

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ 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

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC NÔNG NGHIỆP

TP. HCM - Năm 2022

Công trình được hoàn thành tại:

Viện Nghiên cứu Nuôi Trồng Thủy sản II, 116 Nguyễn Đình Chiểu, Phường
Đa Kao, Quận 1, Thành phố Hồ Chí Minh.

Người hướng dẫn khoa học: TS. Nguyễn Văn Sáng

TS. Nguyễn Hữu Thịnh

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

**Luận án được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp trường họp tại
Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh.**

Vào hồi.....giờ.....ngày.....tháng.....năm

Có thể tìm luận án tại:

- Thư viện Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh.
- Thư viện Quốc gia Hà Nội.

CHƯƠNG 1

MỞ ĐẦU

1.1. Tính cấp thiết của đề tài

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 cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) đạt 1,56 triệu tấn và giá trị xuất khẩu đạt 1,61 tỉ USD trong năm 2021 (VASEP, 2021). Hiện nay, việc nuôi cá tra thâm canh đang phải đối mặt với dịch bệnh xảy ra thường xuyên (Từ Thanh Dung và ctv., 2010; Le và Cheong, 2010). Trong đó, bệnh gan thận mù 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., 2008; Từ Thanh Dung và ctv., 2015). Trong các giải pháp tăng khả năng kháng bệnh cho cá thì chọn giống kháng bệnh theo phương pháp 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 thành lập được quần đàn cá tra bố mẹ chọn giống kháng bệnh gan thận mù (G0) với hệ số di truyền và hiệu quả chọn lọc ước tính là 0,27 và 8,3%. Tuy nhiên, để tiếp tục mang lại hiệu quả chọn lọc cao đối với tính trạng kháng bệnh và tăng trưởng, đàn cá G0 cần được tiếp tục chọn lọc qua nhiều thế hệ. Ngoài ra, bệnh gan thận mù 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. Vì vậy, cần có nghiên cứu ước tính các thông số di truyền trên tính trạng kháng bệnh và tăng trưởng, tỉ lệ sống lúc thu hoạch nhằm định hướng cho chọn lọc các 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 mù 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 lý 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 nhằm định hướng cho chọn lọc thế hệ thứ nhất (G1) và đề xuất các giải pháp kỹ thuật phục vụ chọn lọc kháng bệnh gan thận mũ lâu dài ở cá tra.

1.2. Mục tiêu đề tài

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 kháng bệnh gan thận mũ thế hệ G1 và nghiên cứu các giải pháp kỹ thuật hỗ trợ nâng cao hiệu quả của chọn giống cá tra kháng bệnh trong tương lai.

1.3. 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

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.

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.

1.4. Ý nghĩa khoa học, thực tiễn và tính mới của luận án

1.4.1. 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 mù, 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.

1.4.2. 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.

1.4.3. 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 mù ở giai đoạn cá hương cho quần đàn 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 mù trên cá tra nhằm nâng cao hiệu quả chọn lọc cá tra kháng bệnh trong tương lai.



CHƯƠNG 2

CƠ SỞ LÝ THUYẾT 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 mù 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

Vật liệu chính của nghiên cứu là quần thể cá tra chọn giống kháng bệnh gan thận mũ (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 mũ” giai đoạn 2012 - 2015 thuộc Viện NCNTTS II. Quần thể G0 bao gồm nhóm chọn lọc (710 con, thuộc 120 gia đình) và nhóm đối chứng (120 con, thuộc 25 gia đình).

Nuôi vỗ 425 cá bố mẹ G0 bao gồm 325 con nhóm chọn lọc (133 cá bố và 192 cá mẹ), thuộc 120 gia đình và 100 con nhóm đối chứng (41 cá bố và 59 cá mẹ) cá thuộc 25 gia đình trong ao 2.000 m² 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%.

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

Phương pháp phối: phép phối thứ bậc (n đực \times $2n$ cái = $2n$ gia đình).

2.1.1.3. Ấp trứng cá tra

Cho 0,5 mL tinh dịch vào 50 g trứng và dùng lông cánh gia cầm khuấy nhẹ, nhanh và đều, cho một ít nước vào để hoạt hóa tinh trùng. Sau đó khử dính trứng bằng dung dịch tanin 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 nở được 20 - 30 giờ thì nhanh chóng đưa cá bột sang bể composite 1,5 m³ (thể tích nước 1,0 m³) 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.

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 \times 2,0 \times 1,0 m) đặt trong cùng một ao đất (2.000 m²) cho đến kích cỡ đánh dấu. Sau khi sản xuất được 155 gia đình cá hương 17 ngày tuổi, chọn 33 gia đình cá hương tiến hành cảm nhiễm đánh giá khả năng kháng bệnh ở giai đoạn này.

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), số gia đình cá còn lại là 130 gia đình được tiến hành đánh dấu từ PIT (dấu 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. Đánh dấu PIT cho 7.664 cá (trung bình 58 con/gia đình) thuộc 130 gia đình cho thí nghiệm cảm nhiễm 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.

