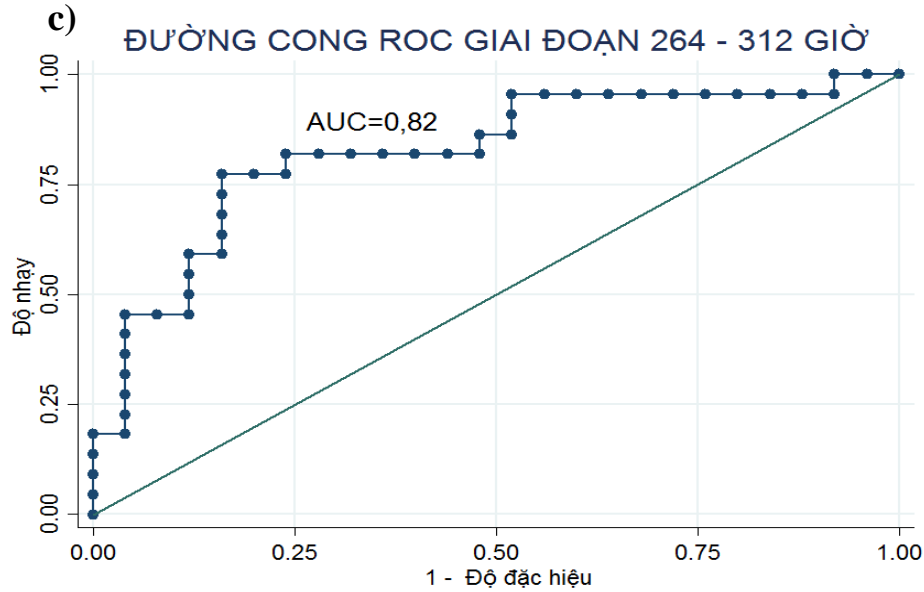
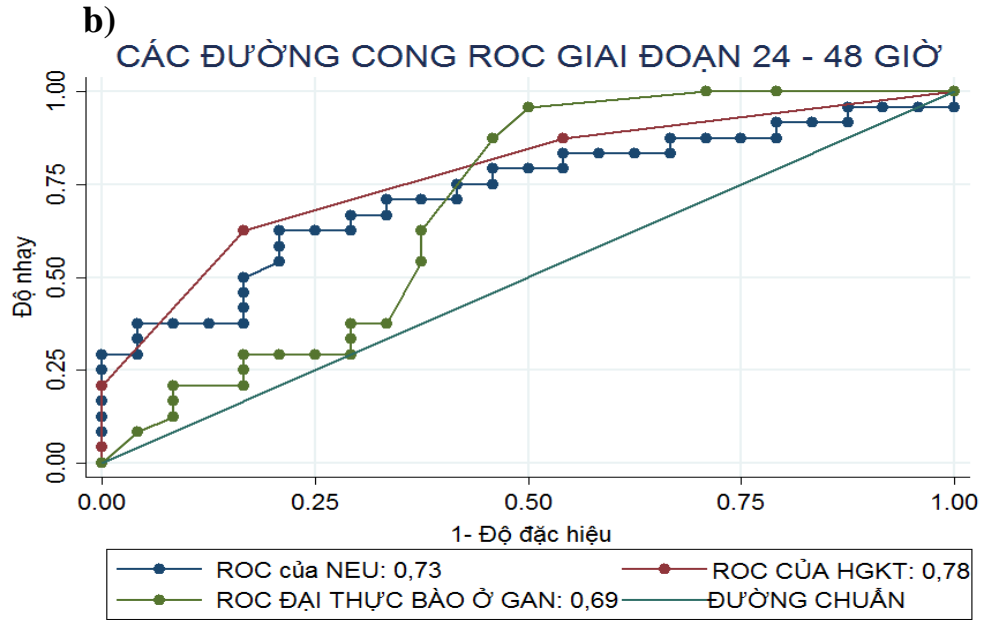
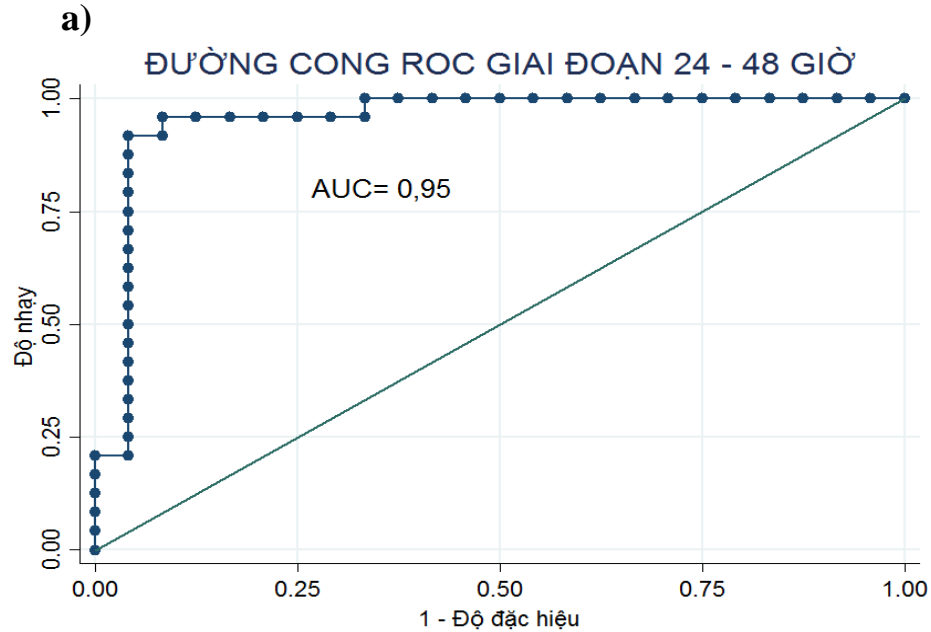
<i>Thông số miễn dịch</i>	24 - 48 hpi	264 - 312 hpi	24 - 312 hpi
<i>Tỉ số ODD<sup>(1)</sup></i>			
NEU	1,002353***	–	–
MONO	–	–	1,0013***
LYM	–	1,000146*	
HGKT	14,03*	–	1,76*
TTĐTB ở gan	3,24**	1,509602***	–
TTĐTB ở thận	–	1,374717**	1,27**
<i>Các giá trị kiểm định mô hình</i>			
Giá trị kiểm định mô hình AIC nhỏ nhất <sup>(2)</sup>	33,07	58,43	101,95
Giá trị đa cộng tuyến VIF trong mô hình <sup>(3)</sup>	1,03	1,09	1,12
Pseudo R <sup>2</sup> <sup>(4)</sup>	0,62	0,22	0,28
AUC <sup>(5)</sup>	0,95	0,82	0,83

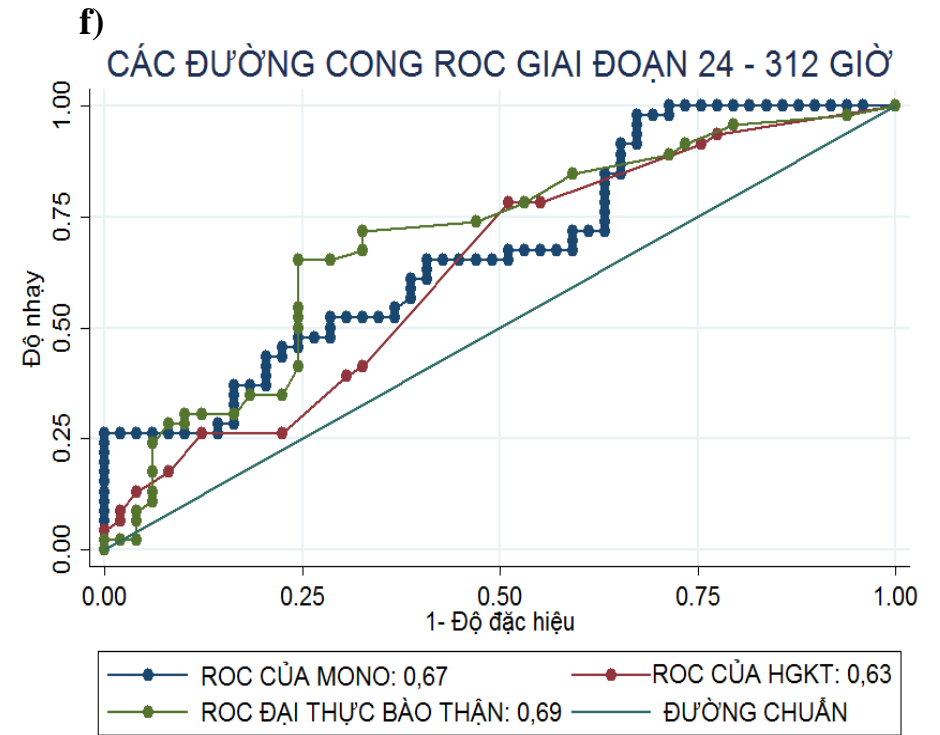
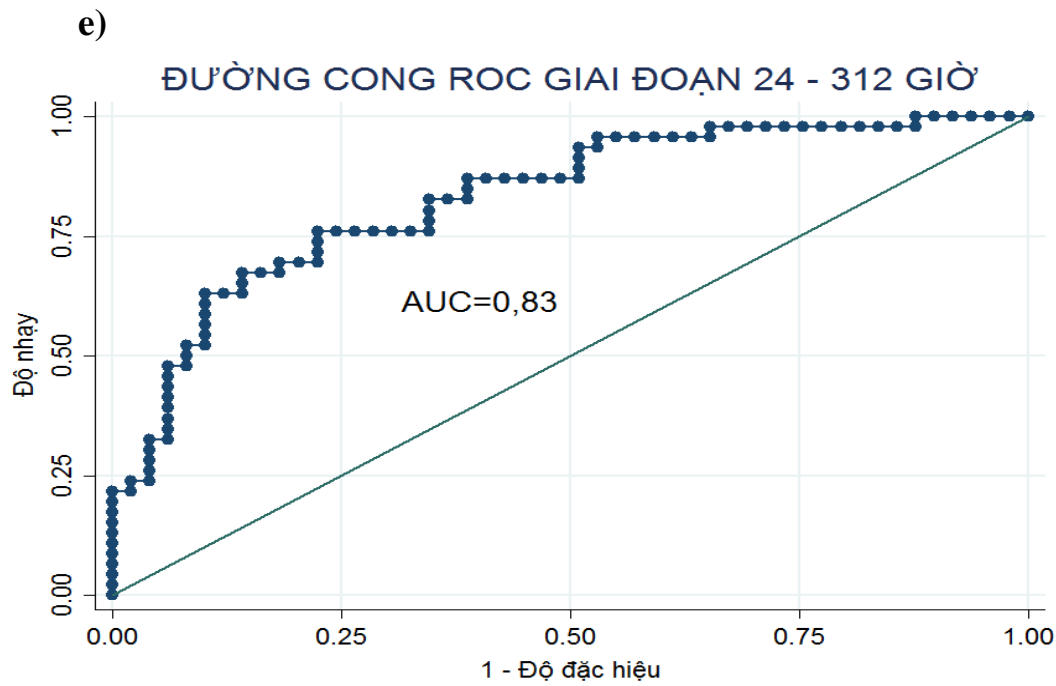
<sup>(1)</sup> Giá trị ODD: tỉ số xác suất phân biệt kháng bệnh cao khi tăng 1 đơn vị giá trị miễn dịch (1 độ lệch chuẩn với các chỉ số máu); <sup>(2)</sup> Giá trị AIC: giá trị kiểm định mô hình; <sup>(3)</sup> Giá trị VIF: giá trị biểu thị mức độ đa cộng tuyến giữa các thông số miễn dịch trong mô hình; <sup>(4)</sup> Pseudo R<sup>2</sup>: Độ phù hợp của mô hình; <sup>(5)</sup> giá trị AUC: giá trị biểu thị khả năng phân biệt cá thể thuộc gia đình kháng bệnh cao hay thấp; Dấu (\*, \*\*, \*\*\*): các thông số miễn dịch kiểm định có ý nghĩa theo thứ tự giảm dần trong mô hình.

Trong nghiên cứu này, phân tích hồi quy logistic đa biến, thông qua việc đánh giá giá trị AIC nhỏ nhất, Pseudo  $R^2$  cao nhất cho thấy mô hình hiệu quả và giá trị đa cộng tuyến  $VIF < 2$  cho thấy sự tồn tại thấp của tính đa cộng tuyến của các thông số huyết học theo mô hình tương tự như Phan và ctv. (2018) đã công bố khi thực hiện thí nghiệm chẩn đoán bệnh ung thư phổi trên người. Nghiên cứu này đã bước đầu xác lập được các mô hình tại các thời điểm cảm nhiễm tại 24 - 48 giờ sau cảm nhiễm (hpi); 264 - 312 hpi và 24 - 312 hpi với các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch có ý nghĩa trong việc xác định được các cá thể thuộc nhóm KBC hay KBT (Bảng 3.23). Ngoài ra, kết quả phân tích tỉ số ODD của các tham số trong mô hình xác định cá thể KBC so với KBT đều cao hơn 1,0 cho thấy khi các thông số miễn dịch tăng sẽ làm tăng khả năng xác định các cá thể KBC.

Trong các mô hình tại các thời điểm khảo sát 24 - 48 giờ sau cảm nhiễm (hpi), 264 - 312 hpi và toàn bộ quá trình cảm nhiễm đều có giá trị AIC và Pseudo  $R^2$  lần lượt là 33,07, 58,43, 101,95 và 0,62, 0,22, 0,28 (Bảng 3.23). Tất cả các mô hình vừa nêu đều có giá trị  $p < 0,05$ . Giá trị AUC cho các thông số miễn dịch trong nghiên cứu này tại 24 - 48 hpi (0,95) cao hơn 264 - 312 hpi (0,82) và toàn bộ quá trình cảm nhiễm (0,83). Các giá trị AUC của các thông số miễn dịch tại từng giai đoạn tương ứng 24 - 48 giờ của bạch cầu trung tính, đại thực bào ở gan và hiệu giá kháng thể lần lượt là 0,73; 0,69; 0,78; tại giai đoạn 264 - 312 giờ của bạch cầu lympho, đại thực bào ở thận, đại thực bào ở gan lần lượt là 0,76; 0,68; 0,59 và tại giai đoạn 24 - 312 giờ của bạch cầu lympho, đại thực bào ở thận, đại thực bào ở gan lần lượt là 0,67; 0,69; 0,63 (Hình 3.15). Khi kết hợp các thông số miễn dịch với nhau trong việc phân biệt các cá thể kháng bệnh cao hay thấp thì giá trị AUC được nâng cao hơn khi chỉ sử dụng một yếu tố miễn dịch để xác định cá thể kháng bệnh. Điều này cho thấy việc tăng hiệu quả của việc phân biệt các cá thể kháng bệnh khi kết hợp các thông số miễn dịch qua các giai đoạn cảm nhiễm (Hình 3.15).





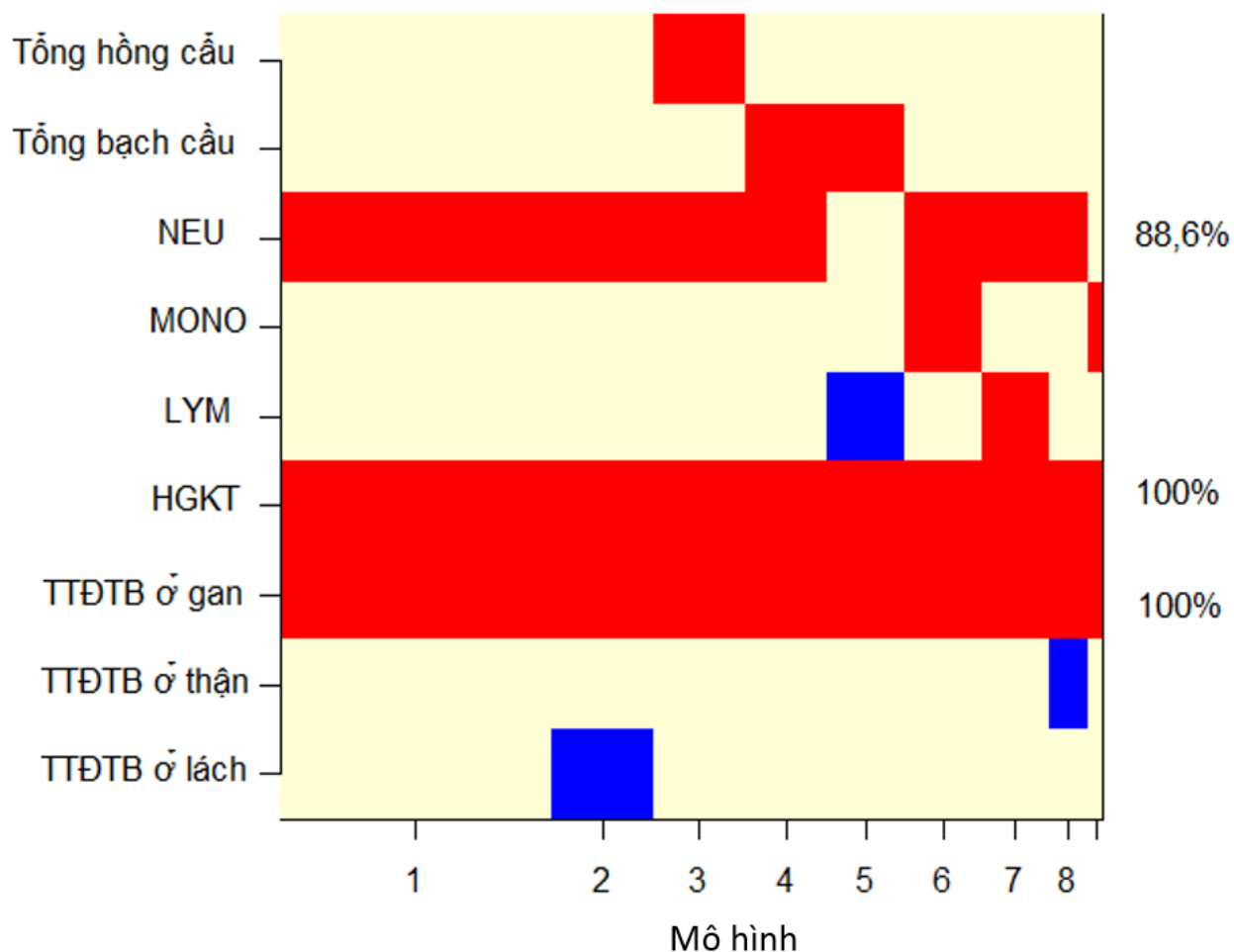


**Hình 3.15.** Đường cong ROC các giai đoạn trong quá trình cảm nhiễm.

Đường cong ROC giai đoạn 24-48 giờ sau cảm nhiễm (a, b). Đường cong ROC giai đoạn 264-312 giờ sau cảm nhiễm (c, d). Đường cong ROC giai đoạn 24-312 giờ sau cảm nhiễm (e, f).

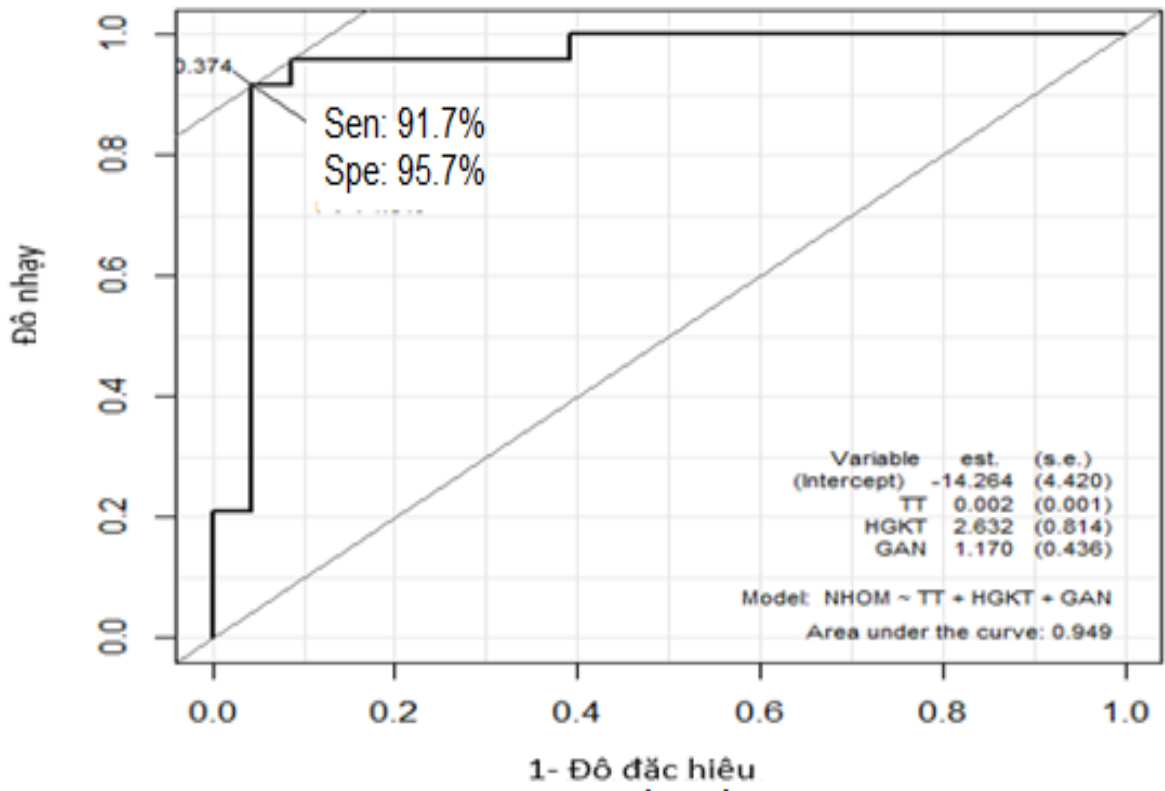
Qua hệ số kiểm định mô hình AIC, Pseudo  $R^2$  và giá trị AUC trong các mô hình cho phép kết luận việc xác định các cá thể thuộc nhóm KBC hay KBT thông qua các thông số miễn dịch là khả thi ở tất cả các giai đoạn cảm nhiễm khảo sát. Kết quả này có ý nghĩa trong chọn giống khi ngoài môi trường tự nhiên vi khuẩn có thể lây nhiễm từ 5 đến 7 ngày (Elibol-Flemming và ctv., 2009) nên các thời điểm khảo sát phù hợp để xác định khả năng kháng bệnh cao hay thấp trong các chương trình chọn giống cá tra kháng bệnh trong tương lai. Phạm vi nghiên cứu này chỉ thực hiện với số mẫu hạn chế là 6 gia đình KBC và KBT nên trong tương lai cần phân tích các thông số miễn dịch tại nhiều thời điểm ở quy mô quần thể chọn giống với số lượng gia đình lớn hơn. Ngoài ra, để có thể vận dụng các mô hình với các thông số miễn dịch vào chương trình chọn giống dài hạn, cần tính toán tương quan di truyền với tính trạng sống/chết trong thí nghiệm cảm nhiễm và hệ số di truyền của chỉ tiêu miễn dịch qua các thế hệ (Fjalestad và ctv., 1993).

