

KHẢ NĂNG KHÁNG BỆNH CỦA CÁ TRÊ LAI (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*) THỂ HỆ F₁ VÀ CON LAI SAU F₁ VỚI VI KHUẨN *Aeromonas hydrophila*

Phạm Thanh Liêm¹, Ambok Bolong Abol-Munaf², Mohd Azmi Ambak²,
Siti Shapor Siraj³ và Đoàn Nhật Phương¹

ABSTRACT

Responses of the Clarias macrocephalus, C. gariepinus and 4 genotypes of hybrid to Aeromonas hydrophila infection were observed in this study. Two experiments were carried out with fingerlings in size of 7.05-11.89 g. In the first experiment, the median lethal dose (LD₅₀) of bacteria was determined, then alterations of blood parameters between infected and control fishes were examined in the second experiment. Both experiments were conducted in 14 days. C. gariepinus performed the highest tolerance to A. hydrophila with highest LD₅₀ (10^{6.40}), followed by reciprocal F₁ hybrids. The most sensitive was C. macrocephalus with lowest LD₅₀ (10^{5.60}). Decrease in number of red blood cell, increase in number and percentages of leukocyte were observed in all genotypes after bacterial infection. Based on LD₅₀, percentages of leukocyte and percentage of phagocytic leukocyte the rank of disease resistance in these genotype were C. gariepinus > reciprocal F₁ hybrids > post-F₁ backcross hybrids > C. macrocephalus

Keywords: *Clarias, hybrid, disease resistance, blood parameter*

Title: *Responses of F1 reciprocal hybrids (clarias macrocephalus x C. gariepinus) and post-F1 backcross hybrids (Clariidae) to Aeromonas hydrophila infection*

TÓM TẮT

Khả năng kháng bệnh khi bị nhiễm Aeromonas hydrophila trên cá trê vàng, trê phi và 4 kiểu di truyền cá trê lai được khảo sát trong nghiên cứu này. Nghiên cứu được tiến hành qua 2 thí nghiệm trên cá giống có kích cỡ dao động từ 7,0 – 11,89g. Trong thí nghiệm 1, liều gây chết 50% (LD₅₀) của vi khuẩn được xác định, sau đó so sánh sự thay đổi về huyết học của cá sau khi nhiễm khuẩn với cá khỏe trong nghiệm thức đối chứng. Cả 2 thí nghiệm được tiến hành trong thời gian 14 ngày. Cá trê phi có sức chịu đựng cao nhất khi bị nhiễm khuẩn với LD₅₀ là 10^{6.40} tiếp theo là cá trê lai F₁. Cá trê vàng có sức chịu đựng thấp nhất với LD₅₀ là 10^{5.60}. Suy giảm số lượng hồng cầu và gia tăng số lượng bạch cầu đặc biệt là bạch cầu đơn nhân và bạch cầu trung tính quan sát được trên tất cả các kiểu di truyền. Trên cơ sở so sánh LD₅₀, tỉ lệ bạch cầu các loại và tỉ lệ bạch cầu thực bào (bạch cầu đơn nhân và bạch cầu trung tính), khả năng đề kháng của cá khi bị nhiễm Aeromonas hydrophila giảm dần theo thứ tự cá trê phi > 2 kiểu cá trê lai F₁ > 2 kiểu cá trê lai hậu F₁ > cá trê vàng.

Từ khoá: *Clarias, con lai, kháng bệnh, huyết học*

1 GIỚI THIỆU

Cải thiện sức đề kháng bệnh của các loài cá nuôi là một trong những biện pháp ngăn ngừa sự phát sinh dịch bệnh và có thể thực hiện được thông qua các chương trình chọn giống trong đó có chương trình lai tạo. Báo cáo trên cá hồi cho thấy có sự gia tăng sức đề kháng bệnh trên con lai tam bội giữa *Onchorhynchus mykiss* và *Salvelinus* spp (Dorson *et al.*, 1991). Con lai F₁ của cá nheo *Ictalurus punctatus* và cá nheo xanh *I. furcatus* có sức đề kháng với *Edwardsiella ictaluri* cao hơn cá nheo (Wolters *et al.*, 1996). Con lai giữa 2

¹ Bộ môn Sinh học và Bệnh thủy sản, Khoa Thủy sản, Đại học Cần Thơ, Việt Nam

² Viện Thủy sản nhiệt đới, Đại học Malaysia Teregganu, Malaysia

³ Khoa Khoa học, Đại học Putra, Malaysia

loài cá rô phi (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) cũng có sức đề kháng với *Aeromonas sobria* cao hơn so với 2 loài bố mẹ (Cai *et al.*, 2004).

Khả năng đề kháng bệnh của cá thường được xác định thông qua chỉ số LD₅₀ (liều gây chết 50%) và phản ứng của hệ miễn dịch khi cá tiếp xúc với tác nhân gây bệnh (Wolters *et al.*, 1996; Bosworth *et al.*, 1998; Cai *et al.*, 2004). Trong khi hệ miễn dịch đặc hiệu cần thời gian dài để tạo nên kháng thể thì hệ miễn dịch không đặc hiệu đóng một vai trò quan trọng trong việc đề kháng lại tác nhân gây bệnh (Anderson, 1992). Theo Ellis (1986), số lượng bạch cầu, tỉ lệ của từng loại bạch cầu là những chỉ số quan trọng thể hiện chức năng đề kháng của hệ miễn dịch không đặc hiệu ở cá.