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

Đưa 33 gia đình cá hương 17 ngày tuổi hay 130 gia đình cá giống về thuần tại phòng thí nghiệm ướn trong thời gian 10 ngày trước khi tiến hành thí nghiệm cảm nhiễm.

Chủng vi khuẩn *E. ictaluri* Gly09M dùng cho thí nghiệm cảm nhiễm. Vi khuẩn được phục hồi trên môi trường thạch máu cừu ở trong tủ ẩm 48 giờ ở 28°C, sau đó chọn một đến hai khuẩn lạc nuôi tăng sinh trong môi trường BHIB, lắc 85 vòng trong 24 giờ. Xác định mật độ vi khuẩn bằng máy so màu quang phổ DNA SmartSpec Plus ở bước sóng 550 nm.

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 bằng phương pháp cấy vi khuẩn từ gan, thân và lách, cấy thuần vi khuẩn và nhuộm Gram quan sát hình thái và kiểm tra phát hiện *E. ictaluri* bằng phản ứng PCR.

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 bằng phương pháp ngâm với các liều gây nhiễm 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 và 10^7 CFU/mL. Cá đối chứng âm được ngâm trong nước không có vi khuẩn gây nhiễm và đối chứng dương ngâm trong nước có 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. Liều LD₅₀ của vi khuẩn được xác định theo phương trình Probit (Finney, 1971).

Cá giống: 480 cá giống được gây nhiễm bằng phương pháp cohabitant kết hợp dựa trên những thông số kỹ thuật đã được tối ưu từ kết quả đề tài KC.06. Hai thí nghiệm thăm dò xác định liều và cách gây nhiễm cohabitant kết hợp bao gồm: (1) tỉ lệ ghép cá cohabitant theo tỷ lệ 35% và 50% so với cá thí nghiệm và (2) bổ sung vi khuẩn cho vào bể cảm thí nghiệm nhằm đạt được mật độ 10^5 và 10^6 CFU/mL. Mỗi NT/thí nghiệm thăm dò lặp lại 02 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: 1.650 cá thuộc 33 gia đình (50 con/gia đình) được gây cảm nhiễm bằng phương pháp ngâm trong bể riêng 30 L, mật độ cá trong bể là 1 cá/0,4 lít nước và nhiệt độ nước 26 - 28°C. Liều gây nhiễm được xác định từ kết quả thí nghiệm LD₅₀. Ghi nhận biểu hiện triệu chứng, bệnh tích, số lượng cá chết 3 giờ/lần trong suốt 21 ngày sau khi gây nhiễm.

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) được gây cảm nhiễm bằng phương

pháp cohabitant kết hợp. Cá cohabitant được tiêm vi khuẩn vào xoang bụng với liều 2×10^5 CFU/cá. Thí nghiệm thực hiện trong 2 bể 16.000 L, mật độ cá là 1 cá/4,1 lít nước, nhiệt độ 26 - 28°C. Tỷ lệ ghép cá cohabitant và liều bổ sung vi khuẩn được xác định từ kết quả thí nghiệm thăm dò. Ghi nhận triệu chứng, bệnh tích, số cá chết 3 giờ/lần theo truy dấu từ PIT cho từng cá thể.

Thu thập số liệu trong thí nghiệm cảm nhiễm

Theo dõi tình trạng sống/chết của từng cá thể 3 giờ/lần. 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). 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 tính 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 tương ứng là SUR50, SUR25, SUREND và TIME50, TIME25 và TIMEEND.

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

Cá giống: 5.838 cá thể thuộc 130 gia đình (trung bình 45 con/gia đình) được nuôi trong ao 2.000 m², mực nước 1,5 m, mật độ trung bình 3,1 con/m². Các kĩ thuật nuôi được áp dụng theo quy trình đã được hoàn thiện để đánh giá tăng trưởng cho chọn giống tại Viện NCNTTS II. Sau nuôi tăng trưởng 156 ngày tiến hành đo đạc các tính trạng tăng trưởng, tình trạng sống ở các cá thể.

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

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 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 mô hình không ước tính được nếu có bao gồm ($\sigma_r^2 =$ 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:

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

trong đó y_{ij} là tính trạng sống/chết (SUR) và thời gian chết (TIME) của cá thể j khi kết thúc thí nghiệm cảm nhiễm, μ là trung bình tỉ lệ sống của quần thể cá thí nghiệm sau hiệu chỉnh các yếu tố 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 sống của từng cá thể là: $h^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_C^2 + \sigma_E^2}$.