Trong các mô hình tại các thời điểm khảo sát 24 - 48 giờ sau cảm nhiễm (hpi), 264 - 312 hpi và toàn bộ quá trình cảm nhiễm, nghiên cứu đã cho thấy giai đoạn 24 - 48 hpi là giai đoạn xác định các cá thể thuộc nhóm KBC hay KBT có hiệu quả nhất với các thông số miễn dịch có ý nghĩa là NEU, HGKT, TTĐTB ở gan (tỉ số ODD lần lượt là 1,002345, 13,89, 3,22 và giá trị  $p < 0,05$  cho các thông số miễn dịch trong mô hình) (Bảng 3.23 và Hình 3.16). Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Camp và ctv. (2000), trong giai đoạn đầu của quá trình cảm nhiễm sự khác biệt về đáp ứng miễn dịch của các gia đình kháng bệnh cao và thấp thể hiện rõ nhất. Elibol-Flemming và ctv. (2009) so sánh gen biểu hiện cho thấy đáp ứng miễn dịch gia tăng trong giai đoạn 48 - 96 hpi và những khác biệt cụ thể trong sự biểu hiện gen xác định các cơ chế kiểm soát sự kháng bệnh hoặc tính nhạy cảm với bệnh gan thận mũ là nhiều thông tin nhất trong giai đoạn 24 - 48 hpi.



**Hình 3.16.** Xác suất (%) liên quan đến xác định được cá thể thuộc gia đình KBC hay KBT qua mô hình BMA tại giai đoạn 24 - 48 hpi. Màu đỏ trong mô hình là tần suất xuất hiện nhiều, màu xanh là tần suất xuất hiện ít của thông số miễn dịch trong các mô hình giả định phân biệt khả năng kháng bệnh.

*Đánh giá mô hình giúp phân biệt được các cá thể kháng bệnh cao và thấp với các chỉ tiêu miễn dịch tại giai đoạn 24 - 48 giờ sau cảm nhiễm*



**Hình 3.17.** Độ nhạy và độ đặc hiệu của mô hình phân biệt khả năng kháng bệnh giai đoạn 24 - 48 hpi. Sen: độ nhạy, Spe: độ đặc hiệu, TT: bạch cầu trung tính, HGKT: hiệu giá kháng thể, GAN: trung tâm đại thực bào sắc tố ở gan.

Nghiên cứu tiến hành phân tích độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp phân biệt các cá thể kháng bệnh cao và thấp tại giai đoạn 24 - 48 hpi. Kết quả cho thấy mô hình phân biệt các cá thể kháng bệnh có độ nhạy và độ đặc hiệu cao lần lượt là 91,7% và 95,7% (Hình 3.17). Vì vậy, đây là mô hình hiệu quả trong việc phân biệt các cá thể kháng bệnh cao và thấp. Kết quả tương tự nghiên cứu của Phan và ctv. (2018) nghiên cứu chẩn đoán bệnh thảo luận rằng tính trạng thông số miễn dịch như tổng hồng cầu, tỉ lệ các loại bạch cầu có khả năng chẩn đoán về bệnh đạt độ nhạy và độ đặc hiệu cao lần lượt là 74,8% đến 87,1%.

Việc xác định những cá thể kháng bệnh đạt hiệu quả cao hơn khi kết hợp các thông số miễn dịch với các ngưỡng phân biệt tối ưu tại giai đoạn này (Phan và ctv., 2018). Trong mô hình xác định khả năng KBC hay KBT tại giai đoạn 24 - 48 hpi, nghiên cứu đã xác định được độ nhạy của NEU, HGKT và TTĐTB ở gan đạt 70,83 - 95,83%, độ đặc hiệu đạt 45,83 - 66,67% với ngưỡng phân biệt tương ứng là  $2.610 \times 10^3$  TB/mm<sup>3</sup>, 1,00, 2,5 TTĐTB/mô (Bảng 3.24).

**Bảng 3.24.** Khả năng phân biệt các cá thể kháng bệnh cao hay thấp của các thông số miễn dịch giai đoạn 24 - 48 giờ sau cảm nhiễm

Thông số miễn dịch	Giá trị đánh giá (đơn vị)	Giá trị
NEU	Sen/Spe (%)	70,83/ 66,67
	AUC	0,73
	Cut off ((10 <sup>3</sup> TB/mm <sup>3</sup> ))	2.610
HGKT	Sen/Spe (%)	87,50/45,83
	AUC	0,78
	Cut off (log <sub>2</sub> (HGKT))	1,00
TTĐTB ở gan	Sen/Spe (%)	95,83/50,00
	AUC	0,69
	Cut off (ổ/mẫu mô)	2,50

#### 3.2.2.4. Đánh giá về khả năng ứng dụng giải pháp kỹ thuật chẩn đoán khả năng kháng bệnh với các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch vào chọn giống cá tra kháng bệnh gan thận mũ các thế hệ tiếp theo

Nghiên cứu đã thực hiện phát triển mô hình chẩn đoán khả năng kháng bệnh với các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch phục vụ chọn giống khả thi ở các giai đoạn cảm nhiễm khác nhau, đặc biệt tại giai đoạn 24-48 giờ sau cảm nhiễm. Đây là những dữ liệu khoa

học bổ sung vào việc sử dụng chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch kết hợp khả năng sống/chết để đánh giá tính trạng phục vụ chọn giống nhằm nâng cao hiệu quả chọn lọc cá tra kháng bệnh trong tương lai. Kết quả cho thấy các chỉ tiêu miễn dịch có tiềm năng sử dụng trong chương trình chọn giống gồm các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu như bạch cầu đơn nhân, trung tính, lympho, trung tâm đại thực bào sắc tố ở gan, thận, lách và chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch đặc hiệu là hiệu giá kháng thể. Tuy nhiên, phạm vi nghiên cứu này chỉ thực hiện với một số các chỉ tiêu miễn dịch nên trong tương lai cần phân tích thêm các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch tại nhiều thời điểm khác nhau như nồng độ ceruloplasmin, cortisol, lysozyme, hoạt động respiratory burst, v.v. tại nhiều giai đoạn cảm nhiễm (24 giờ cảm nhiễm/lần thu mẫu các chỉ tiêu miễn dịch). Ngoài ra, để có thể vận dụng vào chương trình chọn giống dài hạn, cần thực hiện trên thực tế quần thể chọn giống khi cảm nhiễm với số lượng lớn cá thể và gia đình, từ đó ước tính hệ số di truyền và tương quan di truyền giữa chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch với tính trạng sống/chết của thí nghiệm cảm nhiễm và kiểm chứng qua vài thế hệ trước khi áp dụng.

Qua việc thực hiện hai nội dung chính gồm nghiên cứu ứng dụng di truyền số lượng, di truyền phân tử và các giải pháp kỹ thuật để vào chọn giống cá tra G1, đề tài đã ứng dụng di truyền số lượng nhằm định hướng chọn lọc cá giống thế hệ thứ nhất (G1) và các thế hệ chọn giống kháng bệnh tiếp theo. Ngoài ra, việc ước tính thông số di truyền thế hệ G1 và hệ số di truyền ước tính đã công bố ở G0 trên cùng quần thể (Trịnh Quốc Trọng, 2016a, b) cho thấy hệ số di truyền cho tính trạng này ở quần thể cá tra chọn giống hiện có ở mức trung bình. Kết quả cho thấy khả năng di truyền của tính trạng kháng bệnh, đây là cơ sở để thực hiện chương trình chọn giống trên tính trạng kháng bệnh dài hạn. Lần đầu tiên trong chọn giống cá tra kháng bệnh, nghiên cứu đã ước tính được các thông số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mũ ở giai đoạn cá hương cho quần thể cá tra tại Viện NCNTTS II. Đồng thời, nghiên cứu này đã sàng lọc được một bộ chỉ thị gồm các microsatellite ổn định và có khả năng truy

xuất phả hệ cao, phù hợp thay thế phương pháp đánh dấu từ PIT trong thực tiễn chọn giống thế hệ tiếp theo. Nghiên cứu cũng đã thực hiện phát triển mô hình chẩn đoán khả năng kháng bệnh với các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch phục vụ chọn giống. Trong tương lai, các chương trình chọn giống cần tiếp tục chọn lọc qua nhiều thế hệ để mang lại hiệu quả chọn lọc tính trạng kháng bệnh gan thận mù và một phần các tính trạng tăng trưởng và tỉ lệ sống lúc thu hoạch và đồng thời kiểm chứng lại các giải pháp kĩ thuật trong 1 - 2 thế hệ trước khi áp dụng vào chương trình chọn giống trong thực tế.



## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### 1. Kết luận

Các kết quả nghiên cứu của đề tài đã đạt được mục tiêu nghiên cứu ban đầu. Nghiên cứu đã ứng dụng di truyền số lượng và đề xuất phương án chọn lọc thế hệ G1. Đồng thời, nghiên cứu đưa ra các giải pháp kỹ thuật nhằm áp dụng cho chọn lọc kháng bệnh gan thận mù lâu dài cho các chương trình chọn giống cá tra như sau:

- Nghiên cứu áp dụng mô hình tuyến tính hỗn hợp cá thể ước tính chính xác các thông số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mù trên cá giống. Hệ số di truyền tại giai đoạn cắt ngang tỉ lệ sống toàn bộ 50%, 25% trong thí nghiệm cảm nhiễm bệnh gan thận mù ở mức trung bình đến cao (0,22 - 0,38), kì vọng mang lại hiệu quả tương ứng nếu áp dụng chọn lọc cho tính trạng này; chọn lọc tăng khả năng kháng bệnh gan thận mù không làm suy giảm tăng trưởng nhờ vào tương quan thuận. Nghiên cứu cũng đã đề xuất được định hướng cho chọn lọc cá tra kháng bệnh gan thận mù thế hệ G1. Việc ước tính thông số di truyền thế hệ G1 và hệ số di truyền ước tính đã công bố ở G0 trên cùng quần thể cho thấy hệ số di truyền cho tính trạng này ở quần thể cá tra chọn giống hiện có ở mức trung bình. Đây là cơ sở để thực hiện chương trình chọn giống trên tính trạng kháng bệnh dài hạn.

- Nghiên cứu bước đầu ước tính các thông số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mù ở cá hương, cho thấy hệ số di truyền cao (0,43 - 0,55). Trong đó, tương quan di truyền theo EBV của tính trạng tỉ lệ sống và thời gian sống tại giai đoạn cắt ngang tỉ lệ sống toàn bộ 50%, 25% và kết thúc thí nghiệm khi cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri* giữa giai đoạn cá hương và cá giống theo mô hình tuyến tính tương ứng từ - 0,04 đến 0,26. Như vậy cho thấy chọn lọc tính trạng kháng bệnh gan thận mù ở cá giống không làm giảm khả năng kháng bệnh ở cá hương.

- Nghiên cứu đã sàng lọc được một bộ chỉ thị gồm 9 microsatellite và thử nghiệm truy xuất phả hệ đàn cá tra chọn giống với tỉ lệ truy xuất cả bố và mẹ đúng (93,4%) trong tất cả các gia đình cao, đặc biệt trên gia đình con bố có half-sib (94,0%). Khả năng truy xuất của bộ chỉ thị phân tử với 9 microsatellite (truy xuất đúng cả bố và mẹ

là 93,4%) có thể ứng dụng vào thực tiễn cho việc truy xuất phả hệ trên quần thể chọn giống tiếp theo.

- Nghiên cứu đã thực hiện phát triển mô hình chẩn đoán khả năng kháng bệnh với các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch phục vụ chọn giống. Kết quả cho thấy các chỉ tiêu miễn dịch (bạch cầu đơn nhân, trung tính, lympho, trung tâm đại thực bào sắc tố ở gan, thận, hiệu giá kháng thể) đều có tiềm năng xác định các cá thể thuộc nhóm KBC hay KBT ở các thời điểm 24 - 48 và 264 - 312 giờ sau cảm nhiễm, đặc biệt tại giai đoạn 24 - 48 hpi với các thông số miễn dịch gồm bạch cầu trung tính, hiệu giá kháng thể, trung tâm đại thực bào ở gan.

## **2. Kiến nghị**

- Trong các chương trình chọn giống tiếp theo cần nâng cao số lượng gia đình và gia đình có nhóm half-sib tại giai đoạn cá hương trong những nghiên cứu tiếp theo để có thể tách được  $c^2$  nhằm ước tính hệ số di truyền và tương quan di truyền giữa các tính trạng kháng bệnh tại hai giai đoạn cá hương và cá giống chính xác hơn, từ đó có định hướng tiếp theo cho chọn lọc khả năng kháng bệnh cho hai giai đoạn.

- Khả năng truy xuất của bộ chỉ thị phân tử đã được sàng lọc trong nghiên cứu có thể áp dụng vào thực tiễn cho việc truy xuất phả hệ trên quần thể chọn giống tiếp theo góp phần chọn lọc chính xác và mang lại hiệu quả cao hơn. Đặc biệt nếu phát triển và sử dụng thêm một số chỉ thị microsatellite khác từ hệ gen cá tra thì có thể tăng khả năng truy xuất cao hơn (95 - 100%).

- Các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch được xác định có tiềm năng xác định các cá thể thuộc nhóm kháng bệnh cao hay thấp ở các thời điểm sau cảm nhiễm, để có thể vận dụng vào chương trình chọn giống dài hạn cần thực hiện trên thực tế quần thể chọn giống khi cảm nhiễm với số lượng lớn cá thể và gia đình lớn nhằm ước tính hệ số di truyền và tương quan di truyền giữa chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch với tính trạng sống/chết của thí nghiệm cảm nhiễm. Trong tương lai cần phân tích thêm các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch tại nhiều thời điểm cảm nhiễm khác nhau để lựa chọn được chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch hiệu quả trong việc phân biệt được các cá thể kháng bệnh và kiểm chứng qua vài thế hệ trước khi áp dụng.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Antonello J., Massault C., Franch R., Haley C., Pellizzari C., Bovo G., Patarnello T., de Koning J. and Bargelloni L., 2009. Estimates of heritability and genetic correlation for body length and resistance to fish pasteurellosis in the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture* 298 (1-2): 29-35.
2. Argue B.J., Arce S.M., Lotz J.M. and Moss S.M., 2002. Selective breeding of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for growth and resistance to Taura Syndrome Virus. *Aquaculture* 204: 447-460.
3. Ashton N.K., Campbell M.R., Anders P.J., Powell M.S. and Cain K.D., 2016. Evaluating Microsatellite Markers for Parentage-Based Tagging of Hatchery Burbot. *Northwest Science* 90 (3): 249-259.
4. Benli C.K. and Yildiz H.Y., 2004. Blood parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Spontaneously infected with *Edwardsiella tarda*. *Aquaculture* 25: 1880-1880.
5. Brody T., Wohlfarth G., Hulata G. and Moav R., 1981. Application of electrophoretic genetic markers to fish breeding. IV. Assessment of breeding value of full-sib families. *Aquaculture* 24 (C): 175-186.
6. Budiari N.L.G., Pujiawati Y., Kertawirawan I.P.A. and Adijaya I.N., 2021. Effect of *Pomacea canaliculata* snail feed on carcass physical composition, meat chemical composition, and hematological profile of muscovy duck. *E3S Web of Conferences* 306: 1-9.
7. Bùi Thị Bích Hằng và Nguyễn Hoàng Vũ, 2019. Ảnh hưởng của thức ăn có bổ sung chitosan lên một số chỉ tiêu miễn dịch không đặc hiệu ở cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ* 55 (5B): 33-41.
8. Bùi Thị Bích Hằng, Trương Quỳnh Như, Phạm Văn Thi, Nguyễn Minh Tân và Nguyễn Thanh Phương, 2015. Ảnh hưởng của vitamin C lên một số yếu tố miễn dịch không đặc hiệu và khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh của cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, (39), 85-91.
9. Bùi Thị Liên Hà, Lê Ngọc Thùy Trang và Nguyễn Văn Sáng, 2017. Thử nghiệm xác định phả hệ bằng chỉ thị phân tử microsatellite trên quần đàn chọn giống cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn* 5: 88-97.
10. Camp K.L., Wolters W.R. and Rice C.D., 2000. Survivability and immune responses after challenge with *Edwardsiella ictaluri* in susceptible and resistant families of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Fish Shellfish Immunology* 10 (6): 475-487.
11. Castro J., Pino A., Hermida M., Bouza C., Chavarrías D., Merino P., Sánchez L. and Martínez P., 2007. A microsatellite marker tool for parentage assessment in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 272: S210-S216.
12. Charo-Karisa H., Komen H., Rezk M.A., Ponzoni R. W., van Arendonk J.A.M. and Bovenhuis H., 2006. Heritability estimates and response to selection for growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in low-input earthen ponds. *Aquaculture* 261 (2): 479-486.
13. Chen H., Yuan G., Su J. and Liu X., 2019. Hematological and immune genes responses in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) with septicemia induced by *Edwardsiella ictaluri*. *Fish and Shellfish Immunology* 97: 531-539.
14. Crumlish M., Dung T., Turnbull J., Ngoc N. and Ferguson H., 2002. Identification of *Edwardsiella ictaluri* from diseased freshwater catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), cultured in the Mekong Delta, Vietnam. *Journal of fish diseases* 25: 733-736.

15. Cruz P., Ibarra A.M., Mejia-Ruiz H., Gaffney P.M. and Pérez-Enríquez R., 2004. Genetic variability assessed by microsatellites in a breeding program of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Marine Biotechnology* 6: 157-164.
16. Dakin E.E. and Avise J.C., 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93 (5): 504-509.
17. Das S. and Sahoo K.P., 2014. Makers for selection of disease resistance in fish a review. *Aquaculture International* 22 (6): 1793-1812.
18. Datta S. N., Singh A., Jassal G. and Pandey A., 2018. A study on induced breeding, embryonic and larval development of *Pangasianodon hypophthalmus* in semi-arid agro-climate. *Journal of Environmental Biology* 39 (5): 671-676.
19. Đinh Hùng, Nguyễn Thanh Vũ, Nguyễn Văn Hào và Phạm Đình Khôi, 2011. Thông số di truyền các tính trạng tăng trưởng trên tôm càng xanh chọn giống qua hai thế hệ.
20. Đỗ Thị Thanh Hương, Nguyễn Tính Em, Tăng Minh Kỳ, Takagi Yasuaki, Nguyễn Thị Kim Hà và Nguyễn Thanh Phương, 2020. Ảnh hưởng của độ mặn lên chỉ tiêu sinh lý, tăng trưởng và hoạt tính men tiêu hóa của cá lóc (*Channa striata*) giai đoạn cá bột lên cá hương. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ* 56: 11-19.
21. Doan Q.K., Vandeputte M., Chatain B., Morin T. and Allal F., 2016. Viral Encephalopathy and Retinopathy in Aquaculture: A Review. *Journal of Fish Diseases* 40(5): 717-742.
22. Dung T.T., Chiers K., Tuan N. A., Sorgeloos P., Haesebrouck F. and Decostere A., 2012. Early interactions of *Edwardsiella ictaluri*, with *Pangasianodon* catfish and its invasive ability in cell lines. *Veterinary Research Communication* 36: 119-227.
23. Dupont-Nivet M., Vandeputte M., Haffray P. and Chevassus B., 2006. Effect of different mating designs on inbreeding, genetic variance and response to selection when applying individual selection in fish breeding programs. *Aquaculture* 252: 161-170.
24. Eide D.M., Linder R.D., Strømsheim A., Fjalestad K., Larsen H. J. S. and Røed K. H., 1994. Genetic variation in antibody response to diphtheria toxoid in Atlantic salmon and rainbow trout. *Aquaculture* 127 (2-3): 103-113.
25. Elibol-Flemming B., Waldbieser G.C., Wolters W.R., Boyle C.R. and Hanson L.A., 2009. Expression analysis of selected immune-relevant genes in channel catfish during *Edwardsiella ictaluri* infection. *Journal of Aquatic Animal Health* 21 (1): 23-35.
26. Estoup A., Gharbi K., SanCristobal M., Chevalet C., Haffray P. and Guyomard R., 1998. Parentage assignment using microsatellites in turbot (*Scophthalmus maximus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hatchery populations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55(3): 715-723.
27. Faggion S., Bertotto D., Babbucci M., Rovere G.D., Franch R., Bovolenta M., Laureau S., Pascoli F., Toffan A., Bargelloni L. and Carnier P., 2021. Resistance to viral nervous necrosis in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): heritability and relationships with body weight, cortisol concentration, and antibody titer. *Genetics Selection Evolution* 53:32.
28. Falconer D.S. and Mackay T.F., 1996. *Introduction to quantitative genetics* (4th Ed), Oliver and Boyd, 479 pp.
29. FAO, 2020. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action*. Rome <<https://doi.org/10.4060/ca9229en>>.
30. Fariedah, F., Inalya, I., Rani, Y., A'yunin, Q., & Evi, T. (2018). Penggunaan Tanah Liat untuk Keberhasilan Pemijahan Ikan Patin Siam (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan* 10(2), 91-94.
31. Ferguson H.W., 2006. *Systemic pathology of fish: A text and atlas of normal tissues in teleosts and their responses in disease*. Scotian Press, 367 pp.

32. Ferguson H.W., Turnbull J.F., Shin A., Thompson K., Tu D.T. and Crumlish M., 2001. Bacillary necrosis in farmed *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), from the Mekong Delta, Vietnam. *Journal of Fish Diseases* 24: 509-513.
33. Ferrari S., Chatain B., Cousin X., Leguay D., Vergnet A., Vidal M.O., 2014. Early individual electronic identification of sea bass using RFID microtags: a first example of early phenotyping of sex-related growth. *Aquaculture* (426-427): 165-171.
34. Finney D.J., 1971. *Probit Analysis*, 3rd ed, Cambridge University Press, New York, NY 10022, 333 pp.
35. Fishback A.G., 1999. *Genetic and environmental influences on the spawning time and progeny growth of hatchery rainbow trout*. Department of Zoology, 118pp.
36. Fjalestad K.T., Gjedrem T. and Gjerde B., 1993. Genetic improvement of disease resistance in fish: an overview. *Aquaculture* 111: 65-74.
37. Flanagan S.P. and Jones A.G., 2018. The future of parentage analysis: From microsatellites to SNPs and beyond. *Molecular Ecology* 28(3): 544-567.
38. Francis-Floyd R., Bealeu M. H. , Waterstrat P.R. and Bowser P.R., 1987. Effect of water temperature on the clinical outcome of infection with *Edwardsiella ictaluri* in channel catfish. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 191(11): 1413-1416.
39. Fu J., Shen Y., Xu X., Chen Y., Li D. and Li J., 2013. Multiplex microsatellite PCR sets for parentage assignment of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture International* 21 (6): 1195-1207.
40. Gaaib J. and A. and Al-Assie A., 2011. Simple salting out method for genomic ADN extraction from whole blood. *Tikrit Journal of Pure Science* 16 (2), ISSN: 1813 - 1662.
41. Galina J., 2017. *Fish Diseases*. Academic Press is an imprint of Elsevier, 259pp.
42. Getabalew M., Alemneh T., and Akeberegn D., 2019. Heritability and its Use in Animal Breeding. *Journal of Veterinary Science and Technology* 4 (1): 001–005.
43. Gilmour A., Gogel B., Cullis B., Welham S., Thompson R., Butler D., Cherry M., Collins D., Dutkowski G. and Harding S., 2014. *ASReml user guide. Release 4.1 structural specification*. UK: VSN International Ltd, 346pp.
44. Gitterle T., Ødegård J., Gjerde B., Rye M. and Salte R., 2006. Genetic parameters and accuracy of selection for resistance to White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* using different statistical models. *Aquaculture* 251: 210-218.
45. Gjedrem T. and Baranski M., 2009. *Selective Breeding in Aquaculture: an Introduction*, Springer, 221pp.
46. Gjedrem T., 2005. *Selection and Breeding Programs in Aquaculture*, Springer, Dordrecht, the Netherlands, 364pp.
47. Gjedrem T., 2012. Genetic improvement for the development of efficient global aquaculture: a personal opinion review. *Aquaculture* (344-349): 12-22.
48. Gjedrem T., Robinson N. and Rye M., 2012. The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: a review. *Aquaculture* (350-353): 117-129.
49. Gjedrem T., Salte R. and Gjoen H. M., 1991. Genetic variation in susceptibility of Atlantic salmon to furunculosis. *Aquaculture* 97: 1-6.
50. Gjedrem. T, 2015. Disease Resistant Fish and Shellfish Are within Reach: A Review. *Genetic Breeding Technology and Its Application in Marine Aquaculture* (3): 146-153.
51. Gjerde B., Evensen Ø., Bentsen H. B. and Storset A., 2009. Genetic (co)variation of vaccine injuries and innate resistance to furunculosis (*Aeromonas salmonicida*) and infectious salmon anaemia (ISA) in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 287: 52-58.