Cá trê lai *Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus* là một đối tượng được nuôi phổ biến ở các nước vùng Đông nam Á. Chúng có ưu điểm lớn nhanh và có thể nuôi với mật độ cao (100 con/m²) với sản lượng có thể đạt đến 100 tấn/ha khi nuôi trong ao (Areerat, 1987). Tuy nhiên, các nghiên cứu về khả năng kháng bệnh cũng như những biến đổi về các chỉ tiêu huyết học khi cá bị nhiễm khuẩn còn rất hiếm. Do vậy nghiên cứu này được tiến hành nhằm xác định LD₅₀ và các biến đổi huyết học của các loại cá trê lai khi bị nhiễm vi khuẩn *Aeromonas hydrophila*, cũng như khả năng cải thiện sức đề kháng bệnh trên cá trê thông qua chương trình lai tạo.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Có 2 thí nghiệm được tiến hành với 6 kiểu di truyền của cá trê bao gồm 2 loài cá bố mẹ (CM: *Clarias macrocephalus* và CG: *C. gariepinus*), 2 kiểu con lai ngược xuôi F₁ (CMxCG và CGxCM), và 2 kiểu con lai trở lại với bố mẹ (CMCGxCM và CMCGxCG). Chỉ số LD₅₀ được xác định thông qua thí nghiệm 1. Trong thí nghiệm 2, sự khác biệt về huyết học của cá lai giữa cá khỏe và cá bị nhiễm *A. hydrophila* được khảo sát và so sánh với loài bố mẹ.

2.1 Cá thí nghiệm

Các kiểu cá lai và 2 loài cá bố mẹ có được từ sinh sản nhân tạo. Cá được chọn đồng cỡ, không nhiễm bệnh trước khi thí nghiệm và được thuần hóa với điều kiện thí nghiệm 3 ngày. Cá được cho ăn bằng thức ăn viên (Cargill, 6113) với khẩu phần ăn là 4 – 5% khối lượng thân. Chất thải và thức ăn thừa được rút ra trước khi cho cá ăn. Bể thí nghiệm được thay nước 2 lần/tuần với khoảng 90% thể tích nước. Trước khi bố trí thí nghiệm, cá được sát khuẩn bằng cách tắm trong formol 200 ppm trong 5 phút, và nguồn nước được xử lý bằng chlorine 30 ppm.

2.2 Chuẩn bị vi khuẩn cho thí nghiệm

Vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* dùng trong thí nghiệm được phân lập từ cá trê bệnh nuôi tại Trại cá thực nghiệm, Trường Đại học Malaysia Terengganu (UMT). Vi khuẩn được phân lập và định danh dựa vào bộ thử API 20E.

Vi khuẩn gốc được nuôi 24 giờ trên đĩa môi trường TSA (CM0131B, Oxoid) ở nhiệt độ 30°C. Sau khi kiểm tra độ thuần của vi khuẩn dựa vào hình dạng khuẩn lạc và kết quả nhuộm Gram dưới kính hiển vi, vi khuẩn được nuôi tăng sinh trong môi trường TSB 24 giờ ở nhiệt độ 30°C. Vi khuẩn sau đó được thu bằng cách ly tâm (5,000 vòng/phút trong vòng 5 phút) ở nhiệt độ 4°C và rửa sạch 3 lần bằng nước muối sinh lý (0,85 % NaCl). Mật độ vi khuẩn trong dung dịch chuẩn bị tiêm cho cá được xác định bằng phương pháp so màu sử dụng Microplate reader (Tecan, A5082) ở bước sóng 600 nm.

2.3 Xác định liều gây chết LD₅₀

Thí nghiệm được tiến hành trong hệ thống bể kính (0,35 x 0,20 x 0,20m) với 5 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức có 3 bể và mỗi bể bố trí 6 cá thí nghiệm. Ở mỗi nghiệm thức, cá được tiêm vào xoang bụng 0,1 mL vi khuẩn với mật độ khác nhau bao gồm dung dịch vi khuẩn gốc S ($2,34 \times 10^7 - 4,5 \times 10^7$ CFU/mL), và 4 dung dịch vi khuẩn pha loãng ở tỉ lệ $10^{0,3}$ (S/2, S/4, S/8 và S/16). Ở nghiệm thức đối chứng, 18 cá được chia ngẫu nhiên vào 3 bể và được tiêm 0,1 mL nước muối sinh lý. Khối lượng trung bình của cá thí nghiệm là 9,48 g ($\pm 1,09$), 9,33 g ($\pm 1,11$), 9,15 g ($\pm 1,28$), 9,34 g ($\pm 1,06$), 9,54 g ($\pm 1,17$) và 9,01 g ($\pm 1,00$) lần lượt cho cá lai CMxCG, CGxCM, CMCGxCM, CMCGxCG, và 2 loài bố mẹ CG, CM. Cá sau khi tiêm được theo dõi 14 ngày và tỉ lệ chết được ghi nhận hàng ngày. Cá chết do nhiễm *A. hydrophila* được xác định bằng cách tái phân lập vi khuẩn từ thận của cá chết. Trong quá trình thí nghiệm, nhiệt độ nước, oxy hòa tan và pH dao động từ 27,6 – 28,5°C, 6,4–7,4 ppm và 7,1–7,7.

LD₅₀ được tính dựa theo phương pháp của Reed và Muench (1938).

$$LD_{50} = 10^{\alpha \log b + c}$$

- Trong đó $\alpha = (\text{Tỉ lệ chết trên } 50\% \text{ nhỏ nhất} - 50) / (\text{Tỉ lệ chết trên } 50\% \text{ nhỏ nhất} - \text{Tỉ lệ chết dưới } 50\% \text{ lớn nhất})$;
- $b = \text{Tỉ lệ pha loãng}$, trong thí nghiệm này $b = 0,5$;
- $c = \text{số lũy thừa thấp nhất của mật độ vi khuẩn tại đó tỉ lệ chết cao hơn } 50\%$.