- Hệ số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mũ 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 (σ_C^2 = phương sai di truyền, σ_E^2 = phương sai số dư và phương sai kiểu hình, $\sigma_P^2 = \sigma_G^2 + \sigma_E^2$) là:

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

trong đó, y_{ijkl} là tính trạng SUR và TIME của cá thể k ở các cắt ngang và khi kết thúc thí nghiệm cảm nhiễm, μ là trung bình của quần thể cá thí nghiệm sau hiệu chỉnh các yếu tố ảnh hưởng, β_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 $c^2 = \frac{\sigma_C^2}{\sigma_A^2 + \sigma_C^2 + \sigma_E^2}$. Các ngắt đoạn cho SUR và TIME tương tự như mô tả cho cá hương ở trên.

2.1.4.2. Hệ số di truyền 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) và chiều dài (HL) lúc thu hoạch bao gồm σ_A^2 = phương sai di truyền cộng gộp, σ_C^2 = phương sai ảnh hưởng của môi trường chung, σ_E^2 = phương sai số dư và phương sai kiểu hình $\sigma_P^2 = \sigma_A^2 + \sigma_C^2 + \sigma_E^2$ là:

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

trong đó y_{ijklm} là khối lượng của cá thể k khi thu hoạch, μ là trung bình của quần thể sau hiệu chỉnh các yếu tố ảnh hưởng, β_1 là hệ số hồi quy của hiệp biến thời gian ương cho đến khi đánh dấu (*Nursetime*), β_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_l* là ảnh hưởng ngẫu nhiên của cá thể l, *dam_m* là ảnh hưởng của môi trường ương riêng rẽ đến đánh dấu và e_{ijklm} là ảnh hưởng ngẫu nhiên của số dư. 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 $c^2 = \frac{\sigma_C^2}{\sigma_A^2 + \sigma_C^2 + \sigma_E^2}$.

2.1.5. Ước tính tương quan di truyền

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. 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 giữa giá trị EBV (r_G) của các gia đình.

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

truyền của hai tính trạng, σ_1^2 và σ_2^2 lần lượt là phương sai của ảnh hưởng di truyền của tính trạng 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 $R = i \times h^2 \times \sigma_P$ (Falconer và Mackay, 1996).

2.1.7. Đề xuất định hướng chọn lọc thế hệ G1

Nghiên cứu từ các kết quả ước tính các thông số di truyền trong Mục 2.1.4, 2.1.5, 2.1.6 đề xuất tính trạng và ngưỡng cắt ngang trong quá trình cảm nhiễm nhằm xử lý số liệu chọn lọc cá tra kháng bệnh G1.

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

2.2.1.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu vây ngực cá tra (0,5 cm) của 50 gia đình full và half-sib gồm 90 mẫu vây cá bố mẹ G0 (40 mẫu cá bố và 50 mẫu cá mẹ) và 500 mẫu vây cá con G1.

Mười microsatellite được sử dụng trong nghiên cứu này được phát triển và đánh giá có tính đa hình cao bởi Nguyễn Văn Sáng và ctv. (2020). Trong một bộ multiplex PCR, các cặp môi trong cùng một 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).

2.2.1.2. 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 trên 50 cá thể bố mẹ G0 và 50 cá thể con G1 thông qua:

+ Hiệu suất PCR 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 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.

2.2.1.3. 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 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). Truy xuất bằng phần mềm COLONY 2.0.6.6 với phương pháp xác định bố mẹ dựa trên khả năng.

Các tỉ lệ để đánh giá năng lực truy xuất được tính toán theo Fu và ctv. (2013) trên các gia đình bằng cách sử dụng các công thức sau:

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

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

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 , %):

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

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) ($P_{f(m)}$, %):

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

$A_{f(m)}$ là số lượng các cá con truy xuất được 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 và tần số null-alen được kiểm định có ý nghĩa thống kê bằng phần mềm MICROCHECKER, tỉ lệ lỗi ghi nhận kiểu gen được tính bằng phần mềm COLONY 2.0.6.6.

- Truy xuất với 9 microsatellite

Sau khi truy xuất phả hệ với 10 microsatellite, chỉ thị microsatellite Pahr-02 có tần số null-alen và sai số ghi nhận cao nên loại khỏi phân tích. Bộ chỉ thị còn lại với 9 microsatellite dùng để truy xuất phả hệ với các bước thực hiện truy xuất phả hệ tương tự trong truy xuất với 10 microsatellite trên.

2.2.2. Phương pháp về đánh giá và đề xuất chỉ tiêu miễn dịch là tính trạng kháng bệnh gan thận mỡ 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 dựa vào xếp hạng EBV trung bình của 130 gia đình cá giống tại giai đoạn cắt ngang tỉ lệ sống toàn bộ cá thí nghiệm 50% trong hai giai đoạn cảm nhiễm.

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

- Thí nghiệm cảm nhiễm thăm dò thời điểm thu mẫu chỉ tiêu miễn dịch

Thí nghiệm được bố trí gồm 2 bể 500 L gồm mỗi bể có 35 cá cohabitant và 100 cá thí nghiệm với thông số kỹ thuật tương tự như thí nghiệm cảm nhiễm trên 130 gia đình cá giống. Thời gian thu mẫu máu và mô 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. Thu mẫu trung bình 6 mẫu/bể/lần.