52. Gjøen H.M., Refstie T., Ulla O. and Gjerde B., 1997. Genetic correlations between survival of Atlantic salmon in challenge and field tests. *Aquaculture* 158: 277-288.
53. Glaubitz J. C., Rhodes Jr O. E. and DeWoody J. A., 2003. Prospects for inferring pairwise relationships with single nucleotide polymorphisms. *Molecular Ecology* 12(4): 1039-1047.
54. Glover K. A., Aasmundstad T., Nilsen F., Storset A. and Skaala Ø., 2005. Variation of Atlantic salmon families (*Salmo salar* L.) in susceptibility to the sea lice *Lepeophtheirus salmonis* and *Caligus elongatus*. *Aquaculture* 245(1-4): 19-30.
55. Gomez E., Mendez J., Cascales D. and Guijarro J. A., 2014. *Flavobacterium psychrophilum* vaccine development: a difficult task. *Microbial Biotechnology* 7(5): 414-423.
56. Hawke, J. P., Durborow, R. M., Thune, R. L., & Camus, A. C. (1998). Enteric septicemia of catfish. *SRAC publication* (477).
57. Henryon M., Berg P., Olesen N.J., Kjaer T.E., Slierendrecht W.J., Jokumsen A. and Lund I., 2005. Selective breeding provides an approach to increase resistance of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) to the diseases, enteric redmouth disease, rainbow trout fry syndrome, and viral haemorrhagic septicaemia. *Aquaculture* 250: 621-636.
58. Henryon M., Jokumsen A., Berg P., Lund I., Pedersen P.B., Olesen N.J. and Slierendrecht W.J., 2002. Genetic variance for growth rate, feed conversion efficiency, and disease resistance exists within a farmed population of rainbow trout. *Aquaculture* 209: 59-76.
59. Herlin M., Taggart J.B., McAndrew B.J. and Penman D.J., 2007. Parentage allocation in a complex situation: a large commercial Atlantic cod (*Gadus morhua*) mass spawning tank. *Aquaculture* 272: S195-S203.
60. Hiệp hội chế biến và xuất khẩu thủy sản Việt Nam (VASEP), 2020. Tổng quan ngành cá tra. Ngày truy cập: 03/01/2022 <<https://vasep.com.vn/san-pham-xuat-khau/ca-tra/tong-quan-nganh-ca-tra>>.
61. Hiệp hội chế biến và xuất khẩu thủy sản Việt Nam (VASEP), 2021. Xuất khẩu cá tra Việt Nam năm 2021 với nhiều cố gắng ngoài sức tưởng tượng. Ngày truy cập: 27/01/2022 <<https://vasep.com.vn/san-pham-xuat-khau/ca-tra/xuat-nhap-khau/xuat-khau-ca-tra-viet-nam-nam-2021-voi-nhieu-co-gang-ngoai-suc-tuong-tuong-23704.html>>.
62. Hogan Z.S. and May B.P., 2002. Twenty-seven new microsatellites for the migratory Asian catfish family Pangasiidae. *Molecular Ecology Notes* 2: pp. 38 - 41.
63. Hrubec C.T., Cardinale J.L. and Smith S.A., 2000. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Veterinary Clinical Pathology* 29(1): 7-12
64. Huang Y.C., Yin Z.X., Weng S.P., He J.G. and Li S.D., 2012. Selective breeding and preliminary commercial performance of *Penaeus vannamei* for resistance to white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture* 364: 111-117.
65. Jerry D. R., Preston N. P., Crocos P. J., Keys S., Meadows J. R. S. and Li Y. T., 2004. Parentage determination of Kuruma shrimp *Penaeus (Marsupenaeus japonicus)* using microsatellite markers. *Aquaculture* 235: 237 – 247.
66. Jones A.G., Small C.M., Paczolt K.A. and Ratterman N.L., 2010. A practical guide to methods of parentage analysis. *Molecular Ecology Resources* 10(1): 6-30.
67. Jones O. R. and Wang J., 2010. COLONY: A program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources* 10: 551–555.
68. Kause A., Ritola O., Paananen T., Mäntysaari E. and Eskelinen U., 2002. Coupling body weight and its composition: a quantitative genetic analysis in rainbow trout. *Aquaculture* 211 (1-4): 65-79.

69. Khaw H.L., Ponzoni R.W. and Danting M.J.C., 2008. Estimation of genetic change in the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by comparing contemporary progeny produced by males born in 1991 or in 2003. *Aquaculture* 275: 64-69.
70. Kim O.T.P., Nguyen P.T., Shoguchi E., Hisata K., Vo T.T.B., Inoue J., Shinzato C., Le B.T.N., Nishitsuji K., Kanda M., Nguyen V.H., Nong H.V. and Satoh N., 2018. A draft genome of the striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*, for comparative analysis of genes relevant to development and a resource for aquaculture improvement. *BMC Genomics* 19 (1): 1-16.
71. Kjøglum S., Henryon M., Aasmundstad T. and Korsgaard I., 2008. Selective breeding can increase resistance of Atlantic salmon to furunculosis, infectious salmon anaemia and infectious pancreatic necrosis. *Aquaculture Research* 39: 498-505.
72. Kolstad K., Thorland I. and Refstie T., 2006. Body weight, sexual maturity, and spinal deformity in strains and families of Atlantic cod (*Gadus morhua*) at two years of age at different locations along the Norwegian coast. *ICES Journal of Marine Science* 63 (2): 246-252.
73. Kuthu Z.H., Javed K., Awan K., Ahmad N. and Ahad A. 2017. A Study on Phenotypic and Genetic Correlations between Birth Weight and other Growth Traits in Teddy Goat. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research* 5 (5): 00158.
74. Lafarga-de la Cruz F., Aguilar-Espinoza A. and Gallardo-Escárate C., 2015. Parentage assignment in hybrid abalones (*Haliotis rufescens* × *Haliotis discus hannai*) based on microsatellite ADN markers. *Aquaculture Research* 46 (1): 216-225.
75. Lê Đức Liêm, Bùi Đức Hồng, Phan Thị Thu, Nguyễn Phương Thảo và Huỳnh Kim Anh, 2017. Báo cáo tổng kết nhiệm vụ “Kiểm tra chất lượng đàn cá tra bố mẹ chọn giống”. Bộ NNPTNT, 57 trang.
76. Lê Hồng Phước, 2013. Báo cáo tổng hợp kết quả khoa học công nghệ đề tài cấp Nhà nước “Nâng cao hiệu quả sử dụng vaccine bất hoạt thông qua sốc nhiệt protein trong vaccine”. Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II, 165 trang.
77. Lê Minh Khôi, Từ Thanh Dung, Bùi Thị Bích Hằng, Eng Khuan Seng, Seah Keng Hian, Trần Thị Tuyết Hoa và Đặng Thuỳ Mai Thy, 2021. Đánh giá hiệu quả miễn dịch của vaccine phòng bệnh xuất huyết do vi khuẩn aeromonas hydrophila trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ* 57 (3B): 181-190.
78. Lê Quốc Việt, Trần Ngọc Hải và Nguyễn Anh Tuấn, 2010. Ảnh hưởng mật độ ương và thức ăn có hàm lượng protein khác nhau lên sự tăng trưởng và tỷ lệ sống của cá đối (*Liza subviridis*) từ giai đoạn cá hương lên giống. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ* 15a: 189-197.
79. Le T.C. and Cheong F., 2010. Perceptions of risk and risk management in Vietnamese catfish farming: An empirical study. *Aquaculture Economics and Management* 14: 282-314.
80. Lê Văn Dân và Lê Tiến Hữu, 2017. Sinh sản nhân tạo cá lăng chấm (*Hemibagrus Guttatus* Lacépède, 1803) tại Quảng Bình. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* 126 (3C): 69-76.
81. Leeds T.D., Silverstein J.T., Weber G.M., Vallejo R.L., Palti Y., Rexroad C.E., Evenhuis J., Hadidi S., Welch T.J. and Wiens G.D., 2010. Response to selection for bacterial cold water disease resistance in rainbow trout. *Journal of Animal Science* 88: 1936-1946.
82. Li R., Qi L. and Yu R., 2009. Parentage determination and effective population size estimation in mass spawning pacific oyster, *Crassostrea gigas*, based on microsatellite analysis. *Journal of the World Aquaculture Society* 40(5): 667-677.
83. Liu S., Palti Y., Gao G. and Rexroad C. E., 2016. Development and validation of a SNP panel for parentage assignment in rainbow trout. *Aquaculture* 452: 178-182.

84. Liu Z., Cao J., Lu M., Gao F., Ke X., Wang M. and Yi M., 2021. Establishment and application of a microsatellite-based parentage identification method for *Oreochromis niloticus*, *O. aureus*, and *O. niloticus* × *O. aureus*. *Journal of Applied Ichthyology* 37 (1): 83-88.
85. Luan T.D., Olesen I., Ødegård J., Kolstad K. and Dan N.C., 2008. Genotype by environment interaction for harvest body weight and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in brackish and freshwater ponds. In *8<sup>th</sup> International Symposium on Tilapia in Aquaculture*.
86. Lý Thị Thanh Loan, Võ Hồng Phượng, Lê Hữu Tài, Mã Tú Lan, Nguyễn Diễm Thu và Đoàn Văn Cường, 2009. Báo cáo sơ kết đề tài “Nghiên cứu bệnh trắng mang, trắng gan trên cá Tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) và biện pháp phòng trị, 106 trang.
87. Magnadottir B., 2010. Immunological control of fish diseases. *Marine Biotechnology* 12: 361-379.
88. Mahapatra K.D., Gjerde B., Reddy P.V.G.K., Sahoo M., Jana R.K., Saha J.N. and Rye M., 2008b. Tagging: on the use of passive integrated transponder (PIT) tags for the identification of fish. *Aquaculture Research* 32 (1): 47-50.
89. Mahapatra K.D., Gjerde B., Sahoo P.K., Saha J.N., Barat, A., Sahoo M., Mohanty B.R., Ødegård J., Rye M., Salte R., 2008a. Genetic variations in survival of rohu carp (*Labeo rohita*, Hamilton) after *Aeromonas hydrophila* infection in challenge tests. *Aquaculture* 279: 29-34.
90. Marshall T.C., Slate J., Kruuk L.E.B. and Pemberton J.M., 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7 (5): 639–655.
91. Neira R., 2010. *Breeding in aquaculture species: genetic improvement programs in developing countries*. Proceedings of the 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production.
92. Nguyễn Công Dân, Trần Đình Luân, Phan Minh Quý và Nguyễn Thị Hoa, 2003. Chọn giống cá rô phi dòng GIFT nhằm nâng cao sức tăng trưởng và khả năng chịu mặn. Trong *Tuyển tập Báo cáo khoa học và nuôi trồng thủy sản*, Hội thảo khoa học toàn quốc lần thứ hai tại Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I: 133-139.
93. Nguyễn Hữu Hùng, 2019. *Nghiên cứu đa dạng di truyền và các thông số di truyền theo tính trạng tăng trưởng phục vụ chọn giống tôm sú (Penaeus Monodon Fabricius, 1798)*. Luận án Tiến sĩ. Trường Đại học Nha Trang, 133 trang.
94. Nguyễn Hữu Ninh và Lưu Thị Hà Giang, 2012. Nghiên cứu xác định đa dạng di truyền và huyết thống cá tra (*Pangasius hypophthalmus*) bằng chỉ thị microsatellite. Bài báo khoa học, Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I, 10 trang.
95. Nguyễn Quốc Thịnh, Trần Minh Phú, Huỳnh Sô Ni, S. Quennery, Đỗ Thị Thanh Hương, Nguyễn Thanh Phương, P. Kestemont và M. L. Scippo, 2014. Tình hình sử dụng thuốc hóa chất trong mô hình lúa-cá kết hợp, cá tra ao đất và cá điêu hồng trong lồng bè ở Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. Số chuyên đề Thủy sản, 278-283.
96. Nguyễn Thị Hồng, 2014. *Kỹ thuật nuôi cá tra và cá ba sa trong bè*. Nhà xuất bản Thanh Hóa. 105 trang
97. Nguyễn Thị Ngọc Huyền và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2020. Đặc điểm bệnh học của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh gan thận mù trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) và cá điêu hồng (*Oreochromis* sp.). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ* 56 (1): 52-63
98. Nguyễn Thị Thúy Liễu, Bùi Thị Bích Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2011. Tìm hiểu sự biến động của các yếu tố miễn dịch không đặc hiệu trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) nhiễm vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, (17a): 20-29.



99. Nguyễn Thiện Nam, Phạm Thanh Hương, Trần Duy Phương và Từ Thanh Dung, 2010. Nghiên cứu sự đa kháng thuốc của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 14b: 200-210.
100. Nguyen V.T., Tran P.H., Nguyen K.T., Nguyen N.T.K and Nguyen N.H., 2019a. Should only females of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* be selected in genetic improvement programmes?. *Aquaculture Research* (00): 1-7.
101. Nguyen V.T., Nguyen S.V., Trinh T.Q., Nguyen D. H., Nguyen D.T. and Nguyen N.H., 2019b. Breeding for improved resistance to *Edwardsiella ictaluri* in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*): Quantitative genetic parameters. *Journal of Fish Diseases* (42): 1409-1417.
102. Nguyen V.T., Nguyen S.V., Tran P.H., Nguyen V.T. and Nguyen N.H., 2019c. Genetic evaluation of a 15-year selection program for high growth in striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus*. *Aquaculture* (509): 221-226.
103. Nguyễn Văn Hào, 2016. Ứng dụng di truyền số lượng và di truyền phân tử để tạo vật liệu ban đầu cho chọn giống tôm sú theo tính trạng tăng trưởng. Báo cáo tổng kết đề tài cấp nhà nước, 289 trang.
104. Nguyễn Văn Huy, Nguyễn Tử Minh và Nguyễn Khoa Huy Sơn, 2019. Nuôi vỗ thành thực và ảnh hưởng của liều lượng hormone HCG lên sinh sản của cá bống bớp (*Bostrichthys sinensis* Lacepède, 1801). *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* 128 (3A): 15–25.
105. Nguyễn Văn Sáng, Nguyễn Minh Thành, Nguyễn Hoàng Thông, Trần Hoàng Gia Linh, Lê Hoàng Khôi Nguyên và Nguyễn Hồng Lộc, 2021. Đánh giá đa dạng di truyền các quần thể cá Tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) bằng 20 chỉ thị phân tử microsatellite mới phát triển. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam* 63 (7): 37 – 41.
106. Nguyễn Văn Sáng, Nguyễn Minh Thành, Võ Hồng Lộc, Nguyễn Hoàng Thông và Lê Hoàng Khôi Nguyên, 2020. Kết quả bước đầu phát triển bộ chỉ thị microsatellite mới từ hệ gen cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) bằng công cụ tin sinh học, *Tạp chí Nghề cá sông Cửu Long*, 18: 14-22.
107. Nguyễn Văn Sáng, Nguyễn Thế Vương, Nguyễn Thị Đang, Trịnh Quốc Trọng, Bùi Thị Liên Hà, Nguyễn Thanh Vũ, Nguyễn Huỳnh Duy, Nguyễn Thị Hồng Nhung, Ngô Hồng Ngân và Trần Hữu Phúc , 2016. Báo cáo khoa học tổng kết đề tài cấp quốc gia "Ứng dụng di truyền phân tử và di truyền số lượng chọn giống nâng cao tốc độ sinh trưởng cá Tra (*Pangasianodon hypophthalmus*)". Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II, 143 trang.
108. Nguyễn Văn Sáng, Nguyễn Văn Hào, Nguyễn Quyết Tâm, Nguyễn Thị Đang, Nguyễn Thế Vương và Bùi Thị Liên Hà, 2015. Chọn giống cá tra theo tính trạng khối lượng thu hoạch. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, trang 147-156.
109. Nguyễn Văn Sáng, Nguyễn Văn Hào, Phạm Đình Khôi, Lê Hồng Phước, Ngô Hồng Ngân, Nguyễn Thế Vương, Nguyễn Thị Đang, Nguyễn Quyết Tâm, Trịnh Quang Sơn, Bùi Thị Liên Hà và Nguyễn Điền, 2013. Đánh giá hiệu quả chọn giống cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) về tăng trưởng và tỉ lệ phi lê. Báo cáo khoa học tổng kết đề tài Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II, 90 trang.
110. Nguyễn Văn Sáng, Nguyễn Văn Hào, Phạm Đình Khôi, Trịnh Quốc Trọng, Ngô Hồng Ngân, Nguyễn Thế Vương, Nguyễn Thị Đang, Nguyễn Quyết Tâm và Trịnh Quang Sơn, 2012. Chuyển giao công nghệ sản xuất giống cá tra có chất lượng di truyền cao về tính trạng tăng trưởng cho các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long. Báo cáo khoa học tổng kết dự án Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II, 70 trang.
111. Nguyễn Văn Sáng, Nguyễn Văn Hào, Trần Đình Trọng, Nguyễn Công Dân, Quyền Đình Thi, Nguyễn Thị Diệu Thúy, Đinh Hùng, Phạm Đình Khôi, Bùi Thị Liên Hà, Nguyễn Điền, Nguyễn

Quyết Tâm, Ngô Hồng Ngân và Trịnh Quang Sơn, 2009. Chọn giống cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) nhằm tăng tỉ lệ phi lê bằng chọn lọc gia đình. Báo cáo tổng hợp đề tài khoa học công nghệ cấp Bộ, 84 trang.

112. Nguyễn Văn Sáng, Trịnh Công Thành, Trần Đình Trọng, Nguyễn Văn Hào, Phạm Đình Khôi, Lê Hồng Phước, Nguyễn Điền, Nguyễn Quyết Tâm, Ngô Hồng Ngân, Nguyễn Thị Đang, Nguyễn Thế Vương và Trịnh Quốc Trọng, 2011a. Đánh giá hiệu quả chọn giống cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) về tăng trưởng và tỉ lệ phi lê. Báo cáo khoa học, 29 trang.

113. Nguyễn Văn Sáng, Phạm Văn Khánh, Phạm Đình Khôi, Phan Thanh Lâm, Nguyễn Quyết Tâm, Nguyễn Thị Đang, Đặng Minh Phương, Trần Anh Dũng và Nguyễn Văn Ngô, 2011b. Báo cáo tổng kết khoa học đề tài “Đánh giá hiện trạng sản xuất giống và xây dựng các giải pháp quản lý nhằm nâng cao chất lượng giống cá tra ở Đồng bằng sông Cửu Long”. Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 2, 105 trang.

114. Nguyễn Văn Tuấn, 2015. *Phân tích dữ liệu với R*. Nhà xuất bản Tổng hợp, tr.360-393.

115. Nogueira F., Amaral M., Malcher G., Reis N., Melo M. A., Sampaio I., Rêgo P. S. and Araripe J., 2020. The arapaima, an emblematic fishery resource: Genetic diversity and structure reveal the presence of an isolated population in Amapá. *Hydrobiologia* 847(15): 3169-3183.

116. Nordmo R., Ramstad A. and Riseth J.H., 1998. Induction of experimental furunculosis in heterogenous test populations of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) by use of a cohabitation method. *Aquaculture* 162: 11-21.

117. Ødegård J., Baranski M., Gjerde B. and Gjedrem T., 2011a. Methodology for genetic evaluation of disease resistance in aquaculture species: challenges and future prospects. *Aquaculture Research* (42): 103-114.

118. Ødegård J., Kettunen Præbel A. and Sommer A. I., 2010. Heritability of resistance to viral nervous necrosis in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture* (300): 59-64 <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.01.006>>.

119. Ødegård J., Madsen P., Labouriau R., Gjerde B. and Meuwissen T.H.E., 2011b. A sequential threshold cure model for genetic analysis of time-to-event data. *Journal of Animal Science* (89): 943-950.

120. Ødegård J., Olesen I., Gjerde B. and Klemetsdal G., 2007a. Evaluation of statistical models for genetic analysis of challenge-test data on ISA resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Prediction of progeny survival. *Aquaculture* 266: 70-76.

121. Ødegård J., Olesen I., Gjerde B. and Klemetsdal G., 2007b. Positive genetic correlation between resistance to bacterial (furunculosis) and viral (infectious salmon anaemia) diseases in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 271: 173-177.

122. Panangala V.S., Shoemaker C.A., Van Santen V.L. and Dybvig K., 2007. Multiplex PCR for simultaneous detection of 3 bacterial *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella ictaluri* and *Aeromonas hydrophila*. *Diseases of Aquatic Organisms* 74 (3): 199-208.

123. Paredes M., Gonzalez K., Figueroa J. and Montiel-Eulefi E., 2013. Immunomodulatory effect of prolactin on Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophage function. *Fish Physiology and Biochemistry* 39 (5): 1215-1221.

124. Park Y., Abihssira-García I. S., Thalmann S., Wiegertjes G. F., Barreda D. R., Olsvik P. A. and Kiron V., 2020. Imaging Flow Cytometry Protocols for Examining Phagocytosis of Microplastics and Bioparticles by Immune Cells of Aquatic Animals. *Frontiers in Immunology* (1): 1 - 11.

125. Perry G.M.L., Tarte P., Croisetie're S., Belhumeur P. and Bernatchez L., 2004. Genetic variance and covariance for 0+ brook charr (*Salvelinus fontinalis*) weight and survival time of furunculosis (*Aeromonas salmonicida*) exposure. *Aquaculture* 235: 263-271.