2.4 Khảo sát sự biến đổi về huyết học

Thí nghiệm được tiến hành trên hệ thống bể kính (0,40 x 0,30 x 0,25m). Với mỗi kiểu di truyền, 60 cá được chia ngẫu nhiên vào 4 bể kính trong đó 3 bể được gây cảm nhiễm với vi khuẩn và 1 bể đối chứng. Khối lượng trung bình của cá thí nghiệm lần lượt là 9,45 g ($\pm 1,10$), 9,32 g ($\pm 0,97$), 8,98 g ($\pm 1,17$), 9,41 g ($\pm 1,06$), 9,64 g ($\pm 1,06$) và 8,73 g ($\pm 1,7$) đối với cá lai CMxCG, CGxCM, CMCGxCM, CMCGxCG, và 2 loài bố mẹ CG, CM. Cá ở lô thí nghiệm được gây cảm nhiễm bằng cách tiêm 0,1 mL dung dịch vi khuẩn *A. hydrophila* ($1,05 \times 10^6$ CFU/mL) trong khi cá ở lô đối chứng không được tiêm bất kỳ dung dịch nào. Sau 14 ngày thí nghiệm, mẫu máu của 15 cá được gây cảm nhiễm (5 con/bể) và 15 cá ở bể đối chứng được thu từ tĩnh mạch đuôi của cá bằng ống tiêm.

Sự biến đổi về huyết học được phân tích dựa trên số lượng hồng cầu (RBC), bạch cầu (LKC) và số lượng của từng loại bạch cầu. Tổng số hồng cầu được xác định bằng buồng đếm hồng cầu Neubauer cải tiến. Mẫu máu được nhuộm và pha loãng 200 lần bằng dung dịch Natt-Herrick (Hrubec *et al.*, 2000; Benli và Yildiz, 2004). Số lượng bạch cầu và từng loại bạch cầu được xác định trên phết kính sau khi nhuộm với Wright – Giemsa. Chuẩn bị tiêu bản phết kính và thuốc nhuộm theo qui trình đề xuất bởi Chinabut *et al.* (1991). Số lượng RBC, LKC và từng loại bạch cầu được xác định theo phương pháp của Hrubec *et al.* (2000). Tế bào máu được phân loại dựa vào mô tả của Chinabut *et al.* (1991) trên cá trê trắng *C. batrachus*.

2.5 Thu và phân tích số liệu

Sự khác biệt về số lượng và tỉ lệ của từng loại tế bào máu giữa các kiểu di truyền được phân tích bằng ANOVA một nhân tố theo sau là phép thử Duncan ở mức ý nghĩa 0,05. Khác biệt các chỉ tiêu huyết học giữa các lô cá gây cảm nhiễm và lô đối chứng được kiểm chứng bằng phép thử T-test, trong một số trường hợp phép thử Mann-Whitney U được sử dụng thay thế. Số lượng tế bào máu được chuyển sang dạng log trước khi phân tích.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Liều gây chết 50%

Cá chết có các dấu hiệu đặc trưng do bị nhiễm khuẩn như xuất huyết vì mạch máu bị tổn thương ở mang, ruột và nhất là phần ruột sau. Xuất huyết ở vùng tiêm vi khuẩn, các vết lở loét trên da và râu cũng quan sát được. Các dấu hiệu này cũng giống như các dấu hiệu của bệnh “lở loét” gây nên bởi vi khuẩn *A. hydrophila* (Pal và Pradhan, 1990; Angka *et al.*, 1995) đã được mô tả trên cá da trơn và một số loài cá khác. Kết quả tái phân lập vi khuẩn từ thận cá chết cho thấy 100% cá lai CMxCG, CMCGxCM và CMCGxCG; 97,37% cá lai CGxCM; 96,30% cá trê phi CG; và 98,18% cá trê vàng CM bị nhiễm vi khuẩn *A. hydrophila*. Cá bắt đầu chết sau khi tiêm vi khuẩn 12 giờ. Như vậy có thể khẳng định là trong thí nghiệm xác định LD₅₀, hầu hết cá chết là do bị nhiễm khuẩn.

Bảng 1: Liều gây chết 50% của vi khuẩn *A. hydrophila* trên cá trê lai và 2 loài cá bố mẹ

Kiểu di truyền	Số lượng vi khuẩn được tiêm (CFU/0,1mL)	Tỉ lệ chết (%)	LD ₅₀ (CFU)
CM x CG	2,93 x 10 ⁶	77,78	10 ^{6,22}
	2,93 x 10 ^{5,7}	44,44	
	2,93 x 10 ^{5,4}	11,11	
	2,93 x 10 ^{5,1}	0,00	
	2,93 x 10 ^{4,8}	0,00	
CG x CM	2,93 x 10 ⁶	94,44	10 ^{5,93}
	2,93 x 10 ^{5,7}	72,22	
	2,93 x 10 ^{5,4}	44,44	
	2,93 x 10 ^{5,1}	0,00	
	2,93 x 10 ^{4,8}	0,00	
CMCG x CM	2,34 x 10 ⁶	100,00	10 ^{5,83}
	2,34 x 10 ^{5,7}	72,22	
	2,34 x 10 ^{5,4}	44,44	
	2,34 x 10 ^{5,1}	11,11	
	2,34 x 10 ^{4,8}	0,00	
CMCG x CG	2,43 x 10 ⁶	94,44	10 ^{5,82}
	2,43 x 10 ^{5,7}	88,89	
	2,43 x 10 ^{5,4}	44,44	
	2,43 x 10 ^{5,1}	5,56	
	2,43 x 10 ^{4,8}	0,00	
CM x CM	2,43 x 10 ⁶	94,44	10 ^{5,60}
	2,43 x 10 ^{5,7}	88,89	
	2,43 x 10 ^{5,4}	77,78	
	2,43 x 10 ^{5,1}	33,33	
	2,43 x 10 ^{4,8}	11,11	
CG x CG	4,50 x 10 ⁶	83,33	10 ^{6,40}
	4,50 x 10 ^{5,7}	44,44	
	4,50 x 10 ^{5,4}	5,56	
	4,50 x 10 ^{5,1}	16,67	
	4,50 x 10 ^{4,8}	0,00	