- Cảm nhiễm và đánh giá khả năng đáp ứng miễn dịch của hai nhóm gia đình kháng bệnh cao và thấp theo EBV

Sáu gia đình cá giống G1 (30 cá/gia đình) có trọng lượng trung bình là 25 g/con được bố trí cảm nhiễm trong bể nhựa ($70 \times 30 \times 30$ 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.

- Thu thập và phân tích các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch

Tổng 119 cá thể với 58 cá thể thuộc gia đình kháng bệnh cao (KBC) và 61 cá thể thuộc gia đình kháng bệnh thấp (KBT) được thu mẫu máu và mẫu mô để phân tích qua các thời điểm là ngay trước khi cảm nhiễm, 24, 48, 264 và 312 giờ sau cảm nhiễm (hpi); thu mẫu trung bình 04 cá thể/gia đình/thời điểm. Phân tích các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch như sau: (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 thân 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).

- 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 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 kháng bệnh trên phần mềm thống kê SPSS.

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 mỡ

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

Xác suất xác định được cá thể thuộc gia đình kháng bệnh cao hay thấp của các thông số miễn dịch được mô phỏng bằng mô hình hồi quy logistic Bayes đa biến với các tính trạng miễn dịch thực hiện trên 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 mô hình và 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, Pseudo R^2 , tính đa cộng tuyến qua

hệ số VIF (Phan và ctv., 2018). Ngoài ra, tỉ số ODD 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 bao gồm: (1) độ nhạy (Sen) là xác suất phân biệt được cá thể kháng bệnh cao chính xác; (2) độ đặc hiệu (Spe) là xác suất phân biệt được cá thể kháng bệnh thấp chính xác; (3) Giá trị diện tích dưới đường cong ROC (Area Under the Curve - AUC); (4) giá trị ngưỡng phân biệt tối ưu của các chỉ tiêu miễn dịch.



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

Tỉ lệ thành thực cá bố mẹ đạt 100% cho cả cá mẹ và bố sau bốn tháng nuôi vỗ. Tỉ lệ cá mẹ rụng trứng và trứng vuột được cao lần lượt là 93 - 100% và 11,7%. Tỉ lệ thụ tinh của cá mẹ đạt trung bình 78,6% (55 - 91%) và tỉ lệ cá con nở của các gia đình đạt trung bình 89,7% (80 - 98%). 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.

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

Số lượng các gia đình ương nuôi từ giai đoạn cá bột đến đánh dấu đạt 130 gia đình gồm 108 gia đình chọn lọc và 22 gia đình đối chứng (hao hụt 25 gia đình so với khi thả ương cá hương).

3.1.1.3. Kết quả đánh dấu các gia đình cá giống

Số lượng cá giống 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.

3.1.2. Kết quả cảm nhiễm bệnh gan thận mũ

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

Giá trị LD₅₀ của chủng vi khuẩn giảm qua các giai đoạn cảm nhiễm và tại ngày 13 sau cảm nhiễm đạt $5,8 \times 10^4$ CFU/mL. Trong chọn giống số lượng cá chết tối thiểu trong thí nghiệm cảm nhiễm có thể giúp xử lí số liệu chọn lọc

là 50%. Vì vậy, dựa vào kết quả LD₅₀ của vi khuẩn trên cá hương, nghiên cứu chọn liều cảm nhiễm trên cá hương là 10⁵ CFU/mL.

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

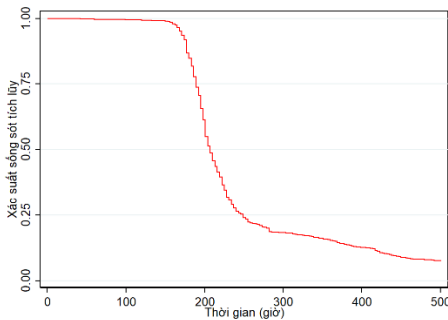
Tỉ lệ cá thí nghiệm chết tương ứng cho hai tỉ lệ ghép cá cohabitant (35% và 50%) lần lượt là 20,0%, 31,1% và tỉ lệ cá thí nghiệm chết tương ứng cho hai liều bổ sung vi khuẩn vào bể cảm nhiễm (10⁵ CFU/mL và 10⁶ CFU/mL) là 73,5% và 93%. Tỉ lệ ghép cá cohabitant 35% và liều bổ sung vi khuẩn 10⁵ CFU/mL được sử dụng cho 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

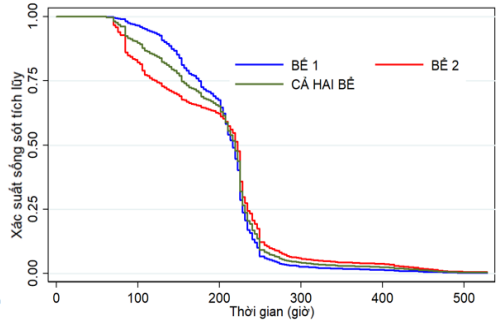
- Kết quả chỉ tiêu môi trường và mầm bệnh trong quá trình cảm nhiễm