126. Petersen E.F., 2003. *Monoclonal antibodies to leucocytes and immunoglobulin from Atlantic salmon (Salmo salar L.) - Production, characterisation and application*. Doctor Science Thesis, Department of Fisheries and Marine Biology, University of Bergen.
127. Phạm Đình Khôi, Nguyễn Văn Hào, Nguyễn Văn Sáng, Nguyễn Quyết Tâm, Ngô Hồng Ngân, Nguyễn Thanh Vũ, Nguyễn Thị Hiền, Nguyễn Diễm Thư và Hà Thị Ngọc Nga, 2010. Báo cáo sơ kết đề tài “Đánh giá tính khả thi của việc chọn giống cá tra trên tính trạng kháng bệnh gan-thận mủ”. Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II, 15 trang.
128. Pham K.D., Ødegård J., Nguyen S.V., Gjøsøn H.M and Klemetsdal G., 2020a. Genetic analysis of resistance in Mekong striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) to bacillary necrosis caused by *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Fish Diseases* (00): 1-10.
129. Pham K.D., Ødegård J., Nguyen S.V., Gjøsøn M.H and Klemetsdal G., 2020b. Genetic correlations between challenge tested susceptibility to bacillary necrosis, caused by *Edwardsiella ictaluri*, and growth performance tested survival and harvest body weight in Mekong striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Journal of Fish Diseases* (01): 1-9.
130. Pham K.D., Ødegård J., Nguyen S.V, Gjøsøn H. M. and Klemetsdal G., 2020c. Genetic analysis of resistance to bacillary necrosis caused by *Edwardsiella ictaluri* in Mekong striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Journal of Fish Diseases* (00), 1-10.
131. Phạm Quốc Nguyên, Lê Hồng Y, Nguyễn Văn Công và Trương Quốc Phú, 2014. Diễn biến một số chỉ tiêu chất lượng nước trong ao nuôi cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) thâm canh, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, Phần A: Khoa học Tự nhiên, Công nghệ và Môi trường* 34: 128-136.
132. Phạm Văn Khánh, 1996. Sinh sản nhân tạo và nuôi cá tra (*Pangasius hypophthalmus* (Sauvage 1878)) ở Đồng bằng sông Cửu Long, Luận án phó tiến sĩ khoa học nông nghiệp. Trường Đại học Thủy sản Nha Trang, 203 trang.
133. Phạm Thế Hiền, 2009. *Kỹ thuật sinh sản nhân tạo cá tra (Pangasianodon hypophthalmus) ở trung tâm giống CASEMAX – thành phố Cần Thơ*. Luận văn tốt nghiệp đại học ngành Bệnh học Thủy sản. Trường Đại học Cần Thơ
134. Phan L.T., Bui T.M., Nguyen T.T.T., Gooley G.J., Ingram B.A., Nguyen H.V., Nguyen P.T. and De Silva S.S., 2009. Current status of farming practices of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* in the Mekong Delta, Vietnam. *Aquaculture*, 296: 227-236.
135. Phan T.T., Nguyen A.T.T., Nguyen A.V.N., Nguyen H.T., Ho T.T., Pho P.S., Mai B.T. and Nguyen S.T., 2018. Neutrophil to lymphocyte with monocyte to lymphocyte ratio and white blood cell count in prediction of lung cancer. *Australasian Medical Journal*, 11 (4): 231-236.
136. Phan Vĩnh Thịnh, Nguyễn Thanh Phương, Đỗ Thị Thanh Hương và Nguyễn Trọng Hồng Phúc, 2014. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sinh lý và tăng trưởng của cá tra giống (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ* (1): 292 - 301.
137. Pirarat N., Ooi E. L., Thompson K. D., Thinh N. H., Maita M. and Katagiri T., 2016. Examination of entry portal and pathogenesis of *Edwardsiella ictaluri* infection in striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*. *Aquaculture* 464: 279-285.
138. Prchal M., Zhao J., Gela D., Kaspar J., Lepic J., Kaspar V. and Kocour M., 2021. Simplified method for genetic slaughter yields improvement in common carp under European pond conditions. *Aquaculture* 21, 100832.
139. Reed L.J. and Muench H., 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoint. *American Journal of Hygiene* 27: 493-497.
140. Rye M., Lillevik K. M. and Gjerde B., 1990. Survival in early life of Atlantic salmon and rainbow trout: estimates of heritabilities and genetic correlations. *Aquaculture* 89: 209-216.

141. Saeki I., Hirao A. S. and Kenta T., 2015. Development and evaluation of microsatellite markers for *Acer miyabei* (Sapindaceae), a threatened maple species in East Asia. *Applications in plant sciences* 3(6): 1500020.
142. Sahoo P. K., Das S., Mahapatra K. D., Saha J. N., Baranski M., Ødegård J. and Robinson N., 2013. Characterization of the ceruloplasmin gene and its potential role as an indirect marker for selection to *Aeromonas hydrophila* resistance in rohu, *Labeo rohita*. *Fish & shellfish immunology* 34 (5): 325-1334.
143. Sahoo P.K., Rauta P.R., Mohanty B.R., Mahapatra K.D., Saha J.N., Rye M. and Eknath A.E., 2011. Selection for improved resistance to *Aeromonas hydrophila* in Indian major carp *Labeo rohita*: Survival and innate immune responses in first generation of resistant and susceptible lines. *Fish and Shellfish Immunology* 31 (3): 432-438.
144. Salte R., Bentsen H. B., Moen T., Tripathy S., Bakke T. A., Ødegård J., Omholt S. and Hansen L.P., 2010. Prospects for a genetic management strategy to control *Gyrodactylus salaris* infection in wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) stocks. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 67: 121-129.
145. Shoemaker, C. A., Klesius, P. H. and Plumb, J. A. (1997): Killing of *Edwardsiella ictaluri* by macrophages from channel catfish immune and susceptible to enteric septicemia of catfish. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 58(2), 181–190.
146. Shoemaker, Lozano C.A., LaFrentz C.A., Garcia B.R., Soto J.C., Xu E. and Rye M., 2017. Additive genetic variation in resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Streptococcus iniae* and *S. agalactiae capsular type Ib*: Is genetic resistance correlated. *Aquaculture* 468: 193-196.
147. Storset A., Strand C., Wetten M., Kjøglum S. and Ramstad A., 2007. Response to selection for resistance against infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 272: 62-68.
148. Taylor R.S., Kube P.D., Muller W.J. and Elliott N.G., 2009. Genetic variation of gross gill pathology and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during natural amoebic gill disease challenge. *Aquaculture* 294: 172-179.
149. Thanh M.N., Le Nguyen T.P., Nguyen T.L. and Duong AL., 2019. Parentage assignment in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) based on microsatellite markers. *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh* 71, 9pp.
150. Thrusfield M., Christley R., Brown H., Diggle P.J., French N., Howe K., Kelly L., O'Connor A., Sargeant J. and Wood H., 2018. *Veterinary Epidemiology*. Veterinary Clinical Sciences, University of Edinburgh, pp. 422-423.
151. Thủ tướng Chính phủ, 2012. Quyết định Số: 439/QĐ-TTg về việc phê duyệt Danh mục sản phẩm quốc gia thực hiện từ năm 2012 thuộc Chương trình phát triển sản phẩm quốc gia đến năm 2020.
152. Tổng cục Thủy sản, 2014. QCVN 02 - 20: 2014/BNNPTNT về quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về cơ sở nuôi cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus* Sauvage, 1878) trong ao - điều kiện bảo đảm vệ sinh thú y, bảo vệ môi trường và an toàn thực phẩm.
153. Trần Đình Trọng và Đặng Hữu Lanh, 2005. *Cơ sở di truyền và chọn giống cá*. Trường Đại học Thủy sản Nha Trang, Tp. Nha Trang Việt Nam, 200 trang.
154. Trần Hạnh Triết, Vũ Thị Thanh Hương, Bùi Thị Thanh Tịnh, Lê Văn Hậu, Trần Thanh Tiếng và Nguyễn Quốc Bình, 2014. So sánh khả năng xâm nhiễm của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* và *Aeromonas hydrophila* trên cá tra (*Pangasius hypophthalmus*). *Tạp chí sinh học* 36(1se): 1-7.
155. Trần Mai Thiên, 1998. Nghiên Cứu nâng cao chất lượng di truyền cá nuôi ở Miền Bắc, Việt Nam Trong *Báo cáo tóm tắt hội thảo khoa học toàn quốc về Nuôi trồng Thủy Sản, Bộ Thủy Sản*, 98 trang.

156. Trần Ngọc Hải và Phùng Thị Tuyền, 2013. Đánh giá mức độ đa dạng di truyền loài Du sam đá vôi (*Keteleeria davidiana* (Bertrand) Beissn.) bằng kỹ thuật Rapt. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm Nghiệp* 1: 22-27.
157. Tran T.T.H., Boerlage A.S., Tran T.M.D., Dang T.M.T., Nguyen T.T.H., Humphry R.W. and Nguyen T.P., 2021. Nursing stages of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in Vietnam: Pathogens, diseases and husbandry practices. *Aquaculture* 533: 736-114 <<https://doi.org/10.1016/J.Aquaculture.2020.736114>>.
158. Trần Thị Phương Dung và Nguyễn Hồ Phương Uyên, 2019. Khảo sát ảnh hưởng của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* lên các chỉ tiêu huyết học của cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Trong *Báo cáo khoa học về nghiên cứu và giảng dạy sinh học ở Việt Nam - Hội nghị khoa học quốc gia lần thứ 4*. 670-679, DOI: 10.15625/vap.2020.00083.
159. Trần Trung Giang, Âu Văn Hóa, Trương Quốc Phú, Huỳnh Trường Giang và Vũ Ngọc Út, 2021. Hàm lượng dinh dưỡng môi trường nước tự nhiên khu vực nuôi cá tra tỉnh An Giang. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ* 57 (3): 207-218.
160. Trịnh Quốc Trọng, Nguyễn Huỳnh Duy và Nguyễn Thanh Vũ, 2016a. Các thông số di truyền của tính trạng kháng bệnh gan thận mù trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí Nông nghiệp-Phát triển Nông thôn* 23: 84 - 90.
161. Trịnh Quốc Trọng, Nguyễn Thanh Vũ, Ngô Hồng Ngân, Nguyễn Huỳnh Duy, Nguyễn Thị Đăng, Trần Hữu Phúc và Phạm Đăng Khoa, 2016b. Chọn giống cá tra kháng bệnh gan thận mù Trong *Báo cáo tổng kết đề tài trọng điểm cấp Nhà nước thuộc Chương trình KC06, Bộ Khoa học Công nghệ*, 72 trang.
162. Trinh T.Q., van Bers N., Crooijmans R., Dibbits B. and Komen H., 2013b. A comparison of microsatellites and SNPs in parental assignment in the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): The power of exclusion. *Aquaculture* 388-391 (1): 14-23.
163. Trinh T.T., Nguyen H.H., Nguyen N.H., Knibb W. and Nguyen N.H., 2019. Genetic variation in disease resistance against white spot syndrome virus (WSSV) in *liptopenaeus vannamei*. *Frontiers in Genetics* 10 (MAR): 264.
164. Từ Thanh Dung, 2011. Vaccine ALPHAJECT® *Panga 1* phòng bệnh do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) trong ao nuôi thương phẩm. Báo cáo thực nghiệm (CAT 002.09 FT (PHARMAQ AS)).
165. Từ Thanh Dung, Đặng Thị Hoàng Oanh và Phạm Minh Đức, 2015. Bệnh và quản lý dịch bệnh trong nuôi cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Trích trong: Nguyễn Thanh Phương và Nguyễn Anh Tuấn (chủ biên). *Nuôi cá tra (Pangasianodon hypophthalmus) ở Đồng bằng sông Cửu Long: Thành công và thách thức trong phát triển bền vững*. Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ, trang 156-189.
166. Từ Thanh Dung, F. Haesebrouck, Nguyễn Anh Tuấn, P. Sorgeloos, M. Baele và A. Decostere, 2010. Hiện tượng kháng thuốc kháng sinh trên vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh gan, thận mù trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) ở Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ* 15a: 162-171.
167. Từ Thanh Dung, Trần Hoa Cúc, Nguyễn Hoàng Nhật Uyên và Mã Lê Diễm Trang, 2013. Khả năng đáp ứng miễn dịch của cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) chống lại *Edwardsiella ictaluri*. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ. Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học* (26): 269-276.
168. Uribe T.C., Folch H., Enriquez R. and Moran G., 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinarni Medicina.*, 56 (10): 486-503.

169. Van Oosterhout C., Hutchinson W. F., Wills D. P. and Shipley P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4 (3): 535-538.
170. Vandeputte M., Rossignol M.N. and Pincent C., 2011. From theory to practice: Empirical evaluation of the assignment power of marker sets for pedigree analysis in fish breeding. *Aquaculture* 314 (1-4): 80-86.
171. Volckaert F.A.M., Hellemans B. and Pouyaud L., 1999. Nine polymorphic microsatellite markers in the SE Asian catfishes *Pangasius hypophthalmus* and *Clarias batrachus*. *Animal Genetics* 30 (5): 383-384.
172. Wahlroos H., Dolby A., Kause A., Ritola O., Ruohonen K. and Houlihan D., 2003. Genetic parameters for growth and food intake in rainbow trout. *International Association for Genetics in Aquaculture VIII*, Chile.
173. Wang J., 2004. Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. *Genetics* 166(4): 1963-1979. <<https://doi.org/10.1093/genetics/166.4.1963>>.
174. Wetten M., Aasmundstad T., Kjøglum S. and Storset A., 2007. Genetic analysis of resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 272: 111-117.
175. Wiegertjes G.F., Stet R.M., Parmentier H.K. and Muiswinkel W.B., 1996. Immunogenetics of disease resistance in fish: A comparative approach. *Developmental and Comparative Immunology* 20 (6): 365-381.
176. Wonmongkol P., Sukhavachana S., Ampolsak K., Srisapomee P., Suwanasopee T. and Poompuang S., 2018. Genetic parameters for resistance against *Flavobacterium columnare* in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Journal of Fish Diseases* 41: 321-328.
177. Xiong X.M, Chen Y.L, Liu L.F., Wang W., Robinson N.A. and Gao Z.X., 2017. Estimation of genetic parameters for resistance to *Aeromonas hydrophila* in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Aquaculture* 479: 768-773.
178. Yáñez J.M., Bangera R., Lhorente J.P., Barría A., Oyarzún M., Neira R. and Newman S., 2016. Negative genetic correlation between resistance against *Piscirickettsia salmonis* and harvest weight in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 459: 8-13.
179. Yue G.H. and Xia J.H., 2014. Practical Considerations of Molecular Parentage Analysis in Fish. *Journal of the World Aquaculture Society* 45(2): 89-103.
180. Zane L., Bargelloni L. and Patarnello T., 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11(1): 1-16.
181. Ziegler J. S., Su Y., Corcoran K. P., Nie L., Mayrand P. E., Hoff L. B., McBride L.S., Kronick M.N. and Diehl, S. R., 1992. Application of automated DNA sizing technology for genotyping microsatellite loci. *Genomics* 14 (4): 1026-1031.

## DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1/ Trần Thị Phương Dung, Trần Hữu Phúc, Nguyễn Thanh Vũ, Võ Hồng Phượng, Nguyễn Văn Sáng, 2020. Ước tính các thông số di truyền của tính trạng kháng bệnh gan thận mỡ của cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) ở giai đoạn cá hương. *Tạp chí Nghề cá sông Cửu Long* 18: 3-13, ISSN 1859-1159.

2/ Trần Thị Phương Dung, Trần Hữu Phúc, Nguyễn Thanh Vũ, Võ Hồng Phượng, Huỳnh Thị Bích Liên, Nguyễn Văn Sáng, 2021. Các thông số di truyền ước tính cho tính trạng kháng bệnh gan thận mỡ trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển* 20(1): 39-49, pISSN 2615-9503, eISSN 2615-949X. DOI: 10.52997/jad.6.01.2021.

3/ Trần Thị Phương Dung, Nguyễn Văn Sáng, Trần Hữu Phúc, Võ Hồng Phượng, Huỳnh Thị Trúc Quân, Nguyễn Hữu Thịnh, 2021. Đánh giá đáp ứng miễn dịch của đại thực bào trong các gia đình cá tra chọn giống (*Pangasianodon hypophthalmus*) kháng bệnh gan thận mỡ. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển* 20(5) : 28-38, pISSN 2615-9503, eISSN 2615-949X. DOI: 10.52997/jad.4.05.2021.

4/Trần Thị Phương Dung, Nguyễn Hồng Lộc, Nguyễn Hoàng Thông, Lê Hoàng Khôi Nguyên, Nguyễn Văn Sáng, 2022. Ứng dụng chỉ thị phân tử Microsatellite trong truy xuất phả hệ quần đàn cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) chọn giống. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Việt Nam* 64(2): 48-53, ISSN 1859-4794, DOI: 10.31276/VJST.64(2).48-53.

5/ Trần Thị Phương Dung, Nguyễn Văn Sáng, Trần Hữu Phúc, Võ Hồng Phượng, Huỳnh Thị Trúc Quân, Nguyễn Hữu Thịnh, 2022. Đánh giá đáp ứng miễn dịch của các gia đình cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) kháng bệnh gan thận mỡ và xác định các chỉ thị miễn dịch phục vụ chọn giống. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Việt Nam*, 64(5): 65-69, ISSN 1859-4794, DOI: 10.31276/VJST.64(5).65-69.

# PHỤ LỤC



**Phụ lục 1.** Thông tin thông số di truyền của tính trạng kháng bệnh gan thận mỡ trên quần thể G0

Chỉ tiêu	$\sigma_A^2$	$\sigma_E^2$	$\sigma_P^2$	$h^2 \pm se$	R_ước tính	Số lượng cá thể (cá)	Số gia đình (gđ)
G0	0,082	0,276	0,364	0,37 $\pm$ 0,05	8,3%	830	145

$\sigma_A^2$  = phương sai di truyền cộng gộp,  $\sigma_E^2$  = phương sai của số dư,  $\sigma_P^2$  = phương sai kiểu hình,  $h^2$  = hệ số di truyền,  $se$  = sai số chuẩn,  $R$  = hiệu quả chọn lọc

**Phụ lục 2.** Danh sách cá bố mẹ G0 nuôi vỗ cho sinh sản G1

STT	ID	Giới tính	Nhóm cá	EBV	KL khi nuôi vỗ (kg)
1	0418F801E3	Cái	Chọn lọc	0,1076	7,7
2	0418CBCADE	Cái	Chọn lọc	0,02593	8,1
3	0418CBEC76	Đực	Chọn lọc	0,1572	8,1
4	0418CC14C3	Cái	Chọn lọc	0,02274	8,4
5	0418CBD653	Cái	Chọn lọc	0,1111	8,4
6	0418CBCF98	Cái	Chọn lọc	0,1199	8,8
...	.....	....	....	....	...
414	0418CC0FF8	Cái	Chọn lọc	0,2082	11,1
415	0418CC2628	Cái	Chọn lọc	0,1108	10,9
416	0418CBC281	Cái	Chọn lọc	0,2751	8,3
417	0418CBE77A	Cái	Chọn lọc	0,1984	10,1
418	0418CC0E75	Cái	Chọn lọc	0,1309	9,1
419	0418CC3F42	Cái	Chọn lọc	0,2968	6,9
420	0418C84B46	Cái	Chọn lọc	0,1558	10,1
421	0417BFA3F9	Cái	Đối chứng	-0,0002	9,1
422	0418CC020B	Cái	Chọn lọc	0,1438	8,7
423	0418CBFCAF	Cái	Chọn lọc	0,07925	8,5
424	0418CBBE51	Cái	Chọn lọc	0,04887	8,9
425	0418CC14FB	Cái	Đối chứng	0,00034	6,9

**Phụ lục 3.** Kiểm tra mức độ thành thực cá bố mẹ G0 – Phục vụ sinh sản tạo G1

STT	ID	Giới tính	Kiểm tra thành thực	Ngày kiểm tra
1	0418CC0D6D	Cái	Giai đoạn III	3/5/2019
2	0418CBD04E	Cái	Giai đoạn III	3/5/2019
3	0418C82C42	Cái	Giai đoạn IV	3/5/2019
4	0418CBF0C1	Cái	Giai đoạn IV	3/5/2019
5	0418F801E3	Cái	Giai đoạn IV	3/5/2019
6	0418C8109A	Cái	Giai đoạn IV	3/5/2019

7	0418CBC3D5	Cái	Giai đoạn IV	3/5/2019
8	0418CC0368	Cái	Giai đoạn IV	3/5/2019
9	0418CC0910	Cái	Giai đoạn IV	3/5/2019
10	0418CBE9A1	Cái	Giai đoạn IV	3/5/2019
11	0418CC0C6A	Cái	Giai đoạn III	3/5/2019
12	0418C81E04	Cái	Giai đoạn III	3/5/2019
13	0418CBD596	Cái	Giai đoạn IV	3/5/2019
14	0418CC1068	Cái	Giai đoạn III	3/5/2019
31	0418CBDED5	Đục	Có tinh	3/5/2019
32	0418CC2447	Đục	Có tinh	3/5/2019
33	0418C80AF9	Đục	Có tinh	3/5/2019
34	0418F7D460	Đục	Có tinh	3/5/2019
35	0418CC0BD4	Đục	Có tinh	3/5/2019
36	0418C82FE2	Đục	Có tinh	3/5/2019
....	.....	.....	.....	.....
19	0418CBFE31	Cái	Giai đoạn IV	2/7/2019
20	0418F7FC30	Cái	Giai đoạn IV	2/7/2019
21	0418C84B46	Cái	Giai đoạn IV	2/7/2019
22	0418CBBE51	Cái	Giai đoạn IV	2/7/2019
23	0418CBD439	Cái	Giai đoạn IV	2/7/2019
24	0418C80B95	Cái	Giai đoạn IV	2/7/2019
25	0418CBD653	Cái	Giai đoạn IV	2/7/2019
26	0418CC13D9	Cái	Giai đoạn IV	2/7/2019
27	0418CC10DC	Cái	Giai đoạn IV	2/7/2019
28	0418CC016B	Cái	Giai đoạn IV	2/7/2019
29	04179A0DA2	Cái	Giai đoạn IV	2/7/2019
30	0418CC07D7	Cái	Giai đoạn IV	2/7/2019
45	0418F809FD	Đục	Có tinh	2/7/2019
46	0418CBDA6A	Đục	Có tinh	2/7/2019
47	1000000985170001784539	Đục	Có tinh	2/7/2019
48	0418CBCC88	Đục	Có tinh	2/7/2019
52	0417BF819E	Đục	Có tinh	2/7/2019

**Phụ lục 4.** Tỷ lệ nở, tỷ lệ thụ tinh của các đợt sinh sản gia đình G1 từ bố mẹ G0

<b>Chỉ tiêu</b>	<b>Công thức</b>	<b>Tác giả</b>
Tỷ lệ cá bố mẹ thành thực (%)	$\frac{\text{Số cá thành thực (con)}}{\text{Số cá đưa vào nuôi vỗ (con)}} \times 100$	Lê Văn Dân và Lê Tiến Hữu (2017)
Tỷ lệ cá mẹ rụng trứng (%)	$\frac{\text{Số lượng cá cái rụng trứng (con)}}{\text{Số lượng cá cái đã tiêm chất kích thích sinh sản (con)}} \times 100$	Lê Văn Dân và Lê Tiến Hữu (2017)
Tỷ lệ trứng vượt đực (%)	$\frac{\text{Số trứng vượt đực (kg)}}{\text{Khối lượng cá cái rụng trứng (kg)}} \times 100$	Lê Văn Dân và Lê Tiến Hữu (2017)
Tỷ lệ thụ tinh của trứng (%)	$\frac{\text{Số trứng thụ tinh (trứng)}}{\text{Số trứng kiểm tra (trứng)}} \times 100$	Nguyễn Văn Huy và ctv. (2019)
Tỷ lệ nở (%)	$\frac{\text{Số trứng nở (trứng)}}{\text{Số trứng thụ tinh (trứng)}} \times 100$	Lê Văn Dân và Lê Tiến Hữu (2017)
Tỷ lệ sống cá bột lên cá hương (%)	$\frac{\text{Số cá hương (con)}}{\text{Số cá bột ương nuôi (con)}} \times 100$	Đỗ Thị Thanh Hương và ctv. (2020)
Tỷ lệ sống cá hương lên cá giống (%)	$\frac{\text{Số cá giống (con)}}{\text{Số cá hương ương nuôi (con)}} \times 100$	Lê Quốc Việt và ctv. (2010)