Dựa vào tỉ lệ chết trong suốt 14 ngày thí nghiệm, kết quả tính LD₅₀ được trình bày trong Bảng 1. Cá trê phi *C. gariepinus* có sức chịu đựng cao nhất đối với vi khuẩn *A. hydrophila* với LD₅₀ cao nhất (10^{6,40} CFU), theo sau là 2 kiểu cá lai ngược xuôi F₁ (CMxCG và CGxCM). Cá trê vàng *C. macrocephalus* có sức chịu đựng kém nhất với LD₅₀ là 10^{5,60} CFU. Kết quả cũng cho thấy LD₅₀ của vi khuẩn *A. hydrophila* trên tất cả cá nhóm cá đều nhỏ hơn 10⁷, do vậy vi khuẩn sử dụng trong thí nghiệm này cũng thuộc nhóm có độc lực (Stevenson, 1988). Giá trị LD₅₀ của *A. hydrophila* trên tất cả các kiểu di truyền cá trê *Clarias* trong thí nghiệm này nằm trong khoảng dao động của giá trị LD₅₀ xác định được trên cá nheo Mỹ là 2,8 x 10⁴–10⁹ CFU (Thune *et al.*, 1986). Tuy nhiên,

những giá trị này thấp hơn các giá trị LD₅₀ đã được báo cáo trên cá trê trắng *Clarias batrachus* là 3,10–5,92 x 10⁷ CFU (Majumdar *et al.* 2006) và cá trê lai CMxCG là 2,08 x 10⁶–1,02 x 10⁷ CFU (Phuong, 2007). Kết quả của thí nghiệm này còn chỉ ra được một điểm quan trọng cho nghề nuôi cá trê là tất cả các nhóm cá trê lai đều có sức chống chịu lại *A. hydrophila* cao hơn hẳn so với loài bản địa là cá trê vàng.

3.2 Sự biến đổi về huyết học

Bảng 2: Tỷ lệ và số lượng tế bào máu của cá trê vàng *C. macrocephalus*, trê phi *C. gariepinus* và con lai ở lô đối chứng sau 14 ngày thí nghiệm

Chỉ tiêu	CMxCG	CGxCM	CMCGxCM	CMCGxCG	CM	CG
RBC*	2,59 ^a	2,52 ^{ab}	2,00 ^c	1,87 ^c	2,63 ^a	2,36 ^b
	± 0,33	± 0,29	± 0,24	± 0,22	± 0,23	± 0,17
LKC**	93,07 ^{ab}	80,85 ^{ab}	73,88 ^{bc}	66,15 ^c	92,47 ^{ab}	95,30 ^a
	± 26,50	± 20,44	± 18,81	± 24,83	± 26,53	± 24,69
LKC (%)	3,60 ^{ab}	3,26 ^b	3,68 ^{ab}	3,48 ^{ab}	3,50 ^{ab}	4,05 ^a
	± 0,97	± 0,96	± 0,74	± 1,04	± 0,89	± 1,02
Lym.**	69,38 ^a	60,27 ^a	55,34 ^{ab}	49,83 ^b	66,90 ^a	69,89 ^a
	± 21,66	± 15,60	± 16,38	± 22,52	± 22,64	± 19,52
Lym. (%)	74,30 ^a	75,13 ^a	74,98 ^a	73,20 ^a	72,03 ^a	73,30 ^a
	± 8,67	± 9,65	± 9,40	± 10,52	± 10,55	± 8,04
Mono**	2,06 ^{ab}	1,75 ^b	1,52 ^b	1,33 ^b	1,96 ^{ab}	2,72 ^a
	± 0,95	± 1,15	± 0,99	± 0,86	± 1,39	± 1,20
Mono (%)	2,31 ^a	2,13 ^a	2,07 ^a	2,16 ^a	2,11 ^a	2,90 ^a
	± 1,15	± 1,18	± 1,24	± 1,39	± 1,33	± 1,23
Neu.**	1,24 ^a	0,95 ^a	1,02 ^a	0,88 ^a	1,07 ^a	1,19 ^a
	± 0,90	± 0,91	± 0,72	± 0,77	± 0,90	± 0,83
Neu. (%)	1,33 ^a	1,02 ^a	1,34 ^a	1,25 ^a	1,12 ^a	1,37 ^a
	± 0,94	± 0,80	± 0,93	± 0,87	± 0,79	± 1,00
Throm.**	20,39 ^{ab}	17,89 ^{ab}	16,01 ^{ab}	14,11 ^b	22,54 ^a	21,50 ^a
	± 9,05	± 9,81	± 7,43	± 4,34	± 10,54	± 9,61
Throm. (%)	22,07 ^a	21,72 ^a	21,61 ^a	23,40 ^a	24,73 ^a	22,43 ^a
	± 7,99	± 8,87	± 9,20	± 10,22	± 10,24	± 7,64

RBC: số lượng hồng cầu; LKC: số lượng bạch cầu; LKC (%): phần trăm LKC trên số lượng RBC; Lym., Lym (%): số lượng và tỉ lệ lympho bào; Mono., Mono (%): số lượng và tỉ lệ bạch cầu đơn nhân; Neu., Neu. (%): số lượng và tỉ lệ bạch cầu trung tính; Throm., Throm. (%): số lượng và tỉ lệ tiểu cầu