Trong quá trình thí nghiệm cảm nhiễm thì các thông số thủy lý hóa nước như pH (7,5 - 7,9) và nhiệt độ của nước được duy trì ổn định (26,1 - 26,8^oC) cho sự phát triển của cá tra. Đồng thời, nhiệt độ và pH của nước trong thí nghiệm thích hợp để vi khuẩn *E. ictaluri* phát triển để gây bệnh. Sau 48 giờ cảm nhiễm trên cá hương và 12 giờ cảm nhiễm trên cá giống, tại mô cá ghi nhận vi khuẩn xuất hiện. Sau đó, các triệu chứng bệnh quan sát được ở cá hương và cá giống bệnh sau khi cảm nhiễm *E. ictaluri* tương tự các nghiên cứu trước đây như sung huyết, xuất huyết, hoại tử gan, thận và lách. Các đặc điểm về hình thái, khuẩn lạc, DNA của tác nhân gây bệnh phân lập trong nghiên cứu này hoàn toàn giống với các đặc điểm của chủng vi khuẩn *E. ictaluri* được công bố và chủng Gly09M dùng cho thí nghiệm ban đầu.

- Kết quả tỉ lệ sống, thời gian sống của 33 gia đình cá hương và 130 gia đình cá giống



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



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

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 (Hình 3.6). 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 .

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 (Hình 3.7). Sau đó cá chết giảm từ 240 hpi và ngừng chết tại giai đoạn 480 hpi. Kết thúc thí nghiệm, tỉ lệ sống trung bình của 130 gia đình cá giống là 0,30%.

3.1.3. Kết quả nuôi tăng trưởng các cá thể và gia đình cá giống G1

Khối lượng trung bình cá tại thời điểm thu hoạch là 868,40 g/con, chiều dài chuẩn trung bình đạt 38,45 cm/con. Tỉ lệ sống cả đàn đạt 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%.

3.1.4. Kết quả 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

Về chọn các thời điểm cắt ngang để ước tính các thông số di truyền, theo Gjøsøn và ctv. (1997) và Ødegård và ctv. (2011) nghiên cứu các mô hình toán xử lí 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, Phạm và ctv. (2020b; 2020c) 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. Trong nghiên cứu này thời gian cá sống đạt ngưỡng 50% và 25% tổng số cá thí nghiệm là nhanh (< 80 giờ) sau đó cá thí nghiệm chết chậm hơn; 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 lí để đánh giá các biến dị di truyền. Hơn nữa, từ giai đoạn cá giống 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 giai đoạn cá hương

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 toàn bộ cá thí nghiệm sống đạt 50%, 25% và kết thúc thí nghiệm đạt mức cao tương ứng là 0,43, 0,43, 0,55 và 0,46, 0,51, 0,55 (Bảng 3.9). 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.

Bảng 3.9. Các phương sai thành phần và hệ số di truyền ước tính (h^2) cho tính trạng kháng bệnh gan thận mù 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 ($h^2 \pm se$)
	σ_G^2	σ_E^2	σ_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

σ_A^2 : phương sai di truyền, σ_E^2 : phương sai của số dư, σ_P^2 : phương sai kiểu hình, h^2 : hệ số di truyền ước tính, se: sai số chuẩn.

- Hệ số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mù 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 cho các cắt ngang SUR50, SUR25 và SUREND tương ứng là 0,2200, 0,3731 và 0,1304 (Bảng 3.10).

Bảng 3.10. Các phương sai thành phần và hệ số di truyền ước tính (h^2) cho tính trạng kháng bệnh gan thận mù 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)
	σ_A^2	σ_C^2	σ_E^2	σ_P^2		
SUR50	0,0500	0,0070	0,1703	0,2273	0,2200 \pm 0,03	0,0308 \pm 0,03
TIME50	7404,3700	887,9000	22192,8000	30485,0700	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

σ_A^2 : phương sai di truyền, σ_C^2 : phương sai của số dư, σ_E^2 : phương sai ảnh hưởng môi trường nuôi riêng rẽ các gia đình đến lúc đánh dấu, σ_P^2 : phương sai kiểu hình, h^2 : hệ số di truyền ước tính; se: sai số chuẩn.

Ngoài ra, h^2 cho tính trạng kháng bệnh thông qua thời gian sống (TIME) ở mức trung bình và cao tương ứng là 0,2429, 0,3798 và 0,3618 (Bảng 3.10). Kết quả cho thấy hiệu quả ở mức trung bình đến cao nếu thực hiện chọn lọc cho tính trạng kháng bệnh gan thận mù trên cá giống ở các cắt ngang tỉ lệ sống toàn bộ 50% và 25% và thấp nếu thực hiện chọn lọc cho tính trạng kháng bệnh gan thận mù trên cá giống khi kết thúc thí nghiệm cảm nhiễm.