**Phụ lục 5.** Thông tin chi tiết về sinh sản, đánh dấu, cảm nhiễm và nuôi tăng trưởng các gia đình cá

<b>Chỉ tiêu</b>	<b>Cá hương<sup>1</sup></b>	<b>Cá giống<sup>1</sup></b>	<b>Cá giống<sup>2</sup></b>
<b>Sinh sản cá</b>			
- Ngày sinh sản	22/08/2019	22/08 – 09/10/2019	22/08 – 09/10/2019
<b>Đánh dấu cá</b>			
- Ngày ương đến kích cỡ cảm nhiễm đánh dấu (ngày)	27 - 28	123 - 167	141 - 184
- Số gia đình đánh dấu	33	130	130
- Số cá đánh dấu cho các thí nghiệm	-	8.207	5.838
<b>Thí nghiệm cảm nhiễm</b>			
- Số cá thí nghiệm	1.650	8.207	
- Thời điểm cảm nhiễm (ngày)	21	23	-
<b>Thí nghiệm nuôi tăng trưởng</b>			
- Số cá thí nghiệm			5.838
- Thời gian thu hoạch (ngày)	-	-	131 - 163

1: thí nghiệm cảm nhiễm; 2: thí nghiệm tăng trưởng

**Phụ lục 6.** Thông tin thu mẫu xét nghiệm bệnh của các gia đình cá trước và sau khi cảm nhiễm

STT	Ngày thu mẫu kiểm tra	Thời điểm lấy mẫu	ID Gia đình/mẫu kiểm tra	Biểu hiện cá khi lấy mẫu
<b>Cảm nhiễm cá hương</b>				
1	17/9/2019	Trước cảm nhiễm	607	0
2	17/9/2019	Trước cảm nhiễm	613	0
3	17/9/2019	Trước cảm nhiễm	574	0
4	17/9/2019	Trước cảm nhiễm	622	0
5	17/9/2019	Trước cảm nhiễm	612	0
6	17/9/2019	Trước cảm nhiễm	565	0
7	17/9/2019	Trước cảm nhiễm	586	0
8	17/9/2019	Trước cảm nhiễm	566	0
9	17/9/2019	Trước cảm nhiễm	600	0
10	17/9/2019	Trước cảm nhiễm	601	0
11	19/9/2019	Ngày 1	580	0
12	19/9/2019	Ngày 1	635	0
13	19/9/2019	Ngày 1	625	0
14	19/9/2019	Ngày 1	570	0
15	19/9/2019	Ngày 1	578	0
16	20/9/2019	Ngày 2	592	0
17	20/9/2019	Ngày 2	572	0
18	20/9/2019	Ngày 2	632	0
19	20/9/2019	Ngày 2	608	0
20	20/9/2019	Ngày 2	582	0
21	26/9/2019	Ngày 8	612	3
22	26/9/2019	Ngày 8	578	3
....	....	....	....	.....
24	26/9/2019	Ngày 8	566	3
25	26/9/2019	Ngày 8	580	4
<b>Cảm nhiễm cá giống</b>				
1	18/2/2020	Trước cảm nhiễm	100000098209106246354 5	0
2	18/2/2020	Trước cảm nhiễm	100000098209106246336 1	0
3	18/2/2020	Trước cảm nhiễm	100000098209106246421 5	0
4	18/2/2020	Trước cảm nhiễm	100000098209106246392 7	0
5	18/2/2020	Trước cảm nhiễm	100000098209106246470 6	0
6	18/2/2020	Trước cảm nhiễm	100000098209106246589 3	0
7	18/2/2020	Trước cảm nhiễm	100000098209106246589 5	0
8	18/2/2020	Trước cảm nhiễm	100000098209106246349 4	0

STT	Ngày thu mẫu kiểm tra	Thời điểm lấy mẫu	ID Gia đình/mẫu kiểm tra	Biểu hiện cá khi lấy mẫu
<b>Cảm nhiễm cá giống (tiếp theo)</b>				
45	18/2/2020	Trước cảm nhiễm	100000098209106246396 3	0
46	19/2/2020	Ngày 1	100000098209106246416 7	3
47	19/2/2020	Ngày 1	100000098209106246053 8	3
48	19/2/2020	Ngày 1	100000098209106246137 9	2
49	19/2/2020	Ngày 1	100000098209106246216 2	3
50	19/2/2020	Ngày 1	100000098209106246487 9	3
51	19/2/2020	Ngày 1	100000098209106246502 0	2
52	19/2/2020	Ngày 1	100000098209106246076 2	3
54	20/2/2020	Ngày 2	100000096500000012017 8	3
55	20/2/2020	Ngày 2	100000098209106246674 7	3
....	....	....	....	....
72	24/2/2020	Ngày 6	100000098209106246638 3	3
73	24/2/2020	Ngày 6	0418CC0D45	3
74	24/2/2020	Ngày 6	100000098209106246671 1	2
75	24/2/2020	Ngày 6	100000098209106246507 1	4
76	24/2/2020	Ngày 6	100000098209106246379 8	4
77	26/2/2020	Ngày 8	100000098209106246200 2	4
78	26/2/2020	Ngày 8	100000098209106246177 9	4
79	26/2/2020	Ngày 8	100000098209106246273 8	4
80	26/2/2020	Ngày 8	100000098209106246338 6	4
81	26/2/2020	Ngày 8	100000098209106246036 0	4
...	...	...	...	...
96	26/2/2020	Ngày 8	100000098209106246494 7	4
97	3/3/2020	Ngày 13	100000098209106224301 7	2
98	3/3/2020	Ngày 13	100000098209106246299 9	3
99	3/3/2020	Ngày 13	100000098209106246152 2	4

100	3/3/2020	Ngày 13	100000096800001097894 1	4
101	3/3/2020	Ngày 13	100000098209106246290 5	3
102	3/3/2020	Ngày 13	100000098209106246175 8	2
116	3/3/2020	Ngày 13	100000098209106246264 3	4
117	3/3/2020	Ngày 13	100000098209106246276 5	2
...	...	...	...	...
150	3/3/2020	Ngày 13	04179A1291	2

*Không dấu bất thường: 0; Gan trắng, thận lách bình thường: 1; Gan trắng, thận lách bầm: 2;  
Gan, thận, lách bầm: 3; Gan, thận, lách có mù: 4.*

**Phụ lục 7a.** Các chỉ tiêu theo dõi cho thí nghiệm cảm nhiễm

<b>GD</b>	<b>ID Bố</b>	<b>ID Mẹ</b>	<b>Đợt sinh sản</b>	<b>Ương trong bể<sup>1</sup></b>	<b>Ương trong giai<sup>1</sup></b>	<b>Thời gian thuần</b>	<b>Tuổi đánh dấu<sup>3</sup></b>	<b>Tỉ lệ sống<sup>3</sup></b>
503	1304	1575	Đợt 1	23,00 ± 0,00	144,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	167,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
504	1301	1541	Đợt 1	23,00 ± 0,00	143,00 ± 0,00	14,00 ± 0,00	166,00 ± 0,00	0,03 ± 0,18
516	1306	1552	Đợt 1	23,00 ± 0,00	144,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	167,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
517	1308	1550	Đợt 1	23,00 ± 0,00	144,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	167,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
522	1319	1564	Đợt 1	23,00 ± 0,00	144,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	167,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
525	1305	1573	Đợt 1	23,00 ± 0,00	144,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	167,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
526	1313	1556	Đợt 1	23,00 ± 0,00	144,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	167,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
528	1310	1553	Đợt 1	23,00 ± 0,00	144,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	167,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
530	1311	1554	Đợt 1	23,00 ± 0,00	144,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	167,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
534	1299	1569	Đợt 1	23,00 ± 0,00	144,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	167,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
565	1328	1624	Đợt 2	21,00 ± 0,00	126,00 ± 0,00	8,00 ± 0,00	147,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
569	1316	1561	Đợt 2	21,00 ± 0,00	121,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	142,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
570	1324	1577	Đợt 2	21,00 ± 0,00	121,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	142,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
572	1333	1595	Đợt 2	21,00 ± 0,00	123,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	144,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
573	1316	1578	Đợt 2	21,00 ± 0,00	121,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	142,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
752	1364	1646	Đợt 3	33,00 ± 0,00	92,00 ± 0,00	7,00 ± 0,00	125,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

<sup>1</sup>: Thời gian nuôi, <sup>2</sup>: tuổi cá từ giai đoạn cá bột đến khi cá được đánh dấu; <sup>3</sup>: tỉ lệ sống của gia đình cá khi kết thúc thí nghiệm



**Phụ lục 7b.** Các chỉ tiêu theo dõi cho thí nghiệm nuôi tăng trưởng

<b>G Đ</b>	<b>ID Bố</b>	<b>ID Mẹ</b>	<b>Đợt sinh sản</b>	<b>Ương trong bê<sup>1</sup></b>	<b>Ương trong giai<sup>1</sup></b>	<b>Ngày nuôi<sup>2</sup></b>	<b>Khối lượng<sup>2</sup></b>	<b>Chiều dài<sup>2</sup></b>	<b>Tỉ lệ sống<sup>3</sup></b>
25 8	141 2	172 0	Đợt 1	16,00 ± 0,00	228,00 ± 0,00	136,44 ± 3,19	776,75 ± 148,47	37,78 ± 2,15	0,92 ± 0,28
52 8	131 0	155 3	Đợt 1	16,00 ± 0,00	184,00 ± 0,00	156,28 ± 2,92	921,48 ± 139,40	39,48 ± 1,42	0,89 ± 0,31
53 4	129 9	156 9	Đợt 1	16,00 ± 0,00	184,00 ± 0,00	153,72 ± 3,39	1158,38 ± 207,02	41,83 ± 2,36	0,93 ± 0,27
53 5	130 7	154 8	Đợt 1	16,00 ± 0,00	184,00 ± 0,00	154,38 ± 3,21	1346,85 ± 291,49	43,62 ± 2,45	0,90 ± 0,31
53 6	131 3	155 7	Đợt 1	16,00 ± 0,00	184,00 ± 0,00	154,00 ± 3,09	1152,95 ± 181,03	42,08 ± 1,67	0,94 ± 0,24
53 8	132 1	157 4	Đợt 1	16,00 ± 0,00	186,00 ± 0,00	151,05 ± 3,26	1299,35 ± 261,77	43,15 ± 2,23	0,81 ± 0,40
54 4	129 9	153 9	Đợt 1	16,00 ± 0,00	183,00 ± 0,00	154,83 ± 3,15	1362,74 ± 163,60	44,01 ± 1,83	0,86 ± 0,36
55 0	130 4	154 4	Đợt 1	16,00 ± 0,00	184,00 ± 0,00	153,43 ± 3,49	1178,70 ± 183,61	42,02 ± 1,83	0,95 ± 0,21
55 3	130 7	157 2	Đợt 1	16,00 ± 0,00	186,00 ± 0,00	151,68 ± 3,27	1183,36 ± 207,67	42,42 ± 1,87	0,94 ± 0,24
56 5	132 8	162 4	Đợt 2	16,00 ± 0,00	169,00 ± 0,00	144,11 ± 2,99	975,50 ± 170,20	40,23 ± 2,11	0,90 ± 0,31
58 7	132 5	158 6	Đợt 2	16,00 ± 0,00	162,00 ± 0,00	151,77 ± 3,37	919,22 ± 153,76	39,57 ± 1,80	0,96 ± 0,19
59 7	133 0	159 0	Đợt 2	16,00 ± 0,00	161,00 ± 0,00	151,40 ± 2,66	927,93 ± 147,05	39,73 ± 2,00	0,93 ± 0,27
61 6	133 5	159 4	Đợt 2	16,00 ± 0,00	161,00 ± 0,00	151,48 ± 3,59	1131,78 ± 199,06	41,50 ± 2,31	0,92 ± 0,28
62 4	133 8	161 7	Đợt 2	16,00 ± 0,00	169,00 ± 0,00	143,57 ± 2,40	967,86 ± 192,39	39,69 ± 1,76	0,97 ± 0,18
62 7	135 0	163 1	Đợt 2	16,00 ± 0,00	168,00 ± 0,00	144,55 ± 3,20	1100,59 ± 149,38	40,82 ± 1,35	0,87 ± 0,34
63 3	133 7	159 7	Đợt 2	16,00 ± 0,00	161,00 ± 0,00	152,60 ± 2,99	847,96 ± 123,54	38,90 ± 1,52	0,83 ± 0,39
63 5	134 0	160 0	Đợt 2	16,00 ± 0,00	161,00 ± 0,00	151,83 ± 2,87	1110,71 ± 150,76	41,16 ± 1,54	0,83 ± 0,38
73 2	135 9	164 0	Đợt 3	16,00 ± 0,00	146,72 ± 1,31	144,55 ± 3,70	765,48 ± 258,58	36,95 ± 4,64	0,88 ± 0,33
74 0	135 6	164 9	Đợt 3	16,00 ± 0,00	143,21 ± 5,73	146,80 ± 5,54	856,80 ± 178,72	38,78 ± 2,66	0,79 ± 0,42
74 1	136 3	164 4	Đợt 3	16,00 ± 0,00	146,50 ± 0,51	144,74 ± 3,88	713,83 ± 122,89	36,57 ± 1,85	0,95 ± 0,22
...	....	...	....	...	....	...	....	...	....
74 2	135 8	163 9	Đợt 3	16,00 ± 0,00	148,00 ± 0,00	143,61 ± 3,48	514,82 ± 122,25	33,17 ± 2,32	0,90 ± 0,31
74 4	136 0	164 1	Đợt 3	16,00 ± 0,00	142,73 ± 5,10	148,00 ± 5,31	935,14 ± 177,59	40,25 ± 2,67	0,92 ± 0,28
75 3	135 3	163 8	Đợt 3	16,00 ± 0,00	146,00 ± 0,00	145,73 ± 3,11	697,73 ± 155,05	36,30 ± 2,06	0,93 ± 0,26

Số liệu trình bày dưới dạng TB ± SD: trung bình ± độ lệch chuẩn; <sup>1</sup>: Thời gian nuôi, <sup>2</sup>: từ khi đánh dấu đến thu hoạch; <sup>3</sup>: tỉ lệ sống của gia đình cá khi thu hoạch.

**Phụ lục 8.** Thông tin về các ảnh hưởng đưa vào mô hình ước tính các thông số di truyền

Chỉ tiêu	Đợt sinh sản	Tuổi đánh dấu	Thời gian thuần	Tuổi cảm nhiễm	Bề cảm nhiễm	Thời gian nuôi	Cá mẹ
Cá hương				NS	NS		
<b>Cá giống</b>							
Cảm nhiễm	NS	*	NS	NS	*		*
Tăng trưởng	*	*				*	*

Theo kiểm định Wald-F statistic \*: có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) trong mô hình; NS: không có ý nghĩa thống kê trong mô hình ( $p > 0,05$ )

**Phụ lục 9.** Các phương pháp phân tích định lượng các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch của hai nhóm gia đình kháng bệnh cao và kháng bệnh thấp**Phương pháp định lượng tổng hồng cầu**

Phương pháp xác định tổng hồng cầu (N1) được tiến hành theo Budiari và ctv (2021) như sau: (1) pha loãng máu bằng dung dịch đếm hồng cầu; (2) đếm tổng số lượng hồng cầu (A) trên buồng đếm hồng cầu dưới kính hiển vi quang học với vật kính 40X tại 4 ô vuông lớn (1 ô vuông lớn có 16 ô vuông nhỏ) ở 4 góc và 1 ô vuông lớn ở trung tâm buồng đếm; (3) định lượng tổng hồng cầu theo công thức:  $N1 = A \times (4.000 : 80) \times 200 = A \times 10.000$ .

**Phương pháp định lượng tổng bạch cầu**

Phương pháp xác định tổng bạch cầu (N2) được tiến hành theo Budiari và ctv (2021) như sau: (1) pha loãng máu bằng dung dịch đếm bạch cầu; (2) đếm tổng số lượng bạch cầu (B) trên buồng đếm Neubauer dưới kính hiển vi quang học với vật kính 40X tại 4 ô vuông lớn (1 ô vuông lớn có 16 ô vuông nhỏ) ở 4 góc; (4) tính tổng bạch cầu trên 4 góc theo công thức:  $N2 = B \times 50$ .

**Phương pháp định lượng từng loại bạch cầu**

Phương pháp xác định số lượng từng loại bạch cầu được tiến hành theo Hrubec và ctv. (2000) có hiệu chỉnh: (1) phết kính mẫu máu trên lam kính và nhuộm mẫu bằng thuốc nhuộm Giemsa; (2) đếm số lượng từng loại bạch cầu trong tổng số 100 tế bào bạch cầu; (3) tính số lượng từng loại bạch cầu = (số lượng mỗi loại BC  $\times$  Tổng bạch cầu (N2))/100).

**Phương pháp xác định kháng thể trong huyết thanh**

Phương pháp xác định hiệu giá kháng thể trong huyết thanh được tiến hành theo phương pháp của Thrusfield và ctv. (2018) có hiệu chỉnh như sau: (1) máu được li tâm 6.000 vòng/phút trong 5 phút rồi thu phần huyết thanh; (2) thực hiện phản ứng vi ngưng kết giữa loạt huyết thanh pha loãng theo hệ số pha loãng 2 lần và huyền phù vi khuẩn *E. ictaluri* được bất hoạt bằng formol 2% trong đĩa 96 giếng; (3) xác định độ pha loãng huyết thanh cao nhất tại giếng có phản ứng vi ngưng kết dương tính; (4) xác định hiệu giá kháng thể:  $HGKT = \log_2(1/\text{độ pha loãng của huyết thanh})$ .

**Phương pháp nhuộm mô học và định lượng trung tâm đại thực bào sắc tố**

Phương pháp xác định số lượng trung tâm đại thực bào sắc tố (TTĐTB) ở trên mẫu mô gan, thận và lách được tiến hành theo Camp và ctv. (2000) như sau: (1) nhuộm Hematoxylin & Eosin lát cắt mô (gan; thận và lách); (2) quan sát mẫu trên kính hiển vi quang học với vật kính 40X tại 5 vùng thị kính (4 góc và chính giữa lát cắt mô); (3) đếm tổng số trung tâm đại thực bào sắc tố ở mỗi mô (gan; thận và lách) trong 5 vùng thị kính.

**Đánh giá khả năng thực bào của tế bào đại thực bào từ thận trước của cá**

Phương pháp xác định khả năng thực bào của đại thực bào được thực hiện theo Paredes và ctv. (2013) có hiệu chỉnh như sau: thu mẫu thận trước, nghiền nát thận trước và rửa qua dung dịch RPMI+Herparin. Sau đó hút dung dịch chứa đại thực bào cho vào vòng tròn được vẽ sẵn bằng bút pap có đường kính bằng chiều rộng lam kính. Ủ ấm 28°C trong 60 phút cho đại thực bào bám vào lam kính. Sau khi rửa nhẹ nhàng lam kính bằng dung dịch Hank, hút 150µL dung dịch chứa nấm men (đã được nhuộm bằng thuốc nhuộm congo red) nhỏ vào trong mỗi vòng. Ủ trong 2 giờ để hoạt động thực bào diễn ra. Rửa lam kính với dung dịch PBS (Phosphate Buffer Saline, pH=7,2) gồm 13,8 g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 17,82 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O và 8,5 g/L NaCl trong 1 lít nước, sau đó cố định mẫu lần lượt bằng methanol 100% và 70%. Sau cùng nhuộm lam kính bằng thuốc nhuộm Giemsa. Quan sát dưới kính hiển vi vật kính 100X.

Công thức tính hoạt lực thực bào theo Paredes và ctv. (2013) và chỉ số thực bào theo Park và ctv. (2020):

$$PA = \frac{\text{Số tế bào đại thực bào đã thực bào nấm men}}{\text{Số tế bào đại thực bào}} \times 100$$

$$PI = \frac{\text{Số tế bào nấm men đã bị thực bào}}{\text{Số tế bào đại thực bào đã thực bào nấm men}} \times \frac{PA}{100}$$

PA (Phagocytic activity, %): hoạt lực thực bào

PI (Phagocytic index, nấm men/tế bào đại thực bào): chỉ số thực bào

**Phụ lục 10.** Tỷ lệ đẻ trứng của cá cái G0, sinh sản tạo G1

STT	Gia đình	Ngày thực hiện	Đợt	Khối lượng cá cái (kg)	Giờ đẻ	Số lượng trứng (kg)
1	502	22/8/2019	1	8.8	8h06	1.3
2	503	22/8/2019	1	8.9	9h10	1.3
3	504	22/8/2019	1	7.5	8h19	0.7
4	505	22/8/2019	1	10	8h10	1.6
5	507	22/8/2019	1	9.5	8h14	1.3
6	509	22/8/2019	1	9.5	9h44	1
7	510	22/8/2019	1	8.3	9h55	0.9
8	511	22/8/2019	1	12	6h55	2.5
9	512	22/8/2019	1	9.1	9h58	0.8
10	513	22/8/2019	1	7.3	8h27	1
11	562	22/8/2019	1	8.2	10h00	1
...	...	...	...	...	...	...
35	565	16/9/2019	2	8.4	8h50	0.9
36	566	16/9/2019	2	9.5	8h45	1.3
37	567	16/9/2019	2	12.5	7h20	1.6
38	569	16/9/2019	2	8	7h23	1.2
39	570	16/9/2019	2	9	7h57	0.7
40	571	16/9/2019	2	7.4	10h50	1.2
41	572	16/9/2019	2	8.8	7h21	1.4
42	573	16/9/2019	2	8.5	8h00	1.2
44	575	16/9/2019	2	9.5	8h00	1.2
45	576	16/9/2019	2	8.6	7h14	0.5
46	577	16/9/2019	2	8.8	7h15	0.8
47	578	16/9/2019	2	6.2	8h11	0.5
48	579	16/9/2019	2	7.1	8h05	0.3
49	580	16/9/2019	2	8.7	7h55	0.9
51	582	16/9/2019	2	8.9	8h04	1.3
52	626	16/9/2019	2	11.5	11h50	1.6
53	627	16/9/2019	2	9.4	11h24	0.8
54	628	16/9/2019	2	9.4	12h00	1.1
56	631	16/9/2019	2	11.4	11h23	1.8
57	632	16/9/2019	2	7.1	11h28	1.6
58	634	16/9/2019	2	13.4	11h15	2.4
59	635	16/9/2019	2	9.5	11h30	0.6
60	636	16/9/2019	2	8.2	11h53	1.4
...	...	...	...	...	...	...