* x 10⁶ cells/ μ L; ** x 10³ cells/ μ L

^{a,b} Giá trị trong cùng dòng có các mẫu tự khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa (p<0,05)

Trong suốt 14 ngày thí nghiệm, chỉ có 1 (3,33%) cá trê vàng *C. macrocephalus* chết và không quan sát được triệu chứng nhiễm bệnh do vi khuẩn trên các nhóm cá được tiêm vi khuẩn. Các chỉ tiêu huyết học của nhóm đối chứng và các nhóm tiêm vi khuẩn *A. hydrophila* được trình bày trong Bảng 2 và Bảng 3. Bốn loại bạch cầu được tìm thấy trên các nhóm cá thí nghiệm bao gồm lympho bào, tiểu cầu, bạch cầu đơn nhân, và bạch cầu trung tính, giống với các loại bạch cầu phát hiện được trên cá trê trắng *C. batrachus*, và cá rô phi *Oreochromis aureus* (Chinabut *et al.*, 1991; Silveira-Coffigny *et al.*, 2004).

Kết quả kiểm định T-test cho thấy, có sự thay đổi về các chỉ tiêu huyết học trên cá bị nhiễm khuẩn so với nhóm đối chứng: số lượng hồng cầu suy giảm, tỉ lệ và số lượng bạch cầu, đặc biệt là bạch cầu đơn nhân và bạch cầu trung tính, gia tăng trên tất cả các kiểu di truyền. Tỉ lệ lympho bào có giảm, nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa (p>0,05) so với đối chứng. Trừ trường hợp cá lai CMCGxCM và CMCGxCG, số lượng lympho bào cũng gia tăng trên các kiểu di truyền còn lại. Trong các nhóm cá đối chứng không có sự khác biệt về tỉ lệ bạch cầu tổng cộng, bạch cầu đơn nhân và bạch cầu trung tính (p>0,05) giữa các kiểu di truyền.

Bảng 3: Tỷ lệ và số lượng tế bào máu của cá trê vàng *C. macrocephalus*, trê phi *C. gariepinus* và con lai sau khi tiêm vi khuẩn *A. hydrophila* 14 ngày

Chỉ tiêu	CMxCG	CGxCM	CMCGxCM	CMCGxCG	CM	CG
RBC*	2,33 ^{ab}	2,23 ^{ab}	1,79 ^c	1,69 ^c	2,38 ^a	2,14 ^b
	± 0,22	± 0,34	± 0,22	± 0,19	± 0,20	± 0,19
LKC**	133,23 ^a	120,59 ^a	90,62 ^b	85,75 ^b	119,98 ^a	135,48 ^a
	± 17,62	± 26,49	± 18,09	± 18,58	± 16,80	± 26,51
LKC (%)	5,75 ^{ab}	5,46 ^b	5,10 ^b	5,05 ^b	5,08 ^b	6,34 ^a
	± 0,93	± 1,14	± 1,06	± 0,83	± 0,88	± 1,09
Lym.**	98,33 ^a	87,21 ^a	63,92 ^{b (ns)}	61,40 ^{b (ns)}	84,37 ^a	97,43 ^a
	± 19,99	± 21,91	± 14,11	± 15,47	± 12,52	± 21,84
Lym. (%)	73,26 ^{a (ns)}	72,46 ^{a (ns)}	70,77 ^{a (ns)}	71,48 ^{a (ns)}	70,78 ^{a (ns)}	72,05 ^{a (ns)}
	± 8,00	± 9,51	± 8,28	± 7,08	± 8,30	± 8,45
Mono**	6,03 ^{ab}	5,08 ^{bc}	3,37 ^d	3,24 ^d	4,41 ^{cd}	8,02 ^a
	± 1,87	± 1,77	± 1,61	± 1,66	± 1,86	± 2,14
Mono (%)	4,51 ^b	4,24 ^b	3,72 ^b	3,65 ^b	3,62 ^b	5,94 ^a
	± 1,17	± 1,24	± 1,51	± 1,34	± 1,37	± 1,40
Neu.**	2,85 ^{ab}	2,48 ^{bc}	1,96 ^c	1,85 ^c	2,39 ^{bc}	3,67 ^a
	± 1,17	± 1,19	± 0,97	± 0,99	± 1,19	± 1,58
Neu. (%)	2,16 ^a	2,07 ^a	2,17 ^a	2,12 ^a	2,02 ^a	2,77 ^a
	± 0,84	± 0,90	± 0,98	± 0,97	± 1,01	± 1,29
Throm.**	26,01 ^{ab (ns)}	25,81 ^{ab (ns)}	21,37 ^{ab (ns)}	19,27 ^b	28,81 ^{a (ns)}	26,36 ^{ab (ns)}
	± 8,64	± 11,89	± 9,17	± 6,79	± 11,83	± 13,04
Throm. (%)	20,07 ^{a (ns)}	21,23 ^{a (ns)}	23,34 ^{a (ns)}	22,75 ^{a (ns)}	23,58 ^{a (ns)}	19,23 ^{a (ns)}
	± 8,30	± 8,75	± 8,50	± 7,24	± 7,61	± 8,22

RBC: số lượng hồng cầu; LKC: số lượng bạch cầu; LKC (%): phần trăm LKC trên số lượng RBC; Lym., Lym (%): số lượng và tỉ lệ lympho bào; Mono., Mono (%): số lượng và tỉ lệ bạch cầu đơn nhân; Neu., Neu. (%): số lượng và tỉ lệ bạch cầu trung tính; Throm., Throm. (%): số lượng và tỉ lệ tiểu cầu