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

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 $0,47 \pm 0,18$ (Bảng 3.11) và khác zero có ý nghĩa thống kê. Hệ số di truyền cho tỉ lệ sống lúc thu hoạch sau nuôi tăng trưởng (SURGROW) ở mức trung bình ($0,23 \pm 0,02$) và khác zero có ý nghĩa thống kê. 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)
	σ_A^2	σ_C^2	σ_E^2	σ_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	$0,23 \pm 0,02$	$0,10 \pm 0,05$

σ_A^2 : phương sai di truyền, σ_C^2 : phương sai của số dư, σ_E^2 : phương sai ảnh hưởng môi trường nuôi riêng rẽ các gia đình đến lúc đánh dấu, σ_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

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

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 ¹	SUR25 ¹	SUREND ¹	TIME50 ¹	TIME25 ¹	TIMEEND ¹
SUR50 ²	0,04	0,02	-0,18	— ⁽³⁾	—	—
SUR25 ²	-0,03	0,00	-0,02	—	—	—
SUREND ²	0,04	0,18	0,26	—	—	—
TIME50 ²	—	—	—	0,10	0,07	-0,01
TIME25 ²	—	—	—	-0,03	-0,04	-0,06
TIMEEND ²	—	—	—	0,15	0,14	0,09

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

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 thấp từ tương quan nghịch đến thuận (-0,18

- 0,26) (các giá trị âm không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với zero) (Bảng 3.12). Như vậy cho thấy chọn lọc tính trạng kháng bệnh ở cá giống không làm giảm khả năng kháng bệnh ở cá hương.

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 (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).

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	-	-(1)	-	-	-	-
TIME50	0,99	-	-	-	-	-
SUR25	0,79	0,72	-	-	-	-
TIME25	0,90	0,87	0,94	-	-	-
SUREND	0,18	0,22	0,39	0,33	-	-
TIMEEND	0,86	0,86	0,81	0,90	0,55	-

¹: 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

Tương quan di truyền (r_A) thuận và gần tuyệt đối (0,99) giữa HW và HL và hai tính trạng này có thể xem như là một. Tương quan di truyền nghịch và ở mức $-0,13 \pm 0,12$ giữa HW và SURGROW, khác zero không có ý nghĩa thống kê và cho thấy chọn lọc nâng cao HW có thể không ảnh hưởng đến tỉ lệ sống lúc thu hoạch (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 cá giống

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

Tương quan di truyền (r_A) giữa HW với SUR50, SUR25 và SUREND và r_A giữa SURGROW và SUR50, SUR25, SUREND, TIME50, TIME25 và TIMEEND (Bảng 3.14) 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.

Qua kết quả 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 và tương quan di truyền giữa chúng, nghiên cứu đề xuất 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 để ước tính giá trị chọn giống (EBV) phục vụ cho chọn lọc cá giống G1.

3.1.6. Hiệu quả chọn lọc ước tính trên tính trạng kháng bệnh

Khi áp dụng tỉ lệ chọn lọc trong nghiên cứu này là 8% để có thể đảm bảo chọn lọc đủ số lượng cá bố mẹ cho chọn giống thế hệ tiếp theo, hiệu quả chọn lọc ước tính cho thế hệ G1 cho tính trạng SUR50 (R-SUR50) và tính trạng SUR25 (R-SUR25) đạt 8,34 - 15,13% (Bảng 3.15).

Bảng 3.15. Hiệu quả chọn lọc ước tính cho tính trạng kháng bệnh gan thận mù 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	8,00	1,858	0,22	20,41	8,34
R-SUR25	8,00	1,858	0,37	22,01	15,13

3.1.7. Đề xuất định hướng chọn lọc thế hệ G1

Qua các luận giải trong nghiên cứu, tỉ lệ chết trong thí nghiệm cao (99,70%) như hiện tại, 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) đạt 8,34 - 15,13% tùy thuộc vào tính trạng. Ngoài ra, nếu chọn lọc được áp dụng cho tính trạng kháng bệnh gan thận mù theo SUR50 hoặc SUR25 thì không ảnh hưởng đến tính trạng kháng bệnh giai đoạn cá hương và có khả năng mang lại hiệu quả một phần tỉ lệ sống sau nuôi tăng trưởng ở quần thể cá tra G1.

3.2. Kết quả 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 cao từ 98 - 100%. Tổng số alen của từng chỉ thị trên nhóm mẫu cá tra bước sàng lọc này (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. Các microsatellite khảo sát trên quần thể G0 và G1 đều tuân theo quy luật Hardy-Weinberg ngoại trừ Pahy-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 bước sàng lọc này cho thấy, 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.

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 trình bày tại Bảng 3.17. 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 con. 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). Vì vậy, nghiên cứu đã xử lí truy xuất tiếp theo từ 9 microsatellite mà không bao gồm Pahy-02.