87	641	25/9/2019	3	8.9	8h00	1.4
88	642	25/9/2019	3	9.8	10h45	1
89	643	25/9/2019	3	11.2	9h07	0.7
90	699	25/9/2019	3	9.5	10h51	1.5
91	700	25/9/2019	3	8.5	7h31	0.5
92	701	25/9/2019	3	7.9	10h17	1.2
93	702	25/9/2019	3	8.4	8h58	1.1
94	703	25/9/2019	3	7.6	9h25	0.4
95	705	25/9/2019	3	10.1	11h42	0.6
96	706	25/9/2019	3	7.1	10h26	0.6
97	707	25/9/2019	3	8.6	10h45	1.5
98	708	25/9/2019	3	8.9	10h16	0.9
99	709	25/9/2019	3	9.2	9h05	0.8
100	710	25/9/2019	3	9.7	9h00	0.8
...	...	...	...	...	...	...
128	716	9/10/2019	4	8.2	7h51	0.5
129	717	9/10/2019	4	6.5	7h16	0.8
130	718	9/10/2019	4	9.8	13h32	1.3

**Phụ lục 11.** Tỷ lệ nở, tỷ lệ thụ tinh của các đợt sinh sản gia đình G1 từ bố mẹ G0

Gia đình	Ngày thực hiện	Đợt	Khối lượng cá cái (kg)	Giờ đẻ	Số lượng trứng (kg)	Tỷ lệ thụ tinh (%)	Tỷ lệ nở (%)
511	22/8/2019	1	12	6h55	2,5	90	100
521	22/8/2019	1	7,7	9h51	0,8	68	85
528	22/8/2019	1	8,3	7h00	1,1	88	96
579	16/9/2019	2	7,1	8h05	0,3	57	95
591	16/9/2019	2	9,3	9h50	2,1	80	90
609	16/9/2019	2	5,6	9h51	1	75	100
676	25/9/2019	3	7,3	7h59	0,4	70	86
688	25/9/2019	3	7,2	8h45	1,1	75	95
699	25/9/2019	3	9,5	10h51	1,5	91	95
726	9/10/2019	4	8,5	7h19	0,2	88	90
735	9/10/2019	4	7,6	8h00	1	76	95
748	9/10/2019	4	9,7	10h44	1,2	55	80

**Phụ lục 12.** Các thông tin thủy lý hóa nước

Chỉ tiêu lí hóa	Nuôi vồ	Bể composite ương	Ao ương	Thí nghiệm cảm nhiễm	Thí nghiệm nuôi tăng trưởng
- Nhiệt độ (°C)	31,75 ± 4,9	19,5 ± 4,7	29,2 ± 6,9	26,80 ± 1,60	33,09 ± 1,53
- pH	8,2 ± 1,2	8,2 ± 1,3	8,2 ± 1,9	7,90 ± 0,83	8,14 ± 0,17
- DO (mg/L)	4,2 ± 0,7	6,6 ± 1,2	3,9 ± 1,1	4,08 ± 1,52	4,84 ± 0,27
- NH <sub>3</sub> (mg/L)	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,2	0,80 ± 0,21	0,01 ± 0,16

**Phụ lục 13.** Kết quả đánh dấu các gia đình cá (kết quả đại diện)

Mã GD	ID Bố	ID Mẹ	Đợt sinh sản	Nhóm <sup>1</sup>	Kích thước <sup>1</sup>
566	1315	1579	Đợt 1	CL	21,00 ± 0,00
573	1316	1578	Đợt 1	CL	24,00 ± 0,00
576	1328	1584	Đợt 1	CL	22,60 ± 0,00
578	1325	1580	Đợt 1	CL	27,00 ± 0,00
594	1324	1583	Đợt 1	ĐC	26,40 ± 0,00
595	1323	1576	Đợt 1	CL	24,00 ± 0,00
605	1336	1596	Đợt 2	CL	25,60 ± 0,00
606	1349	1627	Đợt 2	CL	26,60 ± 0,00
608	1327	1582	Đợt 2	CL	24,60 ± 0,00
609	1327	1616	Đợt 2	CL	20,60 ± 0,00
617	1317	1615	Đợt 2	CL	25,40 ± 0,00
622	1314	1559	Đợt 3	CL	26,60 ± 0,00
624	1338	1617	Đợt 3	ĐC	20,60 ± 0,00
625	1348	1611	Đợt 3	CL	22,40 ± 0,00
...	....	.....	....	.....	....
628	1348	1623	Đợt 3	CL	23,20 ± 0,00
720	1355	1647	Đợt 3	CL	25,80 ± 0,00
721	1367	1662	Đợt 3	CL	22,20 ± 0,00
723	1372	1663	Đợt 3	CL	23,40 ± 0,00
725	1370	1658	Đợt 3	CL	18,00 ± 0,00
726	1370	1665	Đợt 3	CL	18,00 ± 0,00
727	1368	1655	Đợt 3	CL	21,40 ± 0,00
729	1371	1659	Đợt 3	CL	22,40 ± 0,00
730	1361	1642	Đợt 3	CL	23,20 ± 0,00
735	1359	1652	Đợt 3	CL	21,40 ± 0,00
748	1353	1632	Đợt 3	CL	23,60 ± 0,00
750	1362	1643	Đợt 3	CL	20,60 ± 0,00

Số liệu trình bày dưới dạng TB ± SD: trung bình ± độ lệch chuẩn;

<sup>1</sup>: Giai đoạn đánh dấu cá

**Phụ lục 14.** Kết quả số cá chết trong thí nghiệm thăm dò liều cảm nhiễm trên cá hương

Thời gian (ngày)	0 (ĐC) CFU/mL	0 (HBI) CFU/mL	10 <sup>3</sup> CFU/mL	10 <sup>4</sup> CFU/mL	10 <sup>5</sup> CFU/mL	10 <sup>6</sup> CFU/mL	10 <sup>7</sup> CFU/mL
N1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,33 ± 0,58	0,33 ± 0,58	0,00 ± 0,00
N2	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,33 ± 0,58	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	14,33 ± 10,20
N3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	35,67 ± 10,20
N4	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,67 ± 0,58	1,33 ± 2,31	0,33 ± 0,58	1,67 ± 2,89	0,00 ± 0,00
N5	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,00 ± 1,00	1,00 ± 1,00	2,67 ± 2,52	16,33 ± 13,80	0,00 ± 0,00
N6	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	6,33 ± 4,73	19,67 ± 10,6	0,00 ± 0,00
N7	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,33 ± 1,15	6,67 ± 4,62	9,33 ± 11,37	0,00 ± 0,00
N8	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	2,00 ± 1,00	6,33 ± 2,89	2,67 ± 4,62	0,00 ± 0,00
N9	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,33 ± 0,58	6,33 ± 2,06	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
N10	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,33 ± 1,53	1,00 ± 1,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
N11	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,33 ± 1,53	0,67 ± 0,58	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
N12	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
N13	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,33 ± 0,58	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Số liệu trình bày dưới dạng TB ± SD: trung bình ± độ lệch chuẩn; N: ngày cảm nhiễm.

**Phụ lục 15.** Kết quả số cá chết trong thí nghiệm thăm dò liều cảm nhiễm trên cá giống

A/ Thí nghiệm thăm dò tỉ lệ ghép cá cohabitant: cá thí nghiệm

Thời gian (ngày)	Cá Cohabitant		Cá thí nghiệm	
	NT bổ sung 50% cá cohabitant	NT bổ sung 30% cá cohabitant	NT bổ sung 50% cá cohabitant	NT bổ sung 30% cá cohabitant
N1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
N2	1,33 ± 0,58	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
N3	3,67 ± 1,15	1,33 ± 0,58	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
N4	7,00 ± 1,00	6,33 ± 0,58	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
N5	2,67 ± 2,31	2,33 ± 0,58	2,00 ± 1,00	3,00 ± 1,00
N6	0,33 ± 0,58	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,67 ± 1,15
N7	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
N8	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
N14	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Số liệu trình bày dưới dạng TB ± SD: trung bình ± độ lệch chuẩn; N: ngày cảm nhiễm

**Phụ lục 15.** Kết quả số cá chết trong thí nghiệm thăm dò liều cảm nhiễm trên cá giống

B/ Thí nghiệm thăm dò liều bổ sung vi khuẩn

<b>Thời gian (ngày)</b>	<b>NT 10<sup>5</sup> (CFU/mL)</b>	<b>NT 10<sup>6</sup> (CFU/mL)</b>
<b>N1</b>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>N2</b>	1,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00
<b>N3</b>	3,00 ± 2,83	1,00 ± 1,41
<b>N4</b>	2,50 ± 2,12	4,00 ± 2,83
<b>N5</b>	3,50 ± 0,71	2,50 ± 0,71
<b>N6</b>	3,00 ± 1,41	7,00 ± 8,49
<b>N7</b>	4,50 ± 4,95	7,50 ± 7,78
<b>N8</b>	4,50 ± 2,12	7,50 ± 3,54
<b>N9</b>	7,00 ± 1,41	15,50 ± 4,95
<b>N10</b>	10,00 ± 7,07	24,00 ± 5,66
<b>N11</b>	9,50 ± 2,12	11,00 ± 7,07
<b>N12</b>	8,50 ± 2,12	5,50 ± 4,95
<b>N13</b>	3,50 ± 2,12	1,50 ± 0,71
<b>N14</b>	3,50 ± 0,71	1,50 ± 2,12
<b>N15</b>	3,50 ± 0,71	0,50 ± 0,71
<b>N16</b>	1,50 ± 0,71	0,00 ± 0,00
<b>N17</b>	300 ± 1,41	1,00 ± 1,41
<b>N18</b>	1,50 ± 2,12	0,00 ± 0,00

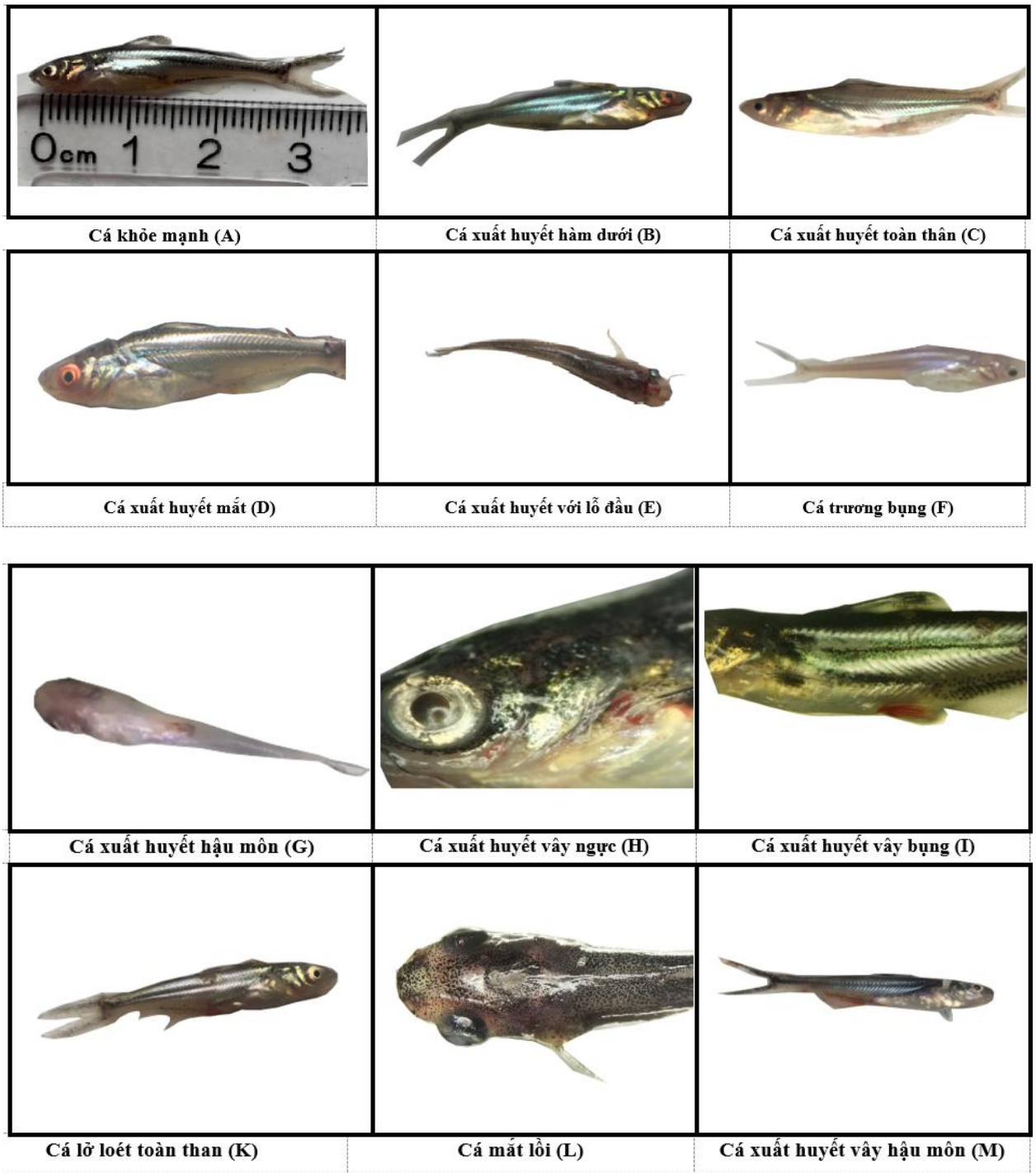
*Số liệu trình bày dưới dạng TB ± SD: trung bình ± độ lệch chuẩn; N: ngày cảm nhiễm*



**Phụ lục 16.** Kết quả phát hiện tác nhân gây bệnh trong thí nghiệm cảm nhiễm trên cá hương và cá giống

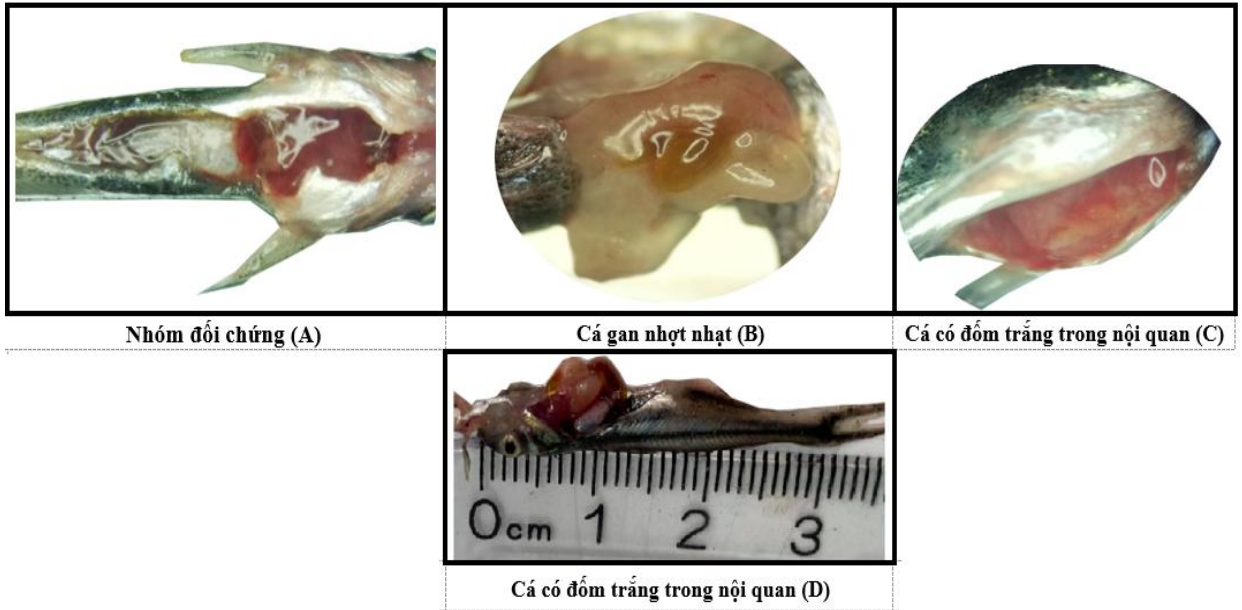
Thời điểm kiểm tra	Số mẫu kiểm tra	Nhuộm Gram tiêu bản phết mẫu mô thận (*)/Tổng số mẫu	Cấy trang mẫu (**)/Tổng số mẫu	PCR (+)/Tổng số mẫu
<b>Cảm nhiễm trên cá hương</b>				
TCN	10	0/10	0/10	-
Ngày 1	5	1/5	4/5	3/3
Ngày 2	5	2/5	5/5	5/5
Ngày 8	20	20/20	19/20	10/10
<b>Cảm nhiễm trên cá giống</b>				
TCN	45	0/10	3/45	-
Ngày 1	9	3/9	7/9	7/9
Ngày 2	18	5/9	18/18	18/18
Ngày 6	5	5/5	5/5	5/5
Ngày 8	20	5/6	18/20	11/11
Ngày 13	54	-	52/54	20/20
(+): dương tính, -: không xét nghiệm; *xuất hiện vi khuẩn trong mẫu mô khi nhuộm Gram; **xuất hiện khuẩn lạc trắng phát triển trên môi trường thạch máu cừu. TCN: trước cảm nhiễm;				

**Phụ lục 17.** Biểu hiện triệu chứng, bệnh tích của 33 gia đình cá hương trong quá trình cảm nhiễm  
A/ Bệnh tích bên ngoài

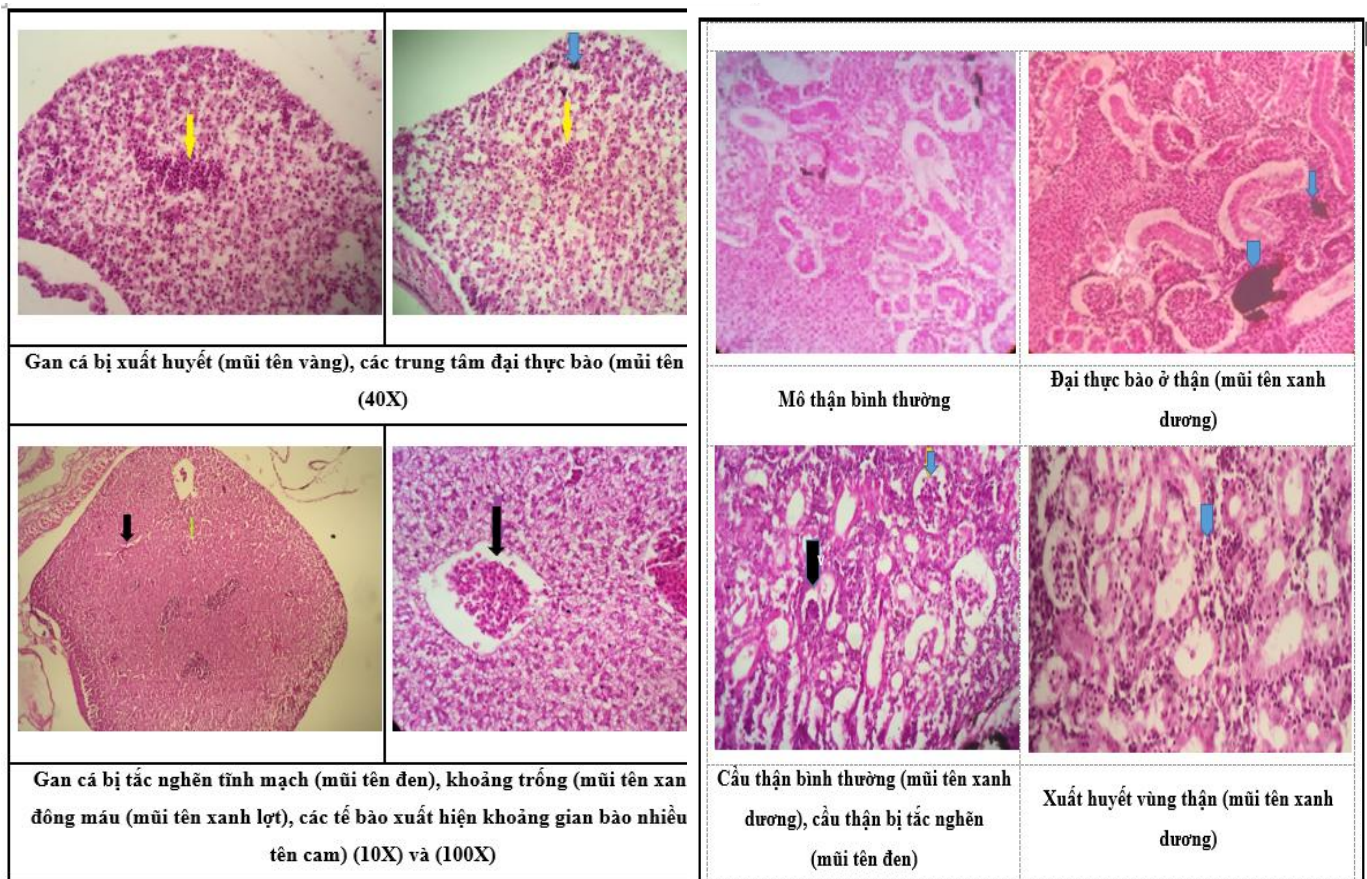


**Phụ lục 17.** Biểu hiện triệu chứng, bệnh tích của 33 gia đình cá hương trong quá trình cảm nhiễm (tt)

**B/ Bệnh tích bên trong**















**C/ Bệnh tích ở mô**



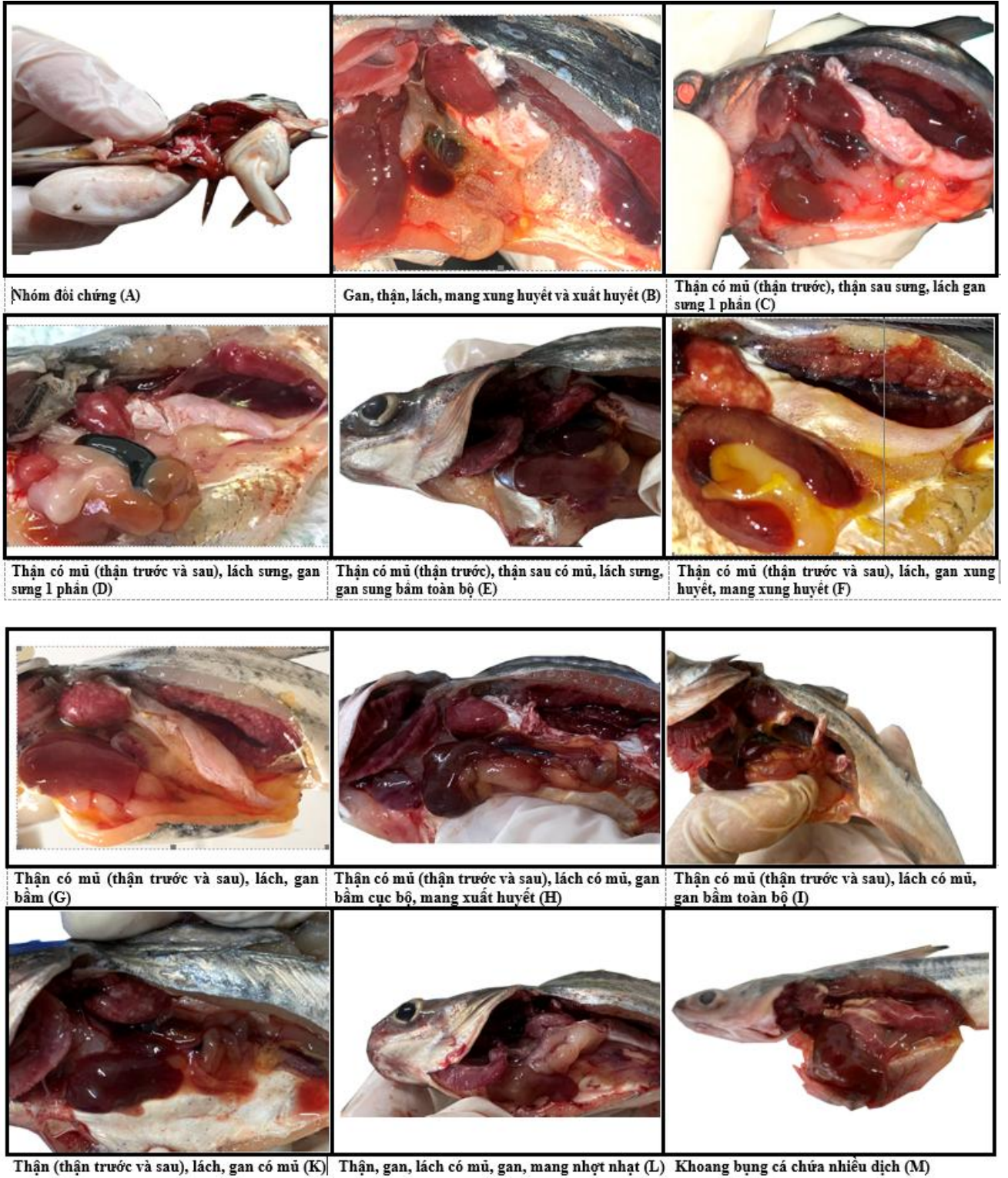
**Phụ lục 18.** Biểu hiện triệu chứng, bệnh tích của 130 gia đình cá giống trong quá trình cảm nhiễm