* x 10⁶ cells/ μ L; ** x 10³ cells/ μ L

^{a,b} Giá trị trong cùng dòng có các mẫu tự khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa (p<0,05)

^(ns) không khác biệt ý nghĩa so với lô đối chứng

Kiểu biến đổi tương tự cũng đã được ghi nhận trên cá rô phi *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis aureus* và cá trê lai CMxCG sau khi nhiễm khuẩn (Benli và Yildiz, 2004; Silveria-Coffgny, 2004; và Phuong, 2007). Ở cá, hệ thống bạch huyết đóng một vai trò quan trọng trong hệ miễn dịch không đặc hiệu và có cấu thành chủ yếu là bạch cầu trung tính và bạch cầu đơn nhân (Swain *et al.*, 2007). Sự gia tăng về tỉ lệ và số lượng bạch cầu đơn nhân và bạch cầu trung tính trong quá trình nhiễm khuẩn cho thấy hoạt động của hệ bạch huyết gia tăng nhằm tiêu diệt các vi sinh vật hay các vật thể lạ xâm nhập vào cơ thể. Mặt khác, các bạch cầu đơn nhân và bạch cầu trung tính được cho là nguồn tạo ra lysozyme (Murray và Fletcher, 1976) một hoạt chất của hệ miễn dịch không đặc hiệu kháng lại ký sinh trùng và vi khuẩn (Alexander và Ingram, 1992). Vì vậy, sự biến động của bạch cầu đơn nhân và bạch cầu trung tính có thể sử dụng như một chỉ số đánh giá mức độ phản ứng của nhóm cá trê *Clarias* khi bị nhiễm vi khuẩn *A. hydrophila*.

Có sự khác biệt về số lượng bạch cầu tổng cộng, bạch cầu đơn nhân và bạch cầu trung tính giữa các kiểu di truyền cá trê trong khảo sát này. Ở cá lai hậu F₁ (CMCGxCM và CMCGxCG), số lượng bạch cầu tổng cộng trong cả lô đối chứng và lô gây cảm nhiễm thấp hơn có ý nghĩa (p<0,05) so với các chỉ tiêu này trên cá lai F₁ và 2 loài bố mẹ, trong khi không có sự khác biệt về số lượng bạch cầu tổng cộng giữa cá lai F₁ và 2 loài bố mẹ. Số lượng bạch cầu đơn nhân và bạch cầu trung tính của cá lai CMxCG (F₁) nhiễm khuẩn tương đương với cá trê phi và cao hơn hẳn so với cá trê vàng. Tuy nhiên, do số lượng bạch cầu giữa các kiểu di truyền ở các lô đối chứng khác biệt nhau nên việc so sánh trực

tiếp số lượng bạch cầu không cho thấy sự khác biệt về mức độ phản ứng với tác nhân gây bệnh của các nhóm cá thí nghiệm. Một chỉ số tương đối là tỉ lệ gia tăng so với giá trị của nhóm đối chứng có thể cho thấy sự khác biệt về mức độ phản ứng giữa các nhóm cá thí nghiệm như kết quả trong Bảng 4. Kết quả này cho thấy số lượng bạch cầu tổng cộng gia tăng nhiều nhất trên cá lai F₁, theo sau là cá trê Phi. Cá lai hậu F₁ và cá trê vàng ít gia tăng về số lượng bạch cầu hơn so với cá lai F₁.

Bảng 4: Thể tích hồng cầu và nhân hồng cầu; tỉ lệ gia tăng (%) của bạch cầu và từng loại bạch cầu trên cá gây cảm nhiễm so với cá đối chứng

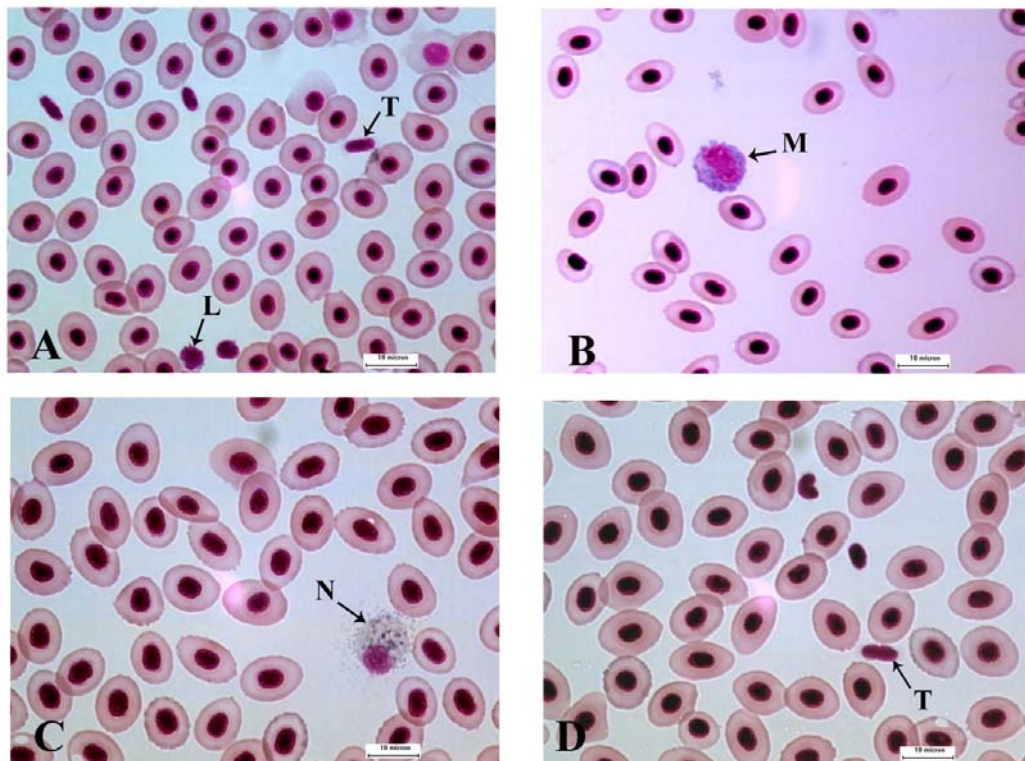
Chỉ tiêu	CMxCG	CGxCM	CMCGxCM	CMCGxCG	CM	CG
Vol.	300,93	316,81	469,09	498,68	273,53	315,24
RBC*						
Nu.	33,25	35,84	51,59	58,21	33,11	34,47
RBC*						
LKC**	43,14	49,15	22,66	29,63	29,75	42,17
Mono**	192,58	190,36	122,26	143,59	124,78	194,89
Neutro**	130,46	162,56	93,29	109,79	123,72	208,10