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_r , %)	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	
Các chỉ tiêu phân tích	Truy xuất trên hai nhóm gia đình theo bố	
	Gia đình I	Gia đình II
Số cá con được truy xuất bố mẹ	300	200
Tỉ lệ cá con truy xuất đúng bố (P_r , %)	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 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%) (Bảng 3.19) so với 10 microsatellite (83,0%). Kết quả truy xuất đúng bố, mẹ, cả bố và mẹ của các gia đình I và II cao (93% và 94%) cho thấy 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.

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>Các chỉ tiêu phân tích</i>	<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

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

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 và -0,03). 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 tỉ lệ sống và thời gian sống hai nhóm kháng bệnh có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$). Sự khác biệt tỉ lệ sống tích lũy của hai nhóm kháng bệnh cao và thấp chủ yếu thể hiện trong giai đoạn 24 - 200 giờ sau cảm nhiễm (hpi).

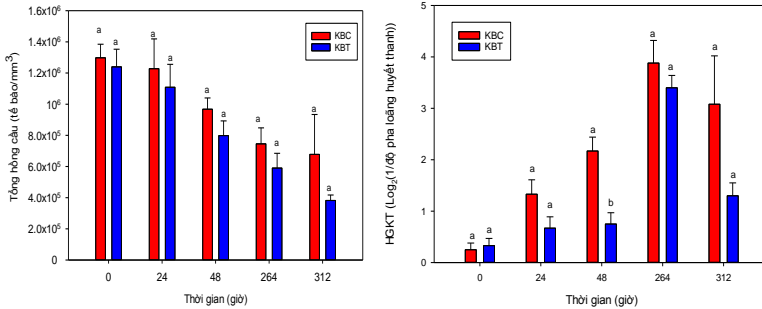
3.2.2.2. Đánh giá các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu và đáp ứng miễn dịch đặc hiệu của hai nhóm gia đình kháng bệnh cao và thấp - Kết quả thí nghiệm thăm dò thu máu phân tích chỉ tiêu miễn dịch

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

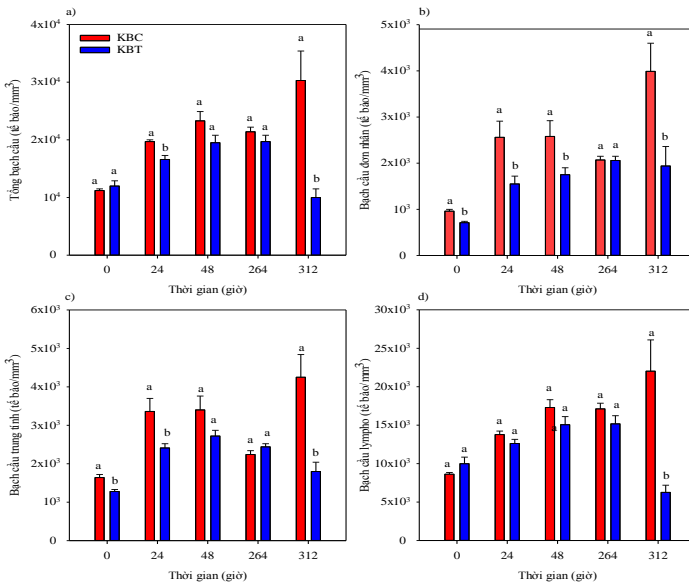
giai đoạn 264 hpi. Đây cũng là thời điểm cá lờ độ và chết cao điểm trong thí nghiệm. Giai đoạn các thông số miễn dịch bắt đầu giảm trong thí nghiệm là tại 312 hpi. Vì vậy, nghiên cứu quyết định thu mẫu cá và mô tại các giai đoạn trước cảm nhiễm, 24 hpi, 48 hpi, 264 hpi, 312 hpi nhằm phân tích các yếu tố đáp ứng miễn dịch cho 6 gia đình cá tra chọn giống được cảm nhiễm.

- Đánh giá các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch của hai nhóm gia đình kháng bệnh cao và thấp