A/ Biểu hiện bên ngoài

		
Nhóm đối chứng (A)	Cá Xuất huyết hàm dưới (B)	Cá Xuất huyết toàn thân (C)
		
Cá Xuất huyết mắt, da (D)	Cá xuất huyết với lỗ đầu (E)	Cá trương bụng (F)
		
Cá chết không triệu chứng bên ngoài (H)	Cá xuất huyết vây ngực, vây bụng (I)	Cá xuất huyết vây bụng (K)
		
Cá xuất huyết hậu môn (L)	Xuất huyết vây lưng, ngực, bụng, hậu môn (M)	Cá xuất huyết vây hậu môn (N)

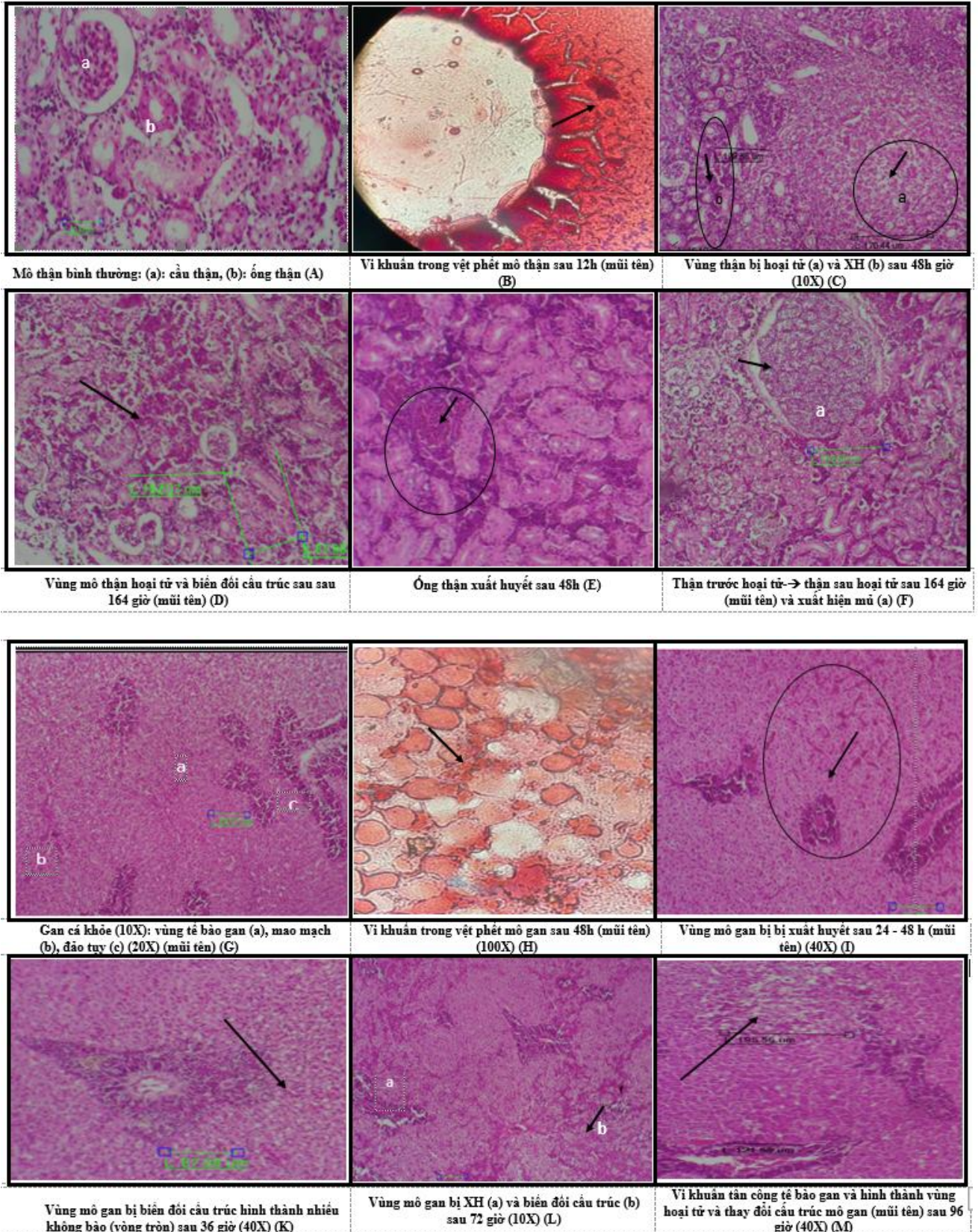
**Phụ lục 18.** Biểu hiện triệu chứng, bệnh tích của 130 gia đình cá giống trong quá trình cảm nhiễm (tt)

B/ Biểu hiện bên trong



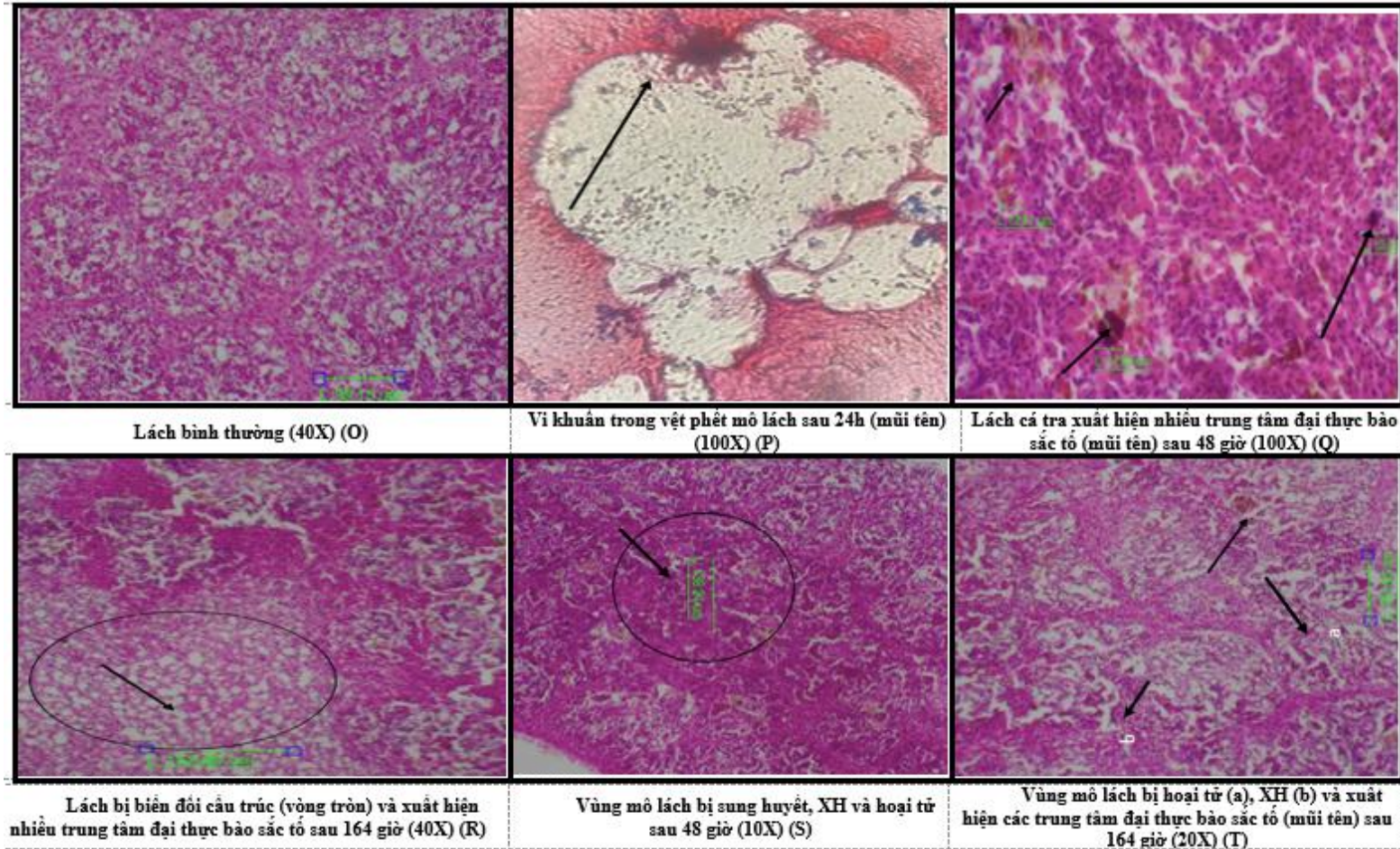
**Phụ lục 18. Biểu hiện triệu chứng, bệnh tích của 130 gia đình cá giống trong quá trình cảm nhiễm (tt)**

**C/ Biểu hiện mô thận và gan**

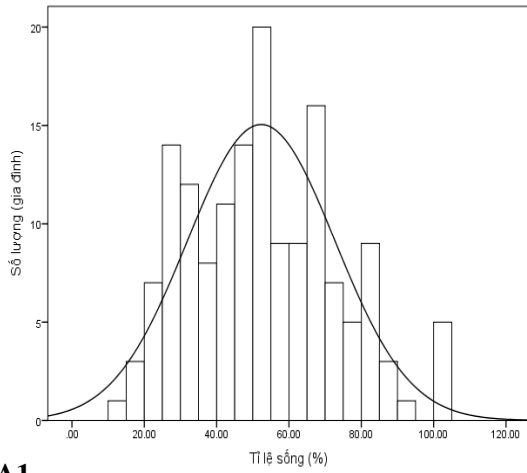


**Phụ lục 18.** Biểu hiện triệu chứng, bệnh tích của 130 gia đình cá giống trong quá trình cảm nhiễm (tt)

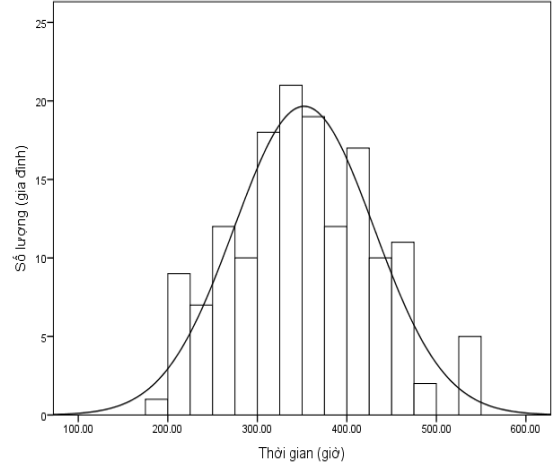
C/ Biểu hiện mô lách



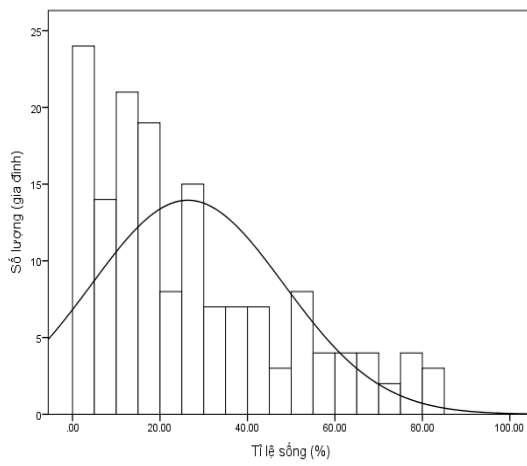
**Phụ lục 19.** Tỷ lệ chết và thời gian chết trên 130 gia đình cá giống trong quá trình cảm nhiễm tại các giai đoạn cắt ngang: thời điểm cắt ngang tỉ lệ sống 50% (A1, A2), 25% (B1, B2), cuối thí nghiệm cảm nhiễm (C1, C2) theo các gia đình.



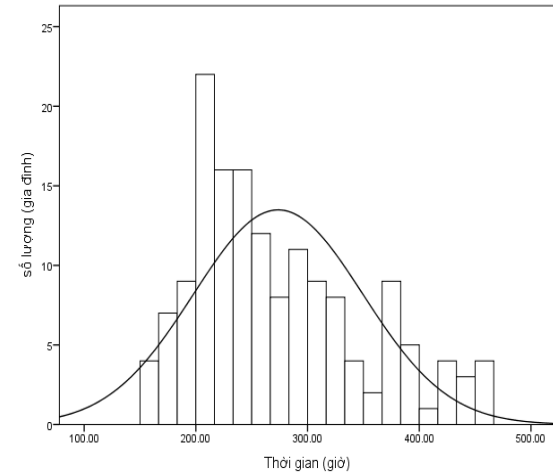
**A1**



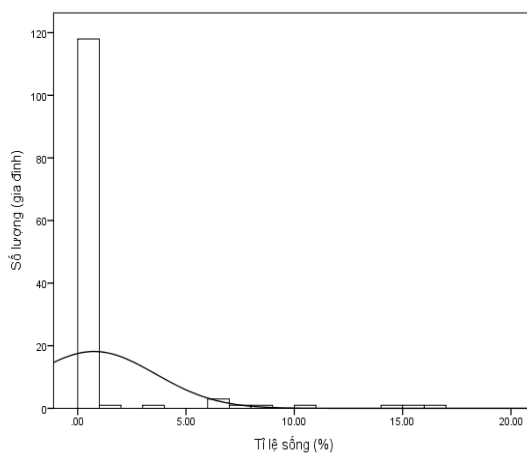
**A2**



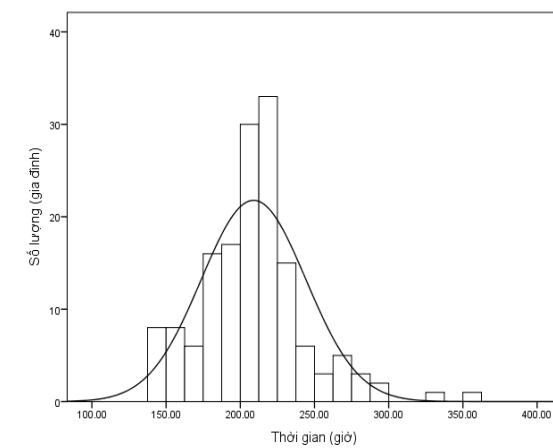
**B1**



**B2**



**C1**



**C2**



**Phụ lục 20.** Kết quả ước tính hệ số di truyền trên cá hương từ ASREml (minh họa ước tính hệ số di truyền tính trạng tỉ lệ sống tại giai đoạn kết thúc thí nghiệm cảm nhiễm)

ASREml 3.0 [01 May 2020] Challenge test 33 families of juvenile kb2020

Build hv [01 May 2020 ] 32 bit

Licensed to: Research Institute for Aquaculture No. 2 31-oct-2019

\*\*\*\*\*

- - - Results from analysis of SUREND - - -

Approximate stratum variance decomposition

Stratum	Degrees-Freedom	Variance	Component	Coefficients
id	1727.31	0.566523E-01	0.6	1.0
Residual Variance	71.69	0.337385E-01	0.0	1.0

	Source	Model terms	Gamma	Component	Comp/SE	% C
id	2196	2196	1.21008	0.408261E-01	3.85	0 P
Variance	1800	1799	1.00000	0.337385E-01	5.99	0 P

Wald F statistics

Source of Variation	NumDF	DenDF	F-inc	P-inc
15 mu	1	32.1	4.90	0.034

Notice: The DenDF values are calculated ignoring fixed/boundary/singular

variance parameters using numerical derivatives.

	Solution	Standard Error	T-value	T-prev
15 mu	1	0.636201E-01	0.287501E-01	2.21
1 id	2196 effects fitted			

D:\2012\Daotao\D\20-day challenge\sur\_id\_linear.pvc - - - Results from analysis of sur - - -

1 id	0.408261E-01
2 Variance	0.337385E-01
3 p1	0.74565E-01 0.55859E-02
h2 = id 1/p1 3=	0.5475 0.1044

Notice: The parameter estimates are followed by their approximate standard errors.



SUR502	Hệ số tương quan Pearson	-.184	.040	.017	-.040	.038	.021	-.192	1	.562**	.820**	.952**	.837**
	Kiểm định tương quan	.306	.825	.926	.824	.833	.906	.286		.001	.000	.000	.000
	Số gia đình	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33
Tương quan		SUREN D1	SUR50 1	SUR75 1	TIMEEN D1	TIME5 01	TIME7 51	SUREN D2	SUR50 2	SUR75 2	TIMEEN D2	TIME5 02	TIME7 52
SUR752	Hệ số tương quan Pearson	-.018	-.034	.002	.052	-.017	.017	-.014	.562**	1	.517**	.431*	.826**
	Kiểm định tương quan	.922	.851	.990	.774	.925	.926	.940	.001		.002	.012	.000
	Số gia đình	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33
TIMEEND2	Hệ số tương quan Pearson	-.079	.149	.134	.093	.148	.140	.032	.820**	.517**	1	.892**	.840**
	Kiểm định tương quan	.662	.407	.456	.605	.412	.438	.858	.000	.002		.000	.000
	Số gia đình	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33
TIME502	Hệ số tương quan Pearson	-.184	.102	.057	-.007	.101	.067	-.212	.952**	.431*	.892**	1	.814**
	Kiểm định tương quan	.305	.573	.755	.969	.574	.709	.236	.000	.012	.000		.000
	Số gia đình	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33
TIME752	Hệ số tương quan Pearson	-.199	-.051	-.064	-.057	-.034	-.042	-.193	.837**	.826**	.840**	.814**	1
	Kiểm định tương quan	.268	.777	.725	.751	.852	.817	.281	.000	.000	.000	.000	
	Số gia đình	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33

1: các tính trạng trên cá hương

2: các tính trạng trên cá giống

\*: có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$

\*\* : có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$

**Phụ lục 22.** Kết quả xử lý đa dạng di truyền 50 cá thể bố mẹ

Cervus 3.0.7 - (c) Copyright Tristan Marshall 1998-2014

Distributed by Field Genetics Ltd - www.fieldgenetics.com

Licensed for non-commercial use only

Allele frequency analysis completed

\*\*\*\* Summary statistics \*\*\*\*

Locus	k	N	HObs	HExp	PIC	NE - 1P	NE - 2P	NE- PP	NE - I	NE - SI	HW	F (Null)
Pahy-01	6	50	0,68	0,737	0,687	0,678	0,502	0,316	0,116	0,414	NS	0,0414
Pahy-02	14	50	0,68	0,831	0,802	0,51	0,339	0,157	0,051	0,352	NS	0,0947
Pahy-03	11	50	0,74	0,811	0,778	0,552	0,376	0,19	0,064	0,365	NS	0,0426
Pahy-04	14	50	0,72	0,828	0,8	0,514	0,342	0,158	0,052	0,353	NS	0,0634
Pahy-06	7	50	0,70	0,723	0,665	0,703	0,533	0,356	0,132	0,425	NS	0,0169
Pahy-10	7	50	0,66	0,621	0,568	0,784	0,618	0,432	0,195	0,491	NS	-0,0341
Pahy-13	8	50	0,74	0,726	0,684	0,674	0,493	0,295	0,114	0,419	NS	-0,0277
Pahy-15	13	50	0,7	0,685	0,635	0,719	0,547	0,351	0,147	0,447	NS	-0,0163
Pahy-17	8	50	0,92	0,83	0,797	0,529	0,355	0,178	0,056	0,353	ND	-0,0581
Pahy-18	9	50	0,72	0,753	0,703	0,658	0,482	0,299	0,107	0,404	NS	0,0201

Number of individuals:	50
Number of loci:	10
Mean number of alleles per locus:	9.700
Mean proportion of loci typed:	1.0000
Mean expected heterozygosity:	0.7544
Mean polymorphic information content (PIC):	0.7120
Combined non-exclusion probability (first parent):	0.00912693
Combined non-exclusion probability (second parent):	0.00033268
Combined non-exclusion probability (parent pair):	0.00000127
Combined non-exclusion probability (identity):	5.070E-0011
Combined non-exclusion probability (sib identity):	0.00010484

**Phụ lục 23.** Kết quả xử lý đa dạng di truyền 50 cá thể đàn con

\*\*\*\*\*

\*

Cervus 3.0.7 - (c) Copyright Tristan Marshall 1998-2014  
 Distributed by Field Genetics Ltd - www.fieldgenetics.com  
 Licensed for non-commercial use only

Allele frequency analysis completed

\*\*\*\* Summary statistics \*\*\*\*

Locus	K	N	HObs	HExp	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI	HW	F (Null)
Pahy-01	6	50	0,68	0,69	0,634	0,727	0,558	0,373	0,15	0,446	NS	0,0011
Pahy-02	10	50	0,78	0,748	0,719	0,631	0,443	0,236	0,089	0,402	NS	-0,0332
Pahy-03	8	49	0,571	0,759	0,718	0,633	0,454	0,26	0,095	0,398	NS	0,1491
Pahy-04	10	50	0,7	0,827	0,8	0,516	0,342	0,158	0,052	0,354	NS	0,0761
Pahy-06	5	50	0,8	0,646	0,583	0,78	0,619	0,449	0,187	0,477	NS	-0,1286
Pahy-10	5	50	0,7	0,623	0,554	0,794	0,643	0,474	0,21	0,494	NS	-0,059
Pahy-13	7	50	0,8	0,701	0,656	0,708	0,528	0,333	0,132	0,436	NS	-0,0833
Pahy-15	7	50	0,66	0,588	0,548	0,803	0,63	0,436	0,209	0,511	NS	-0,0776
Pahy-17	8	50	0,9	0,831	0,798	0,53	0,355	0,179	0,056	0,353	ND	-0,0467
Pahy-18	5	49	0,735	0,714	0,653	0,716	0,548	0,373	0,139	0,431	NS	-0,0245