*Thể tích hồng cầu (Vol. RBC) và nhân hồng cầu (Nu. RBC): được xác định theo Cal et al. (2005)

$$V (\mu\text{m}^3) = 4/3\pi * a * b^2;$$

Trong đó a và b là bán kính lớn và nhỏ của hồng cầu; xác định từ 15 cá ở nhóm đối chứng, 10 hồng cầu được đo trên mỗi cá.

**Tỉ lệ gia tăng (%) = 100 x (giá trị trên đối chứng – giá trị trên nhóm cảm nhiễm)/giá trị trên đối chứng. Mono: bạch cầu đơn nhân, Neutro: bạch cầu trung tính.



Hình 1: Sự khác biệt về kích thước hồng cầu của cá lai CMxCG, cá lai hậu F₁ và cá trê vàng C. macrocephalus

A: Hồng cầu của cá lai CMxCG; B: hồng cầu của cá trê vàng C. macrocephalus; C: hồng cầu của cá lai CMCGxCM; và D: hồng cầu của cá lai CMCGxCG.

(L) Lympho bào; (M) bạch cầu đơn nhân; (N) bạch cầu trung tính; và (T) tiểu cầu. Thước đo: 10 μm

Số lượng hồng cầu của cá lai hậu F₁ thì thấp hơn có ý nghĩa so với cá lai F₁ và 2 loài cá bố mẹ do có sự khác biệt về kích thước như được trình bày trong Bảng 4 và Hình 1. Kết

qua từ Bảng 4 cho thấy thể tích hồng cầu của cá lai CMCGxCM và CMCGxCG tăng 55,88% và 65,71% so với thể tích hồng cầu của cá lai CMxCG; 48,8% và 58,19% so với cá trê Phi; 71,50% và 82,31% khi so với cá trê vàng. Sự gia tăng thể tích này tương tự với trường hợp hồng cầu của cá bơn, cá chêm và cá chạch tam bội (Cal *et al.*, 2005; Peruzzi *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2007). Như vậy cá trê lai hậu F₁ trong nghiên cứu này có khả năng là cá tam bội. Đã có nhiều trường hợp tam bội thể hình thành khi cho con lai F₁ lai trở lại với loài cá bố mẹ như trường hợp con lai giữa cá diếc x cá chép (Ojima *et al.*, 1975, trích dẫn bởi Gomelsky 2003), và con lai giữa cá hồi Đại Tây Dương x cá hồi nâu (Galbreath và Thorgaard, 1995; Garcia-Vazquez *et al.*, 2003).

Như vậy căn cứ vào các chỉ tiêu LD₅₀, tỉ lệ bạch cầu tổng cộng và tỉ lệ bạch cầu thực bào (bạch cầu đơn nhân và bạch cầu trung tính), cá trê phi *C. gariepinus* thể hiện sức đề kháng cao nhất với *A. hydrophila*, theo sau là cá lai CMxCG (F₁). Mặc dù sự khác biệt về tỉ lệ bạch cầu và tỉ lệ bạch cầu thực bào không có ý nghĩa (p>0,05) giữa cá lai CGxCM, cá lai hậu F₁ và cá trê vàng, trên cơ sở các giá trị trung bình sức đề kháng với *A. hydrophila* của các nhóm cá có thể sắp xếp theo thứ tự giảm dần như sau: CG>CMxCG và CGxCM> CMCGxCM và CMCGxCG>CM. Kết quả này tương tự với trường hợp con lai cá nheo Mỹ x cá nheo xanh khi gây cảm nhiễm với *E. ictaluri*, con lai ngược xuôi F₁ thể hiện sức đề kháng bệnh (tỉ lệ sống và lượng kháng thể) trung gian giữa 2 loài bố mẹ (Bosworth *et al.*, 1998). Tuy nhiên, con lai giữa cá rô phi vàng x rô phi xanh có sức đề kháng (xét về LD₅₀, tổng số hồng cầu thụ cảm C3b, và tỉ lệ bạch cầu thực bào) cao hơn 2 loài bố mẹ khi gây cảm nhiễm với *A. sobria* (Cai *et al.*, 2004).