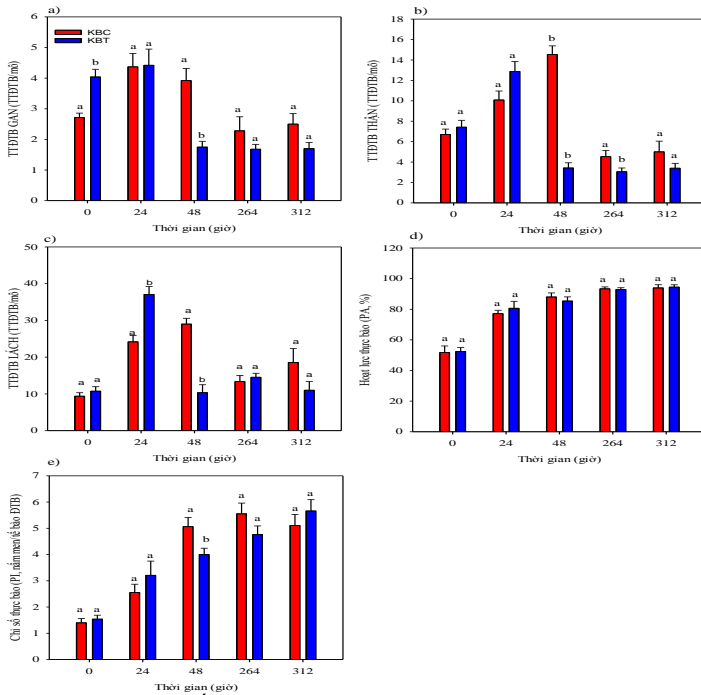
Đáp ứng miễn dịch nhóm KBC cho thấy có hiệu quả hơn nhóm KBT trong quá trình cảm nhiễm trình bày tại Hình 3.11, Hình 3.12 và Hình 3.13.



Hình 3.11. So sánh tổng hồng cầu và hiệu giá kháng thể sau khi cảm nhiễm *E. ictaluri* của hai nhóm gia đình 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 KBC và KBT.



Hình 3.13. So sánh số lượng TTĐTB và khả năng thực bào của đại thực bào (PA; PI) sau khi cảm nhiễm *E. ictaluri* của hai nhóm gia đình cá tra KBC và KBT.

Đáp ứng miễn dịch nhóm KBC cho thấy có hiệu quả hơn nhóm KBT trong quá trình cảm nhiễm: (1) số lượng THC 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; 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 (HGKT) nhóm KBC cao hơn nhóm KBT trong các giai đoạn cảm nhiễm (Hình 3.11, 3.12, 3.13).

- Đánh giá và đề xuất chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch làm chỉ tiêu xác định khả năng kháng bệnh gan thận mủ

Các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch dễ thực hiện (ngoại trừ khả năng thực bào của đại thực bào) có liên quan đến đặc điểm kháng bệnh trong toàn bộ quá trình cảm nhiễm với xác suất liên quan từ 12,40 - 100%. 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 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. Phân tích hồi quy logistic đa biến, 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 R² lần lượt là 33,07, 58,43; 101,95 và 0,62, 0,22, 0,28 ($p < 0,05$). Giá trị AUC cho các thông số miễn dịch trong nghiên cứu này tại 24 - 48 hpi, 264 - 312 hpi và toàn bộ quá trình cảm nhiễm từ 0,82 - 0,95. Vì vậy, 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. Trong đó, giai đoạn 24 - 48 hpi là giai đoạn xác định các cá thể thuộc nhóm KBC hay KBT có hiệu quả nhất (AUC= 0,95) với các thông số miễn dịch có ý nghĩa là NEU, HGKT, TTĐTB ở gan. Mô hình tại giai đoạn 24 - 48 hpi có độ nhạy và độ đặc hiệu là 91,7 % và 95,7% với ngưỡng phân biệt các cá thể kháng bệnh của NEU, HGKT và TTĐTB tương ứng là 2.610×10^3 TB/mm³, 1,00, 2,5 TTĐTB/mô.

❖ ❖ ❖ ❖ ❖ ❖
CHƯƠNG 4
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Các kết quả nghiên cứu của đề tài đã đạt được mục tiêu nghiên cứu ban đầu như sau:

- Nghiên cứu ước tính 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. Từ đó, 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 ở cá giống không làm giảm khả năng kháng bệnh gan thận mù 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%) nên có thể ứng dụng vào thực tiễn cho việc truy xuất phả hệ trên quần thể chọn giống tiếp thay thế đánh dấu PIT.

- 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 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 và chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch đặc hiệu là hiệu giá kháng thể 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.

4.2. Kiến nghị

- 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 ở 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 nhằm thay thế phương pháp đánh dấu từ PIT. Từ đó, góp phần chọn lọc chính xác và mang lại hiệu quả cao hơn, đặc biệt khi chúng ta 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%).

- Trong tương lai cần phân tích thêm các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch tại nhiều thời điểm khác nhau hơn để lựa chọn được chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch hiệu quả trong việc phân biệt được các cá thể kháng bệnh. Ngoài ra, để có thể sử dụng vào chương trình chọn giống dài hạn, cần thực hiện trên thực tế quần đàn chọn giống khi cảm nhiễm với số lượng cá thể và gia đình lớn hơn, 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.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CÓ LIÊN QUAN ĐÃ CÔNG BỐ

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 mù 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 mù 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 mù. *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 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 mù và xác định các chỉ thị miễn dịch phục vụ chọn giống. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam* 64(5): 65-69, ISSN 1859-4794, DOI: 10.31276/VJST.64(5).65-69.

5/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 phủ hệ quần đàn cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) chọn giống. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam* 64(2): 48-53, ISSN 1859-4794, DOI: 10.31276/VJST.64(2).48-53.