Number of individuals: 50  
 Number of loci: 10  
 Mean number of alleles per locus: 7,100  
 Mean proportion of loci typed: 0,9960  
 Mean expected heterozygosity: 0,7127  
 Mean polymorphic information content (PIC): 0,6661  
 Combined non-exclusion probability (first parent): 0,01999846  
 Combined non-exclusion probability (second parent): 0,00099159  
 Combined non-exclusion probability (parent pair): 0,00000744  
 Combined non-exclusion probability (identity): 5,573E-0010  
 Combined non-exclusion probability (sib identity): 0,00020177

**Phụ lục 24.** Truy xuất phá hệ với 10 microsatellite (kết quả đại diện)

<b>Tổng số cá con truy xuất (con)</b>		500	
<b>Số cá con truy xuất bố mẹ không chính xác (con)</b>		89	
<b>Tỉ lệ truy xuất chính xác (%)</b>		83%	
<b>ID cá thể con</b>	<b>Truy xuất bố</b>	<b>Truy xuất mẹ</b>	<b>Xác suất truy xuất cả bố và mẹ</b>
510-01	D510	C510	1
510-02	D510	C510	1
510-03	D510	C510	0,9987
510-04	D510	C510	1
510-05	D510	C510	1
510-06	D510	C510	1
510-07	D510	#	1
510-08	D510	C510	1
510-09	D510	C510	1
510-10	D510	#	0,9873
510-10	D510	C510	0,0127
528-01	D528	C528	1
528-02	D528	C528	1
528-03	D528	C528	1
528-04	D528	C528	1
528-05	D528	C528	1
528-06	D528	C528	1
528-07	D528	C528	1
528-08	D528	C528	1
528-09	D528	C528	1
528-10	D528	C528	1
530-01	D530	C530	1
530-02	D530	C530	1
530-03	D530	C530	1
530-04	D530	C530	1
530-05	D530	C530	1
530-06	D530	C530	1
530-07	D530	C530	1
530-08	D530	C530	1
530-09	D530	C530	1
530-10	*	#	1
536-01	D536	C536	1
536-02	D536	C536	1
536-03	D536	C536	1

\*: Truy xuất không được mẹ

#: Truy xuất không được bố

Kết quả truy xuất chính xác: truy xuất đúng bố và mẹ với xác suất  $\geq 98\%$

**Phụ lục 25.** Kiểm tra tần số null-alen của 10 microsatellite trên 90 cá thể bố mẹ và 500 cá thể con

<b>Microsatellite</b>	<b>F (Null)</b>	<b>Statistical significance <sup>a</sup></b>
Pahy-01	0,005	NS
Pahy-02	0,065	*
Pahy-03	0,031	NS
Pahy-04	0,019	NS
Pahy-06	-0,029	NS
Pahy-10	-0,019	NS
Pahy-13	-0,027	NS
Pahy-15	-0,007	NS
Pahy-17	-0,017	NS
Pahy-18	0,002	NS

\*: có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ )

**Phụ lục 26.** Truy xuất phủ hệ với 9 microsattelite (kết quả đại diện)

<b>Tổng số cá con truy xuất (con)</b>		500	
<b>Số cá con truy xuất bố mẹ không chính xác (con)</b>		33	
<b>Tỉ lệ truy xuất chính xác (%)</b>		93.40%	
ID cá thể con	Truy xuất bố	Truy xuất mẹ	Xác suất truy xuất cả bố và mẹ
510-01	D510	C510	1
510-02	D510	C510	1
510-03	D510	C510	1
510-04	D510	C510	1
510-05	D510	C510	1
510-06	D510	C510	1
510-07	D510	C510	1
510-08	D510	C510	1
510-09	D510	C510	1
510-10	D510	C510	1
528-01	D528	C528	1
528-02	D528	C528	1
528-03	D528	C528	1
528-04	D528	C528	1
528-05	D528	C528	1
528-06	D528	C528	1
528-07	D528	C528	1
528-08	D528	C528	1
528-09	D528	C528	1
530-05	D530	C530	1
530-06	D530	C530	1
530-07	D530	C530	1
530-08	D530	C530	1
530-09	D530	C530	1
530-10	*	#	1
536-01	D536	#	1
536-02	D536	C536	1
536-03	D536	C536	1
536-04	D573	#	0,9988
536-05	D536	C536	1
536-06	D536	C536	1
536-07	D536	C536	1
536-08	D536	C536	1
536-09	D536	C536	1
536-10	D536	C536	1
588-01	D591-588	C588	1
588-02	D591-588	C588	1
588-03	D591-588	C588	1

\*: Truy xuất không được mẹ

#: Truy xuất không được bố

Kết quả truy xuất chính xác: truy xuất đúng bố và mẹ với xác suất  $\geq 98\%$



**Phụ lục 27.** Kết quả chọn lọc nhóm gia đình kháng bệnh cao và thấp dựa vào EBV giai đoạn cá hương và cá giống

Gia đình	STT	Giá trị EBV <sup>1</sup>
Kháng bệnh cao	1	0,07
	2	0,05
	3	0,06
Kháng bệnh thấp	4	-0,05
	5	0,03
	6	-0,03

<sup>1</sup>: giai đoạn cá giống;

**Phụ lục 28.** Tỷ lệ chết và thời gian chết của 6 gia đình cá giống trong thí nghiệm cảm nhiễm

Thời gian (ngày)	KBC	KBT
N1	0,00 ± 0,00	11,33 ± 6,66
N2	5,67 ± 9,81	13,00 ± 1,00
N3	0,67 ± 1,15	5,00 ± 4,58
N4	1,33 ± 1,53	1,67 ± 0,58
N5	0,67 ± 1,15	2,33 ± 1,15
N6	1,67 ± 2,08	2,00 ± 1,73
N7	1,33 ± 0,58	5,00 ± 2,00
N8	13,33 ± 17,93	13,00 ± 2,65
N9	2,67 ± 1,53	5,33 ± 1,53
N10	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
N11	16,00 ± 18,19	18,33 ± 1,51
N12	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
N13	0,00 ± 0,00	0,33 ± 0,58
N14	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
N15	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
N16	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
N17	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
N18	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
N19	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
N20	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
N21	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Số liệu trình bày dưới dạng TB ± SD: trung bình ± độ lệch chuẩn; N: ngày cảm nhiễm.

KBC: gia đình kháng bệnh cao; KBT: gia đình kháng bệnh thấp

**Phụ lục 29.** Thí nghiệm thăm dò chọn thời điểm thu mẫu máu phân tích miễn dịch

<b>Chỉ tiêu</b>	<b>THC</b> ( $10^5$ TB/mm <sup>3</sup> )	<b>TBC</b> ( $10^4$ TB/mm <sup>3</sup> )	<b>HGKT</b> log <sub>2</sub> (1/Độ pha loãng)
<b>TCN</b>	15,50 ± 1,12	1,44 ± 0,09	0,17 ± 0,41
<b>N1*</b>	14,55 ± 1,00	1,74 ± 0,22	1,00 ± 0,89
<b>N1<sup>#</sup></b>	14,32 ± 1,31	2,2 ± 0,56	1,67 ± 1,03
<b>N2*</b>	17,95 ± 1,23	2,83 ± 0,41	2,50 ± 0,55
<b>N2<sup>#</sup></b>	13,07 ± 1,51	1,95 ± 0,47	2,5 ± 0,84
<b>N3</b>	13,18 ± 1,03	1,77 ± 0,18	2,50 ± 0,55
<b>N4</b>	16,00 ± 2,45	2,18 ± 0,50	2,50 ± 1,38
<b>N5</b>	13,07 ± 1,92	1,91 ± 0,46	2,67 ± 0,82
<b>N6</b>	13,12 ± 5,34	2,20 ± 0,73	2,67 ± 0,82
<b>N7</b>	11,73 ± 1,15	1,86 ± 0,81	3,17 ± 0,41
<b>N11</b>	17,48 ± 1,42	2,73 ± 0,30	3,67 ± 0,82
<b>N13</b>	7,71 ± 1,28	1,89 ± 0,57	3,33 ± 0,82

Số liệu trình bày dưới dạng TB ± SD: trung bình ± độ lệch chuẩn; N: ngày cảm nhiễm; \*: 12 giờ trong ngày; #: 24 giờ trong ngày.

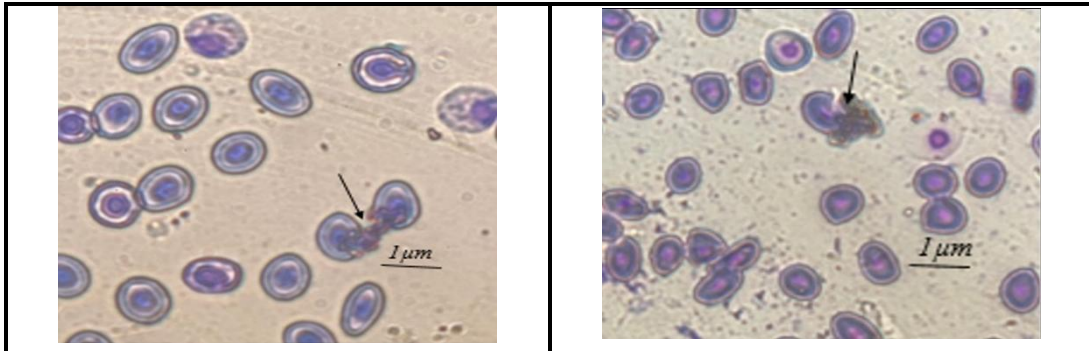
**Phụ lục 30.** Sự thay đổi của các thông số miễn dịch qua các giai đoạn cảm nhiễm

Chỉ tiêu miễn dịch	Đơn vị	Nhóm	Số mẫu	Trước cảm nhiễm	24 hpi	48 hpi	264 hpi	312 hpi
Tổng hồng cầu	10 <sup>5</sup> TB/mm <sup>3</sup>	KBT	61	12,40 <sup>ax</sup> ± 1,13 (12)	11,09 <sup>axy</sup> ± 1,47 (12)	7,99 <sup>ayz</sup> ± 0,94 (12)	5,90 <sup>azw</sup> ± 0,95 (20)	3,82 <sup>aw</sup> ± 0,35 (5)
		KBC	58	12,98 <sup>ax</sup> ± 0,87 (12)	12,28 <sup>ax</sup> ± 1,91 (12)	9,68 <sup>axy</sup> ± 0,72 (12)	7,46 <sup>ay</sup> ± 1,02 (16)	6,78 <sup>ay</sup> ± 2,56 (6)
Tổng bạch cầu	10 <sup>4</sup> TB/mm <sup>3</sup>	KBT	61	1,20 <sup>ax</sup> ± 0,09 (12)	1,66 <sup>ay</sup> ± 0,07 (12)	1,95 <sup>ay</sup> ± 0,13 (12)	1,97 <sup>ay</sup> ± 0,11 (20)	1,00 <sup>ax</sup> ± 0,15 (5)
		KBC	58	1,12 <sup>ax</sup> ± 0,03 (12)	1,97 <sup>by</sup> ± 0,03 (12)	2,33 <sup>ay</sup> ± 0,16 (12)	2,14 <sup>ay</sup> ± 0,08 (16)	3,03 <sup>bz</sup> ± 0,51 (6)
Bạch cầu trung tính	10 <sup>3</sup> TB/mm <sup>3</sup>	KBT	61	1,28 <sup>ax</sup> ± 0,05 (12)	2,41 <sup>ay</sup> ± 0,11 (12)	2,72 <sup>ay</sup> ± 0,15 (12)	2,44 <sup>ay</sup> ± 0,08 (20)	1,80 <sup>az</sup> ± 0,24 (5)
		KBC	58	1,64 <sup>bx</sup> ± 0,08 (12)	3,36 <sup>by</sup> ± 0,34 (12)	3,40 <sup>ay</sup> ± 0,36 (12)	2,24 <sup>ax</sup> ± 0,10 (16)	4,25 <sup>bz</sup> ± 0,59 (6)
Bạch cầu đơn nhân	10 <sup>3</sup> TB/mm <sup>3</sup>	KBT	61	0,71 <sup>ax</sup> ± 0,03 (12)	1,55 <sup>ay</sup> ± 0,17 (12)	1,75 <sup>ayz</sup> ± 0,15 (12)	2,06 <sup>az</sup> ± 0,09 (20)	1,94 <sup>ayz</sup> ± 0,42 (5)
		KBC	58	0,96 <sup>bx</sup> ± 0,04 (12)	2,56 <sup>by</sup> ± 0,35 (12)	2,58 <sup>by</sup> ± 0,34 (12)	2,07 <sup>ay</sup> ± 0,08 (16)	3,99 <sup>bz</sup> ± 0,61 (6)
Bạch cầu Lympho	10 <sup>3</sup> TB/mm <sup>3</sup>	KBT	61	9,99 <sup>ax</sup> ± 0,85 (12)	12,62 <sup>axy</sup> ± 0,53 (12)	15,06 <sup>ay</sup> ± 1,05 (12)	15,17 <sup>ay</sup> ± 1,06 (20)	6,26 <sup>az</sup> ± 0,93 (5)
		KBC	58	8,62 <sup>ax</sup> ± 0,22 (12)	13,77 <sup>ay</sup> ± 0,46 (12)	17,30 <sup>ay</sup> ± 1,01 (12)	17,12 <sup>ay</sup> ± 0,73 (16)	22,03 <sup>bz</sup> ± 4,06 (6)
Hiệu giá kháng thể*	log <sub>2</sub> (1/Độ pha loãng)	KBT	122	0,33 <sup>ax</sup> ± 0,14 (24)	0,67 <sup>axy</sup> ± 0,22 (24)	0,75 <sup>axy</sup> ± 0,22 (24)	3,40 <sup>az</sup> ± 0,24 (40)	1,30 <sup>ay</sup> ± 0,25 (10)
		KBC	116	0,25 <sup>ax</sup> ± 0,13 (24)	1,33 <sup>axy</sup> ± 0,28 (24)	2,17 <sup>byz</sup> ± 0,27 (24)	3,88 <sup>azw</sup> ± 0,44 (32)	3,08 <sup>aw</sup> ± 0,94 (12)
Đại thực bào ở gan*	TTĐT/mô	KBT	122	4,04 <sup>ax</sup> ± 0,25 (24)	4,42 <sup>ax</sup> ± 0,53 (24)	1,75 <sup>ay</sup> ± 0,19 (24)	1,68 <sup>ay</sup> ± 0,16 (40)	1,70 <sup>ay</sup> ± 0,20 (10)
		KBC	116	2,71 <sup>bxy</sup> ± 0,16 (24)	4,37 <sup>az</sup> ± 0,44 (24)	3,92 <sup>byz</sup> ± 0,40 (24)	2,28 <sup>ax</sup> ± 0,46 (32)	2,50 <sup>ax</sup> ± 0,34 (12)

Đại thực bào ở thận*	TTĐTĐTB/mô	KBT	122	7,42 <sup>ay</sup> ± 0,67 (24)	12,88 <sup>ax</sup> ± 0,98 (24)	3,42 <sup>az</sup> ± 0,51 (24)	3,05 <sup>az</sup> ± 0,37 (40)	3,40 <sup>az</sup> ± 0,48 (10)
		KBC	116	6,71 <sup>ax</sup> ± 0,52 (24)	10,08 <sup>by</sup> ± 0,88 (24)	14,54 <sup>bz</sup> ± 0,84 (24)	4,53 <sup>bx</sup> ± 0,61 (32)	5,00 <sup>ax</sup> ± 1,05 (12)
Đại thực bào ở lách*	TTĐTĐTB/mô	KBT	122	10,75 <sup>ax</sup> ± 1,21 (24)	37,08 <sup>ay</sup> ± 2,13 (24)	10,33 <sup>ax</sup> ± 2,17 (24)	14,53 <sup>ax</sup> ± 1,08 (40)	11,00 <sup>ax</sup> ± 2,42 (10)
		KBC	116	9,38 <sup>ax</sup> ± 0,95 (24)	24,17 <sup>bxy</sup> ± 1,76 (24)	29,00 <sup>bz</sup> ± 1,57 (24)	13,34 <sup>axy</sup> ± 1,70 (32)	18,58 <sup>ay</sup> ± 3,74 (12)
Hoạt lực thực bào	%	KBT	35	52,36 <sup>ax</sup> ± 2,59 (6)	80,64 <sup>ay</sup> ± 4,56 (6)	85,36 <sup>az</sup> ± 2,71 (6)	92,86 <sup>az</sup> ± 1,17 (12)	94,45 <sup>az</sup> ± 1,51 (5)
		KBC	32	51,69 <sup>ax</sup> ± 4,36 (6)	77,11 <sup>ay</sup> ± 2,22 (6)	88,02 <sup>az</sup> ± 2,64 (6)	93,33 <sup>az</sup> ± 1,26 (10)	93,94 <sup>az</sup> ± 2,06 (4)
Chỉ số thực bào	Nấm men/tế bào đại thực bào	KBT	35	1,54 <sup>ax</sup> ± 0,15 (6)	3,21 <sup>ay</sup> ± 0,54 (6)	4,00 <sup>ayz</sup> ± 0,24 (6)	4,76 <sup>azw</sup> ± 0,33 (12)	5,66 <sup>aw</sup> ± 0,43 (5)
		KBC	32	1,40 <sup>ax</sup> ± 0,16 (6)	2,55 <sup>ay</sup> ± 0,32 (6)	5,06 <sup>bz</sup> ± 0,35 (6)	5,55 <sup>az</sup> ± 0,41 (10)	5,11 <sup>az</sup> ± 0,42 (4)

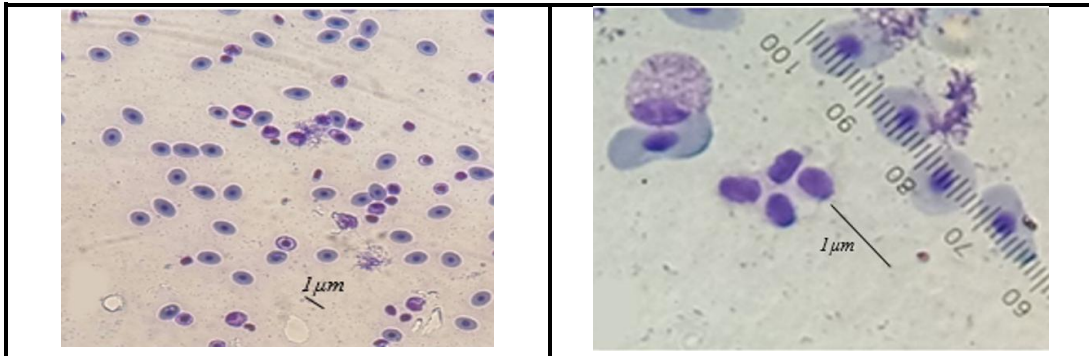
Số liệu trình bày dưới dạng TB ± SD: trung bình ± độ lệch chuẩn; N: ngày cảm nhiễm. Các chữ cái a, b trong cùng một cột chỉ sự khác biệt về chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch theo cặp gia đình kháng bệnh cao và thấp với mức ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ); Các chữ cái x, y, z, w trong cùng một hàng chỉ sự khác biệt về chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch theo các giai đoạn của từng nhóm kháng bệnh với mức ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ); KBC/KBT: các gia đình kháng bệnh cao/thấp; \*: các đáp ứng miễn dịch có phân tích lặp lại 2 lần/mẫu.

**Phụ lục 31.** Sự thay đổi của các thông số miễn dịch qua các giai đoạn cảm nhiễm



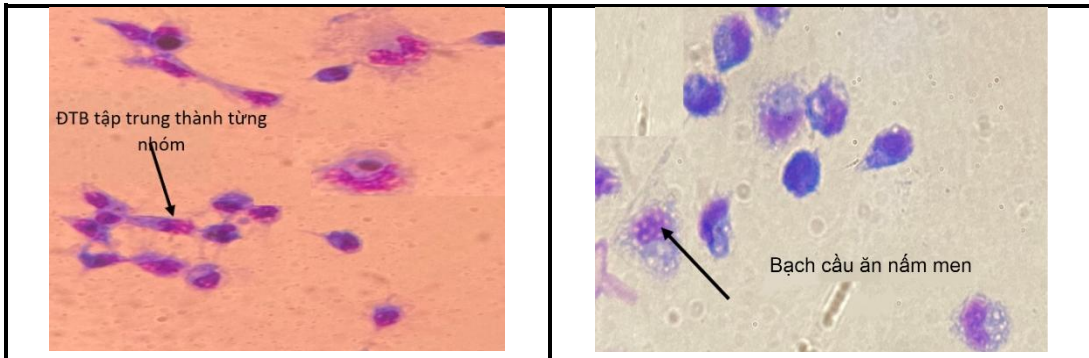
Vi khuẩn tấn công hồng cầu sau 12 giờ (A)

Hồng cầu bị vỡ màng sau 18 giờ (B)



Bạch cầu vây xung quanh vi khuẩn (C)

Bạch cầu Lympho phân chia sau 12 giờ (D)



Đại thực bào vây xung quanh nấm men (E)

Đại thực bào ăn nấm men (F)

**Phụ lục 32.** Kết quả xử lý mô hình tối ưu BMA từ phần mềm R phiên bản 3.5.2 (đại diện tại giai đoạn 24 giờ sau cảm nhiễm)

```
> setwd("D:/DATA/D")
> a=read.csv("R.csv", header=TRUE)
> attach(a)
> head(a)
> library(BMA)
> x=a[,c(2,3,4,5,6,7,8,9,10)]
> y=a[,1]
> s=bic.glm(x, y, strict=F, OR=20, glm.family="binomial")
> summary(s)
```

Call:

```
bic.glm.data.frame(x = x, y = y, glm.family = "binomial", strict = F, OR = 20)
```

40 models were selected

Best 5 models (cumulative posterior probability = 0.4324):

	p!=0	EV	SD	model 1	model 2	model 3	model 4
Intercept	100	-6.600e+00	1.710e+00	-5.752e+00	-6.312e+00	-6.879e+00	....
THC	12.4	8.861e-08	3.096e-07	.	.	.	....
TBC	23.7	1.019e-04	2.594e-04	.	.	.	....
NEU	25.3	2.276e-04	4.692e-04	.	.	.	....
MONO	69.1	8.057e-04	6.663e-04	1.262e-03	1.183e-03	1.310e-03	....
LYM	18.1	-8.252e-05	2.548e-04	.	.	.	....
HGKT	100.0	6.679e-01	2.222e-01	5.699e-01	7.342e-01	6.921e-01	....
TTĐTĐTB ở GAN	63.1	3.237e-01	3.128e-01	.	5.988e-01	3.950e-01	....
TTĐTĐTB ở THẬN	95.1	2.349e-01	1.048e-01	2.447e-01	2.917e-01	1.898e-01	....
TTĐTĐTB ở LÁCH	41.8	-3.598e-02	5.143e-02	.	.	-8.398e-02	....