CẢM ƠN

Xin chân thành cảm ơn Bộ Khoa học Công nghệ và Phát minh - Malaysia đã tài trợ kinh phí thực hiện nghiên cứu trong khuôn khổ của Dự án IRPA (Đề tài 01-02-12-0063-EA-10701). Cảm ơn Bộ Giáo dục và Đào tạo - Việt nam cũng đã hỗ trợ kinh phí thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alexander I.B. and G.A. Ingram, 1992. Non-cellular non-specific defense mechanisms in fish. Annual Review of Fish Diseases, 2: 249-279.
- Anderson, D.P., 1992. Immunostimulants, adjuvants and vaccine carrier in fish: application to aquaculture. Annual Review of Fish Disease, 2: 281-307
- Angka, S.L., T.J. Lam, and Y.M. Sin, 1995. Some virulence characteristics of *Aeromonas hydrophila* in walking catfish (*Clarias gariepinus*). Aquaculture, 130: 103-112
- Areerat, S., 1987. *Clarias* culture in Thailand. Aquaculture, 63: 355-362.
- Benli, A.C.K. and H.Y. Yildiz, 2004. Blood parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) spontaneously infected with *Edwardsiella tarda*. Short communication. Aquaculture Research, 35: 1388-1390
- Bosworth, B.G., W.R. Wolters, D.J. Wise and M.H. Li, 1998. Growth, feed conversion, fillet proximate composition and resistance to *Edwardsiella ictaluri* of channel cat fish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), blue cat fish, *Ictalurus furcatus* (Lesueur), and their reciprocal F₁ hybrids fed 25% and 45% protein diets. Aquaculture Research, 29: 251-257
- Cai, W., S. Li., and J. Ma, 2004. Diseases resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), blue tilapia (*Oreochromis aureus*) and their hybrid (female Nile tilapia x male blue tilapia) to *Aeromonas sobria*. Aquaculture, 229: 79-87
- Cal, R.M., S. Vidal, T. Camacho, F. Piñerres and F.J. Guitián, 2005. Effect of triploidy on turbot haematology. Comp. Biochem. Physiol. Part A, 141: 35-41
- Chinabut, S., C. Limsuwan and P. Kitsawat, 1991. Histology of the walking catfish *Clarias batrachus*. AAHRI, Bangkok, Thailand. 96 p.

- Dorson M., B. Chevassus and C. Torhy, 1991. Comparative susceptibility of three species of char and rainbow trout x char triploid hybrids to several pathogenic salmon viruses. *J. Dis. Aquat. Org.*, 11: 217-224
- Ellis, A.E., 1986. The function of teleost fish lymphocytes in relation to inflammation. *Int. Tissue React.*, 8: 263-270.
- Galbreath, P.F. and G.H. Thorgaard, 1995. Sexual maturation and fertility of diploid and triploid Atlantic salmon x brown trout hybrids. *Aquaculture*, 137: 299-311
- Gao, Z., W. Wang, K. Abbas, X. Zhou, Y. Yang, J.S. Diana, H. Wang, H. Wang, Y. Li and Y. Sun, 2007. Haematological characterization of loach *Misgurnus anguillicaudatus*: Comparison among diploid, triploid and tetraploid specimens. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* (in press), doi:10.1016/j.cbpa.2007.03.006
- García-Vázquez, E., F. Ayllon, J.L. Martínez, J. Pérez and E. Beall, 2003. Reproduction of interspecific hybrids of Atlantic salmon and brown trout in a stream environment. *Freshwater Biol.*, 48: 1100-1104
- Gomelsky, B., 2003. Chromosome set manipulation and sex control in common carp: a review. *Aquat. Living Resour.*, 16: 408-415
- Hrubec, T.C., J.L. Cardinale, and S.A. Smith, 2000. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis Hybrid*). *Vet. Clin. Pathol.*, 29(1): 7-12.
- Majumdar, T., S. Ghosh, J. Pal, and S. Mazumder, 2006. Possible role of a plasmid in the pathogenesis of a fish disease caused by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 256: 95-104
- Murray, C.K. and T.C. Fletcher. 1976. The immunohistochemical localization of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) tissues. *Journal of Fish Biology*, 9: 329-334
- Pal J. and K. Pradhan, 1990. Bacterial involvement in ulcerative condition of air breathing fish from India. *J. Fish Biol.*, 36: 833-836.
- Peruzzi, S., S. Varsamos, B. Chatain, C. Fauvel, B. Menu, J.C. Falguière, A. Sévère, and C. Flik, 2005. Haematological and physiological characteristics of diploid and triploid sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture*, 244: 359-367
- Phuong, D.N., 2007. Non-specific immune responses towards ascorbic acid supplementation in hybrid cat fish (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*) feed. Master Thesis, University Malaysia Terengganu, Malaysia
- Reed, L.J. and H.A. Muench, 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. *American J. Hygiene.*, 27: 493-497.
- Silveira-Coffigny, R., A. Prieto-Trujillo, and F. Ascencio-Valle, 2004. Effects of different stressors in haematological variables in cultured *Oreochromis aureus* S., *Comp. Biochem. Physiol., Part C*, 139: 245-250
- Stevenson, R.M.W. 1988. Vaccination against *Aeromonas hydrophila*. In *Fish vaccination*, ed. A.E. Ellis, pp 112-123. Harcourt Brace Jovanovich Publishers, England: Academic Press
- Swain, P., S. Dash, P.K. Sahoo, P. Routray, S.K. Sahoo, S.D. Gupta, P.K. Meher and N. Sarangi, 2007. Non-specific immune parameters of brood Indian major carp *Labeo rohita* and their seasonal variations. *Fish & Shellfish Immunology*, 22: 38-43
- Thune, R.L., M.C. Johnson, T.E. Graham, and R.L. Amborski, 1986. *Aeromonas hydrophila* B-haemolysin: purification and examination of its role in virulence in O-group channel cat fish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish Disease*, 9: 55-61
- Wolters, W.R., D.J. Wise, and P.H. Klesius, 1996. Survival and antibody response of channel cat fish, blue cat fish, and channel cat fish female x blue cat fish male hybrids after exposure to *Edwardsiella ictaluri*. *J. Aquatic Animal Health*, 8 (3): 249-254